

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA**

**AVALIAÇÃO DIAGNÓSTICA DOS MÉTODOS ELISA E
QUIMILUMINESCÊNCIA COMO TESTES DE TRIAGEM ALTERNATIVOS
À MUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA PARA A DETECÇÃO DE
ANTICORPOS ANTINUCLEARES**

**Belo Horizonte
2012**

FABIANO DE ALMEIDA BRITO

**AVALIAÇÃO DIAGNÓSTICA DOS MÉTODOS ELISA E
QUIMILUMINESCÊNCIA COMO TESTES DE TRIAGEM ALTERNATIVOS À
IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA PARA A DETECÇÃO DE
ANTICORPOS ANTINUCLEARES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Patologia - Área de Concentração Propedêutica Complementar - da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Patologia.

ORIENTADORA: Profa. Suzane Pretti F. Neves

CO-ORIENTADORA: Profa. Silvana Maria Elói Santos

Universidade Federal de Minas Gerais

Faculdade de Medicina

Belo Horizonte

2012

Brito, Fabiano de Almeida.
B862a Avaliação do desempenho diagnóstico dos métodos elisa e quimiluminiscência como testes de triagem alternativos à imunofluorescência indireta para a detecção de anticorpos anti-nucleares [manuscrito]. / Fabiano de Almeida Brito. - - Belo Horizonte: 2012.
138f.: il.
Orientadora: Suzane Pretti Figueiredo Neves.
Co-Orientadora: Silvana Maria Elói Santos.
Área de concentração: Patologia.
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.
1. Doenças Reumáticas. 2. Anticorpos Antinucleares. 3. Imunofluorescência. 4. Ensaio de Imunoabsorção Enzimática. Dissertações Acadêmicas. I. Neves, Suzane Pretti Figueiredo. II. Santos, Silvana Maria Elói. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.

NLM: WE 195



FACULDADE DE MEDICINA
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO

Av. Prof. Alfredo Balena 190/sala 533
Belo Horizonte – MG - CEP 30.130-100
Fone: (031) 3409.9641 FAX: (31) 3409.9640
epg@medicina.ufmg.br



DECLARAÇÃO

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, composta pelos professores doutores: Suzane Pretti Figueiredo Neves, Silvana Maria Elói Santos, Gifone Aguiar Rocha e Luís Eduardo Coelho Andrade, aprovou a defesa da dissertação intitulada: **“AVALIAÇÃO DIAGNÓSTICA DOS MÉTODOS ELISA E QUIMILUMINESCÊNCIA COMO TESTES DE TRIAGEM ALTERNATIVOS À IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA PARA A DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTINUCLEARES”**, apresentada pelo mestrando : **FABIANO DE ALMEIDA BRITO**, para obtenção do título de Mestre em Patologia, pelo Programa de Pós-Graduação em Patologia - Área de Concentração em Propedêutica Complementar, da Universidade Federal de Minas Gerais, realizada em 29 de fevereiro de 2012.

Profa. Suzane Pretti Figueiredo Neves
Orientadora

Profa. Silvana Maria Elói Santos
Coorientadora

Prof. Gifone Aguiar Rocha

Prof. Luís Eduardo Coelho Andrade



FACULDADE DE MEDICINA
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO

Av. Prof. Alfredo Daltro 190 / sala 533
Belo Horizonte - MG - CEP 30130-100
Fone: (031) 3429-9641 FAX: (31) 3429-9640
cpo@medicina.ufmg.br



ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE Mestrado de **FABIANO DE ALMEIDA BRITO**, nº de registro 2010652376. Às dez horas do dia **29 de fevereiro de dois mil e doze**, reuniu-se na Faculdade de Medicina da UFMG, a Comissão Examinadora de defesa de dissertação, indicada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Patologia da UFMG, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado: **"AVALIAÇÃO DIAGNÓSTICA DOS MÉTODOS ELISA E QUILUMINESCÊNCIA COMO TESTES DE TRIAGEM ALTERNATIVOS À IMUNOFLORESCÊNCIA INDIRETA PARA A DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTINUCLEARES"**, requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Patologia, pelo Programa de Pós-Graduação em Patologia da UFMG - Área de Concentração em Propeidática Complementar. Abriando a sessão, a Presidente da Comissão, Profa. Suzane Pretti Figueiredo Neves, após dar a conhecer aos presentes o teor das normas regulamentares do trabalho final passou a palavra ao candidato para apresentação do seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores com a respectiva defesa do candidato. Logo após, a Comissão se reuniu sem a presença do candidato e do público para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Profa. Suzane Pretti Figueiredo Neves/Orientadora	Instituição: UFMG	Indicação: <u>Aprovada</u>
Profa. Silvana Maria Elói Santos/Cocrienciadora	Instituição: UFMG	Indicação: <u>Aprovada</u>
Prof. Gifone Aguiar Rocha	Instituição: UFMG	Indicação: <u>Aprovado</u>
Prof. Luís Eduardo Coelho Andrade	Instituição: UNIFESP	Indicação: <u>Aprovada</u>

Pelas indicações, o candidato foi considerado Aprovado.

O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 29 de fevereiro de 2012.

Profa. Suzane Pretti Figueiredo Neves Suzane Pretti Figueiredo Neves

Profa. Silvana Maria Elói Santos Silvana Maria Elói Santos

Prof. Gifone Aguiar Rocha Gifone Aguiar Rocha

Prof. Luís Eduardo Coelho Andrade Luís Eduardo Coelho Andrade

Prof. Wagner Luiz Tafuri (Coordenador) Wagner Luiz Tafuri

Obs.: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador.

Prof. Wagner Luiz Tafuri
Coordenador de Programa de Pós-Graduação em Patologia - Faculdade de Medicina/UFMG


CONFERE COM ORIGINAL
Centro de Pós-Graduação
Faculdade de Medicina - UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Reitor: Prof. Clélio Campolina Diniz

Vice-Reitora: Profa. Rocksane de Carvalho Norton

Pró-Reitor de Pós-Graduação: Prof. Ricardo Santiago Gomez

Pró-Reitor de Pesquisa: Prof. Renato Lima Santos

FACULDADE DE MEDICINA

Diretor: Prof. Francisco José Penna

Vice-Diretor: Prof. Tarcizo Afonso Nunes

Coordenador do Centro de Pós-Graduação: Prof. Manoel Otávio da Costa Rocha

Subcoordenadora do Centro de Pós-Graduação: Profa. Teresa Cristina de Abreu Ferrari

Chefe do Departamento de Anatomia Patológica e Medicina Legal: Profa. Helenice Gobbi

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Patologia: Prof. Wagner Luiz Tafuri

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE-ÁREA DE CONCENTRAÇÃO PATOLOGIA

Subcoordenador: Prof. Geovanni Dantas Cassali

Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Patologia

Prof. Wagner Luiz Tafuri

Prof. Geovanni Dantas Cassali

Profa. Rosa Maria Esteves Arantes

Profa. Silvana Maria Elói Santos

Profa. Helenice Gobbi

Prof. Marcelo Vidigal Caliar

Izabela Ferreira Gontijo de Amorim – Representante Discente Titular

Aldair Junio Woyames Pinto – Representante Discente Suplente

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais

A Priscila

Ao Laboratório Hermes Pardini, em especial a Assessoria Científica, o *Core Lab*, e ao Dr. Guenael Freire, a Dra. Darlene Carvalho, ao Dr. Guilherme Collares, a Cristina Pessoa, a Janaína Gradisse, a Lara Costa e a Grecilane Tomaz.

À Coleta Ambulatorial do Laboratório Central do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais, em especial ao José Oswaldo de Oliveira, a Tânia Ferrari e ao Manoel.

Ao setor de Sorologia e Hormônios do Laboratório Central do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

Ao Serviço de Reumatologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais, em especial ao Prof. Marco Antônio Parreiras de Carvalho, a Profa. Cristina Costa Duarte Lanna, a Neusa Beata e Vânia Branco.

Ao Serviço de Reumatologia da Santa Casa de Belo Horizonte, em especial ao Dr. Paulo Madureira de Pádua.

Ao Centro de Pesquisas René Rachou, em especial ao Prof. Olindo Assis Filho, a Maísa de Oliveira Santos, e ao Márcio Sobreira.

A minha orientadora Profa. Suzane Pretti Figueiredo Neves.

A minha co-orientadora Profa. Silvana Maria Elói Santos.

A minha colaboradora Professora Gilda Aparecida Ferreira.

Ao Dr. William Pedrosa.

Ao Dr. Roberto Santoro Meirelles.

A Luciane Xavier.

Aos acadêmicos Tiago Lemos Cerqueira e Gabriela Correa Reis Oliveira.

Ao Laboratório Carlos Chagas, de Governador Valadares, Minas Gerais.

Às empresas DiaSorin, Human Diagnostics, Inova Diagnostics, Orgentec Diagnostics, Alka Diagnóstica, In Vitro Diagnóstica, Beckman Coulter, Hemagen do Brasil, Greiner Bio One.

A todos os pacientes e voluntários.

RESUMO

A detecção de anticorpos antinucleares (FAN) desempenha um papel importante no diagnóstico das doenças reumáticas autoimunes (DRAI). Diferentes métodos como imunofluorescência indireta em células HEp-2 (IFI HEp-2), ELISA e quimiluminescência podem ser utilizados para a pesquisa do FAN, embora a IFI HEp-2 seja considerada a técnica padrão ouro. O presente estudo tem como objetivo comparar o desempenho diagnóstico da IFI HEp-2 com o de três kits ELISA e um kit de quimiluminescência, com princípios e composição antigênica diferentes, considerando-se a clínica como padrão de acurácia diagnóstica. Foram avaliados 143 pacientes com diagnóstico de DRAI estabelecida (grupo 1), 166 pacientes portadores de doenças infecciosas e outras doenças reumáticas (grupo 2), 89 indivíduos com suspeita não confirmada de DRAI (grupo 3) e 134 indivíduos saudáveis (grupo 4). A sensibilidade dos testes, determinada no grupo 1, foi de 87,4% para a IFI, e de 62,9% a 90,0% para os demais kits. A especificidade dos testes, determinada no grupo 2, foi de 72,3% para a IFI, e de 45,2% a 90,4% para os demais kits. A concordância dos testes com a IFI variou de regular a moderada. As áreas sob a curva ROC dos testes não foram significativamente diferentes da IFI. A frequência de resultados positivos da IFI HEp-2 no grupo 4 foi de 13,5%, comparada a frequências de 6,0% a 36,0% para os outros testes, sendo a diluição de 1:160 definida como o "título anormal". No grupo 3, a sensibilidade e a especificidade da IFI foi de 92,0% e 57,8%, enquanto a dos demais testes variou entre 76,0% e 100% e 26,6% e 89,1%, respectivamente. Alguns kits ELISA apresentam sensibilidade diagnóstica comparável ou superior à IFI HEp-2, podendo ser utilizados como métodos alternativos para a triagem do FAN. Amostras positivas devem ser submetidas à IFI para confirmação do resultado e determinação do título e do padrão de fluorescência. Devido a diferenças de sensibilidade entre os kits, é fundamental que uma validação clínica cuidadosa seja realizada antes da sua introdução na rotina diagnóstica.

PALAVRAS-CHAVE: DOENÇA REUMÁTICA AUTOIMUNE, ANTICORPOS ANTINUCLEARES, IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA HEp-2, ELISA, ACURÁCIA DIAGNÓSTICA, VALIDAÇÃO

ABSTRACT

Detection of antinuclear antibodies (ANA) plays an important role in the diagnosis of autoimmune rheumatic diseases(ARD). Different methods such as indirect immunofluorescence on HEp-2 cells (HEp-2 IIF), ELISA and chemiluminescence can be used for ANA testing, although HEp-2 IIF is considered the gold standard. The goal of this study was to evaluate the diagnostic accuracy of three commercially available ELISA kits and one chemiluminescent kit for ANA detection, with different principles and antigenic composition, and to verify the possibility of using them as an alternative to the IIF method, considering the clinical diagnostic accuracy as the standard. We evaluated 143 patients with established diagnosis of ARD (group 1), 166 patients with infectious diseases and other rheumatic diseases (group 2), 89 patients with suspicion of ARD (group 3) and 134 healthy subjects (group 4). The sensitivity of the tests, given in group 1 was 87.4% for IIF and 62.9% to 90.0% for the other kits. The specificity of the tests, given in group 2, was 72.3% for IIF and 45.2% to 90.4% for other kits. The agreement with the IIF test ranged from regular to moderate. Areas under the ROC curve of the tests were not significantly different from the IIF. The frequency of positive results of IIF HEp-2 in group 4 was 13.5%, compared with frequencies of 6.0% to 36.0% for the other tests, and a 1:160 dilution was defined as "abnormal title". In group 3, the sensitivity and specificity of IIF was 92.0% and 57.8%, while the other tests ranged between 76.0% and 100% and 26.6% and 89.1%, respectively. Some ELISA kits have comparable or superior diagnostic sensitivity to HEp-2 IIF and could be used as an alternative method for ANA screening. Positive samples should be submitted to IIF for confirmation of results, determination of the title and the fluorescence pattern. Due to differences in sensitivity between the kits, it is essential that a careful clinical validation is performed prior to their introduction into the diagnostic routine.

KEY WORDS:AUTOIMMUNE RHEUMATIC DISEASE, ANTINUCLEAR ANTIBODIES, HEP-2 IMMUNOFLUORESCENCE, ELISA, DIAGNOSTIC ACCURACY, VALIDATION

LISTA DE QUADROS, TABELAS E FIGURAS

Quadro 1	20
Quadro 2	40
Quadro 3	41
Quadro 4	45
Quadro 5	46
Quadro 6	70
Tabela 1	48
Tabela 2	50
Tabela 3	54
Tabela 4	55
Tabela 5	61
Tabela 6	62
Tabela 7	62
Tabela 8	63
Tabela 9	65
Tabela 10	65
Tabela 11	67
Tabela 12	67
Tabela 13	68
Tabela 14	69
Tabela 15	72
Tabela 16	73
Figura 1	49
Figura 2	51
Figura 3	51
Figura 4	52
Figura 5	52
Figura 6	53
Figura 7	56

Figura 8	57
Figura 9	58
Figura 10	59
Figura 11	60
Figura 12	64
Figura 13	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACR: *American College of Rheumatology* – Colégio Americano de Reumatologia

AF/CDC: *Arthritis Foundation – Centers for Disease Control*

AIDS: *Acquired immunodeficiency syndrome*- Síndrome da imunodeficiência adquirida

ANA: *Antinuclear antibodies*

Anti-P: Anti-ribossomal P

AR: Artrite reumatóide

ARD: *Autoimmune rheumatic diseases*

AUC: *Area Under the Curve* - Área sob a curva

CENP: Centrômero

CLSI: *Clinical and Laboratory Standards Institute*

DITC: Doença indiferenciada do tecido conjuntivo

DM/PM: Dermatomiosite/Polimiosite

DMTC: Doença mista do tecido conjuntivo

DNA: *Deoxyribonucleic acid* – Ácido desoxirribonucleico

DO: Densidade ótica

DRAI: Doença reumática autoimune

dsDNA: *double stranded DNA* - DNA de fita dupla

EA: Espondiloartrite

ENA: *Extractable Nuclear Antigens* – Antígenos nucleares extraíveis

ES: Esclerose sistêmica

EUA: Estados Unidos da América

FAN: Fator antinúcleo

FIBRO: Fibromialgia

FN: Falso negativo

FP: Falso positivo

HC-UFGM: Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais

HCV: *Hepatitis C Virus* - Vírus da hepatite C

HIV: *Human immunodeficiency virus* - Vírus da imunodeficiência humana

HRP: *Horseradishperoxidase* - Peroxidase de rábano

IC95%: Intervalo de confiança de 95%

IFI: Imunofluorescência indireta

IgA: Imunoglobulina A

IgG: Imunoglobulina G

IgM: Imunoglobulina M

IhIDRD: Imunodifusão radial dupla *in house*

IIF: *Indirect immunofluorescence*

IMS: Imunossupressor

INFEC: Infecções

LES: Lúpus eritematoso sistêmico

NA: Não se aplica

NPF: Nuclear pontilhado fino

NPFD: Nuclear pontilhado fino denso

PBS: *Phosphate buffered saline*; Solução salina fosfatada

PCNA: *Proliferating Cell Nuclear Antigen*

PDC: *Pyruvate dehydrogenase complex* – Complexo piruvato desidrogenase

PPT: Probabilidade pós-teste

RI: Resultado indeterminado

ROC: *Receiver Operating Characteristic*

RV-: Razão de verossimilhança negativa

RV+: Razão de verossimilhança positiva

SLEDAI 2K: *Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index 2000*

SRP: Signal recognition particle

SS: Síndrome de Sjögren

ssDNA: *single stranded DNA* - DNA de fita simples

STARD: *STatement for Reporting studies of Diagnostic accuracy*

T/C: Título/Concentração

TMB: Tetrametilbenzidina

VASC: Vasculite

VN: Verdadeiro negativo

VP: Verdadeiro positivo

VPN: Valor predictivo negativo

VPP: Valor predictivo positivo

VS: *versus*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1 Histórico	17
2.2 Acurácia diagnóstica	20
2.3 FAN HEp-2 na prática clínica: desempenho, vantagens e desvantagens	22
2.4 Métodos alternativos para a detecção do FAN	24
3 OBJETIVOS	32
3.1 Objetivo geral	32
3.2 Objetivos específicos	32
4 CASUÍSTICA E MÉTODOS	34
4.1 Sujeitos	34
4.2 Critérios de inclusão	34
4.3 Critérios de exclusão:	35
4.4 Métodos	35
4.4.1 Coleta, processamento e armazenamento das amostras:	35
4.4.2 Imunofluorescência indireta em células HEp-2	36
4.4.3 ELISA e quimiluminescência	36
4.4.4 Soros de referência	41
4.4.5 Determinação da atividade da doença em pacientes com LES	42
4.4.6 Determinação do título anormal do FAN e da diluição de triagem da IFI	43
4.5 Análise estatística	43
4.5.1 Cálculo amostral	43
4.5.2 Análise dos dados	44

5 RESULTADOS	47
5.1 Sensibilidade e especificidade dos testes nos grupos 1, 2 e 4	50
5.2 Sensibilidade dos testes nos pacientes com LES de acordo com a atividade da doença	61
5.3 Estudo da concordância	61
5.4 Análise dos resultados discrepantes entre a IFI HEp-2 e os outros testes	62
5.5 Estudo da acurácia dos testes pela análise por curva ROC e determinação de valores de corte ótimos	63
5.6 Estabelecimento de intervalos de resultados de acordo com diferentes razões de verossimilhança	66
5.7 Frequência de resultados positivos no grupo 4	66
5.8 Determinação do título anormal do FAN	68
5.9 Avaliação do painel de soros de referência do CDC	69
5.10 Sensibilidade, especificidade e valores preditivos dos testes no grupo 3	70
6 DISCUSSÃO	74
7 CONCLUSÕES	98
8 REFERÊNCIAS BIBLOGRÁFICAS	99
9 ANEXO	108
Anexo I - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido/Doença reumática	109
Anexo II - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido/Saudável	112
Anexo III - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido/Doença infecciosa	115
Anexo IV - Questionário Grupo 1	118
Anexo V - Questionário Grupo 2 - Pessoa com doença reumática	122
Anexo VI - Questionário Grupo 2 - Pessoa com doença infecciosa	125
Anexo VII - Questionário Grupo 3	127
Anexo VIII - Questionário Grupo 4	132
Anexo IX - Lista de verificação STARD	136

1 INTRODUÇÃO

Uma das características das doenças reumáticas autoimunes sistêmicas (DRAIs) é a produção de autoanticorpos dirigidos contra vários antígenos celulares, incluindo numerosas enzimas, algumas ribonucleoproteínas e DNA. Autoanticorpos são frequentemente detectados no soro de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (LES), síndrome de Sjögren (SS), esclerose sistêmica (ES), dermatomiosite/polimiosite (DM/PM) e doença mista do tecido conjuntivo (DMTC)^{1,2,3,4}.

LES, SS, ES, DM/PM e DMTC, também denominadas de doenças do tecido conjuntivo, são um grupo de doenças raras, mas com grande morbidade e mortalidade quando não diagnosticadas precocemente e/ou quando não adequadamente tratadas^{5,6}. Acometem predominantemente mulheres e podem ocorrer em qualquer faixa etária, mas são mais freqüentes em adultos jovens^{5,6}. Possuem um amplo espectro de manifestações clínicas, incluindo sintomas mucocutâneos, músculo-esqueléticos (artralgia/artrite/mialgia/miosite) e alterações renais, gastrointestinais, respiratórias e do sistema nervoso central. Sua incidência e prevalência variam em diferentes grupos étnicos e raciais. Apesar da grande variabilidade na literatura quanto à incidência e a prevalência dessas doenças, as estimativas apontam a SS como a mais comum, acometendo de 0,5% a 3% da população⁵. A prevalência do LES pode variar entre 15 a 50 casos por 100.000 habitantes e, dependendo do critério de classificação utilizado, a prevalência da ES varia de 13 a 2280 casos por milhão de habitantes⁵. A DM/PM e DMTC são consideradas doenças muito raras, com prevalências de 5 a 3,8 casos por 100.000 habitantes, respectivamente^{6,7}.

Quando há uma relação bem estabelecida entre a expressão de determinados autoanticorpos e a presença de uma DRAI específica, eles podem ser utilizados como marcadores diagnósticos^{1,2,3,4}. Os autoanticorpos também podem estar associados com alguns aspectos particulares das DRAIs, como a atividade da doença, o risco de acometimento de um órgão alvo em especial ou o prognóstico, sendo considerados, nessas situações, como marcadores de atividade da doença, de subtipos de doença ou prognósticos^{1,2,3,4}.

Na Medicina Laboratorial, alguns destes autoanticorpos são pesquisados pelo teste do FAN. O teste, também conhecido historicamente pelo nome de fator anti-nuclear, permite a detecção, em amostras de soro, de anticorpos contra componentes do núcleo celular. Entretanto, embora a denominação histórica persista, é sabido que anticorpos reagentes contra componentes do nucléolo, citoplasma e aparelho mitótico também podem ser detectados no exame⁹.

Na maioria dos laboratórios clínicos, a pesquisa do FAN é feita pela técnica de imunofluorescência indireta (IFI) utilizando como substrato células HEp-2 . Em alguns poucos, pelo método de ELISA. Entretanto, nenhum dos métodos define a especificidade do autoanticorpo. Neste caso, a identificação dependerá de testes específicos utilizando antígenos celulares purificados, sintéticos ou recombinantes como o *immunoblot*, hemaglutinação, imunodifusão dupla de Outchterlony ou ELISA^{1,10}.

A despeito das DRAIs serem incomuns na população, o FAN é um dos testes laboratoriais mais solicitados na avaliação de pacientes com sintomas sugestivos de doença de tecido conjuntivo^{11,12,13}. A explicação para esse fenômeno é que dor musculoesquelética difusa e fadiga, na ausência de edema articular ou de outras manifestações sugestivas de DRAI, são as principais indicações clínicas associadas com a requisição do exame de FAN. Entretanto, esses sintomas são altamente prevalentes na população geral e são inespecíficos para o diagnóstico das DRAIs^{11,12,13}.

No decorrer dos anos uma redução progressiva no tempo decorrido entre o início dos sintomas e o diagnóstico do LES foi observada, a qual resultou em um impacto importante na melhora da sobrevida e da qualidade de vida dos pacientes. Um dos fatores responsáveis por essa mudança foi a introdução do FAN na prática clínica como marcador diagnóstico das DRAIs¹⁴.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Histórico

A descoberta das células LE por Hargraves e colaboradores, em 1948, possibilitou o surgimento do primeiro exame laboratorial capaz de detectar, embora indiretamente a presença de autoanticorpos antinucleares circulantes¹⁵. O fenômeno LE nada mais é do que a presença de material nuclear fagocitado no interior de leucócitos polimorfonucleares. Os núcleos de células com cromatina estruturalmente alterada como resultado da presença de altos títulos de anticorpos anti-histona H1, são reconhecidos e englobados por leucócitos polimorfonucleares^{16,17,18}. Caracteristicamente, a fagocitose completa do material nuclear resulta em um deslocamento do núcleo do fagócito para a periferia celular, produzindo a morfologia típica da célula LE. Estas são observadas em aproximadamente 50,0% a 70,0% dos casos de LES, sendo raramente descritas em outras doenças autoimunes¹⁹. Devido à alta especificidade diagnóstica, a pesquisa de células LE foi incorporada como um dos critérios diagnósticos do LES e, durante muitos anos, foi um ensaio laboratorial extremamente importante na avaliação desses pacientes¹⁹. Contudo, sua pesquisa apresentava uma série de limitações técnicas: era um exame trabalhoso, de difícil padronização e interpretação, com baixa reprodutibilidade. Outra limitação do teste era a baixa sensibilidade diagnóstica, visto que em uma proporção significativa de pacientes com sinais e sintomas sugestivos de LES a pesquisa era persistentemente negativa^{1,3}.

Com a demonstração de que o fenômeno LE era o resultado da presença de anticorpos dirigidos contra componentes do núcleo celular, na segunda metade da década de 1950, a IFI, utilizando como substrato cortes de tecido de roedores ou *in print* de fígado de rato, passou a ser empregada para a pesquisa do FAN²⁰. Como esta técnica era capaz de detectar no soro uma grande variedade de autoanticorpos, sua introdução como método diagnóstico resultou em um teste mais sensível para o

diagnóstico do LES do que a pesquisa de células LE, sendo então possível detectar a presença do FAN em até mais de 90% dos pacientes^{21,22}. Todavia, o aumento da sensibilidade da IFI foi acompanhado por uma redução da especificidade diagnóstica, pois resultados positivos passaram a ser encontrados em pacientes com outras doenças autoimunes, como artrite reumatóide (AR), SS e ES, até mesmo em 2% a 4% dos indivíduos saudáveis, fato que praticamente não ocorria com as células LE^{1,3,4}. Ainda assim, um resultado positivo de FAN pela IFI possuía um maior valor preditivo positivo para LES do que para outras doenças¹. Juntamente com as células LE, a presença do FAN pela IFI também passou a ser um dos critérios de classificação do LES estabelecidos pelo *American College of Rheumatology (ACR)*²². Além de detectar a presença do FAN, a IFI fornece uma razoável indicação da especificidade do autoanticorpo detectado e da concentração do mesmo. Essa informação é obtida por meio do padrão de fluorescência, o qual reflete a distribuição topográfica dos antígenos reconhecidos pelos autoanticorpos em determinado soro e da diluição seriada (titulação) do soro testado^{1,3,4}. Por exemplo, o padrão nuclear homogêneo representa a distribuição da cromatina no núcleo e, portanto, tende a ser ocasionado por anticorpos contra o DNA de dupla fita (*double-stranded DNA* ou dsDNA), nucleossomos ou histonas^{1,3,4}. Clinicamente, anticorpos anti-dsDNA e antinucleossomos são considerados marcadores de LES^{23,24,25}. Por se tratar de um exame destinado à triagem de autoanticorpos, a identificação dos padrões de IFI tem como objetivo direcionar o clínico na solicitação de testes específicos que identificam o antígeno-alvo reconhecido por um determinado autoanticorpo^{3,8}. Para esse fim, os testes tradicionalmente utilizados que permitem a identificação de autoanticorpos em doenças reumáticas autoimunes são a imunodifusão dupla de *Outcherlony*, o ELISA, ou a hemaglutinação, para identificação de diversos antígenos nucleares (SS-A/Ro, SS-B/La, Sm, U1-RNP, Jo-1, Scl-70, PM/Scl, nucleossomo), e a imunofluorescência indireta com substratos específicos, como *Crithidia luciliae*, para detecção de anticorpos anti-dsDNA^{1,3,4,10}.

A partir da década de 1990, os substratos de origem animal foram praticamente substituídos por células tumorais humanas, particularmente pelas células HEp-2. Estas células são originárias de carcinoma laríngeo humano que crescem em monocamadas

sobre lâminas de vidro^{1,3,4}. As vantagens do uso de células HEp-2 são:possuir antígenos humanos não encontrados em tecidos de animais; maior concentração de antígenos; apresentar todas as fases de divisão celular, interfase/prófase, metáfase, anáfase e telófase, cada uma delas sendo a expressão fenotípica da atuação de uma série de genes, que codificam uma miríade de proteínas que surgem, reagem, atuam e desaparecem, de acordo com as fases do ciclo de vida celular, possibilitando a identificação de inúmeros autoanticorpos; possuir uma relação núcleo/citoplasma em favor do núcleo, característica neoplásica, que facilita o reconhecimento de vários arranjos fluorescentes; possuir vários nucléolos, permitindo avaliar sua forma de apresentação nos padrões nucleolares e um citoplasma rico em fibrilas e organelas, fundamentais no reconhecimento dos padrões citoplasmáticos. Essas características permitem o reconhecimento de mais de 30 diferentes padrões nucleares, nucleolares, da membrana nuclear, citoplasmáticos e do aparelho mitótico, resultantes da ligação de diferentes autoanticorpos a essas estruturas celulares^{26,27}. Uma diferença importante entre as células HEp-2 e os tecidos de roedores é que um mesmo autoanticorpo pode estar associado com padrões de fluorescência distintos nesses substratos¹.

Além disto, o estabelecimento de uma única linhagem celular traz uma possibilidade de padronização do teste de IFI impossível de ser alcançada com os substratos de origem animal³. A outra vantagem da IFIHEp-2 é a grande sensibilidade do método, que permite a detecção de uma gama imensa de autoanticorpos^{1,3,4,26}. Virtualmente todos os pacientes com LES passaram a apresentar FAN positivo nesse substrato em algum momento da evolução da doença^{22,28}. Isso se deve ao fato de que autoanticorpos dirigidos contra antígenos de importância diagnóstica cuja expressão nos tecidos de roedores é deficiente, puderam ser prontamente detectados pela IFI em células HEp-2^{1,3,4,26}. Este é o caso do antígeno SSA/Ro, de alguns antígenos cuja expressão é restrita a determinadas fases do ciclo celular, como PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*), e de alguns antígenos de localização centromérica e nucleolar¹. Grande parte dos pacientes com essas reatividades apresentava resultados falsos negativos do FAN nos substratos de origem animal. Atualmente, a maioria deles pode

ser facilmente identificada pela IFI HEp-2¹, sendo este método considerado o padrão-ouro para a pesquisa do FAN²⁹.

2.2 Acurácia diagnóstica

Acurácia diagnóstica é a capacidade que um teste tem para discriminar entre quem tem e quem não tem determinada doença. Também pode ser entendida como a proporção de resultados corretos que um teste é capaz de fornecer (resultados verdadeiros positivos e verdadeiros negativos divididos por todos os resultados, incluindo os falsos positivos e negativos)^{30,31}.

Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo, razão de verossimilhança positiva, razão de verossimilhança negativa e área sob a curva ROC são medidas da acurácia diagnóstica de um teste^{30,31}. A acurácia de um teste diagnóstico também é influenciada pela sua reprodutibilidade³⁰.

Sensibilidade é a probabilidade de um teste ser positivo na presença de doença. É calculada como o número de resultados verdadeiros positivos (VP) dividido pela soma dos resultados verdadeiros positivos e falsos negativos (FN)³¹. Especificidade é a probabilidade de um teste ser negativo na ausência de doença. É calculada como o número de resultados verdadeiros negativos (VN) dividido pela soma dos resultados verdadeiros negativos e falsos positivos (FP)³¹.

Valor preditivo positivo é a probabilidade de um indivíduo com o teste positivo ter a doença. É calculado como o número de resultados VP dividido pela soma dos resultados VP e FP. Valor preditivo negativo é a probabilidade de um indivíduo com teste negativo não ter a doença. É calculado como o número de resultados VN dividido pela soma dos resultados VN e FN³¹.

Quando um teste que fornece resultados em uma escala ordinal e contínua é interpretado de maneira dicotômica, a sua sensibilidade e especificidade podem variar de acordo com o valor que define um resultado como positivo, ou valor de corte. Um valor muito baixo resultará em mais resultados falsos positivos (baixa especificidade) e poucos resultados falsos negativos (alta sensibilidade), enquanto um valor mais alto

produzirá poucos resultados falsos positivos (alta especificidade), mas falhará em identificar muitos casos da doença (baixa sensibilidade). Essa relação entre sensibilidade e especificidade pode ser ilustrada graficamente por meio da curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*). Cada ponto da curva representa um valor diferente de positividade do teste, sendo a sensibilidade correspondente plotada no eixo y e a frequência de resultados falsos positivos (100 - especificidade) plotada no eixo x. A área sob a curva quantifica a capacidade discriminatória do teste, com uma área de 1.0 representando um teste perfeito e uma área de 0.5 um teste com desempenho igual ao acaso. Quanto mais próxima do ângulo superior esquerdo do gráfico, mais próximo de 1.0 é a área sob a curva e, portanto, melhor é o teste³².

O poder que o resultado de um teste tem de modificar a probabilidade pré-teste de uma doença é determinado pelo cálculo da razão de verossimilhança (RV) ou *likelihood ratio* (LR). A RV é definida como a razão entre a probabilidade de um determinado resultado de um teste diagnóstico em indivíduos portadores da doença e a probabilidade do mesmo resultado em indivíduos sem a doença^{31,32,33}. O cálculo da RV não depende da prevalência da doença, já que é realizado por meio dos valores de sensibilidade e especificidade apresentados por um determinado teste, estando diretamente ligado à acurácia com a qual o teste identifica a doença em questão. A RV pode ser calculada tanto para resultados negativos (probabilidade de excluir a doença) como para positivos (probabilidade de confirmar a doença). Quanto mais a RV se afasta da unidade (em ambos os sentidos), mais poderoso é o teste em termos diagnósticos^{31,32}.

Razão de verossimilhança positiva (RV+) é calculada pela probabilidade de um resultado positivo do teste na presença de doença dividida pela probabilidade de um resultado positivo na ausência de doença e expressa quantas vezes é mais provável encontrar um resultado positivo em pessoas doentes quando comparado com pessoas não doentes. Razão de verossimilhança (RV-) é calculada pela probabilidade de um resultado negativo do teste na presença de doença dividida pela probabilidade de um resultado negativo na ausência de doença e expressa quantas vezes é mais provável encontrar um resultado negativo em pessoas doentes quando comparado com pessoas

não doentes. Uma RV+ de 15 significa uma probabilidade 15 vezes maior de o teste ser positivo na presença de doença do que na sua ausência. Por sua vez, uma RV- de 0,1 significa uma probabilidade 10 vezes maior de o teste ser negativo na ausência de doença do que na sua presença^{31,32}.

Os efeitos de diferentes valores da RV na probabilidade pós-teste de doença são tradicionalmente interpretados conforme descrito no quadro 1³³.

Quadro 1: Efeitos de diferentes valores da RV na probabilidade pós-teste de doença

RV para resultados +	RV para resultados -	Efeito na PPT
Maior que 10	Menor que 0,1	Grande
Entre 5 e 10	Entre 0,1 e 0,2	Moderado
Entre 2 e 5	Entre 0,2 e 0,5	Mínimo
Igual a 1	Igual a 1	Nenhum

PPT = probabilidade pós-teste

2.3 FAN HEp-2 na prática clínica: desempenho, vantagens e desvantagens

O estabelecimento das células HEp-2 como o substrato de escolha para a pesquisa do FAN, associado à otimização dos kits comerciais no sentido de uma maior sensibilidade para a detecção dos diversos autoanticorpos, à evolução tecnológica dos microscópios e ao emprego do teste por muitos médicos com o objetivo de descartar o diagnóstico das DRAI em pacientes com sinais e sintomas inespecíficos, tornou o FAN HEp-2 um exame com baixa especificidade e valor preditivo positivo.

Uma porcentagem significativa de pacientes com outras doenças autoimunes como AR, tireoidite autoimune e púrpura trombocitopênica idiopática, podem ter FAN HEp-2 positivo sem que o exame tenha qualquer valor diagnóstico². Resultados positivos também podem ocorrer transitoriamente no contexto de várias doenças

infeciosas, como hepatite C crônica, síndrome da imunodeficiência adquirida e infecção por parvovírus B19, assim como em doenças neoplásicas e na vigência do uso de alguns medicamentos.

Atualmente, a maioria dos testes de FAN é utilizada, equivocadamente, como triagem para a presença de doença reumática autoimune em indivíduos com sintomas clínicos inespecíficos e baixa probabilidade pré-teste de doença^{11,12,13}. Como a prevalência das doenças autoimunes é muito menor que a prevalência de FAN na população saudável, a maioria dos resultados positivos em um laboratório geral, não vinculado a serviços de reumatologia ou nefrologia, não está associada com a presença de autoimunidade clínica³⁴. Além disto, uma alta proporção de indivíduos sem evidência clínica ou laboratorial de doença autoimune passou a apresentar resultados positivos em células HEp-2. Tan e colaboradores avaliaram a prevalência do FAN HEp-2 em indivíduos saudáveis recrutados por quinze centros internacionais de referência na pesquisa de autoanticorpos e encontraram resultados positivos em 31,7% deles no título de 1:40, 13,3% no título de 1:80, 5% no título de 1:160 e 3,3% no título de 1:320³⁵. No Brasil, Mariz e colaboradores determinaram, a prevalência de FAN HEp-2 em 918 indivíduos saudáveis e encontraram uma positividade de 13,3% na diluição de 1:80, 7,0% na diluição de 1:160, 6,0% na diluição de 1:320, 4,4% na diluição de 1:640 e 2,1% nas diluições $\geq 1:1280$ ³⁶.

Esses resultados produzem um impacto clínico importante. O FAN é um dos critérios de classificação do LES, conforme o ACR, mas para isto deve estar presente no soro em título anormal. Entretanto, o ACR não oferece nenhuma recomendação específica sobre como estabelecer um título anormal do FAN. Para o estabelecimento de intervalos de referência no laboratório clínico, o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) recomenda a utilização da distribuição dos valores encontrados em 95% dos indivíduos que constituem uma população de referência (percentis 2,5 e 97,5)³⁷. Em relação ao FAN, apenas o limite superior do intervalo seria utilizado, sendo o valor de corte do teste, neste caso, o título correspondente ao percentil 95. Diferentes diluições dos soros, como 1:40, 1:80 e 1:160, são utilizadas em laboratórios clínicos ou recomendadas pela literatura como valores de corte, mas frequentemente não levam

em consideração a recomendação do ACR quanto à definição de um título anormal do FAN^{35,38-41}. Por sua vez, muitos fabricantes de *kits* comerciais sugerem que a triagem do teste seja feita na diluição inicial de 1:40, geralmente com base em estudos realizados em populações européias ou americanas saudáveis, porém étnica e socialmente distintas da população brasileira. Como os pacientes com DRAs tendem a apresentar FAN HEp-2 positivo em títulos mais elevados que os indivíduos sem evidência clínica de autoimunidade, o estabelecimento de uma diluição de triagem adequada, que corresponda ao título anormal do FAN, é fundamental para minimizar a frequência de resultados “falsos positivos” do teste^{3,36}.

Além do número elevado de achados positivos em indivíduos aparentemente hígidos, o FAN-HEp-2 possui limitações técnicas ligadas à falta de padronização de instrumentos e dependência da qualificação dos observadores. Diferenças entre os microscópios utilizados pelos laboratórios e subjetividade na leitura dos padrões de fluorescência contribuem para a falta de reprodutibilidade dos resultados entre os vários laboratórios^{35,42-45}. Os resultados da nona rodada (novembro/2008) do ensaio de proficiência PCQAuto (GMK Diagnosticos) ilustram a variabilidade da IFI, tanto em relação ao padrão quanto ao título. Cerca de 30,0% dos participantes classificaram a amostra como negativa. O padrão de fluorescência foi corretamente classificado por 90% dos laboratórios como nucleolar homogêneo. Os títulos variaram de 1:160 a 1:2560. Essa amostra foi classificada pelo provedor do ensaio como positiva, padrão de fluorescência nucleolar homogêneo com título de 1:2560⁴⁶.

Finalizando, a IFI é um método trabalhoso, manual, cuja execução exige vários profissionais de laboratório com diferentes habilidades e um controle interno da qualidade rigoroso para assegurar resultados confiáveis e reprodutíveis, o que a torna uma técnica limitada para laboratórios que realizam um grande volume de exames por dia^{44,45}.

2.4 Métodos alternativos para a detecção do FAN

Atualmente, existem outros métodos para a pesquisa do FAN, sendo que imunoenaios tais como ELISA, quimiluminescência indireta e as tecnologias *multiplex* já se encontram disponíveis no mercado^{47,48}. Esses testes podem ser automatizados, necessitando de um número menor de técnicos para a sua execução e, como não exigem o uso de microscópio, eliminam a subjetividade inerente à interpretação dos padrões de fluorescência, o que torna os resultados mais reprodutíveis em relação à IFI, e permitem otimização do fluxo de trabalho do laboratório e maior rapidez na liberação dos resultados. Devido ao fato de a maioria das amostras submetidas à pesquisa do FAN em um laboratório geral apresentarem resultados negativos, esses imunoenaios constituem uma alternativa atraente para a pesquisa de autoanticorpos circulantes nas DRAIs. Entretanto, apesar da possibilidade de automação e padronização, existem ainda muitas diferenças entre os diversos imunoenaios⁴⁹. Os fabricantes utilizam diversos protocolos para sensibilizar a fase sólida com os antígenos de interesse; a fonte dos antígenos pode ser o núcleo integral de células HeLa, antígenos específicos purificados de células HEp-2, antígenos específicos recombinantes ou uma mistura de extrato do núcleo de células HEp-2 e antígenos recombinantes específicos⁵⁰; cada kit possui um valor de corte diferente para definição de resultados positivos⁵¹. O resultado dessa falta de padronização é a grande variabilidade de sensibilidade e especificidade entre os testes dos diversos fabricantes e em relação à IFI em células HEp-2⁵².

Bossuyt⁵³ avaliou dois imunoenaios automatizados por meio da análise de amostras enviadas para a triagem de FAN: um método ELISA, que utilizava como substrato extrato de células HEp-2 suplementado com os antígenos purificados Scl-70 e SSA/Ro (EIA ANA Screen, Sigma Diagnostics, St. Louis, MO, EUA); e um imunoenamo enzimático cujo substrato era composto por extrato do núcleo de células HEp-2 suplementado com os antígenos recombinantes SSA/Ro 52 kD, SSA/Ro 60 kD, SSB/La, dsDNA, Jo-1, CENP-B e Scl-70 (Cobas[®] Core HEp-2 EIA ANA, Roche Diagnostics, Basel, Suíça). Todas as amostras foram testadas em células HEp-2. As amostras positivas foram testadas para a presença de anticorpos anti-SSA/Ro, SSB/La, Sm, Jo-1,

RNP e Scl-70 por contraímunoelctroforese, e para anti-dsDNA por IFI. Foram consideradas positivas amostras com título $\geq 1:40$ pela IFI ou com valores acima do valor de corte sugerido pelos fabricantes. A concordância global dos testes com a IFI em amostras com título $<1:160$ foi de, respectivamente, 86,0% e 85,0%. Com os valores de corte sugeridos pelos fabricantes, a sensibilidade dos imunoenaios Sigma e Roche foi de 65% e 61%, respectivamente. Os testes EIA ANA Screen e Cobas[®] Core HEp-2 falharam em detectar algumas amostras com autoanticorpos de importância clínica (anti- SSA/Ro, dsDNA, Jo-1 e centrômero). O autor concluiu que os imunoenaios utilizados não poderiam substituir a IFI.

Dahle e colaboradores⁵⁴ avaliaram e compararam o desempenho de dois kits ELISA com uma combinação de IFI HEp-2 e imunodifusão radial dupla *in house* (ihIDRD), antígeno composto por uma mistura de SSA/Ro, SSB/La, Jo-1, Sm, U1-RNP e Scl-70 para a triagem do FAN em 3000 amostras consecutivas. Os ELISAs avaliados foram o Varelisa[®] SS-A/Ro (Pharmacia Diagnostics GmbH & KG, Freiburg, Germany), que utilizava SSA/Ro 52-kD e 60-Kd como antígeno, e o Varelisa[®] ANA 8 screen (Pharmacia Diagnostics GmbH & KG, Freiburg, Germany), que utilizava como substrato uma mistura dos antígenos SSA/Ro (52/60 kD), SSB/La, Sm, (B, B', D), U1-RNP, snRNP, Scl-70, Jo-1 e CENP-B (proteína B do centrômero). A IFI e a ihIDRD foram considerados os métodos padrão-ouro. Amostras com título $\geq 1:100$ na IFI, presença de linha de precipitação na ihIDRD, ou valores acima do valor de corte recomendado pelos fabricantes foram consideradas positivas. Amostras positivas em quaisquer das técnicas acima foram testadas para a presença de autoanticorpos específicos por IDRDR comercial. Cerca de 68,0% das amostras positivas pela IFI foram negativas pelos ELISAs. O padrão de fluorescência predominante foi o homogêneo (62,0%), indicando anticorpos contra antígenos da cromatina, os quais estão intimamente associados com LES, seguido do nucleolar (22,0%). Nenhum dos ELISAs tinha antígenos da cromatina como parte do substrato. Várias amostras positivas nos ELISAs (30,0%) não apresentaram anticorpos contra antígenos específicos pela IDRDR. Os autores concluíram que a IFI HEp-2 deve permanecer como método de escolha, pelo fato desse substrato apresentar todos os antígenos de relevância para o diagnóstico das DRAIs.

Tonutti e colaboradores⁵⁵ avaliaram a acurácia diagnóstica de cinco kits ELISA comerciais. Amostras com título $\geq 1:40$ na IFI ou que apresentaram valores acima do valor de corte recomendado pelos fabricantes foram consideradas positivas. Amostras positivas na IFI foram testadas para a presença dos autoanticorpos específicos dsDNA, SSA/Ro, SSB/La, Jo-1, Sm, U1-RNP e Scl-70. Foram avaliados 1513 pacientes consecutivos com suspeita de doença reumática autoimune. Em 240 pacientes uma dessas doenças foi diagnosticada (LES, ES, SS, DM/PM, DMTC). A sensibilidade e especificidade da IFI e dos kits de ELISA foram calculadas como a porcentagem de resultados positivos em pacientes com doença reumática autoimune e a porcentagem de resultados negativos em pacientes sem doença autoimune. Cada ELISA possuía substrato antigênico diferente: extrato purificado do núcleo de células HEp-2, núcleo integral de célula HeLa, extrato do núcleo de células HEp-2 suplementado com os antígenos purificados Jo-1, SSA/Ro, SSB/La e DNA de fita simples (*single-stranded* DNA ou ssDNA), antígenos purificados do núcleo de células HEp-2 e extrato do nucléolo suplementados com os antígenos purificados Sm, U1-RNP, Scl-70, PCNA, proteína ribossomal P, Jo-1, SSA/Ro, SSB/La, dsDNA e mitocôndria. Os resultados mostraram que alguns ELISA apresentaram sensibilidade diagnóstica comparável à IFI (93,0%), podendo ser utilizados como método alternativo. Os autores concluíram que nem todos os kits de ELISA apresentaram a mesma sensibilidade e especificidade, devido a diferenças no substrato antigênico, procedimento de sensibilização da fase sólida e a composição do conjugado utilizado. Portanto, antes de introduzir qualquer imunoensaio do tipo ELISA na rotina diagnóstica é necessário um processo de validação cuidadoso.

Fenger e colaboradores⁵⁶ avaliaram seis kits de ELISA em comparação à IFI. Quatro kits utilizavam como substrato uma combinação de extrato de células HEp-2 com antígenos específicos purificados, enquanto dois utilizavam uma combinação de antígenos específicos purificados e recombinantes. Amostras com título $\geq 1:160$ na IFI ou resultados acima do valor de corte recomendado pelos fabricantes foram consideradas positivas. A sensibilidade e especificidade dos kits foram avaliadas em relação ao diagnóstico clínico e comparadas com a IFI. Os métodos foram avaliados em três populações diferentes: 102 pacientes com diagnóstico estabelecido de DRAI (1);

164 pacientes com suspeita de DRAI e sintomas com menos de 1 ano de duração, guardadas em soroteca por 5 anos antes do início dos sintomas (2); 101 pacientes com suspeita de doenças reumáticas, cujo diagnóstico final não foi de autoimunidade (3). Novos valores de corte foram estabelecidos de acordo com a sensibilidade, especificidade e valor preditivo nas populações de pacientes 1 e 3. O estudo mostrou que a detecção do FAN depende do método utilizado. Alguns kits tiveram um desempenho ruim (sensibilidade de 71,0% a 83,0% na população 1 e de 58,0% a 67,0% na população 2), enquanto outros apresentaram sensibilidade diagnóstica semelhante ou melhor que a IFI (sensibilidade de 91,0% a 97,0% na população 1 e de 70,0% a 79,0% na população 2). Os kits que utilizavam extratos de células HEp-2 tiveram sensibilidade maior que aqueles que utilizavam apenas uma combinação de antígenos específicos, porém com uma porcentagem maior de resultados falsos positivos. A mudança do valor de corte dos kits modificou o desempenho do teste, na dependência se o objetivo era melhorar a sensibilidade ou a especificidade diagnóstica. Os autores concluíram que existem diferenças importantes entre os kits de ELISA e que a escolha do teste dependeria de fatores tais como o desempenho analítico e custos. Os resultados positivos pelo método ELISA deveriam ser confirmados e avaliados pela IFI ou testes para autoanticorpos específicos.

Ghillani e colaboradores⁵⁷ avaliaram um ensaio quimiluminescente (LIAISON[®] ANA Screen, Saluggia, Itália), com substrato constituído por extrato do núcleo de células HEp-2 suplementado com os antígenos purificados e recombinantes SSA/Ro, SSB/La, dsDNA, Jo-1, Sm/RNP, CENP-B, Scl-70 e PDC (complexo piruvato desidrogenase ou M2). Todas as amostras foram testadas em células HEp-2 e aquelas positivas foram testadas para a presença de anticorpos específicos. Foram consideradas positivas amostras com título >1:160 pela IFI ou valores acima do valor de corte recomendado pelos fabricante. Foram avaliadas 600 amostras da rotina dos laboratórios, sendo 372 de pacientes com diagnóstico de doença do tecido conjuntivo, além de 300 amostras de doadores de sangue e 273 amostras de pacientes com diagnósticos indefinidos. A concordância positiva e negativa entre os métodos foi de respectivamente 94,9% e 98,8% e a sensibilidade clínica de 94,0% para o ensaio quimiluminescente. A

especificidade encontrada em amostras de doadores de sangue foi de 99,3%. A quimiluminescência falhou em detectar algumas amostras que continham autoanticorpos com especificidade para os antígenos SSA/Ro, dsDNA, Jo-1, Scl-70, U1-RNP, em título menor que 1:160 na IFI. Resultados negativos também foram encontrados em amostras com padrão nucleolar, aparelho mitótico e membrana nuclear na IFI. Os autores concluíram que o FAN por quimiluminescência apresenta sensibilidade aceitável para a detecção dos principais autoanticorpos de importância para o diagnóstico das DRAIs.

Maguire e colaboradores⁵⁸ avaliaram a utilidade clínica do FAN por ELISA em comparação à IFI. O substrato do kit testado era composto por uma mistura dos antígenos específicos dsDNA, SSA/Ro, SSB/La, Jo-1, Sm, U1-RNP, centrômero e Scl-70 (Varelixa ReCombi[®] ANA Screen, Phadia, Milton Keynes, Reino Unido). Amostras com título \geq 1:40 na IFI ou com valores acima do corte recomendado pelo fabricante foram consideradas positivas. Foram avaliadas amostras de 1239 pacientes para os quais um teste de FAN foi solicitado. Desses, 169 pacientes apresentaram FAN positivo pela IFI e negativo pelo ELISA. Foi selecionado um grupo controle, pareado por sexo e idade, com resultado negativo de FAN em ambos os testes. Um ano após a realização do teste, cada paciente respondeu a um questionário com 23 questões para a avaliação de sintomas indicativos de LES, sintomas de outras doenças do tecido conjuntivo e sintomas inespecíficos não relacionados às doenças do tecido conjuntivo. Os resultados mostraram que não houve diferenças entre os grupos em relação às questões sugestivas de LES, doença do tecido conjuntivo ou controle. Apesar dos resultados do estudo não poderem ser extrapolados para outros testes de ELISA com substrato antigênico diferente, os autores concluíram que, após um ano de seguimento, os pacientes com FAN positivo pela IFI e negativo pelo ELISA eram indistinguíveis em termos de sintomas clínicos dos pacientes com resultados negativos em ambos os testes. Portanto, esses pacientes não demandariam uma avaliação clínica diferenciada. A utilização do ELISA reduziria o número de pacientes com resultados de FAN falsos positivos encaminhados para avaliação reumatológica.

Copple e colaboradores⁵⁹ avaliaram a proposta de se realizar a triagem do FAN por ELISA, seguida por IFI HEp-2 nas amostras positivas, em laboratórios de grande rotina. Os autores analisaram quatro kits de ELISA de fabricantes diferentes em paralelo com a IFI-HEp-2. Os substratos eram compostos por uma mistura variável de antígenos específicos recombinantes e/ou purificados (SSA/Ro 52kD, SSA/Ro 60kD, SSB/La, dsDNA, histonas, Sm, Sm/RNP, U1-RNP, Jo-1, proteína ribossomal P, CENP-B, Sci-70 e M2), associados ou não ao extrato de células HEp-2. Foram analisadas 224 amostras caracterizadas clinicamente, sendo 30 de pacientes com diagnóstico de LES, 94 de pacientes com diagnóstico de artrite reumatoide, 100 amostras de indivíduos saudáveis, além de 495 amostras de rotina submetidas à pesquisa de FAN e 12 soros de referência para anticorpos antinucleares. Amostras com título $\geq 1:40$ na IFI ou com valores acima do valor de corte recomendado pelos fabricantes foram consideradas positivas. Todas as amostras positivas em qualquer dos métodos de triagem foram testadas para a presença de anticorpos anti-dsDNA, histonas, cromatina e antígenos nucleares extraíveis (ENA) em quatro plataformas *multiplex* diferentes. A sensibilidade dos diferentes ELISA oscilou entre 90,0% a 97,0%, comparada com uma sensibilidade de 80,0% da IFI HEp-2, nas amostras dos pacientes com LES. A especificidade oscilou entre 36,0% a 94,0%. Os autores concluíram que devido à sua alta sensibilidade, o ELISA poderia ser empregado para a triagem, permitindo a liberação imediata das amostras com resultados negativos, as quais constituem a maior proporção das amostras testadas em um laboratório geral, com consequente redução do tempo de liberação do resultado e melhor custo-efetividade. Por outro lado, devido à menor especificidade do método, amostras positivas pelo ELISA deveriam ser testadas pela IFIHEp-2 para confirmação do resultado, a caracterização do padrão de fluorescência e a determinação do título.

Beéck e colaboradores⁶⁰ avaliaram o desempenho diagnóstico de um imunoenensaio enzimático fluorescente (EliA[®] CTDScreen, Phadia, Freiburg, Alemanha) para a detecção de FAN, em comparação com a IFI em células HEp-2000[®] (Immunoconcepts, Sacramento, EUA), que são uma linhagem de células HEp-2 transfectadas que expressam o antígeno SSA em maior quantidade. O substrato era

constituído de: SSA/Ro 52 kD, SSA/Ro 60 kD, SSB/La, Sm, U1-RNP (70 kD, A, C), Scl-70, Cenp-B, Jo-1, fibrilarina, RNA polimerase III, PM-Scl, proteína ribossomal P, PCNA, M2 e dsDNA. Foram consideradas positivas amostras com título $\geq 1:40$ pela IFI ou com valores acima do valor de corte recomendado pelo fabricante; as amostras positivas foram testadas para a presença de autoanticorpos específicos. Foram avaliados 236 pacientes com diagnóstico de doença reumática autoimune, 149 indivíduos doadores de sangue, 139 pacientes com síndrome da fadiga crônica e um grupo controle de 134 pacientes encaminhados para avaliação reumatológica em que a presença de doença reumática foi descartada. A sensibilidade do teste para LES, ES, SS, DMTCDM/PM foi de 74,0%, 72,0%, 89,0%, 100% e 39,0%, enquanto a da IFI foi de 96,3%, 72,5%, 88,9%, 100% e 39,3%, respectivamente. A positividade no grupo de indivíduos saudáveis, pacientes com síndrome da fadiga crônica e pacientes controle foi inferior a 4%, enquanto a da IFI foi de 12,1%, 14,4% e 35,8%, respectivamente. Os autores concluíram que para um mesmo nível de especificidade, a sensibilidade do EliA[®] CTD Screen foi superior à da IFI, bem como mostrou razão de probabilidade superior a um resultado positivo da IFI para DRAI; um resultado negativo da IFI teve uma razão de probabilidade menor que um resultado negativo EliA[®] CTD Screen para a ausência de doença reumática autoimune; a probabilidade de doença reumática autoimune aumentou com o aumento do índice de reatividade do kit testado.

Parker e colaboradores⁶¹ avaliaram a sensibilidade de um imunoenensaio enzimático fluorescente (EliA[®] CTD Screen, Phadia, AB, Upsala, Suécia) para a detecção de autoanticorpos específicos mais raros associados com DRAIs (LES, ES e DM/PM). Foram avaliados os soros de 399 pacientes com a seguinte distribuição de autoanticorpos: 102 positivos para PM/Scl, 199 positivos para anti-RNA polimerase III, 50 positivos para anti-fibrilarina, 12 positivos para anti-Mi-2, 13 positivos para anti-PCNA e 23 positivos para anti-ribossomal P e concluíram que o EliA[®] CTD Screen foi um teste sensível para a detecção de anticorpos anti-PM/Scl, anti-proteína ribossomal P, anti-PCNA e anti-Mi-2. Entretanto, a sua sensibilidade foi considerada modesta para anticorpos anti-fibrilarina e insatisfatória para anticorpos anti-RNA polimerase.

Em suma, os estudos acima demonstraram resultados discrepantes em relação à sensibilidade (69,5% a 97,7%) e especificidade (66,9% a 97,7%) dos vários imunoenaios analisados. Tais discrepâncias podem ter sido consequência de diferenças qualitativas e/ou quantitativas dos antígenos que compõem o substrato (secundárias à alteração da estrutura conformacional dos mesmos durante o processo de purificação ou revestimento da fase sólida e/ou diferenças na quantidade e exposição de cada antígeno na mistura antigênica), presença de extrato de células HEP-2 como parte do substrato e diferentes valores de corte para definição de resultados positivos^{51,57}. Diferenças na seleção da população avaliada e no desenho dos estudos também foram fatores importantes que afetaram os resultados e a interpretação clínica dos estudos^{51,57}.

O Colégio Americano de Reumatologia, em posicionamento oficial, fez as seguintes recomendações em relação ao método para o teste de FAN: a IFI é o método padrão-ouro para a pesquisa de FAN, com sensibilidade superior aos demais imunoenaios; laboratórios comerciais e hospitalares que usam plataformas *multiplex*, ou outros imunoenaios para a detecção de FAN, devem informar aos médicos solicitantes que o teste utilizado possui sensibilidade e especificidade semelhante ou superior à IFI; os laboratórios devem informar nos laudos o método utilizado para a pesquisa de FAN²⁹. Tais recomendações foram baseadas em uma revisão da literatura que mostrou que até 35% dos pacientes com LES e FAN positivo pela IFI podem apresentar resultados negativos em outros imunoenaios⁶².

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Determinar o desempenho diagnóstico das técnicas de ELISA e QUIMILUMINESCÊNCIA para a pesquisa de anticorpos antinucleares (FAN), utilizando o diagnóstico clínico como o padrão de acurácia diagnóstica.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar a sensibilidade dos testes em uma amostra de pacientes com diagnóstico estabelecido de doenças reumáticas autoimunes para as quais o FAN possui utilidade diagnóstica: LES, SS, ES (incluindo as formas cutâneas limitada e difusa, a DMTC e as formas em sobreposição com LES, AR, SS e PM), DITC e DM/PM.
- Determinar a especificidade dos testes em uma amostra de pacientes com diagnóstico estabelecido de doenças reumáticas para as quais o FAN não possui utilidade diagnóstica, bem como em um grupo de pacientes com diagnóstico de doenças infecciosas agudas e crônicas: artrite reumatóide (AR), vasculites sistêmicas, fibromialgia, espondiloartrites, osteoartrite, gota, hepatite C, síndrome da imunodeficiência adquirida (HIV), dengue, tuberculose pulmonar e doença de Chagas.
- Nos pacientes com diagnóstico de LES, avaliar se existe correlação entre a sensibilidade dos testes e a atividade da doença.
- Determinar a concordância entre os kits ELISA, QUIMILUMINESCÊNCIA e a IFI-HEp-2.
- Descrever as amostras discordantes em relação aos seguintes parâmetros: no caso de amostras IFI positiva e ELISA e/ou QUIMILUMINESCÊNCIA negativa, avaliar o título, o padrão de fluorescência e o diagnóstico clínico. No caso de amostras IFI negativa e ELISA e/ou QUIMILUMINESCÊNCIA positiva, avaliar o diagnóstico clínico.
- Determinar a capacidade discriminatória dos testes por meio da área sob a curva ROC, da razão de verossimilhança positiva e da razão de verossimilhança negativa.
- Estabelecer valores de corte ótimos para cada teste por meio da análise por curva ROC.

- Estabelecer intervalos de resultados para cada teste associados a razões de verossimilhanças que correspondam a diferentes probabilidades pós-teste de DRAI.
- Na amostra de indivíduos saudáveis, determinar a frequência de resultados positivos de cada teste.
- Na amostra de indivíduos saudáveis, determinar a diluição da IFI- HEp-2 e o valor de corte de cada kit de ELISA e QUIMILUMINESCÊNCIA que definem um título/concentração anormal do FAN.
- Avaliar a sensibilidade de cada teste frente ao painel de soros de referência para anticorpos antinucleares da Arthritis Foundation/Centers for Disease Control (CDC, Atlanta. EUA)
- Determinar a sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo dos testes em um grupo de pacientes encaminhados para avaliação reumatológica, com suspeita diagnóstica não confirmada de DRAI.

4 CASUÍSTICA E MÉTODOS

O delineamento do presente estudo foi realizado de acordo com as recomendações do STARD (Statement for Reporting Studies of Diagnostic Accuracy)³⁰, tendo sido observados, na medida do possível, os itens que compõem a lista de verificação (*checklist*) proposta pelo grupo. O STARD é uma iniciativa de um grupo de cientistas e editores cujo objetivo é fornecer diretrizes para o aperfeiçoamento da qualidade dos estudos de acurácia diagnóstica.

4.1 Sujeitos:

Pacientes e indivíduos saudáveis

4.2 Critérios de inclusão:

Indivíduos com idade a partir de 18 anos, acompanhados no Serviço de Reumatologia do Hospital das Clínicas da UFMG (HC-UFMG) e no Serviço de Reumatologia da Santa Casa, ambos situados em Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. Indivíduos saudáveis, com idade entre 18 a 69 anos, provenientes da região metropolitana de Belo Horizonte, MG.

- **Grupo 1:** Indivíduos com diagnóstico estabelecido de lúpus eritematoso sistêmico, síndrome de Sjögren primária, esclerose sistêmica (incluindo as formas cutâneas limitada e difusa, a DMTC e as formas em sobreposição com LES, AR, SS e PM), doença indiferenciada do tecido conjuntivo (DITC) e polimiosite/dermatomiosite, segundo os critérios de classificação específicos⁶³⁻⁶⁹.
- **Grupo 2:** Indivíduos com diagnóstico estabelecido de artrite reumatóide, espondiloartrites, vasculites sistêmicas, osteoartrite, fibromialgia e gota, segundo os critérios de classificação específicos⁷⁰⁻⁷⁸. Também foi selecionado um subgrupo composto de amostras de soroteca e/ou pacientes com diagnóstico das seguintes síndromes infecciosas agudas e crônicas: infecção pelo HIV/AIDS, hepatite B crônica, hepatite C crônica, amostras anti-HCV positivas, amostras de pacientes com tuberculose pulmonar, amostras positivas para doença de Chagas (2 sorologias positivas) e amostras positivas para antígeno NS1 da dengue ou anticorpos IgM.
- **Grupo 3:** Indivíduos da rede primária de assistência encaminhados para avaliação ambulatorial, com suspeita clínica, não confirmada, de doença reumática autoimune.
- **Grupo 4 :** Indivíduos saudáveis, classificados de acordo com os critérios de Tan e colaboradores³⁵.

4.3 Critérios de exclusão:

Indivíduos com diagnóstico de doenças hepáticas autoimunes, como hepatite autoimune e cirrose biliar primária^{79,80}.

4.4 Métodos

4.4.1 Coleta, processamento e armazenamento das amostras:

Todos os pacientes e indivíduos saudáveis foram recrutados de forma consecutiva, entre setembro de 2010 e dezembro de 2011. Após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido, procedeu-se à coleta e centrifugação do sangue. Cerca de 10 mL de sangue foram obtidos por punção venosa periférica, utilizando sistema de tubo à vácuo com gel separador (Z Serum Sep C/A 50, VACUETTE®, Greiner Bio-One, Americana, SP, Brasil). Após aguardar cerca de 30 minutos para a formação do coágulo, as amostras foram centrifugadas a 4000 rotações por minuto durante 10 minutos e o soro obtido foi aliqotado e armazenado a -80 °C. O estudo foi aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais e da Santa Casa de Belo Horizonte.

4.4.2 Imunofluorescência indireta em células HEp-2

A imunofluorescência indireta foi realizada em substrato HEp-2 comercial (BION Enterprises, Des Plaines, IL, EUA), de acordo com o seguinte protocolo: para a triagem, os soros dos pacientes foram diluídos na proporção de 1:80 em tampão salina fosfatada pH 7,4 (PBS) e incubados por 30 minutos em câmara úmida, à temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram lavadas duas vezes por 10 minutos em PBS e incubadas por 30 minutos com anticorpo secundário de carneiro antigamaglobulina humana conjugado com isotiocianato de fluoresceína (cadeia leve e pesada de IgG) em câmara escura, à temperatura ambiente. Após a incubação, as lâminas foram lavadas em PBS e recobertas com tampão glicerol fosfato pH 7,4 e lamínulas. As lâminas foram lidas em microscópio de epifluorescência (Nikon Eclipse E 400), no aumento de 400x. As amostras foram classificadas como positivas quando apresentaram uma intensidade

de fluorescência igual ou superior a do controle positivo de reatividade mínima (1+/4+). As amostras positivas na diluição de triagem (1:80) foram diluídas sucessivamente em PBS até o título de 1:5120, sendo considerado o título final aquele em que ainda era possível identificar um padrão morfológico bem definido. Todas as corridas foram validadas pelo controle positivo e negativo fornecidos pelo fabricante. A leitura das lâminas e a descrição dos padrões de fluorescência foram realizados de acordo com as recomendações do 3º Consenso Brasileiro para a pesquisa de Autoanticorpos (FAN HEp-2), de 2008⁹. Todas as lâminas foram lidas por dois observadores. Resultados discrepantes foram avaliados de forma cega por um terceiro observador e liberados após consenso entre os mesmos.

4.4.3 ELISA equimiluminescência

- **Kit 1:** QUANTA Lite[®]ANA (Inova Diagnostics, San Diego, CA, EUA): ELISA que utiliza como substrato antígenos purificados do núcleo e nucléolo de células HEp-2, associados com os seguintes antígenos purificados: dsDNA, histonas, Sm, RNP, SSA/Ro, SSB/La, Scl-70, centrômero, Jo-1, proteína ribossomalP, PCNA e mitocôndria. O conjugado é um anticorpo de cabra anti-IgG humana marcado com peroxidase. As amostras foram diluídas manualmente na proporção de 1:41 em solução diluente de amostras HRP e incubadas à temperatura ambiente por 30 minutos. As etapas seguintes do teste foram realizadas no equipamento automatizado Stat Fax[®] 2000, de acordo com o seguinte protocolo: cada poço da placa foi lavado três vezes com solução de lavagem HRP. Após a última lavagem, o conjugado foi adicionado e incubado por 30 minutos à temperatura ambiente. Após a incubação o conjugado foi removido por etapa de lavagem idêntica à descrita acima, o cromógeno TMB foi adicionado e incubado por 15 minutos, em temperatura ambiente. Por fim, a solução de paragem HRP foi adicionada às placas e incubada por 5 minutos à temperatura ambiente e a densidade óptica (DO) de cada amostra determinada no comprimento de onda de 450 nm. A reatividade de cada amostra foi calculada dividindo-se a DO da amostra pela DO do controle positivo baixo e

multiplicando-se o valor obtido pelo número de unidades que se encontra no rótulo do controle positivo baixo. Foram consideradas positivas as amostras com resultado igual ou superior a 20 U (unidades). Todas as corridas foram validadas pelo controle positivo e negativo fornecidos pelo fabricante.

- **Kit 2:** ORGENTEC ANA Detect (ORGENTEC Diagnostica, Mainz, Alemanha): ELISA que utiliza como substrato os antígenos purificados SSA 52/Ro 52, SSA 60/Ro 60, SSB/La, RNP/Sm, RNP-70, RNP-A, RNP-C, SmB', Sm-D, Sm-E, Sm-F, Sm-G, Scl-70, Jo-1, dsDNA, ssDNA, poli-nucleossomos, mononucleossomos, complexo de histonas, histona H1, histona H2A, histona H2B, histona H3, histona H4, PM-/Scl-100 e CENP-B. O conjugado é um anticorpo anti-IgG humana marcado com peroxidase. As amostras dos pacientes foram diluídas manualmente na proporção de 1:100 em solução diluente de amostras e incubadas à temperatura ambiente por 30 minutos. As etapas seguintes do teste foram realizadas no equipamento automatizado Stat Fax[®] 2000, de acordo com o seguinte protocolo: cada poço da placa foi lavado três vezes com solução de lavagem. Após a última lavagem, o conjugado foi adicionado às placas e incubado por 15 minutos à temperatura ambiente. Após a incubação o conjugado foi removido por etapa de lavagem idêntica à descrita acima, o substrato TMB foi adicionado e incubado por 30 minutos em câmara escura, à temperatura ambiente. Por fim, a solução de paragem foi adicionada e incubada por 30 minutos em câmara escura, à temperatura ambiente e a DO de cada amostra determinada no comprimento de onda de 450 nm. As amostras com índice menor que 1,0 foram consideradas negativas, entre 1,1 e 1,2 indeterminadas e acima de 1,2 positivas. Todas as corridas foram validadas pelos controles positivo e negativo fornecidos pelo fabricante.
- **Kit 3:** IMTEC ANA Screen (HUMAN Diagnostics Worldwide, Magdeburg, Alemanha): ELISA que utiliza como substrato o núcleo íntegro de células HeLa ligado covalentemente à placa de poliestireno. O conjugado é um anticorpo anti-IgG, IgA e IgM humanas marcado com peroxidase. As amostras dos pacientes foram diluídas manualmente na proporção de 1:100 em solução diluente de amostras e incubadas à temperatura ambiente por 1 hora. As etapas seguintes do teste foram realizadas no

equipamento automatizado Stat Fax[®] 2000, de acordo com o seguinte protocolo: cada poço da placa foi lavado três vezes com o tampão de lavagem. Após a última lavagem, o conjugado foi adicionado e incubado por 30 minutos à temperatura ambiente. Após a incubação o conjugado foi removido por etapa de lavagem idêntica à descrita acima, o substrato TMB adicionado às placas e incubado por 10 minutos em câmara escura, à temperatura ambiente. Por fim, a solução de paragem foi adicionada e a absorbância de cada amostra determinada no comprimento de onda de 450 nm. A reatividade de cada amostra foi calculada pela interpolação do valor da absorbância da amostra na curva de calibração. Amostras com resultado abaixo de 40U/mL foram consideradas negativas, entre 40 a 50 U/mL indeterminadas, e acima de 50 U/mL positivas. Todas as corridas foram validadas pelos controles positivo e negativo fornecidos pelo fabricante.

- **Kit 4:** LIAISON ANA Screen (DiaSorin, Saluggia, Itália): ensaio por quimiluminescência indireta que utiliza como substrato antígenos purificados do núcleo de células HEp-2, associados com os seguintes antígenos recombinantes ou purificados: Sm/RNP, SSA/Ro, SSB/La, Scl-70, CENP-B, PDC, dsDNA na forma de oligonucleotídios sintéticos, imobilizados em partículas magnéticas. O conjugado é um anticorpo monoclonal de rato anti-IgG humana marcado com isoluminol. Todas as etapas de aspiração e diluição das amostras, de dispensação do conjugado, do substrato e dos agentes iniciadores, e de incubação e de lavagem, foram realizadas no analisador LIAISON (DiaSorin, Saluggia, Itália). Resultados com índice abaixo de 1,5 foram considerados negativos, e com índice igual ou superior a 1,5 foram considerados positivos. Todas as corridas foram validadas pelos controles positivo e negativo fornecidos pelo fabricante.

A composição antigênica dos substratos de cada kit e as suas principais características metodológicas estão descritas nos quadros 2 e 3.

Quadro 2: Composição antigênica dos testes ELISA e quimiluminescência

Antígeno	Kit 1	Kit 2	Kit 3	Kit 4
Extrato HEp-2	Sim	Não	Não	Sim
Extrato nucléolo	Sim	Não	Não	Não
Núcleo HeLa	Não	Não	Sim	Não
dsDNA	Sim*	Sim	Não	Sim [§]
ssDNA	Não	Sim	Não	Não
Nucleossomo	Sim	Sim	Não	Não
Histonas	Sim*	Sim	Não	Não
SSA/Ro 52 kD	Não	Sim	Não	Não
SSA/Ro 60 kD	Sim	Sim	Não	Sim
SSB/La	Sim	Sim	Não	Sim ^{§§}
Sm/RNP	Sim	Sim	Não	Sim
Jo-1	Sim	Sim	Não	Sim ^{§§}
ScI-70	Sim	Sim	Não	Sim ^{§§}
CENP B	Sim	Sim	Não	Sim ^{§§}
Ribossomal P	Sim	Não	Não	Não
Mitocôndria	Sim	Não	Não	Sim ^{§§}
PM/ScI	Sim	Sim	Não	Não
PCNA	Sim	Não	Não	Não

*Sob a forma de complexo DNA/histona (nucleossomo)

§oligonucleotídeos sintéticos; §§antígenos recombinantes; demais antígenos são nativos

Quadro 3: Características dos testes ELISA e quimiluminescência

KIT	Fase sólida	Conjugado	Incubação*	Diluição	Calibradores		RI
					Número	Linearidade	
1	Microplacas	IgG de cabra anti-humana-HRP	30/30	41	**	NA	Não
2	Microplacas	Policlonal anti-IgG humana-HRP	30/15	100	**	NA	Sim
3	Microplacas	Anti-Ig(GAM) humana-HRP	60/30	101	5	31,25 a500 U/mL	Sim
4	Micropartículas magnéticas	Monoclonal de rato anti-IgG humana-isoluminol	10/10	10	2	0,5 a 12,0	Não

HRP: peroxidase de rábano

NA: não se aplica

* soro e conjugado, em minutos

** resultados calculados como índice (divisão da DO da amostra pela DO do controle positivo baixo)

RI: faixa de resultados indeterminados

4.4.4 Soros de referência

Soros de referência da Arthritis Foundation/Centers for Disease Control (AF/CDC, ANA Reference Laboratory, Mailstop A-25, Centers for Disease control & Prevention,

1600 Clifton Road, NE, Atlanta, GA 30333 smcdougal@cdc.gov) foram utilizados para avaliar a resposta dos kits de ELISA, quimiluminescência e da IFI-HEp-2 em relação aos diferentes autoanticorpos específicos. Os soros estudados foram: AF/CDC 1 (Padrão homogêneo: Anti-dsDNA), AF/CDC 2 (Anti-SSB/La), AF/CDC 3 (Padrão pontilhado: Anti-U1-RNP, Anti-SSA/Ro, Anti-SSB/La), AF/CDC 4 (Anti-U1-RNP), AF/CDC 5 (Anti-Sm), AF/CDC 6 (Padrão nucleolar: Anti-fibrilarina), AF/CDC 7 (Anti-SSA/Ro), AF/CDC 8 (Anti-centrômero), AF/CDC 9 (Anti-Scl-70), AF/CDC 10 (Anti-Jo-1) e AF/CDC 12 (Anti-ribossomalP).

4.4.5 Determinação da atividade da doença em pacientes com LES

Nos pacientes com diagnóstico de LES, a atividade da doença no momento da coleta foi avaliada pelo instrumento SLEDAI 2K (*Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index 2000*), sendo considerado como indicativo de doença ativa um $score \geq 4$ ^{81,82}.

Para o cálculo do SLEDAI, os seguintes testes foram realizados:

- Pesquisa de anticorpos anti-dsDNA por imunofluorescência indireta utilizando como substrato o protozoário *Crihthidia luciliae*, em kit comercial (DiaTest-Auto Antibody Screen, DTS, Randburg, África do Sul), de acordo com o seguinte protocolo: para a triagem, os soros dos pacientes foram diluídos na proporção de 1:10 em tampão salina fosfatada (PBS) e incubados por 30 minutos em câmara úmida, à temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram lavadas duas vezes por 10 minutos em PBS e incubadas por 30 minutos com anticorpo secundário polivalente antigamaglobulina humana conjugado com isotiocianato de fluoresceína em câmara escura, à temperatura ambiente. Após a incubação, as lâminas foram lavadas em PBS e recobertas com tampão glicerol fosfato e lamínulas. As lâminas foram lidas em microscópio de epifluorescência (Nikon Eclipse E 400), no aumento de 400x. As amostras foram classificadas como positivas se apresentassem uma intensidade de fluorescência do cinetoplasto igual ou superior a do controle positivo de reatividade mínima (1+/4+). As amostras positivas na diluição de triagem foram diluídas

sucessivamente em PBS até o título de 1:1280, sendo considerado o título final aquele em que ainda era possível identificar o cinetoplasto. Todas as corridas foram validadas pelo controle positivo e negativo fornecidos pelo fabricante.

- Dosagem dos componentes C3 e C4 do complemento, por nefelometria (Beckman Coulter, Brea, CA, EUA), no equipamento IMAGE (Beckman Coulter, Brea, CA, EUA). O valor de referência do C3 é de 79 a 152 mg/dL e do C4 é de 16 a 38 mg/dL.

4.4.6 Determinação do título/concentração anormal do FAN e da diluição de triagem da IFI

Seguindo as recomendações do CLSI, para determinar o título anormal do FAN avaliou-se o número mínimo de 120 indivíduos saudáveis provenientes da população geral³⁷. O título anormal do FAN foi definido como o título/concentração de cada teste correspondente ao percentil 95 do grupo de indivíduos saudáveis. Considerou-se como saudável qualquer indivíduo com idade entre 18 a 69 anos que estivesse no exercício pleno e regular das suas atividades laborativas, sem apresentar qualquer condição física ou mental incapacitante³⁵.

4.5 Análise estatística

4.5.1 Cálculo amostral

O tamanho amostral foi calculado para um estudo descritivo de uma variável dicotômica. A fórmula empregada foi $N = 4^{z_{2\alpha}^2} P(1-P)/W^2$; onde $z_{2\alpha}$ = desvio-padrão normal para um α bidirecional, P = proporção esperada para a variável de interesse e W = amplitude total do intervalo de confiança. As sensibilidades utilizadas foram extraídas do artigo de Tonutti e cols⁵⁵. Nesse estudo, estas foram discriminadas como 93% e 88% para os ensaios ANA-EIA (Imteclmmunodiagnostika, Berlim, Alemanha) e QuantaLiteANA Elisa (Inova Diagnostics, San Diego, CA, EUA), respectivamente.

Utilizando uma amplitude total de 0,10 e um nível de confiança para o intervalo de 95%, o número de pacientes com diagnósticos reportados no grupo 1 deveria variar entre 100 e 163. Como se tratou de um estudo tipo casos e controles com proporção de um controle para cada caso, o número de pacientes nos grupos 2 e 3 também deveria variar entre 100 e 163 em cada grupo.

4.5.2 Análise dos dados

As variáveis contínuas com distribuição normal foram apresentadas como média, e as de distribuição não paramétrica, como mediana. As variáveis categóricas foram apresentadas como porcentagem. Para análise das variáveis categóricas foram usados o teste do qui-quadrado (χ^2) ou o teste exato de Fisher. Para comparações de grupos com distribuição normal foram usados o teste *t* de Student e ANOVA. Para comparações de grupos com distribuição não paramétrica foi usado o teste de Man-Whitney. O nível de significância estatística adotado foi de 5% ($p < 0,05$).

As seguintes medidas de acurácia diagnóstica, com os respectivos intervalos de confiança de 95%, foram calculadas para cada teste:

- Sensibilidade: número de resultados positivos do teste nos pacientes do grupo 1 (VP) dividido pelo número total de pacientes do grupo 1 (VP + FN). VP = verdadeiros positivos; FN = falso negativos
- No grupo 3, a sensibilidade foi calculada como o número de resultados positivos do teste nos pacientes com diagnóstico de DRAI (VP) dividido pelo número total de pacientes com DRAI nesse grupo (VP + FN).
- Especificidade: número de resultados negativos do teste nos pacientes do grupo 2 (VN) dividido pelo número total de pacientes do grupo 2 (VN + FP). VN = verdadeiros negativos; FP = falso positivos
- No grupo 3, a especificidade foi calculada como o número de resultados negativos do teste nos pacientes com outros diagnósticos finais (VN) dividido pelo número total de pacientes com outros diagnósticos finais neste grupo (VN + FP).

- Valor preditivo positivo: número de pacientes do grupo 3 com diagnóstico de DRAI e resultados positivos (VP) dividido pelo total de pacientes do grupo 3 com resultados positivos (VP +FP).
- Valor preditivo negativo: número de pacientes do grupo 3 sem diagnóstico de DRAI e com resultados negativos (VN) dividido pelo total de pacientes do grupos 3 com resultados negativos (VN+FN).
- Razão de verossimilhança positiva (RV+): sensibilidade do teste dividida pelo número de resultados falsos positivos, calculada para diferentes valores de corte.
- Razão de verossimilhança negativa (RV-): resultados falsos negativos do teste dividido pela especificidade, calculada para diferentes valores de corte.
- Área sob a curva ROC (AUC/area under the curve).

A interpretação das RV, assim como a construção de intervalos de resultados com diferentes RV, foi feita conforme o quadro 4, proposta na série de artigos *Immunologic Laboratory Testing Guidelines, do American College of Rheumatology*⁸³:

Quadro 4: Efeito do valor da RV na utilidade do teste

RV para resultados +	RV para resultados -	Utilidade do teste
Maior que 5	Menor que 0,2	Muito útil
Entre 5 e 2	Entre 0,2e 0,5	Útil
Menor que 2	Maior que 0,5	Inútil

A sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo, razão de verossimilhança positiva e razão de verossimilhança negativa, foram

calculados com os valores de corte sugeridos pelos fabricantes e com os valores de corte ótimos obtidos pela análise dos dados por curva ROC.

O valor de corte ótimo é aquele que apresenta o melhor equilíbrio entre sensibilidade e especificidade, e corresponde ao resultado do teste com o maior valor do índice de Youden: $J = \max[SE_i + SP_i - 1]$, em que SE e SP são a sensibilidade e a especificidade para cada valor de corte possível. Esse valor corresponde ao ponto da curva ROC mais afastado da linha diagonal.

As áreas sob a curva ROC dos diferentes testes foram comparadas pelo método de DeLong⁸⁴.

A concordância entre os testes foi avaliada pelo índice estatístico *Kappa*. A interpretação dos valores de κ foi realizada conforme o quadro 5⁸⁵:

Quadro 5: Interpretação dos valores de κ

Valor de κ	Grau de concordância
< 0,2	Pobre
0,21-0,40	Regular
0,41-0,60	Moderada
0,61-0,80	Boa
0,81-1,00	Muito boa

A frequência de DRAI foi calculada como o número de pacientes do grupo 3 com diagnóstico final de DRAI dividido pelo número total de pacientes desse grupo.

A análise estatística foi executada pelo pacote estatístico Medcalc para Windows versão 12.2.0 ou superior (Medcalc Software, Mariakerke, Bélgica).

5 RESULTADOS

Um total de 532 voluntários foram recrutados, sendo 143 pacientes no grupo 1, 166 pacientes no grupo 2, 89 pacientes no grupo 3 e 134 indivíduos saudáveis no grupo 4.

Dois pacientes foram excluídos: um paciente com diagnóstico provável de DITC, mas que não preenchia o critério de classificação específico da doença, e uma paciente com osteoartrite de joelhos e diagnóstico associado de cirrose biliar primária.

A composição do grupo 1, de acordo com o diagnóstico clínico específico, foi a seguinte: 72 pacientes apresentaram diagnóstico de LES, 33 de ES (incluindo com a forma cutânea limitada, com a forma cutânea difusa, 7 com sobreposição com outras DRAIs, e 2 com DMTC), 15 de SS, 14 pacientes de DM/PM e 9 de DITC.

A composição do grupo 2, de acordo com o diagnóstico clínico específico, foi a seguinte: 40 pacientes apresentaram diagnóstico de AR, 24 de fibromialgia, 23 de espondiloartrites, 28 de vasculites sistêmicas (granulomatose de Wegener, poliangiíte microscópica, síndrome de Churg-Strauss, poliarterite nodosa, púrpura de Henoch-Schönlein, arterite de Takayasu, doença de Behçet, policondrite recidivante e polimialgia reumática), 10 tinham osteoartrite primária (incluindo mãos, quadris e joelhos), 5 tinham gota. Com parte do grupo, também foi selecionado um subgrupo de 36 pacientes e amostras armazenadas em soroteca, contemplando as seguintes doenças infecciosas: 8 com infecção pelo HIV/AIDS, 1 com hepatite B crônica, 3 com hepatite C crônica, 6 amostras anti-HCV positivas, 6 amostras de pacientes com tuberculose pulmonar, 4 amostras positivas para doença de Chagas (2 sorologias positivas) e 8 amostras positivas para antígeno NS1 da dengue ou anticorpos IgM.

Os dados demográficos de cada grupo estão descritos na tabela 1, e um diagrama relacionando os resultados de cada teste nos pacientes dos grupos 1 e 2 com a presença ou ausência de DRAI encontra-se representado na figura 1.

Tabela 1: Dados demográficos dos pacientes dos grupos 1, 2, 3 e 4

Variável	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
Amostra (n)	143	130*	89	134
Idade (anos)[†]	42 (20-70)	50 (21-79)	45 (20-81)	40 (18-69)
Gênero (F/M)[‡]	127/16	92/38	71/18	71/63
Duração da doença[§] (anos)	6,7 (0,1-36,5)	5,0 (0,1-36,6)	2,2 (0,1-20,1)**	-
Uso de corticoide	99 (69%)	65 (50%)	-	-
Uso de outro IMS	66 (46%)	55 (42%)	-	-

IMS = imunossupressor

*Excluídas as amostras das doenças infecciosas

[†]Média (intervalo total). G1≠G2, G2≠G3 e G4, G3≠ G4; p<0,001; ANOVA

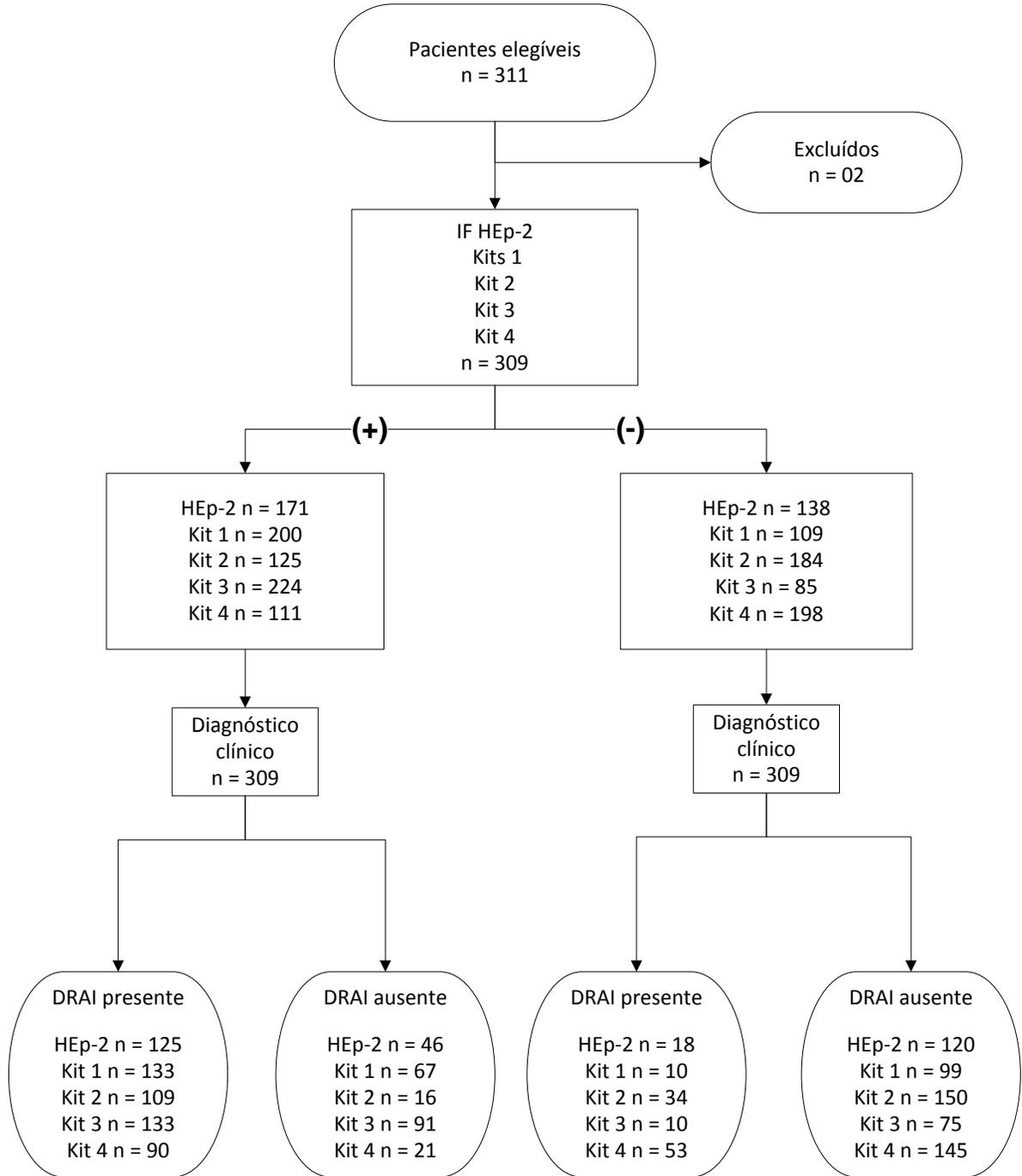
[‡]G1 vs G2 p=0,003; G1 vs G3 p=0,09; G1 vs G4 p<0,0001; G2 vs G3 p=0,179; G2 vs G4 p=0,004; G3 vs G4 p=0,0001

[§]Mediana (intervalo total), tempo após o diagnóstico

**Tempo após o início dos sintomas

Em comparação com o grupo 2, o grupo 1 apresentou uma proporção significativamente maior de pacientes do sexo feminino, mais jovens, em uso de corticoterapia (p=0,002), e com tempo de duração da doença após o diagnóstico mais longo (p=0,033; Mann-Whitney). Não houve diferença significativa entre os dois grupos na proporção de pacientes em uso de imunossupressor (p=0,605).

Figura 1: Resultados do FAN na IFI HEp-2 e nos kits de 1 a 4, em 309 pacientes dos grupos 1 e 2



5.1 Sensibilidade e especificidade dos testes nos grupos 1, 2 e 4

Todas as análises foram realizadas considerando-se os resultados indeterminados dos kits 2 e 3 como positivos. Inicialmente, a sensibilidade de cada teste foi determinada no grupo 1, e a especificidade nos grupos 2 e 4 (tabela 2). A sensibilidade da IFI HEp-2 foi de 87,4%, enquanto a sensibilidade dos outros testes variou entre 62,9% (kit 4) a 90,0% (kits 1 e 3).

Tabela 2: Sensibilidade e especificidade dos testes, calculadas nos pacientes dos grupos 1 e 2, e nos indivíduos saudáveis do grupo 4 (IC95%)

Grupo	Amostra (n)	HEp-2	Kit 1	Kit 2	Kit 3	Kit 4
Sensibilidade (grupo 1)*	143	125 (87,4%) (82,0-92,8)	133 (90,0%) (85,1-94,9)	109 (76,2%) (69,2-83,2)	133 (90,0%) (85,1-94,9)	90 (62,9%) (55,0-70,8)
Especificidade (grupo 2)†	166	120 (72,3%) (64,9-78,9)	99 (59,6%) (52,1-67,1)	150 (90,4%) (85,9-94,9)	75 (45,2%) (37,6-52,8)	145 (87,4%) (82,4-92,4)
Especificidade (grupo 4)‡	134	116 (86,6%) (80,8-92,4)	‡69 (80,5%) (72,2-88,8)	128 (94,0%) (89,0-99,0)	86 (35,8%) (27,7-43,9)	118 (88,1%) (82,6-93,9)

*n (%): Número de resultados positivos (e indeterminados dos kits 2 e 3) do teste nos pacientes do grupo 1 dividido pelo total de pacientes do grupo

†n (%): Número de resultados negativos do teste nos pacientes dos grupo 2 e 4 dividido pelo total de pacientes de cada grupo

‡Calculada em uma amostra de 87 indivíduos

A distribuição dos resultados de cada teste nos pacientes dos grupos 1, 2 e 4 estão representadas nas figuras de 2 a 6.

Figura 2: Distribuição dos títulos da IFI HEp-2 (valor de corte 1:80) nos pacientes dos grupos 1 e 2, e nos indivíduos saudáveis do grupo 4

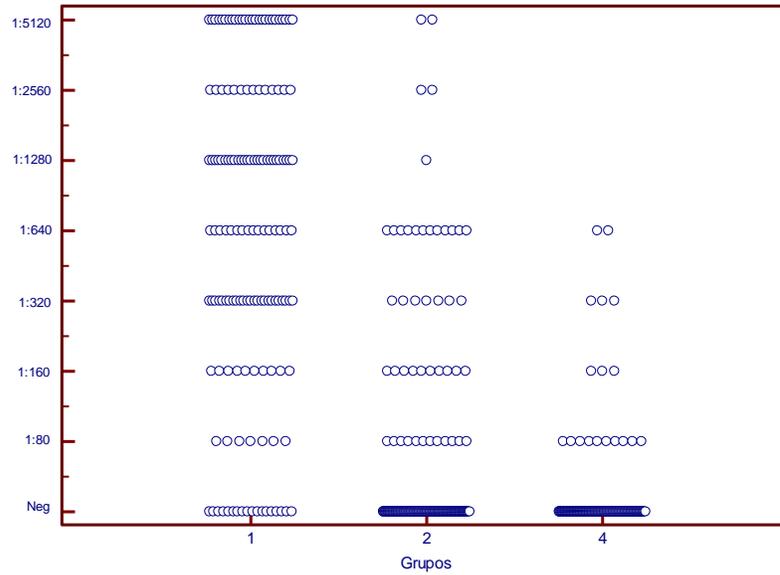


Figura 3: Distribuição das concentrações do kit 1 nos pacientes dos grupos 1 e 2, e nos indivíduos saudáveis do grupo 4
 Linha tracejada indica o valor de corte do kit

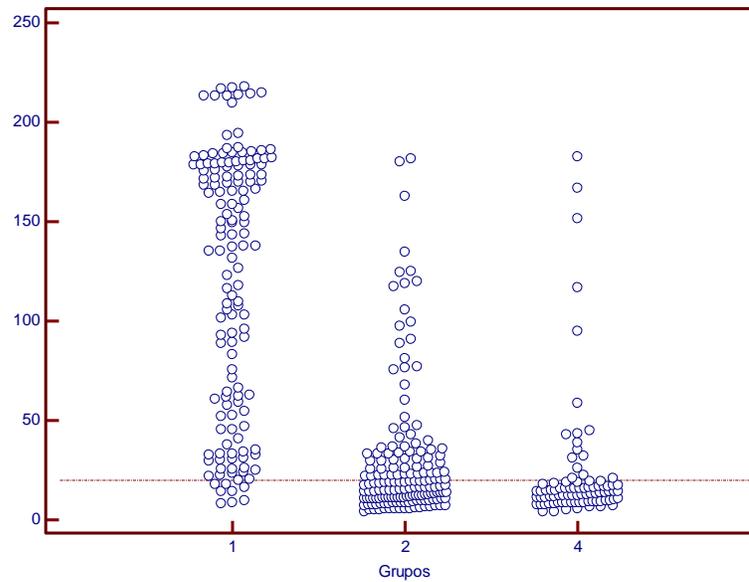


Figura 4: Distribuição dos índices do kit 2 nos pacientes dos grupos 1 e 2, e nos indivíduos saudáveis do grupo 4
Linha tracejada indica o valor de corte do kit considerando os indeterminados como positivos

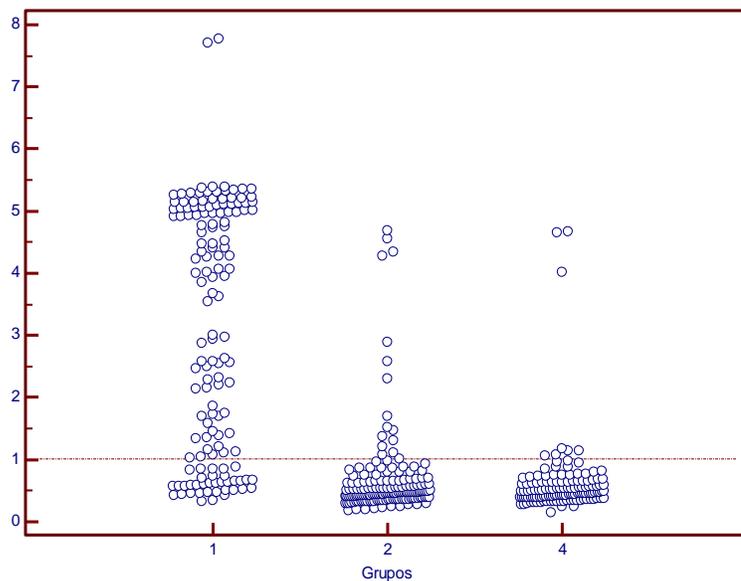


Figura 5: Distribuição das concentrações do kit 3 nos pacientes dos grupos 1 e 2, e nos indivíduos saudáveis do grupo 4
Linha tracejada indica o valor de corte do kit considerando os indeterminados como positivos

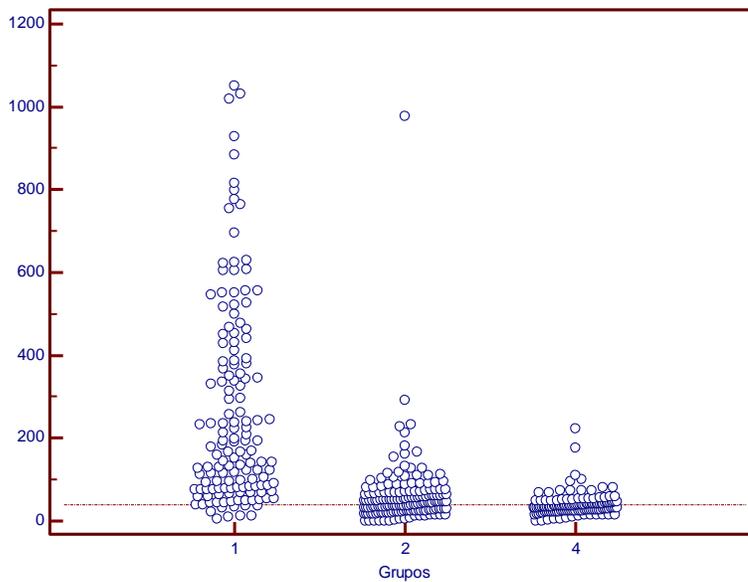
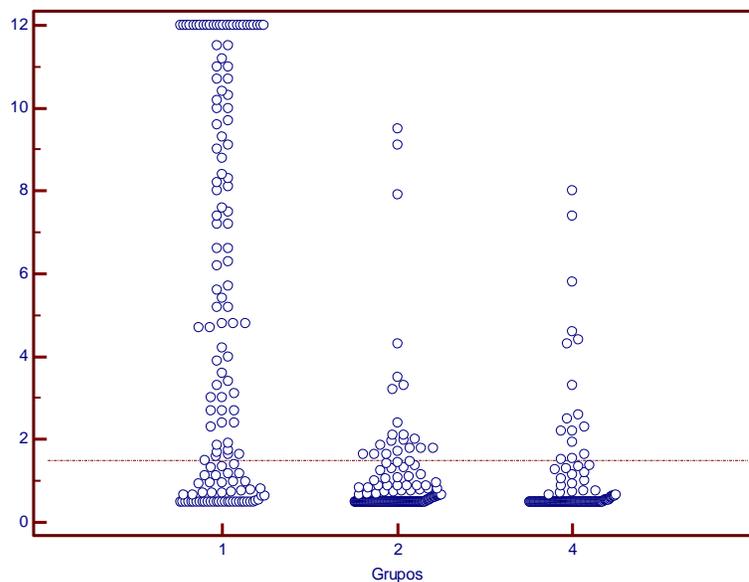


Figura 6: Distribuição dos índices do kit 4 nos pacientes dos grupos 1 e 2, e nos indivíduos saudáveis do grupo 4
Linha tracejada indica o valor de corte do kit



Como a prevalência e a importância diagnóstica do FAN nas diferentes DRAI é variável, e a composição antigênica dos testes avaliados era heterogênea, a sensibilidade da IFI HEp-2 e de cada kit foi determinada individualmente para as doenças representadas no grupo 1 (tabela 3).

Tabela 3: Sensibilidade dos testes nos pacientes do grupo 1, conforme o diagnóstico(IC95%)

Doença	Amostra (n)	HEp-2	Kit 1	Kit 2	Kit 3	Kit 4
LES	72	63 (87,5%)	69 (95,8%)	60 (83,3%)	70 (97,2%)	49 (68,1%)
ES	33	31 (93,9%)	32 (97,0%)	26 (78,8%)	30 (90,9%)	22 (66,7%)
SS	15	15 (100%)	15 (100%)	13 (86,7%)	14 (93,3%)	12 (80%)
DITC	9	9 (100%)	9 (100%)	8 (88,9%)	9 (100%)	7 (77,8%)
DM/PM	14	7 (50,0%)	8 (57,1%)	2 (14,3%)	10 (71,4%)	0 (0%)

n (%): Número de resultados positivos (e indeterminados dos kits 2 e 3) do teste em cada doença, dividido pelo total de pacientes com a doença

De uma forma geral, o mesmo padrão de sensibilidade dos testes observado no grupo 1 como um todo foi reproduzido em cada doença em particular, ou seja, a IFI HEp-2, o kit 1 e o kit 3 apresentando desempenho semelhante, e o kit 4 com a menor sensibilidade dentre todos. Os kits 1 e 3 apresentaram sensibilidade superior à da IFI HEp-2 no LES (95,8%, 97,2% e 87,5%), na ES (kit 1 97,0% e IFI HEp-2 93,9%), e na DM/PM (kit 3 71,4% e IFI HEp-2 50,0%). A sensibilidade dos kits 2 e 4 foi particularmente baixa na DM/PM (14,3% e 0%, respectivamente).

No grupo 2, a especificidade da IFI HEp-2 foi de 72,3%, enquanto a especificidade dos outros testes variou entre 45,2% (kit 3) a 90,4% (kit 2). Os kits com maior sensibilidade foram os que tiveram a especificidade mais baixa, notadamente o kit 3. Por sua vez, os kits com menor sensibilidade foram os mais específicos (kits 2 e 4). Devido à limitação do número de testes disponíveis, apenas 87 indivíduos do grupo 4 foram testados no kit 1. Nessa população, a especificidade da IFI HEp-2 foi de 86,6%, um valor intermediário, portanto, em relação ao do kit menos específico (kit 3, 64,2%) e o do mais específico (kit 2, 94,0%).

Avaliando-se a especificidade dos testes em cada doença do grupo 2, chamou a atenção a baixa especificidade do kit 3 na AR (20,0%) e nas espondiloartrites (43,5%), e dos kits 1 e 3 na fibromialgia (37,5%) e na OA (20,0%). No subgrupo das doenças

infeciosas, o kit 2 foi o que apresentou a menor frequência de resultados falsos positivos (3 num total de 36, especificidade de 91,7%), comparada com uma especificidade entre 75,0% a 80,6% dos demais testes (tabela 4). Alguns testes tiveram uma frequência maior de resultados positivos em certas doenças. Das 7 amostras de pacientes com tuberculose pulmonar, 4 foram positivas na IFI HEp-2, 2 no kit 3 e nenhuma nos outros testes. De 8 amostras de pacientes com infecção/doença pelo HIV, 4 foram positivas no kit 4 e nenhuma na IFI. De 4 amostras de pacientes com doença de Chagas, 3 foram fortemente reativas no kit 1 e uma na IFI. Quaisquer outras associações particulares foram notadas na hepatite C e na dengue.

As distribuições dos títulos/concentrações dos testes em cada doença dos grupos 1 e 2 encontram-se representadas nas figuras de 7 a 11.

Tabela 4: Especificidade dos testes nos pacientes do grupo 2, conforme o diagnóstico

Doença	Amostra (n)	HEp-2	Kit 1	Kit 2	Kit 3	Kit 4
AR	40	24 (60,0%)	20 (50,0%)	34 (85,0%)	8(20,0%)	33 (82,5%)
Fibromialgia	24	17 (70,8%)	9 (37,5%)	21 (87,5%)	9 (37,5%)	21 (87,5%)
Espondiloartrites	23	18 (78,3%)	17 (73,9%)	22 (95,7%)	10 (43,5%)	22 (95,7%)
Vasculites	28	23 (82,1%)	19 (67,9%)	26 (92,9%)	15 (53,6%)	26 (92,9%)
Osteoartrite	10	6 (60,0%)	2 (20,0%)	9 (90,0%)	2 (20,0%)	9 (90,0%)
Gota	5	3 (60,0%)	5 (100%)	5 (100%)	3 (60,0%)	5 (100%)
Infeciosas	36	29 (80,6%)	27 (75%)	33 (91,7%)	28 (77,8%)	29 (80,6%)

n (%): Número de resultados negativos do teste em cada doença, dividido pelo total de pacientes com a doença

Figura 7: Distribuição dos títulos da IFI HEp-2 nos pacientes em cada doença dos grupos 1 (A) e 2 (B). Dados apresentados como box plots, onde os boxes representam os percentis de 25 a 75, a linha horizontal em cada box representa a mediana e as linhas verticais representam o título mínimo e o máximo. ○ indica *outlier* e ■ indica *far outlier*

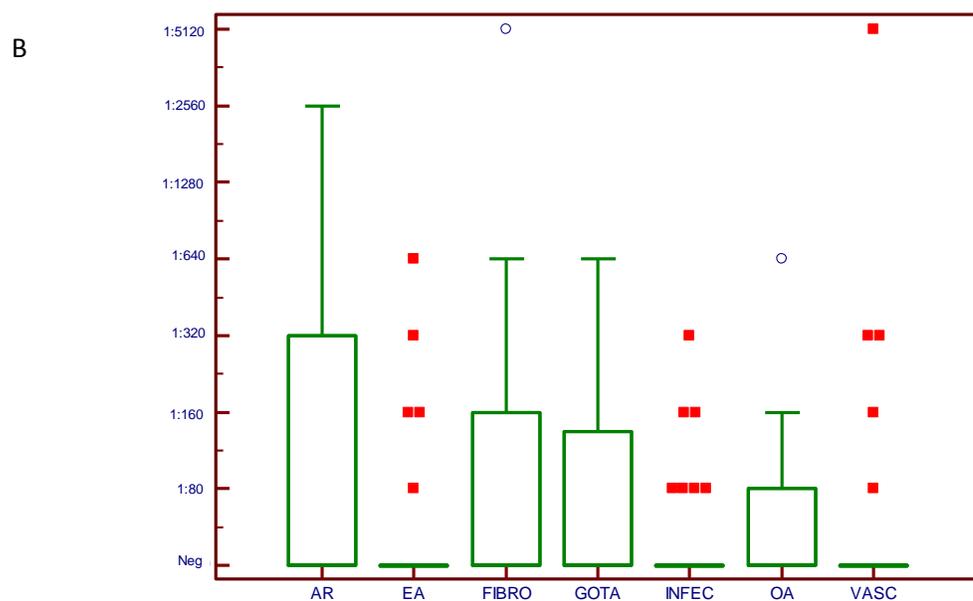
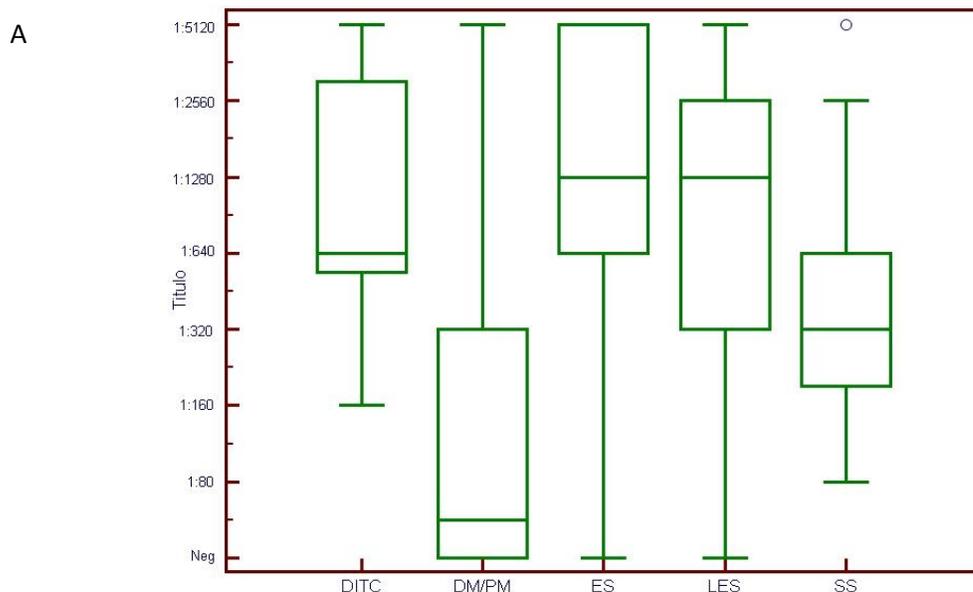
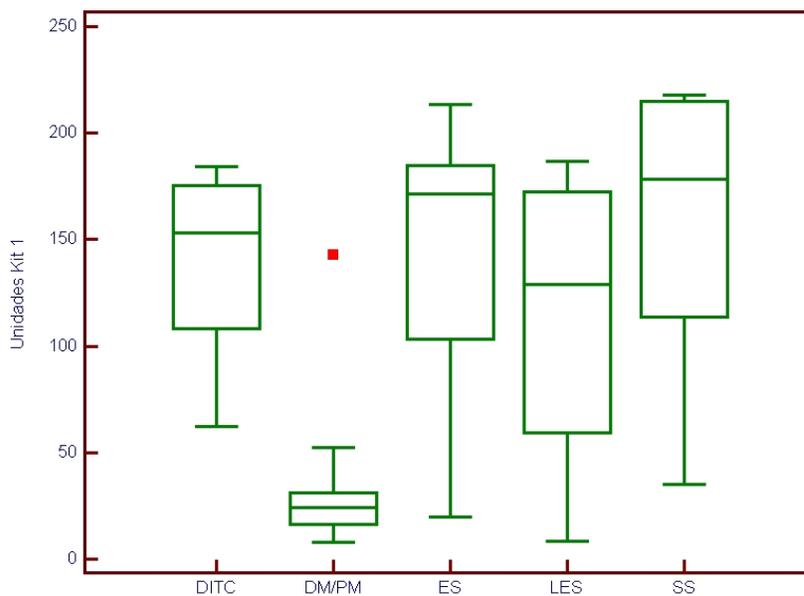


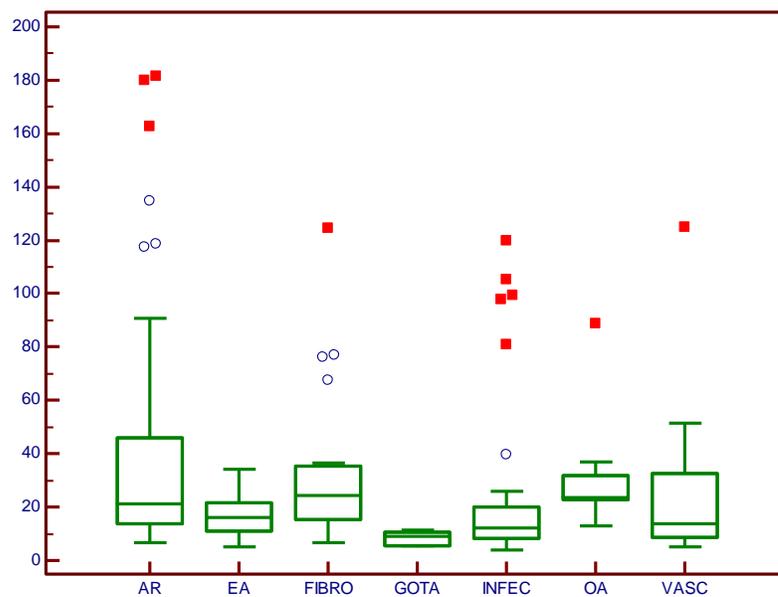
Figura 8: Distribuição das concentrações do kit 1 nos pacientes de cada doença dos grupos 1 (A) e 2 (B). Dados apresentados como box plots, onde os boxes representam os percentis de 25 a 75, a linha horizontal em cada box representa a mediana e as linhas verticais a concentração mínima e a máxima.

○ indica *outlier* e ■ indica *far outlier*

A

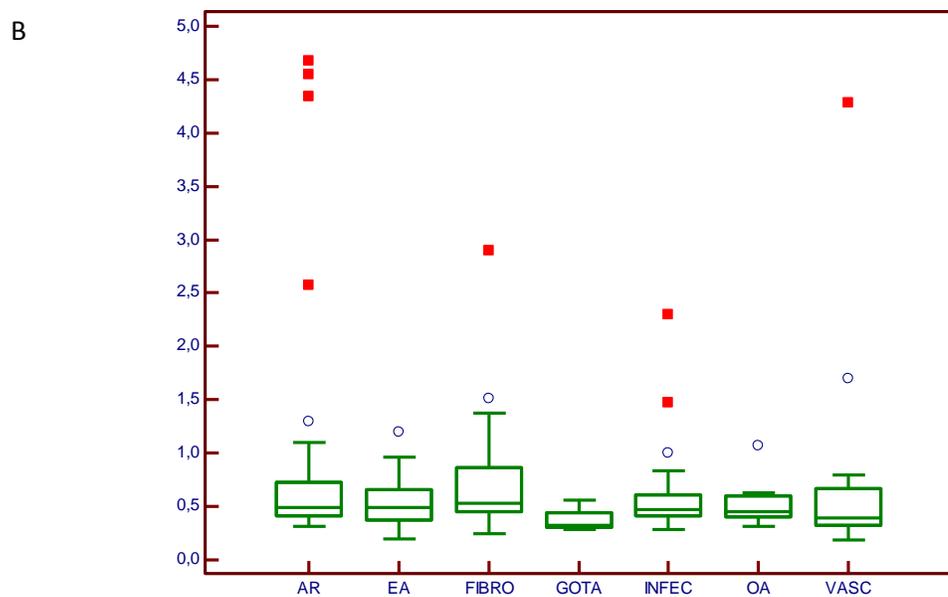
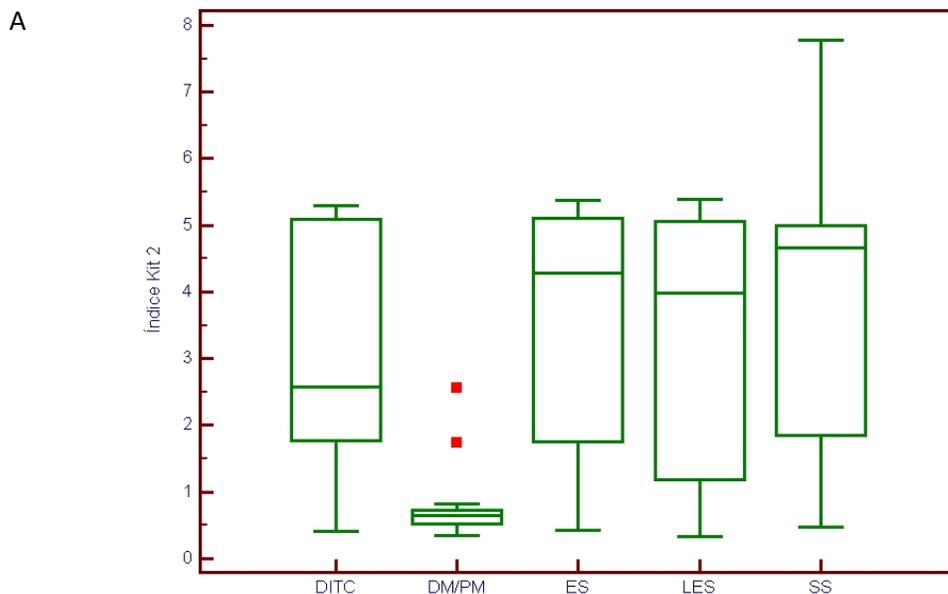


B



Figuras 9: Distribuição dos índices do kit 2 nos pacientes de cada doença dos grupos 1(A) e 2 (B). Dados apresentados como box plots, onde os boxes representam os percentis de 25 a 75, a linha horizontal em cada box representaa mediana e as linhas verticais o índice mínimo e o máximo.

○indica *outlier* e ■indica *far outlier*



Figuras 10: Distribuição das concentrações do kit 3 nos pacientes de cada doença dos grupos 1 (A) e 2 (B). Dados apresentados como box plots, onde os boxes representam os percentis de 25 a 75, a linha horizontal em cada box representa a mediana e as linhas verticais a concentração mínima e a máxima.

○ indica *outlier* e ■ indica *far outlier*

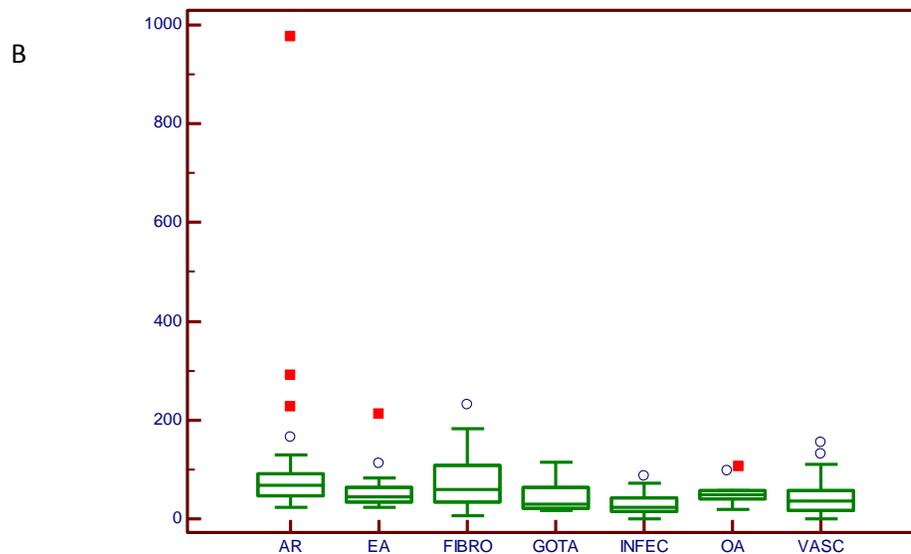
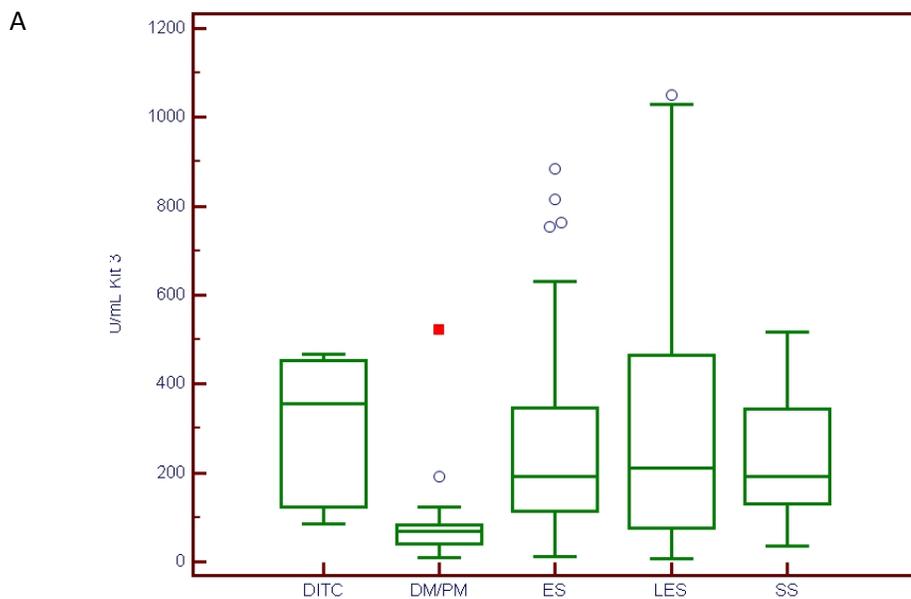
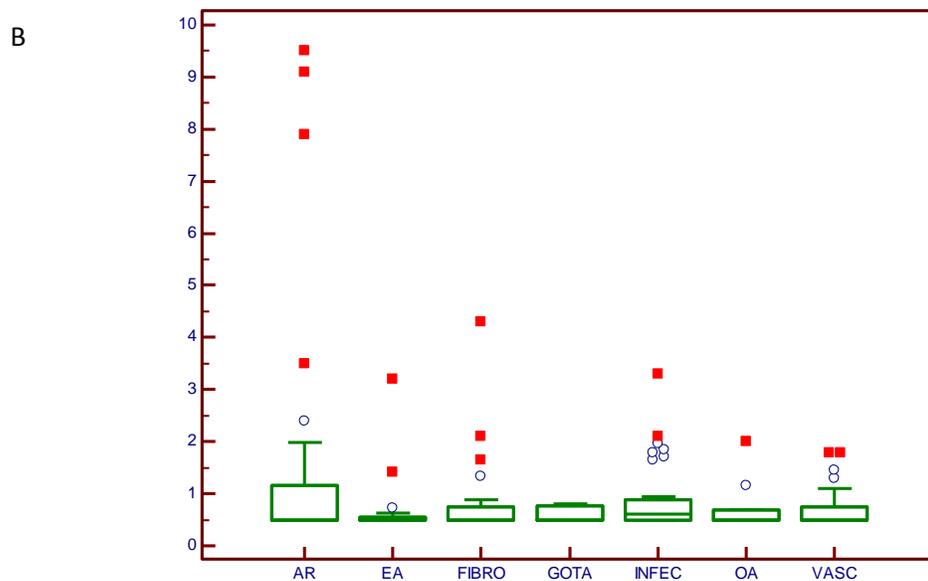
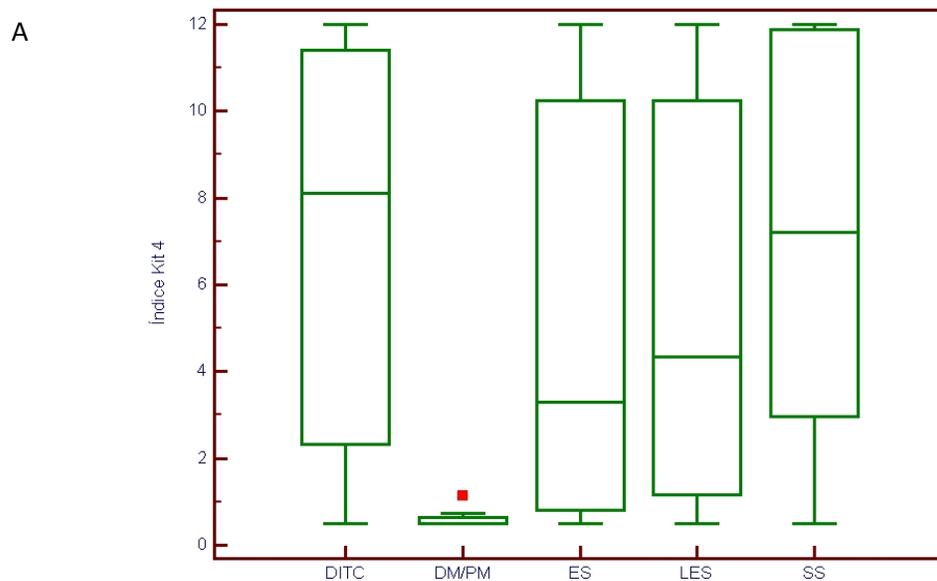


Figura 11: Distribuição dos índices do kit 4 nos pacientes de cada doença dos grupos 1 (A) e 2 (B). Dados apresentados como box plots, onde os boxes representam os percentis de 25 a 75, a linha horizontal em cada box representa a mediana e as linhas verticais o índice mínimo e o máximo.

○ indica *outlier* e ■ indica *far outlier*



5.2 Sensibilidade dos testes nos pacientes com LES de acordo com a atividade da doença

Alguns estudos sugerem relação entre a frequência de positividade da IFI HEp-2 em pacientes com diagnóstico estabelecido de LES e a atividade da doença¹⁵⁰. Como 57,0% dos pacientes com LES estavam com doença inativa no momento da coleta de sangue, a sensibilidade dos testes foi avaliada separadamente em pacientes com doença ativa e inativa (tabela 5). Apesar de não terem sido detectadas, para nenhum dos testes avaliados, diferenças significativas de sensibilidade de acordo com a atividade da doença, uma tendência de maior positividade do kit 2 foi observada no grupo de pacientes com LES ativo, tendo até mesmo o último kit apresentado sensibilidade discretamente superior à IFI HEp-2 nesse grupo.

Tabela 5: Sensibilidade dos testes nos pacientes com LES, de acordo com a atividade da doença (doença ativa se SLEDAI 2K \geq 4)

LES	Amostra (n)	HEp-2	Kit 1	Kit 2	Kit 3	Kit 4
Ativo	31	28 (90,3%)	31 (100%)	29 (93,6%)	31 (100%)	24 (77,4%)
Inativo	41	35 (85,4%)	38 (92,7%)	31 (75,6%)	39 (95,1%)	25 (61,0%)
p	-	0,723	0,254	0,089	0,503	0,220

n (%): sensibilidade = número de resultados positivos (e indeterminados dos kits 2 e 3) do teste dividido pelo total de pacientes em cada grupo

5.3 Estudo da concordância

No estudo da concordância entre os testes, realizado com os resultados dos pacientes dos grupos 1 e 2, a IFI HEp-2 foi utilizada como o padrão de comparação para os demais kits (tabela 6). O índice kappa variou de 0,395 (IFI HEp-2 vs kit 3), indicando uma concordância regular entre os testes, a 0,581 (IFI HEp-2 vs kit 2), indicando uma

concordância moderada entre os testes. Nenhum kit atingiu um bom nível de concordância com a IFI HEp-2. As principais causas de discordância dos kits em relação à IFI HEp-2 foram: resultados positivos no kit 1 e negativos na IFI (53 amostras), resultados negativos no kit 2 e positivos na IFI (56 amostras), resultados positivos no kit 3 e negativos na IFI (71 amostras) e resultados negativos no kit 4 e positivos na IFI (77 amostras).

Tabela 6: Avaliação da concordância entre a IFI HEp-2 e os outros testes pela estatística kappa

	Kit 1	Kit 2	Kit 3	Kit 4
HEp-2	0,485	0,581	0,395	0,409
IC95%	0,388-0,583	0,496-0,667	0,297-0,493	0,317-0,409

5.4 Análise dos resultados discrepantes entre a IFI HEp-2 e os outros testes

Dos pacientes com DRAI, 14 apresentaram resultados negativos do FAN na IFI HEp-2 e positivos em pelo menos um dos outros testes (tabela 7). A maioria desses pacientes tinha diagnóstico de LES, sendo os resultados positivos observados principalmente com os kits 1 e 3. Apenas um paciente com PM apresentou FAN positivo na IFI HEp-2 (padrão de fluorescência nuclear pontilhado fino, título 1:320) e negativo em todos os demais métodos.

Tabela 7: Frequência de resultados negativos na IFI HEp2 e positivos em pelo menos um dos kits, nos pacientes com DRAI

Doença	Amostra (n)	Kit 1	Kit 2	Kit 3	Kit 4
LES	9	9	6	8	2
ES	1	1	0	0	0
DITC	2	2	2	2	2
DM/PM	2	2	0	2	0
Total	14	14	8	12	4

Dos pacientes com diagnóstico de outras doenças reumáticas, 27 apresentaram resultados negativos do FAN na IFI HEp-2 e positivos em pelo menos dois outros testes (tabela 8). A maioria desses pacientes tinha diagnóstico de fibromialgia, sendo os resultados positivos observados principalmente com os kits 1 e 3. Oito pacientes com diagnóstico de outras doenças reumáticas tiveram resultados positivos do FAN na IFI HEp-2 e negativos em todos os outros testes (3 com fibromialgia, 3 com espondiloartrite, 1 com AR e 1 com OA), sendo os seguintes padrões de fluorescência e títulos observados: nucleolar homogêneo (5 pacientes, títulos de 1:160 a 1:1280), pontilhado fino (2 pacientes, título de 1:640) e pontilhado grosso reticulado (1 paciente, título 1:80).

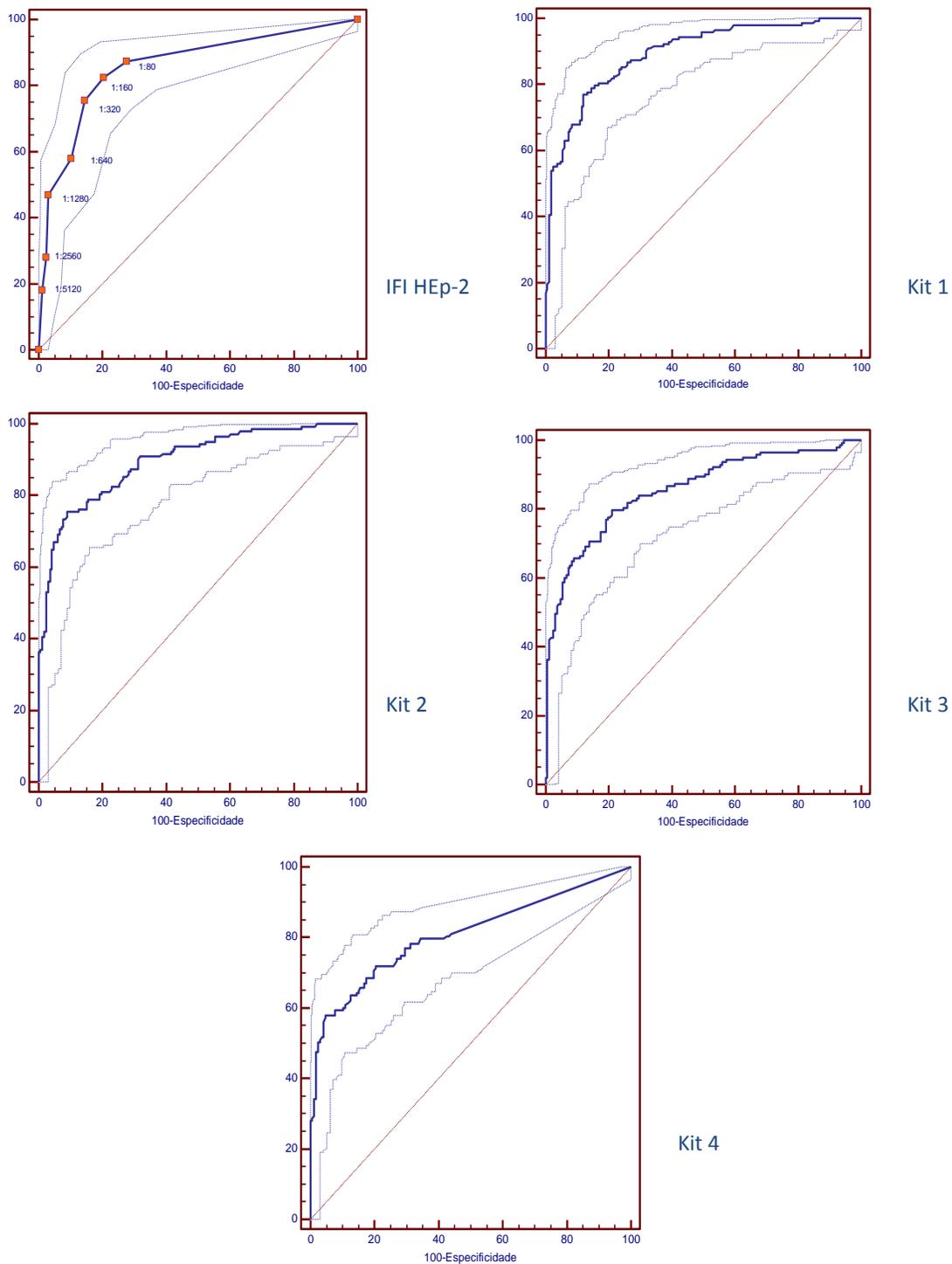
Tabela 8: Frequência de resultados negativos na IFI HEp-2 e positivos em pelo menos dois dos kits, nos pacientes com outras doenças reumáticas

Doença	Amostra (n)	Kit 1	Kit 2	Kit 3	Kit 4
Fibromialgia	12	12	1	11	5
AR	6	6	0	6	1
OA	3	3	0	3	1
Vasculite	6	5	1	6	1
Total	27	26	2	26	8

5.5 Estudo da acurácia dos testes pela análise por curva ROC e determinação de valores de corte ótimos

Pela análise por curva ROC, todos os testes avaliados tiveram um bom desempenho para discriminar entre as doenças do grupo 1 e as doenças do grupo 2 (figura 9 e tabela 9). A maior área sob a curva foi a do kit 2 (AUC = 0,897) e a menor foi a do kit 4 (AUC = 0,807). A área sob a curva do kit 1 foi de 0,893 e a do kit 3 foi de 0,856). As diferenças entre a área sob a curva da IFI HEp-2 (AUC = 0,859) e a dos outros testes não foram estatisticamente significativas (IFI vs kit 1 $p=0,224$; IFI vs kit 2 $p=0,168$; IFI vs kit 3 $p=0,921$ e IFI vs kit 4 $p=0,113$). Na comparação entre as áreas sob a curva dos kits 1 a 4, apenas a do kit 4 foi considerada significativamente diferente em relação a do kit 1 ($p<0,006$) e a do kit 2 ($p<0,003$).

Figura 12: Análise da curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*) dos testes para discriminar os pacientes do grupo 1 e 2



Para a IFI HEp-2, a diluição de 1:160 foi a que apresentou o melhor compromisso entre sensibilidade e especificidade. Salvo o kit 2, todos os valores de corte ótimos estabelecidos para os demais kits foram superiores aos recomendados pelos fabricantes e associados com reduções importantes da sensibilidade diagnóstica (tabela 9). Com a exceção do kit 3, os valores de corte ótimos estabelecidos para os outros kits resultaram em RV + >5, a qual caracteriza um teste diagnóstico como muito útil.

Tabela 9: Área sob a curva ROC e valor de corte ótimo dos testes, com as respectivas sensibilidades, especificidades, razões de verossimilhança positiva e negativa, calculados com base nos resultados obtidos nos pacientes dos grupos 1 e 2 (IC95%)

	HEp-2	Kit 1	Kit 2	Kit 3	Kit 4
Área sob a curva	0,859* (0,817-0,900)	0,893* (0,858-0,929)	0,897* (0,862-0,931)	0,856* (0,813-0,899)	0,807* (0,758-0,856)
Valor de corte†	1:160 1:40	51,4 U > 20,0 U	1,0 >1,2	75,3 U/mL > 50,0 U/mL	2,1 >1,5
Sensibilidade	82,5% (75,3-88,4)	76,9% (69,1-83,6)	75,5% (67,6-82,3)	79,7% (72,2-86,0)	58,4% (49,5-66,2)
Especificidade	79,5% (72,6-85,4)	88% (82-92,5)	91% (85,5-94,9)	78,9% (71,9-84,9)	95,2% (90,7-97,9)
RV+	5,22 (4,7-5,8)	6,38 (5,7-7,1)	8,36 (7,5-9,3)	3,78 (3,4-4,2)	12,04 (10,4- 13,9)
RV-	0,29 (0,2-0,5)	0,26 (0,2-0,4)	0,27 (0,2-0,5)	0,26 (0,2- 0,4)	0,44 (0,2-0,9)

p<0,0001

† (): valor do fabricante

5.6 Estabelecimento de intervalos de resultados de acordo com diferentes razões de verossimilhança

Com base na observação acima e considerando-se que, geralmente, as DRAI estão relacionadas com concentrações séricas mais elevadas de autoanticorpos e, por conseguinte, com resultados mais altos do FAN nos testes de triagem, quando comparadas com outras doenças reumáticas e com a população saudável, intervalos de resultados correspondentes a diferentes RV+ e RV- foram estabelecidos para todos os testes (tabela 10).

Tabela 10: Intervalos de resultados dos testes de acordo com diferentes razões de verossimilhança positiva e negativa

	RV+ \leq 2	RV+ >2 - \leq 5	RV+ > 5	RV- < 0,2
HEp-2 (título)	-	1:80-1:160	\geq 1:320	< 1:80
Kit 1 (U)	até 18,8	> 18,8-39,6	> 39,6	< 30,5
Kit 2 (índice)	até 0,48	> 0,48-0,83	>0,83	< 0,62
Kit 3 (U/mL)	até 49,8	> 49,8- 92,0	> 92,0	< 47,2
Kit 4 (índice)	até 0,57	> 0,57- 1,47	> 1,47	-

5.7 Frequência de resultados positivos no grupo 4

Uma proporção significativa dos indivíduos do grupo 4 teve resultados positivos do FAN, sendo a menor frequência observada com o kit 2 (6,0%) e a maior frequência com o kit 3 (35,8%, tabela 11).

Tabela 11: Frequência de resultados positivos em cada teste no grupo 4

Amostra (n)	HEp-2	Kit 1*	Kit 2	Kit 3	Kit 4
134	18 (13,4%)	18 (20,7%)	8 (6,0%)	48 (35,8%)	16 (11,9%)
IC 95%	7,6-19,2	12,2-29,2	2,0-10,0	27,7-43,9	6,4-17,4

*Em um total de 87 indivíduos testados

Utilizando-se a diluição de triagem de 1:80 como valor de corte, a positividade da IFI HEp-2 no grupo 4 foi de 13,4% (tabela 12), não tendo sido observada diferença de prevalência entre os gêneros feminino e masculino (15,5% e 11,1%, respectivamente; $p=0,6251$, χ^2). A frequência de resultados positivos da IFI HEp-2 foi semelhante nos diferentes estratos etários (12,1% de 18 a 30 anos, 14,3% de 31 a 40 anos, 12,8% de 41 a 50 anos e 14,8% de 51 a 69 anos; $p=0,8237$, χ^2 para tendência).

Tabela 12: Frequência de resultados positivos da IFI HEp-2 em 134 indivíduos do grupo 4, conforme a diluição de triagem

	Diluição			
	1:80	1:160	1:320	1:640
Número	18	8	5	2
Frequência	13,4%	6,0%	3,7%	1,5%

Em relação à distribuição dos títulos nos indivíduos saudáveis, houve predomínio de baixos títulos (1:80 e 1:160), embora 27,7% dos resultados positivos tenham ocorrido em títulos $\geq 1:320$, considerados moderados a altos (tabela 13). Os padrões de fluorescência mais comuns foram o nuclear pontilhado fino, presente em 11 indivíduos (61,1%), e o nuclear pontilhado fino denso, presente em 4 indivíduos (22,2%).

Tabela 13: Distribuição dos padrões de fluorescência e dos títulos da IFI HEp-2 em 18 indivíduos saudáveis

Padrão	Título				Total
	1:80	1:160	1:320	1:640	
NPF	6	3	2	0	11 (61,1%)
NPFD	2	0	1	1	4 (22,2%)
Nucleolar	2	0	0	0	2 (11,1%)
Centromérico	0	0	0	1	1 (5,6%)
Total	10 (55,6%)	3 (16,7%)	3 (16,7%)	2 (11,0%)	18 (100%)

NPF = nuclear pontilhado fino

NPFD = nuclear pontilhado fino denso

5.8 Determinação do título anormal do FAN

Os títulos/concentrações anormais do FAN de todos os testes, definidos como os resultados equivalentes ao percentil 95 dos valores encontrados na população do grupo 4, estão apresentados na tabela 14. Para a IFI HEp-2, esse título correspondeu à diluição de triagem de 1:160. Para os kits 1, 3 e 4, o título anormal do FAN correspondeu a um resultado que variou entre 2 a quase 5 vezes o valor de corte proposto pelo fabricante. A frequência de resultados positivos do FAN nos 72 pacientes com diagnóstico de LES, após o estabelecimento do título anormal, foi a seguinte: IFI HEp-2, 59 positivos (81,9%), kit 1, 44 positivos (61,1%), kit 2, 57 positivos (79,2%), kit 3, 50 positivos (69,4%) e kit 4, 40 positivos (55,6%).

Tabela 14: Título/concentração anormal do FAN para cada teste, com as respectivas sensibilidades, especificidades, razões de verossimilhança positiva e razões de verossimilhança negativa (IC95%)

Teste	T/C*	Sensibilidade†	Especificidade‡	RV+	RV-
HEp-2	1:160	82,5% (75,3-88,4)	79,5% (72,6-85,4)	5,22 (4,7-5,8)	0,29 (0,2-0,5)
Kit 1	98,3 U	63,0% (54,5 a 70,9)	94,0% (89,2 a 97,1)	10,5 (9,2 a 11,9)	0,4 (0,2 a 0,7)
Kit 2	1,1	73,4% (65,4 a 80,5)	92,3% (87,0 a 95,8)	9,4 (8,4 a 10,4)	0,29 (0,2 a 0,5)
Kit 3	79,3 U/mL	76,9% (69,1 a 83,6)	80,7% (73,9 a 86,4)	4,0 (3,6 a 4,5)	0,29 (0,2 a 0,4)
Kit 4	3,2	51,8% (43,2 a 60,2)	96,4% (92,3 a 98,7)	14,3 (12,2 a 16,8)	0,5 (0,2 a 1,1)

T/C = título/concentração

*Estabelecido como o percentil 95 dos títulos/concentração de cada teste encontrado no grupo 4

†Número de resultados positivos nos pacientes do grupo 1 dividido pelo total de pacientes desse grupo

‡Número de resultados negativos do teste nos pacientes do grupo 2 dividido pelo total de pacientes desse grupo

5.9 Avaliação do painel de soros de referência do CDC

Onze soros de referência do CDC, cada um contendo anticorpos contra antígenos específicos, foram testados com o objetivo de avaliar a capacidade dos testes em detectar diferentes autoanticorpos com relevância clínica definida. Cada soro de referência, o seu respectivo anticorpo específico, bem como o resultado dos testes estão descritos no quadro 6. A IFI HEp-2, o kit 1 e o kit 3 falharam em detectar um soro de referência cada (anti-ribossomalP, anti-fibrilarina e anti-Jo-1, respectivamente). O kit 2 não detectou dois soros de referência (anti-fibrilarina e anti-ribossomal) e o kit 4 não detectou três soros (anti-dsDNA, anti-fibrilarina e anti-ribossomal P). Os soros de referência contendo anticorpos anti-SSA/Ro, anti-SSB/La, anti-Sm, anti-U1-RNP, anti-centrômero e anti-Scl-70 foram reconhecidos por todos os testes.

Quadro 6: Reatividade dos testes frente aos soros de referência AF/CDC

Soro	Descrição	HEp-2	Kit 1	Kit 2	Kit 3	Kit 4
1	Homogêneo*	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
2	SSB/La	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
3	Pontilhado†	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
4	U1-RNP	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
5	Sm	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
6	Nucleolar‡	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
7	SSA/Ro	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
8	Centrômero	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
9	Scl-70	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
10	Jo-1	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo
12	Ribossomal P	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo

*dsDNA

†U1-RNP, SSA/Ro e SSB/La

‡Fibrilaria

5.10 Sensibilidade, especificidade e valores preditivos dos testes no grupo 3

No grupo 3, de 91 pacientes inicialmente recrutados, um paciente com diagnóstico de fibromialgia e um paciente com lombociatalgia foram excluídos, devido à hemólise intensa das amostras. A frequência de DRAI foi de 28,1% (25 pacientes com diagnóstico final de DRAI em um total de 89 avaliados). O LES e a DITC foram as DRAIs mais frequentes, não tendo sido diagnosticado nenhum caso de SS ou DM/PM (tabela 15). Com relação às outras doenças, a fibromialgia foi o diagnóstico isolado mais prevalente, seguido da osteoartrite e artrite reumatóide. Um grupo diagnóstico comum também prevalente foi representado por doenças e/ou sinais e sintomas que fazem parte do espectro das DRAIs, mas que estavam presentes como única manifestação na ocasião do estudo, sem preencher qualquer critério de classificação específico adicional (miscelânea). O diagrama relacionando os resultados de cada teste nos pacientes do grupo 3 com a presença ou ausência de DRAI encontra-se representado na figura 13.

Figura 13: Resultados do FAN na IFI HEp-2 e nos kits de 1 a 4, em 89 pacientes com suspeita de DRAI

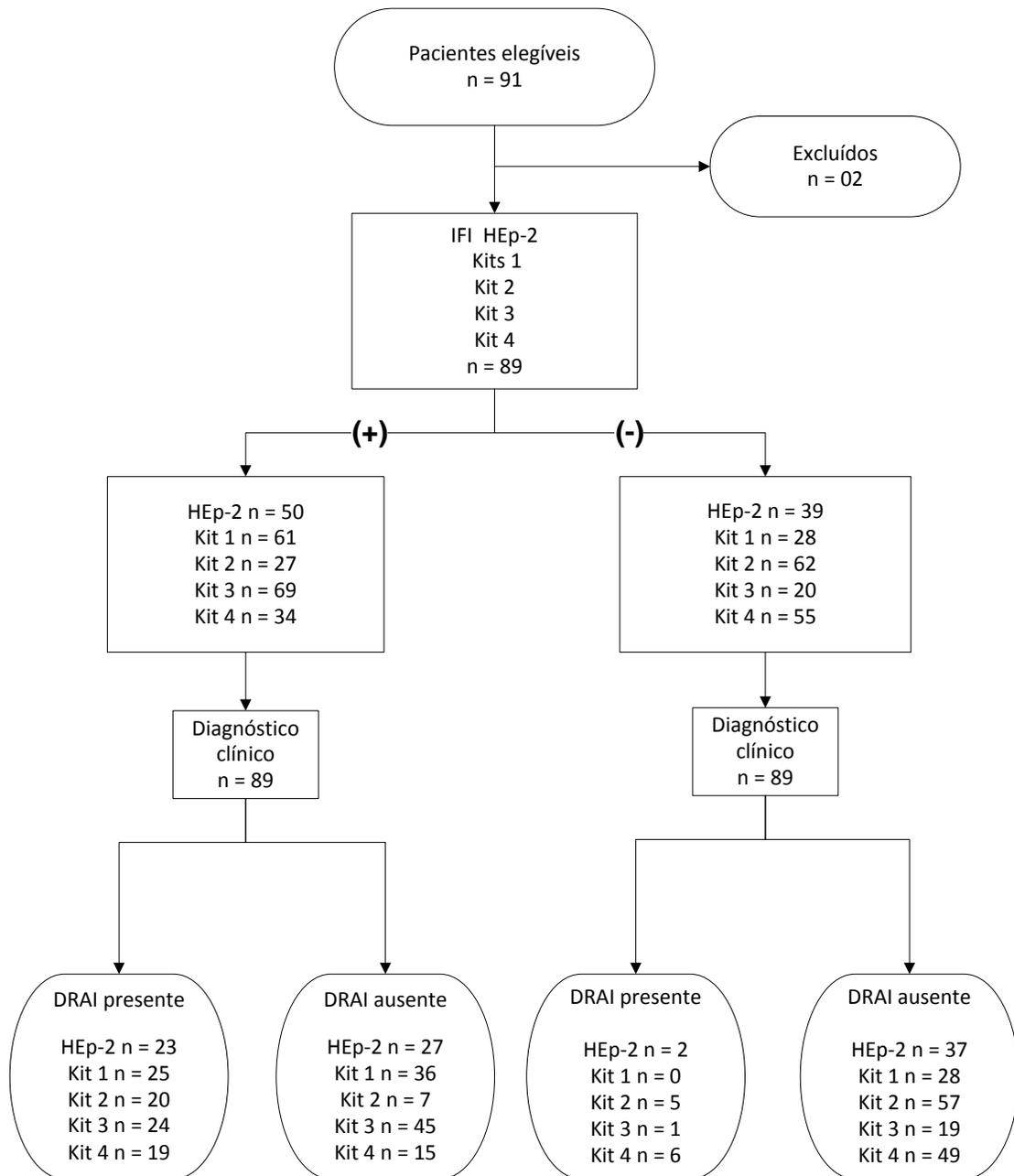


Tabela 15: Número de resultados positivos de cada teste de acordo com o diagnóstico final dos pacientes do grupo 3

Diagnóstico	Número	HEp-2	Kit 1	Kit 2	Kit 3	Kit 4
LES	13	13	13	12	13	12
DITC	11	9	11	7	10	6
ES	1	1	1	1	1	1
AR	8	5	7	2	8	4
Fibromialgia	20	11	11	3	15	4
OA	8	3	3	0	5	0
Espondiloartrite	2	1	1	0	2	0
Vasculite	3	0	2	0	1	0
Miscelânea†	23	7	12	2	14	7

†Inclui artrite indiferenciada, fenômeno de Raynaud primário, ceratoconjuntivite seca, trombose de seio cavernoso, neurite óptica, sarcoidose cutânea, uveíte anterior aguda, uveíte intermediária, lúpus cutâneo subagudo, lúpus cutâneo discóide, eritema nodoso, hanseníase, dermatite inespecífica, doença intersticial pulmonar, distúrbio do humor, lesão de ligamento colateral do joelho, cervicobraquialgia, tenossinovite e lombalgia

A maior sensibilidade diagnóstica foi observada com os kits 1 e 3. A menor sensibilidade da IFI HEp-2 (92%) em relação aos kits 1 e 3 (100% e 96%, respectivamente) foi devido à presença de dois pacientes com diagnóstico de DITC, anticorpos anti-SSA/Ro persistentemente positivos, resultados negativos do FAN na IFI HEp-2 e positivos nesses kits (incluindo também os kits 2 e 4, tabela 16). É importante frisar que esses pacientes foram encaminhados já tendo realizado a IFI HEp-2 em outro laboratório, cujo resultado também foi negativo. A sensibilidade da IFI HEp-2, do kit 1 e do kit 3 no LES foi de 100%. Somente uma única paciente com LES e anticorpo anti-ribossomal P apresentou resultado negativo nos kits 2 e 4.

A especificidade dos testes no grupo 3 foi mais baixa que a estabelecida nos pacientes do grupo 2, provavelmente refletindo tanto a maior probabilidade que pacientes com FAN positivo tem de ser referenciados para o reumatologista, quando

comparados a pacientes com FAN negativo, quanto os critérios de inclusão adotados no presente estudo. Mais uma vez, os kits 1 e 3 foram os menos específicos e os kits 2 e 4 os mais específicos, com a IFI HEp-2 ocupando uma posição intermediária (tabela 16).

A sensibilidade mais alta dos testes nos pacientes com DRAI do grupo 3 se traduziu em altos VPNs, variando entre 89,3% para o kit 4 a 100% para o kit 1 (tabela 16). Apesar da elevada frequência de DRAI nesse grupo, o VPP da maioria dos testes foi baixo, principalmente o do kit 1 (41%) e do kit 3 (33,8%), refletindo a baixa especificidade e, portanto, elevado número de resultados “falsos positivos”. O kit 2 foi o que apresentou VPP mais alto (74,1%).

Tabela 16: Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo dos testes nos pacientes do grupo 3 (IC95%)

Grupo	Amostra (n)	HEp-2	Kit 1	Kit 2	Kit 3	Kit 4
Sensibilidade *	25	23 (92,0%) (68,8-97,5)	25 (100%) (86,3-100)	20 (80,0%) (59,3-93,2)	24 (96,0%) (79,6-99,9)	19 (76,0%) (54,9-90,9)
Especificidade †	64	37 (57,8%) (44,8-70,1)	28 (43,8%) (31,4-56,7)	57 (89,1%) (78,8-95,5)	19 (26,6%) (16,3-39,1)	49 (78,1%) (66-87,5)
VPP‡	-	44,9% (30,7-59,8)	41,0% (28,6-54,3)	74,1% (53,7-88,9)	33,8% (22,9-46,1)	57,6% (39,2-74,5)
VPN§	-	92,5% (79,9-98,4)	100% (87,7-100)	91,9% (82,1-97,4)	94,4% (72,7-99,9)	89,3% (78,1-96,0)

* n (%): Calculada como número de resultados positivos (e indeterminados dos kits 2 e 3) nos pacientes com diagnóstico final de DRAI

† n (%): Calculada como número de resultados negativos nos pacientes com diagnóstico final de outras doenças

‡VPP = resultados positivos (e indeterminados dos kits 2 e 3) nos pacientes com DRAI dividido pelo total de resultados positivos (e indeterminados dos kits 2 e 3) no grupo 3

§VPN = resultados negativos nos pacientes sem DRAI dividido pelo total de resultados negativos no grupo 3

VPP e VPN calculados com base em uma frequência de DRAI de 28,1%

6 DISCUSSÃO

O presente estudo teve como principal objetivo comparar as propriedades diagnósticas de um ensaio quimiluminescente e três kits ELISA, com metodologia e composição antigênica distintas, para a detecção do FAN. Para tanto, foram avaliados um grupo de pacientes com diagnóstico de doença reumática definida, um grupo de pacientes e/ou amostras com diagnóstico de doenças infecciosas e um grupo de pacientes para os quais o FAN foi solicitado como parte da avaliação diagnóstica inicial.

O cenário ideal para se avaliar o desempenho de um novo teste diagnóstico é aquele semelhante à prática clínica, ou seja, aplicando-o a um grupo de pacientes com suspeita de determinada condição clínica, em paralelo com o teste habitualmente empregado nessa situação, utilizando como padrão-ouro de comparação o diagnóstico clínico³⁰. Nessa situação, é possível determinar a prevalência das DRAIs e calcular a sensibilidade, especificidade, o valor preditivo positivo e o valor preditivo negativo de cada teste. Como a maioria das DRAI apresenta baixa incidência e prevalência na população geral, para alcançar o objetivo proposto foi necessário testar um grupo de pacientes com diagnóstico estabelecido. Excetuando a idade, não houve nenhum critério pré-estabelecido de seleção dos pacientes, sendo parte das amostras colhida de doentes em tratamento e/ou com a doença inativa. Entretanto, o estudo de pacientes com doença estabelecida é útil para a comparação do desempenho diagnóstico dos diferentes testes avaliados.

Devido à baixa sensibilidade diagnóstica de algumas plataformas *multiplex* comerciais e do relato de casos de pacientes com LES e atraso no diagnóstico pela ocorrência de resultados falsos negativos do FAN em imunoenaios diferentes da IFI, recentemente o ACR recomendou a IFI HEp-2 como o método de escolha para a pesquisa do FAN²⁹. Como o atraso no tratamento de algumas DRAIs pode ter conseqüências clínicas devastadoras, deve-se priorizar o emprego de métodos de triagem do FAN com alta sensibilidade¹⁴. Contudo, resultados falsos negativos do FAN em pacientes com DRAI também podem ocorrer com a IFI HEp-2, particularmente na presença de anticorpos anti-SSA/Ro, anti-ribossomal P e anti-sintetases^{45,86}.

A maioria dos estudos de avaliação da acurácia de testes diagnósticos apresenta limitações metodológicas importantes que impedem a interpretação adequada e a generalização dos achados⁸⁷. Geralmente, os estudos que mostraram um desempenho superior da IFI consideraram-na como padrão-ouro diagnóstico e não o diagnóstico clínico; avaliaram somente grupos de pacientes com diagnósticos definidos de doenças reumáticas autoimunes; utilizaram como grupo controle somente indivíduos saudáveis e testaram somente um método de imunoensaio^{53,54,88,89,90}.

O valor diagnóstico do teste do FAN não está na capacidade de prever a presença de um autoanticorpo, mas sim na capacidade de prever a doença⁵¹. Sabe-se que determinados padrões de fluorescência da IFI HEp-2 estão intimamente associados com a presença de DRAs, enquanto outros padrões ocorrem indiscriminadamente tanto em indivíduos doentes quanto saudáveis^{3,36,91}. Os estudos mostram que alguns kits ELISA podem não identificar soros com padrões de fluorescência como nucleolar, membrana nuclear, aparelho mitótico e nuclear tipos pontos isolados⁹². É importante salientar que as correlações entre certos autoanticorpos e determinados sintomas ou doenças específicas foram feitas a partir do estudo de pacientes com diagnóstico definido de doença reumática autoimune. Quando se estuda a associação de diferentes anticorpos com determinados sintomas ou doenças, a partir de pacientes selecionados com base na presença inicial de autoanticorpos, essas correlações podem não ser observadas⁹³. É o que acontece em um laboratório geral, em que grande parte dos pacientes que realizam o teste de FAN tem baixa probabilidade pré-teste de doença reumática autoimune.

Khan e colaboradores avaliaram o significado clínico da presença de anticorpos com padrão de fluorescência nucleolar em células HEp-2, em uma população não selecionada de pacientes consecutivos, encaminhados para a pesquisa de FAN. Um total de 104 pacientes apresentou padrão nucleolar⁹⁴. Os diagnósticos clínicos da maioria dos pacientes foram de doença hepática, anemia e câncer, sendo que dois pacientes foram diagnosticados com esclerose sistêmica. Os autores concluíram que, apesar dos anticorpos antinucleolares serem clinicamente importantes em alguns grupos de pacientes, como os portadores de esclerose sistêmica, em um uma

população de pacientes não selecionados, a presença e o subtipo de fluorescência dos anticorpos nucleolares foram pouco específicos para o diagnóstico de esclerose sistêmica.

Os trabalhos bem delineados do ponto de vista metodológico mostraram que alguns kits ELISA apresentaram desempenho equivalente ao da IFI HEp-2 para a triagem de autoanticorpos, mas a escolha entre os dois métodos dependeria das características do laboratório^{55,56}. De acordo com Bernardini, a IFI seria a primeira escolha para laboratórios que têm rotinas menores, técnica bem padronizada, além de observadores experientes e treinados⁵⁰. Por outro lado, o ELISA ou outro método equivalente seria a primeira escolha para laboratórios que processam um grande número de exames, devido à possibilidade de automação e rapidez na liberação de resultados objetivos e quantitativos.

Os resultados do nosso estudo demonstraram claramente que, utilizando-se o diagnóstico clínico como padrão de comparação, a sensibilidade diagnóstica de alguns kits ELISA foi comparável a da IFI HEp-2 (90,0% para os kits 1 e 3 e 87,4% para a IFI), enquanto a sensibilidade diagnóstica de outros testes foi baixa (76,2% para o kit 2 e 62,9% para o kit 4). A sensibilidade do kit 1 e do kit 3 no LES, na ES e na DM/PM foi até mesmo superior à da IFI. Portanto, esses kits podem ser utilizados para a triagem do FAN como uma alternativa à IFI HEp-2.

A alta sensibilidade do kit 1 pode ser resultado tanto do tipo de substrato utilizado, composto por uma variedade de antígenos específicos purificados associados a extrato do núcleo e nucléolos das células HEp-2, quanto da escolha de um valor de corte mais baixo pelo fabricante, visando garantir a menor frequência possível de resultados falsos negativos nas DRAIs.

Por sua vez, a alta sensibilidade do kit 3 pode ser resultado do tipo de substrato utilizado, o núcleo integral das células HeLa ligado de forma covalente à microplaca. As células HeLa são uma linhagem de células epiteliais imortalizadas derivadas de carcinoma cervical, com características antigênicas semelhantes às células HEp-2. O procedimento de sensibilização das microplacas com o substrato desenvolvido pelo fabricante também pode ter contribuído para a alta sensibilidade do teste,

provavelmente por manter os antígenos em sua distribuição topográfica e conformação nativa. Este kit é o único a utilizar um conjugado polivalente, capaz de detectar autoanticorpos das classes IgA, IgG e IgM. Entretanto, para a pesquisa do FAN recomenda-se a utilização de conjugado específico para IgG^{1,38,96}. No LES, em torno de 96% do FAN é da classe IgG, 35% da classe IgM e 16% da classe IgA⁹⁷. Não há evidências de que a pesquisa do FAN das classes IgA e IgM resulte em maior sensibilidade diagnóstica para o LES ou outras DRAIs⁹⁶. Porém, 4% dos pacientes com DRAI produzem quantidades significativas de FAN da classe IgM⁹⁸. Assim, conjugados polivalentes também podem ser utilizados, mas eles estão associados com uma redução da especificidade do teste, pois detectam uma porcentagem maior de autoanticorpos sem significado clínico, especialmente autoanticorpos da classe IgM associados com AR, drogas e com a idade avançada⁹⁶. Contudo, não há como descartar que, ocasionalmente, os autoanticorpos das classes IgA e/ou IgM sejam os únicos presentes no soro de alguns pacientes com DRAI. Dessa forma, os testes com conjugados polivalentes poderiam detectar alguns pacientes adicionais com DRAI, mesmo que ao custo de uma especificidade mais baixa.

Os kits 2 e 4 apresentaram baixa sensibilidade principalmente na ES e na DM/PM. Na esclerose sistêmica, a maioria dos resultados falsos negativos ocorreu nos pacientes com padrão de fluorescência nucleolar na IFI HEp-2. Entre 15% a 40% dos pacientes com ES apresentam anticorpos antinucleolares^{99,100}. O método de escolha para a pesquisa desses anticorpos é a radioimunoprecipitação de RNA e proteínas, disponível apenas em centros de pesquisa^{101,102}. Steen e colaboradores sugerem que, na ES, a presença do padrão de fluorescência nucleolar na IFI HEp-2 define um subgrupo de pacientes com alta prevalência de hipertensão pulmonar associada à fibrose pulmonar grave¹⁰¹. Como métodos diagnósticos específicos para a pesquisa da maioria dos autoanticorpos nucleolares ainda não são comercialmente disponíveis e alguns imunoensaios alternativos não possuem esses antígenos em sua composição, a IFI HEp-2 é o teste de escolha para a triagem de autoanticorpos na ES^{101,102}. Entretanto, convém ressaltar que alguns fabricantes já desenvolveram kits ELISA para a pesquisa de anticorpos anti-RNA polimerase, anti-fibrilarina e anti-PM/ScI¹⁰³. À

medida que antígenos recombinantes ou purificados confiáveis são desenvolvidos e produzidos em larga escala, eles podem ser incorporados nos testes de triagem do FAN⁶¹. Portanto, a ausência de antígenos nucleolares em sua composição, como RNA polimerase, fibrilarina, PM/Scl (apenas kit 4) e Th/To justificaria os resultados falsos negativos dos kits 2 e 4 na ES. Os kits 1 e 3 detectaram todos os pacientes com esclerose sistêmica e padrão de fluorescência nucleolar. O kit 3 utiliza um substrato semelhante as células HEp-2, garantindo alta sensibilidade para a identificação de anticorpos antinucleolares¹⁰⁴. Já o kit 1 é suplementado com extrato do núcleo e de nucléolo das células HEp-2. Embora o emprego de extratos celulares para a pesquisa de alguns anticorpos antinucleolares esteja associado com resultados falsos negativos, principalmente nas técnicas *Western blot* e ELISA, devido à escassa concentração desses antígenos no extrato ou à modificação conformacional dos mesmos, o kit 3 foi capaz de reconhecer todas as amostras com anticorpos antinucleolares, ainda que em concentrações pouco acima do valor de corte¹⁰⁴.

A resposta autoimune na DM/PM é heterogênea, com a produção de autoanticorpos contra vários antígenos nucleares e citoplasmáticos¹⁰⁵⁻¹⁰⁷. Alguns desses autoanticorpos são altamente específicos para a doença, os denominados anticorpos miosite específicos, enquanto outros também podem estar presentes nas demais DRAIs, os denominados anticorpos miosite associados. A definição da especificidade dos autoanticorpos na DM/PM possui relevância clínica, visto que os mesmos fornecem informações importantes quanto à definição de subgrupos de pacientes com diferentes perfis de prognóstico e resposta terapêutica¹⁰⁷⁻¹¹⁰. Na avaliação do comportamento dos kits na DM/PM, é preciso considerar os resultados da IFI HEp-2. Como método de triagem do FAN, a IFI possui sensibilidade em torno de 61,0% para DM/PM². Nos pacientes com doença isolada, ou seja, na ausência de sinais e sintomas de sobreposição com outras DRAIs, a sensibilidade da IFI pode ser de 50% ou menos^{108,109}. Apenas 50% dos pacientes com anticorpos anti-sintetases, que são os anticorpos miosite específicos mais comuns, apresentam IFI HEp-2 positiva^{111,112}. Além disso, os padrões de fluorescência da IFI associados com estes anticorpos não são específicos o bastante para definir a sua presença. Pela baixa sensibilidade e

especificidade, a pesquisa do FAN pela IFI é considerada um exame pouco útil para o diagnóstico da DM/PM, já que um resultado negativo não exclui a doença e um resultado positivo não é suficiente para dispensar a realização de outros exames confirmatórios, como a biópsia muscular^{2,105}. Recentemente, métodos sensíveis para a pesquisa dos anticorpos miosite associados específicos, como *immunoblot* ou plataformas *multiplex*, foram lançados comercialmente^{113,114}.

Os pacientes com DM/PM apresentaram exclusivamente os padrões de fluorescência nuclear pontilhado fino (6 pacientes em 7) e citoplasmático (1 paciente), os quais podem corresponder aos anticorpos miosite específicos anti-Mi-2 e anti-aminoacil-tRNA sintetases, ou a outros anticorpos não definidos. A baixa sensibilidade dos kits 2 e 4 pode ser explicada pelo fato de a histidil-tRNA sintetase (Jo-1) ser o único antígeno específico associado com a DM/PM presente nos kits ou pela ausência de outros antígenos nucleares no seu substrato. Mesmo sendo o anticorpo anti-sintetase mais comum, o único paciente com polimiosite e padrão de fluorescência citoplasmático apresentou resultados negativos em ambos os kits, sugerindo a presença de anticorpos contra as outras sintetases ou contra a partícula reconhecadora de sinal (SRP).

57,1% dos pacientes com DM/PM tiveram resultados positivos no kit 1, geralmente em concentrações ligeiramente acima do valor de corte do teste, subsidiando a impressão de que o fabricante do kit privilegiou a sensibilidade diagnóstica. A maior sensibilidade diagnóstica do kit 3 na DM/PM foi notável. Embora os autoantígenos associados com a DM/PM estejam bem representados nas células HeLa, incluindo as aminoacil-tRNA sintetases, de localização citoplasmática, apenas o núcleo da célula é utilizado como substrato do kit 3¹¹⁵. Mesmo assim a amostra do paciente com padrão de fluorescência citoplasmático também foi detectada pelo kit. Possivelmente, o conjugado polivalente empregado pelo kit pode ter contribuído para a elevada sensibilidade na DM/PM, bem como alguns antígenos citoplasmáticos podem ter permanecido na preparação do substrato.

A baixa sensibilidade do kit 4 não era esperada, visto que, além de antígenos específicos nativos e recombinantes, o teste também utiliza no seu substrato extrato do núcleo das células HEP-2. A presença de extrato de células HEP-2 tem como finalidade

incluir no substrato alguns autoantígenos de importância diagnóstica ainda não identificados ou difíceis de serem obtidos por purificação ou tecnologia recombinante^{50,56}. Todavia, os testes que utilizam extrato de células HEp-2 tem sido associados a uma maior sensibilidade e incidência de resultados falsos positivos, fato não observado com o kit 4. Uma possível justificativa é que o fabricante tenha escolhido um valor de corte que privilegie a especificidade diagnóstica. Alterações da configuração dos epítomos de ligação dos anticorpos durante o processo de purificação dos antígenos nativos ou modificações pós-sintéticas da estrutura dos antígenos recombinantes também podem ter contribuído para a menor sensibilidade do kit⁵⁰.

De uma forma geral, os testes mais sensíveis, como os kits 1 e 3, também apresentaram a maior frequência de resultados falsos positivos, e os testes menos sensíveis, como os kits 2 e 4, tiveram a menor frequência de resultados falsos positivos. Como o substrato do kit 2 é composto apenas por antígenos específicos de importância diagnóstica para as DRAIs, sem a presença de extratos celulares associados, a sua especificidade foi a mais alta. Mesmo com a presença de extrato celular em sua composição, o kit 4 foi o segundo mais específico, possivelmente devido a escolha de um valor de corte pelo fabricante que garanta uma maior especificidade.

Uma proporção significativa dos pacientes com fibromialgia e OA apresentou resultados positivos do FAN na IFI HEp-2 e nos demais testes, provavelmente refletindo uma maior probabilidade que esses indivíduos têm de ser referenciados para um centro de saúde terciário do que aqueles com IFI HEp-2 negativo. Diferentes estudos apontam que entre 11,5% a 30,0% dos pacientes com fibromialgia e 8,9% dos pacientes com OA tem FAN positivo pela IFI^{116,117}. A grande variabilidade de prevalência de FAN positivo na fibromialgia descrita na literatura pode ser resultado de diferenças dos substratos empregados na IFI (células HEp-2 ou fígado de rato) e da diluição de triagem utilizada para definir um resultado como positivo. Ainda assim, a especificidade dos kits 1 e 3 na fibromialgia foi de apenas 37,5%, comparada com uma especificidade de 70,8% da IFI HEp-2, o que pode ser explicado tanto pela utilização de um valor de corte baixo pelo kit 1 quanto pelo emprego de um conjugado polivalente pelo kit 3.

Mesmo que de 30,0% a 50,0% dos pacientes com AR possam ter FAN positivo pela IFI, a pesquisa do FAN não possui utilidade para o diagnóstico da doença^{1,2}. Oitenta por cento dos pacientes com AR tiveram resultados positivos no kit 3, o que também pode estar associado com o tipo de conjugado utilizado. Trata-se de uma frequência de positividade do FAN semelhante à do fator reumatóide, que classicamente é um autoanticorpo da classe IgM¹¹⁸. Fatores reumatóides da classe IgM e, em menor proporção, IgA e IgG coexistem no soro dos pacientes com AR, refletindo uma resposta imunológica humoral policlonal induzida por antígeno, envolvendo autoanticorpos naturais e patogênicos^{119,120}. Ao contrário do LES, na AR o FAN é predominantemente da classe IgM¹²¹. A menor especificidade do kit 3 na AR poderia indicar, portanto, a detecção adicional do FAN da classe IgA e, sobretudo, IgM por esse kit. Essa característica também poderia explicar a menor especificidade do kit 3 nas espondiloartrites e nas vasculites^{1,2}.

As doenças infecciosas podem apresentar manifestações clínicas semelhantes as das DRAI, incluindo artralguas, artrite, mialgias, glomerulonefrite, citopenias, lesões cutâneas, etc. Muitas podem cursar com a produção de autoanticorpos, como FAN, ANCA (anticorpo anti-citoplasma de neutrófilo), anticardiolipina, fator reumatóide e anti-dsDNA. Até mesmo associações entre determinadas infecções e algumas DRAI como poliarterite nodosa, AR, SS, LES e síndrome do anticorpo antifosfolípide foram relatadas. Infecção pelos vírus da hepatite B e C, HIV, dengue e pelo *Mycobacterium tuberculosis* são exemplos de doenças com manifestações e/ou complicações reumáticas bem descritas, e cuja prevalência na população brasileira é maior do que a de muitas DRAI. Mecanismos como ativação policlonal inespecífica dos linfócitos B e mimetismo molecular podem induzir a produção de autoanticorpos ou de fenômenos autoimunes nestes pacientes^{122,123}.

Das doenças infecciosas investigadas, uma maior positividade da IFI HEp-2 foi observada na tuberculose pulmonar (57,1%). Um estudo conduzido em Israel revelou prevalência de 33,0% de IFI HEp-2 positiva (título \geq 1:160) em 47 pacientes com tuberculose pulmonar ativa¹²³. Isenberg descreveu uma prevalência de 42,0% de IFI HEp-2 (título \geq 1:40) em 54 pacientes não tratados com tuberculose pulmonar ativa¹²⁴.

Nenhum dos pacientes com infecção/doença pelo HIV foi positivo na IFI HEp-2. A frequência do FAN nessa população costuma ser pequena, com uma estimativa de 0% no estudo de Berman e colaboradores, até 17,0% pela IFI HEp-2, segundo Massabki e colaboradores^{125,126}. Todavia, 50,0% dos pacientes com HIV foram positivos no kit 4. Curiosamente, Antico e colaboradores notaram uma frequência de 25% de resultados positivos para anticorpos anti-dsDNA com um kit específico do mesmo fabricante, que utiliza o mesmo substrato do kit 4 (oligonucleotídeos sintéticos), em pacientes com hepatite C crônica. Possivelmente, o mesmo problema de especificidade observado na hepatite C crônica também possa ocorrer na infecção pelo HIV¹²⁷.

Dos 8 pacientes com sorologia positiva/infecção pelo vírus da hepatite C, a IFI foi positiva em apenas um. Uma prevalência de FAN positivo pela IFI HEp-2 de 9,4% foi descrita por Narciso-Schiavon e colaboradores, em 270 indivíduos brasileiros com hepatite C crônica, enquanto frequências de até 53,9% foram relatadas por outros autores^{128,129}. Um dos motivos pelos quais não encontramos muitos pacientes com hepatite C e FAN positivo em quaisquer dos testes, é que parte das amostras testadas era de pacientes com apenas sorologia positiva, sem confirmação diagnóstica por método molecular.

Na doença de Chagas, 3 pacientes de um total de 4 tiveram resultados positivos no kit 1. Autoanticorpos contra receptores adrenérgicos e colinérgicos, com potencial participação na fisiopatologia da doença, são descritos no soro dos pacientes com a forma crônica da doença¹³⁰. É interessante mencionar que esses pacientes podem apresentar altos títulos de anticorpos contra as proteínas ribossomais P0, P1 e P2 do parasita, as quais são homólogas às proteínas humanas¹³¹. A sequência antigênica reconhecida por esses anticorpos é a mesma que é alvo da resposta imune anti-ribossomal no LES, e soros de pacientes com LES e anticorpos anti-ribossomal P também reagem com a sequência clonada do parasita, sugerindo que anticorpos com especificidade similar à do anti-ribossomal P no LES podem ser induzidos na doença de Chagas crônica¹³¹. Como a proteína ribossomal P faz parte do substrato do kit 1, é possível que alguma forma de reação cruzada possa ter ocorrido nestes soros.

O pequeno número de amostras representativas de cada síndrome infecciosa pode ter contribuído para os achados da relação entre determinada doença e a frequência de positividade de um teste em particular.

A avaliação da sensibilidade dos testes no LES de acordo com a atividade da doença mostrou uma maior frequência de resultados positivos no LES ativo, particularmente para o kits 2, embora sem atingir a significância estatística. Alguns estudos sugerem que os pacientes com LES em atividade apresentam uma variedade maior de autoanticorpos específicos circulantes, e geralmente em concentração mais elevada do que os pacientes com doença inativa, principalmente anticorpos anti-dsDNA, anti-ssDNA e antinucleossomo, o que poderia justificar os nossos achados¹³²⁻¹³⁵. Provavelmente, alterações biológicas e imunológicas induzidas pela atividade da doença poderiam se refletir, tanto qualitativamente quanto quantitativamente, na produção de um *pool* distinto de autoanticorpos circulantes no pacientes com LES, os quais seriam detectados pelos kits de maneira seletiva, conforme o substrato de cada um. Neste sentido, o kit 2 é o único que possui o antígeno ssDNA, e a sua sensibilidade na doença ativa foi até mesmo ligeiramente superior à da IFI HEp-2 (93,6% *versus* 90,3%). Anticorpos anti-ssDNA são tradicionalmente considerados como de baixa especificidade diagnóstica para o LES porque também podem ser detectados em outras doenças como AR, hepatite autoimune, hepatite viral, linfoma e esclerose múltipla¹³⁶. Alguns autores, contudo, sugerem que esses anticorpos são os marcadores mais sensíveis, e os melhores preditores de atividade do LES¹³⁶. Segundo Paul Ignat e colaboradores, níveis elevados de anti-ssDNA estão presentes em virtualmente 100% dos pacientes com LES inicial e em 87,0% dos pacientes com doença estabelecida¹³⁴. No estudo de Froelich e colaboradores, a frequência de anticorpos anti-ssDNA foi de 90,0% nos pacientes com LES ativo e 45,0% na doença inativa¹³². Anticorpos anti-dsDNA e anti-ssDNA geralmente coexistem, mas em alguns pacientes com LES eles são detectados na ausência de anti-dsDNA¹³⁷. Talvez a identificação adicional de anti-ssDNA tenha contribuído para uma maior sensibilidade do kit 2 no LES ativo.

A concordância da maioria dos kits com a IFI HEp-2 foi regular. Na análise dos resultados discordantes, grande parte das amostras negativas na IFI e positivas em

pelo menos um ou dois testes alternativos ocorreu no grupo 2. Contudo, 14 amostras com esse padrão de discordância ocorreram em pacientes com DRAI, e uma proporção significativa destas foi positiva nos kits 1 a 4. Apesar de ser considerado o método padrão ouro para a pesquisa do FAN, a IFI HEp-2 possui sensibilidade limitada para a detecção de determinados autoanticorpos específicos direcionados contra antígenos clinicamente relevantes, como é o caso dos anticorpos anti-SSA/Ro, anti-ribossomal P, anti-Jo-1 e demais anti-sintetases⁸⁶. Alguns destes antígenos são altamente solúveis, podendo se difundir das células durante o processo de fixação, ou são expressos em quantidade limitada neste substrato, mas estão presentes em concentrações suficientes para atingir uma maior sensibilidade analítica em outros imunoensaios^{86,138,139}. No estudo de Hoffman e colaboradores, a sensibilidade da IFI HEp-2 para identificar anticorpos anti-ENA, os quais foram pesquisados por *immunoblot* e confirmados por imunodifusão radial e ELISA, foi de 72,0%¹⁴⁰. Os resultados falsos negativos foram restritos aos anticorpos anti-SSA/Ro, anti-SSB/La e anti-Jo-1. Como alguns pacientes tinham diagnóstico definido ou sintomas sugestivos de DRAI, os autores sugeriram que a pesquisa de autoanticorpos específicos deve ser realizada em todos os pacientes com sintomas clínicos sugestivos de DRAI e IFI negativa. Com o desenvolvimento de novos imunoensaios que utilizam como substrato antígenos recombinantes ou sintéticos altamente específicos, resultados falsos negativos na IFI para anticorpos anticentrômero (A e B) e anti-PM/Scl também foram descritos, porém, o significado clínico de tais achados ainda não foi estabelecido^{86,141}.

Das amostras com resultado positivo na IFI HEp-2 e negativo nos demais testes, somente uma foi do grupo 1. A maior parte destas foi representada pelos padrões de fluorescência nuclear pontilhado fino ou nucleolar homogêneo, em títulos moderados a altos. Nenhum paciente com padrão nucleolar apresentava sintomas sugestivos de esclerose sistêmica ou síndrome de sobreposição. O padrão nuclear pontilhado fino é o padrão de fluorescência mais prevalente da IFI HEp-2, tanto em indivíduos saudáveis quanto nos com DRAI^{3,36}. Principalmente quando em títulos mais elevados, costuma indicar a presença de anticorpos anti-SSA/Ro e anti-SSB/La¹⁴²⁻¹⁴⁴. Porém, a negatividade simultânea em todos os outros testes é um forte argumento contra a

possibilidade de resultados falsos negativos destes para anti-SSA/Ro e anti-SSB/La. É importante salientar que o kit 3 reconheceu todas as amostras de pacientes com esclerose sistêmica e padrão de fluorescência nucleolar. Apesar de utilizarem substratos semelhantes, a ocorrência de resultados negativos no kit 3 e positivos na IFI sugere que, pelo menos em algumas situações, diferenças biológicas ou no processo de manufatura entre os substratos celulares podem levar a resultados discrepantes. Tal fato acontece até mesmo entre diferentes fabricantes de kits comerciais para IFI HEp-2, visto que alguns são mais sensíveis para identificar determinados autoanticorpos ou padrões de fluorescência que outros^{36,45,145}.

Embora a resposta autoimune em determinada doença seja caracterizada por um padrão de reconhecimento molecular do autoantígeno principal, esta resposta não é uniforme entre os pacientes com a mesma doença, podendo ser heterogênea com relação ao isotipo, a afinidade/avidéz e a especificidade do epítipo reconhecido pelo autoanticorpo. Diversidade na especificidade fina dos autoanticorpos produzidos, secundária a diferentes padrões de reconhecimento intra e inter-molecular dos antígenos (*epitope spreading*) também são relevantes. Estas variações podem, em parte, ser responsáveis pela diversidade de perfis de autoanticorpos observada durante o curso clínico da doença, e pelas discrepâncias nos resultados obtidos em diferentes ensaios de detecção de autoanticorpos, os quais também são heterogêneos do ponto de vista antigênico e quanto ao princípio de detecção dos anticorpos¹⁴⁶.

Pelo menos três dos kits testados no nosso trabalho já foram previamente avaliados em outros estudos. No estudo de Fenger e colaboradores, que consideraram o diagnóstico clínico como padrão ouro de comparação, o kit 1 apresentou uma sensibilidade de 93,0% em um grupo de pacientes com DRAI estabelecida semelhante ao grupo 1, enquanto a sensibilidade da IFI HEp-2 foi de 87,0% (diluição de triagem de 1:160)⁵⁶. No grupo de pacientes encaminhado para avaliação reumatológica com suspeita de DRAI, a sensibilidade e a especificidade do kit 3 foi de 66,7% e 78,2%, enquanto a sensibilidade e a especificidade da IFI HEp-2 foi de 83,3% e 73,3%.

Os kits 1 e 3 foram avaliados por Tonutti e colaboradores, que consideraram o diagnóstico clínico como padrão ouro de comparação e estudaram um grupo de 1513 pacientes para os quais o exame do FAN foi requisitado. Um diagnóstico final de DRAI foi estabelecido em 240 deles⁵⁵. A sensibilidade do kit 1 foi de 88,0%, a do kit 3 foi de 93% e a da IFI HEp-2 foi de 92,0% (diluição de triagem de 1:40). A especificidade do kit 1 foi de 78,0%, a do kit 3 foi de 56,0% e a da IFI HEp-2 foi de 75,0%. A sensibilidade do kit 1 foi particularmente mais baixa no LES, na esclerose sistêmica difusa e na DITC (87,0%, 87,0% e 75,0%). De acordo com os autores, diferenças entre os substratos ou no processo de ligação dos mesmos à fase sólida explicariam o desempenho de cada kit. O kit 3, utilizando o núcleo integral das células HeLa adsorvido à microplaca, permitiria a detecção de autoanticorpos dirigidos contra epítomos conformacionais, o que contribuiria para a ótima sensibilidade do teste. Já o kit 1, que utiliza uma mistura de vários antígenos purificados e extratos celulares, não alcançaria a sensibilidade diagnóstica esperada ou pela perda de epítomos conformacionais, ou pela competição entre os antígenos durante a sensibilização da microplaca, secundária a diferenças de afinidade dos mesmos pela fase sólida, com conseqüente variabilidade na concentração final de cada um.

Tanto o nosso estudo quanto o de Copple e colaboradores não reproduziram a baixa sensibilidade do kit 1 previamente demonstrada por outros autores⁵⁹. No estudo de Copple, a sensibilidade do kit 1, determinada em 30 pacientes com LES estabelecido, foi de 96,6%, comparada a uma sensibilidade de 80,0% da IFI HEp-2 (diluição de triagem de 1:40). Diferenças na composição dos grupos de pacientes e na forma de recrutamento dos mesmos entre os estudos podem explicar essa discrepância. Contudo, houve um hiato de pelo menos sete anos entre os trabalhos citados acima, e é possível que a melhor sensibilidade do kit 1 nos últimos estudos seja resultado do seu aperfeiçoamento pelo fabricante nos últimos anos com o objetivo de maximizar o seu desempenho diagnóstico.

O kit 4 foi anteriormente avaliado apenas no estudo de Ghillani e colaboradores⁵⁷. Apesar de amostras de pacientes clinicamente caracterizadas terem sido utilizadas, apenas a concordância com a IFI HEp-2 foi analisada (concordância

positiva de 79,5% e negativa de 91,2%). Dezesete amostras apresentaram resultados negativos no kit e positivos na IFI, incluindo um paciente com SS e anticorpos anti-Ro52, dois pacientes com esclerose sistêmica e anticorpos anti-Sci70, um com LES e um com DMTC e anticorpos anti-RNP e cinco pacientes com LES inativo e anti-dsDNA. Curiosamente, no nosso estudo, cinco pacientes com LES e padrão de fluorescência nuclear homogêneo na IFI tiveram resultados negativos no kit 4, um deles com anti-dsDNA positivo, demonstrando que o kit pode falhar em detectar alguns pacientes com anticorpos anti-dsDNA, ou pacientes com anticorpos anti-histona/nucleossomo, os quais não são reconhecidos pelo kit por não fazerem parte do seu substrato.

A área sob a curva ROC de todos os testes foi significativamente diferente de 0,5, atestando a sua capacidade para discriminar os pacientes com DRAI e os pacientes com outros diagnósticos. Como a relação entre sensibilidade e especificidade de um teste tende a ser inversa, os valores de corte ótimos estabelecidos para todos os kits resultaram em perda da sensibilidade e aumento da especificidade diagnóstica. A redução de sensibilidade ocorreu mais pronunciadamente com os kits 1 e 3, confirmando que o principal objetivo dos fabricantes foi assegurar uma elevada sensibilidade diagnóstica. Por conseguinte, a adoção dos valores de corte ótimos comprometeria o desempenho destes testes em um ambiente de triagem. O kit 2 foi o que apresentou o melhor equilíbrio entre sensibilidade e especificidade ao longo de diferentes valores de corte. Para um nível idêntico de sensibilidade, a especificidade do kit 2 foi mais elevada que a dos outros, o que justifica a sua maior área sob a curva. Uma elevada especificidade, por sua vez, resulta em valor preditivo positivo mais alto, visto que a maioria dos resultados alterados ocorre em pacientes com DRAI.

O valor de corte ótimo da IFI HEp-2 correspondeu à diluição de 1:160. Resultado similar foi descrito por Beck e colaboradores, em um estudo brasileiro¹⁴⁷. Analisando os resultados da IFI HEp-2 de 47 pacientes com diagnóstico de LES e 27 portadores de outras doenças autoimunes (AR, SS, doença de Graves, tireoidite de Hashimoto) por meio da curva ROC, os autores determinaram a diluição de 1:160 como o valor de corte ótimo do teste.

A escolha do valor de corte de um teste depende da finalidade para a qual o mesmo é empregado³². Para um teste de triagem como o FAN, a sensibilidade deverá ser privilegiada, com o objetivo de se minimizar o número de resultados falsos negativos²⁹. Todavia, devido ao elevado número de falsos positivos de alguns testes, especialmente os kits 1 e 3, todas as amostras positivas nestes kits devem ser retestadas por um teste mais específico, como a IFI HEp-2, para confirmação do resultado e definição do título e padrão de fluorescência, os quais são parâmetros muito úteis para o clínico, muitas vezes direcionando-o para a pesquisa adicional de autoanticorpos específicos.

Alguns pacientes com DRAI podem ter FAN positivo nos kits e negativo na IFI HEp-2. Como concentrações ou títulos mais altos do FAN são mais prováveis de ocorrer em pacientes com DRAI, a observação dos intervalos de referência específicos para diferentes RV é muito útil^{3,36}. A dicotomização dos resultados dos testes em apenas positivo ou negativo quando ele se encontra acima ou abaixo de um valor de corte pré-determinado, leva a uma perda importante de informação diagnóstica^{29,31}. Dependendo da probabilidade pré-teste de DRAI, resultados com concentrações equivalentes a RV+ acima de 2, ainda que com IFI negativa, devem ser valorizados e seguidos da pesquisa de autoanticorpos específicos. Talvez em um ambiente no qual o FAN é solicitado com o objetivo de excluir a possibilidade de DRAI em pacientes com sintomas inespecíficos, o kit 2 poderia ser utilizado como teste de primeira linha por sua especificidade. Nessa circunstância, a IFI seria realizada apenas nos pacientes com clínica compatível de DRAI e resultado negativo no ELISA.

A freqüência de resultados positivos dos testes na população saudável refletiu o perfil de especificidade de cada um, com o teste mais específico (kit 2) apresentando o menor número e o teste menos específico (kit 3) apresentando o maior número de resultados positivos.

Diversos estudos estabeleceram a freqüência e a distribuição dos títulos e padrões de fluorescência da IFI HEp-2 em indivíduos saudáveis^{35,36,148-150}. É importante salientar que diferentes definições para classificar um indivíduo como saudável ou normal foram utilizadas nestes estudos.

A despeito das divergências conceituais, a frequência de FAN positivo por IFI HEp-2 positivo na população saudável, na diluição de triagem de 1:80, foi de 13,5%, similar à descrita por estudos realizados na população brasileira e em outras populações, utilizando diferentes critérios de seleção e definição de indivíduos saudáveis^{35,36,149}.

De modo semelhante ao estudo de Mariz e colaboradores, que foi realizado na população brasileira e envolveu um número significativamente maior de indivíduos saudáveis, nós não observamos diferenças na frequência do FAN por IFI HEp-2 de acordo com o gênero ou a idade³⁶.

Apesar do pequeno número de resultados positivos, a distribuição dos padrões de fluorescência e dos títulos da IFI HEp-2 foram semelhantes à descrita por Mariz e colaboradores os quais caracterizaram uma amostra de 118 resultados positivos de indivíduos saudáveis³⁶. A única exceção foi a ocorrência do padrão de fluorescência nuclear pontilhado centromérico em um indivíduo saudável, o qual, naquele estudo, foi observado exclusivamente em pacientes com DRAI. Hayashi e colaboradores descreveram uma prevalência de anticorpos anticentrômero de 1,4% na população geral (1,8% nas mulheres), sendo que mais da metade dos indivíduos nenhuma doença infecciosa ou reumática autoimune foi diagnosticada durante um período de acompanhamento de 5 anos¹⁵⁰. Como os autoanticorpos podem ser detectados no soro dos pacientes anos antes do desenvolvimento dos sinais e sintomas clínicos das DRAIs, e considerando-se que os anticorpos anticentrômero estão associados predominantemente com a presença de doença autoimune, a sua identificação em indivíduo assintomático indica a necessidade de acompanhamento clínico¹⁵¹.

Tan e colaboradores avaliaram indivíduos saudáveis recrutados por quinze centros internacionais de referência na pesquisa de autoanticorpos e encontraram uma prevalência do FAN, utilizando a IFI HEp-2 em 31,7% no título de 1:40, 13,3% no título de 1:80, 5,0% no título de 1:160 e 3,3% no título de 1:320³⁵.

Por sua vez, Mariz e colaboradores consideraram como saudáveis apenas indivíduos sem evidência pregressa ou atual de DRAI, infecção crônica e neoplasia, com sorologia negativa para HIV, hepatites B e C, e que não estivessem em uso regular

de medicamentos glicocorticoides, imunossupressores, antimicrobianos ou anti-inflamatórios³⁶. De 918 indivíduos saudáveis analisados, 13,3% apresentaram resultados positivos na diluição de 1:80, 7,0% na diluição de 1:160, 6,0% na diluição de 1:320, 4,4% na diluição de 1:640 e 2,1% nas diluições \geq 1:1280.

Fernandez e colaboradores investigaram a frequência de FAN positivo pela IFI HEp-2 em uma população saudável formada por 500 doadores de sangue brasileiros, e encontraram os seguintes resultados: 22,6% na diluição de 1:40, 8,0% na diluição de 1:80, 3,4% na diluição de 1:160 e 1,4% nas diluições \geq 1:320¹⁴⁸.

Ao contrário dos resultados descritos acima, outros autores constataram uma baixa frequência do FAN HEp-2 em indivíduos saudáveis. Copple e colaboradores testaram uma população de 100 indivíduos saudáveis de etnia predominantemente caucasiana, e não observaram nenhum resultado positivo empregando uma diluição de triagem de 1:40⁵⁹.

Estas discrepâncias podem estar relacionadas tanto a fatores populacionais (genético-ambientais ou demográficos) quanto técnicos. Diferenças entre microscópios, reagentes comerciais e a dependência da qualificação dos observadores tornam a IFI HEp-2 uma técnica de baixa reprodutibilidade, com elevada variabilidade inter-laboratorial em seus resultados^{35,43,44}.

Com relação aos dados da literatura a respeito da frequência de resultados positivos com os kits analisados em outras populações saudáveis, Copple e colaboradores encontraram frequência de 20% de resultados alterados com o kit 1 em 100 doadores de sangue saudáveis, resultado idêntico ao nosso⁵⁹. Li e colaboradores encontraram frequência de 25,0% de resultados alterados, utilizando o mesmo kit em uma população de 401 indivíduos saudáveis, sem história atual ou pregressa de qualquer doença autoimune¹⁵². Ghullani e colaboradores avaliaram uma população de 300 doadores de sangue saudáveis, e encontraram uma positividade de 2,0% com o kit 4, inferior ao índice de 11,9% estabelecido em nossa população⁵⁷.

Seguindo a determinação do ACR, que considera como critério diagnóstico do LES apenas o FAN presente em títulos anormais, e adotando as diretrizes do CLSI para o estabelecimento de valores de referência no laboratório clínico, o presente estudo

estabeleceu a diluição de 1:160 como um título anormal da IFI HEp-2^{22,37}. O uso do título/concentração anormal do FAN que define um resultado como alterado resultou em redução considerável da sensibilidade dos testes, embora menos significativa para a IFI HEp-2 e o kit 2. Em relação ao LES, empregando-se a diluição de triagem de 1:160 como valor de corte para a definição de um resultado positivo, observou-se queda na sensibilidade diagnóstica de 87,5% para 81,9%. Sjöwall e colaboradores encontraram uma freqüência de resultados positivos da IFI HEp-2 de 76% em pacientes com LES estabelecido, aplicando a diluição de triagem de 1:200, equivalente ao título anormal do FAN para a sua população¹⁵³. Utilizando a diluição de triagem de 1:320, correspondente ao percentil 95 da sua população, Salonen e colaboradores observaram resultados positivos em 76,0% dos 304 pacientes com LES estabelecido¹⁵⁴.

Não só a diluição de triagem do teste, como também a forma como os pacientes são recrutados, podem influenciar a freqüência de FAN positivo¹⁵³. Nós fizemos uma avaliação transversal de pacientes com LES estabelecido, compreendendo um grupo heterogêneo em relação à atividade e duração da doença, composição étnica e uso de corticosteroides e imunossupressores. Faria e colaboradores analisaram o comportamento longitudinal dos anticorpos anti-dsDNA e anti-ENA no LES e concluíram que algum grau de flutuação na positividade desses autoanticorpos pode ocorrer, refletindo-se tanto como soroconversão quanto soro-reversão¹⁵⁵. Fatores como diferentes métodos analíticos, tipo de terapia medicamentosa e a própria evolução natural da doença podem ser responsáveis pela oscilação dos autoanticorpos ao longo do tempo¹⁵⁶. Analisando os dados dos prontuários médicos dos pacientes com LES, historicamente 98,0% tinham FAN HEp-2 positivo no momento do diagnóstico, o que confirma que parte dos pacientes evoluíram com negatificação do FAN no decorrer do tempo.

Recentemente, algumas diretrizes estrangeiras sobre o uso da IFI HEp-2 foram publicadas. Estas recomendam que a etapa de triagem seja feita na diluição de 1:80^{39,41}. Entretanto, somente títulos $\geq 1:160$ devem ser considerados positivos ou relevantes do ponto de vista diagnóstico, devido ao maior valor preditivo positivo e à probabilidade de detecção de autoanticorpos específicos. Títulos $\leq 1:80$ geralmente não

possuem importância diagnóstica e não estão associados com a presença de autoanticorpos específicos (anti-dsDNA e anti-ENA)^{39,41}. Um estudo espanhol sugeriu o título de 1:160 como a diluição de triagem, enfatizando ter sido mais eficaz do ponto de vista econômico e não resultando em perda da eficiência diagnóstica⁴⁰. Todavia, considerando-se a variabilidade da técnica e as peculiaridades de cada população, recomenda-se que todo laboratório estabeleça seu título anormal de FAN, analisando indivíduos saudáveis provenientes da população local e, utilizando os seus próprios instrumentos.

A resposta dos testes ao painel de soros de referência é a expressão da composição e/ou deficiência antigênica de cada um.

Nenhuma fluorescência foi detectada na IFI HEp-2 com o soro de referência 12 (anti-ribossomal P). Mesmo empregando uma diluição de triagem de 1:40, o resultado do soro de referência 12 também foi negativo pela IFI HEp-2 no estudo de Copple e colaboradores⁵⁹. No trabalho de Mahler e colaboradores, apenas 10,1% de 345 amostras positivas para anticorpos anti-P pelo método ALBIA (QuantaPlex ENA8; INOVA, San Diego, CA, USA) demonstraram padrão de fluorescência citoplasmática típica na IFI HEp-2, sendo que em 2,3% delas nenhuma fluorescência foi observada¹⁵⁷. Um subgrupo de 45 amostras positivas foram testadas em substratos HEp-2 de três fabricantes diferentes, e a sensibilidade destes para o padrão de fluorescência típico variou entre 6,7% a 22,2%. No estudo de Bonfa e Elkon, um terço dos pacientes com LES e anticorpos anti-ribossomal P não apresentavam fluorescência citoplasmática na IFI HEp-2¹⁵⁸. Mais recentemente, Kim e colaboradores pesquisaram anticorpos anti-P no soro de 91 pacientes com LES por diversos métodos e verificaram uma sensibilidade de 11,0% para a IFI HEp-2, comparada a 24,2% para o EliA Rib-P (Phadia AB, Uppsala, Suécia) e 23,1% para o ELISA (Quanta Lite Ribosome P, Inova Diagnostics, San Diego, CA, EUA)¹⁵⁹. Fatores como concentração insuficiente de antígeno no citoplasma, exposição limitada dos epítomos antigênicos na subunidade 60S do ribossomo, interferência de outros autoanticorpos que produzem outros padrões de fluorescência e uma diversidade de protocolos de cultura e fixação celular usados por diferentes fabricantes podem ser responsáveis pela limitação da IFI HEp-2 em detectar

anticorpos anti-ribossomal P¹⁵⁷. Esses achados tem implicações diagnósticas relevantes, visto que anticorpos anti-ribossomal P são altamente específicos para o LES e em uma proporção significativa dos pacientes estão presentes isoladamente^{157,160,161}. Assim sendo, quando clinicamente pertinente, testes adicionais devem ser utilizados para a pesquisa de anticorpos anti-P.

O kit 1 não reconheceu apenas o soro de referência 6 (anti-fibrilarina). No estudo de Copple e colaboradores, além deste soro, o kit também não identificou o soro de referência 11 (anti-PM/ScI)⁵⁹. Ambos são antígenos de localização nucleolar e ilustram que a suplementação com extrato de nucléolo pode não ser suficiente para a detecção de anticorpos antinucleolares.

O kit 2 não reconheceu os soros de referência que contem anticorpos contra antígenos ausentes em seu substrato: fibrilarina (soro 6) e anti-ribossomal P (soro 12).

Como apenas o núcleo da célula HeLa faz parte do seu substrato e a histidil-tRNA sintetase (Jo-1) é um antígeno de localização citoplasmática, o kit 3 foi o único a não reconhecer o soro de referência 10 (anti-Jo-1). Já o soro anti-ribossomal P foi positivo. Apesar de serem organelas citoplasmáticas, a síntese dos ribossomos acontece nos nucléolos, o que justificaria o resultado do soro 12, pois os autoantígenos ribossomais também estão ali localizados¹⁶².

O kit 4, além de não identificar os soros de referência 6 (anti-fibrilarina) e 12 (anti-ribossomal P), pela mesma razão que o kit 2, foi o único a apresentar resultado negativo com o soro 1 (anti-dsDNA). O substrato para a pesquisa de anti-dsDNA empregado pelo kit 4, denominado oligonucleotídeo sintético de DNA, foi inicialmente desenvolvido e validado em um método ELISA. Trata-se de dsDNA obtido por hibridização *in situ* a partir de uma sonda (*probe*) sintética de ácido nucléico 5'fotobiotinilado com comprimento de 40 pares de bases, e sua sequência complementar de oligonucleotídeos altamente específica, ligado à fase sólida por meio de estreptavidina¹⁶³. Tal substrato certificaria a presença de dsDNA não desnaturado e livre de contaminação de ssDNA, histonas ou outras proteínas. No estudo de Radice e colaboradores, a sensibilidade do ELISA baseado nos oligonucleotídeos de DNA, determinada em 68 amostras de pacientes com LES, foi de 66,2%, similar a de outros

testes que utilizam diferentes DNAs, incluindo o radioimunoensaio (Farr). Antico e colaboradores investigaram a sensibilidade de alguns imunoensaios de nova geração para a pesquisa de anticorpos anti-dsDNA, em 54 pacientes com LES e vários controles com diagnóstico de outras doenças reumáticas e infecciosas¹²⁷. Um dos testes avaliados utilizava o mesmo substrato desenvolvido por Radice, mas na forma de um ensaio quimiluminescente com desenho idêntico ao kit 4. Neste estudo, o método quimiluminescente foi o mais sensível (84,6%) e o menos específico (82,9%) para a detecção de anticorpos anti-dsDNA. Considerando esses trabalhos, é difícil justificar o resultado falso negativo do kit 4 com o soro de referência 1. Conforme demonstrado por Stollar, geralmente os anticorpos anti-dsDNA dos pacientes com LES se ligam a fragmentos de DNA com comprimento mínimo de 20 a 40 pares de base¹⁶⁴. Porém, alguns soros de pacientes com LES contêm anticorpos anti-dsDNA que requerem fragmentos maiores de DNA para se ligar, indicando que, eventualmente, os oligonucleotídeos sintéticos podem não apresentar todos os epítomos relevantes de ligação dos anticorpos anti-dsDNA¹⁶⁵. É pertinente reforçar que o kit 4 não identificou 5 pacientes com LES e anticorpos anti-dsDNA no estudo de Ghullani, e um paciente com LES e anti-dsDNA em nosso estudo. Possivelmente diferenças na arquitetura do kit 4 em relação à dos testes avaliados por Radice e Antico, associadas às características biológicas de alguns anticorpos anti-dsDNA, possam ter sido responsáveis pelos achados discrepantes.

Os resultados dos testes obtidos com os pacientes do grupo 3 confirmam a performance diagnóstica dos mesmos previamente determinada nos grupos 1 e 2. Com uma sensibilidade acima de 95,0% nos pacientes com DRAI e de 100% nos pacientes com LES, os kits 1 e kit 3 constituem ótimas alternativas de triagem para o FAN. Os resultados falsos negativos dos kits 2 e 4 na paciente com LES e anticorpos anti-ribossomal P reforçam a importância desse anticorpo para o diagnóstico de LES. Com uma prevalência estimada entre 10,0% a 40,0% e especificidade de 99,0%, podem ser os únicos marcadores sorológicos do LES em 6,7% a 36,3% dos pacientes com resultados negativos para anticorpos anti-dsDNA e anti-Sm^{157,160,161}. Por esse motivo, a

inclusão dos anticorpos anti-ribossomal P como um dos critérios de classificação do LES tem sido recomendada por alguns autores^{160,161}. Os fabricantes dos kits 2 e 4, portanto, deveriam considerar a implementação do antígeno ribossomal P no substrato dos testes.

Dois pacientes com DITC e anticorpos anti-SSA/Ro tiveram resultados persistentemente negativos na IFI HEp-2 e positivos em todos os outros testes. Apesar de não ser considerado um marcador diagnóstico específico, pelo fato de ser detectado em diferentes DRAIs, muitas vezes anti-SSA/Ro é o único autoanticorpo presente no soro de pacientes com DRAI¹⁶⁷. É sabido que alguns pacientes com DRAI e anticorpos anti-SSA/Ro não são identificados pela IFI HEp-2 e que a sensibilidade destas células para esse anticorpo não é uniforme, podendo variar entre diferentes fabricantes^{138,139,140,145}. Bossuyt e colaboradores analisaram 54 amostras com a presença exclusiva de anticorpos anti-SSA/Ro (confirmada por *dot-blot*) em cinco substratos HEp-2 de fabricantes diferentes, e verificaram uma sensibilidade que variou entre 24,0% a 91,0%¹⁴⁵. Avaliando apenas o subgrupo de 24 pacientes com diagnóstico de LES, SS ou lúpus cutâneo subagudo, a sensibilidade da IFI HEp-2 variou entre 29,0% a 100%. No estudo de Blomberg e colaboradores, 25,0% dos pacientes com anticorpos anti-SSA/Ro e IFI HEp-2 negativa tinham LES ou lúpus cutâneo¹⁶⁸.

Como a maioria dos pacientes do grupo 3 foi inicialmente avaliada por um médico não especialista e, então, encaminhados para um serviço terciário de referência com suspeita clínica de doença reumática, a alta frequência de DRAI desse grupo (28,1%) não reflete a da população geral. A baixa especificidade de alguns testes neste ambiente pode ser o resultado de dois fatores. Primeiro, os testes não foram realizados em indivíduos saudáveis, mas sim em pacientes com sinais e sintomas clínicos com algum grau de suspeita de DRAI, e que conduziram o médico assistente a solicitar o teste de FAN. Segundo, muitos pacientes foram encaminhados devido a um resultado positivo de IFI HEp-2, o que pode ter contribuído para o elevado número de resultados positivos na AR, fibromialgia e na OA, sugerindo a ocorrência de viés de referência. Trata-se, porém, de um cenário clínico semelhante ao encontrado nos consultórios

médicos de reumatologia. Todavia, para minimizar o problema, tivemos o cuidado de também incluir pacientes referenciados e com resultado prévio da IFI HEp-2 negativo.

O valor preditivo negativo de todos os testes foi elevado, indicando que um resultado negativo do FAN, principalmente na IFI e nos kits 1 e 3, excluiria a possibilidade de DRAI na maioria das vezes. O valor preditivo positivo dos testes foi relativamente baixo, ainda que maior que o descrito por outros autores. Slater e colaboradores determinaram o desempenho diagnóstico da IFI HEp-2 analisando 1010 amostras submetidas à pesquisa do FAN, configurando, portanto, uma amostragem representativa dos pacientes atendidos em um laboratório e/ou hospital geral¹². Com uma prevalência de DRAI de 5,6%, o VPP do teste foi de 22,0% para DRAI e de 11,0% para o LES. Pela maior frequência de DRAI em nosso estudo, o VPP da IFI no grupo 3 foi de 44,9%.

Suarez-Almador investigaram as propriedades diagnósticas do FAN em 711 pacientes encaminhados pelo médico generalista para avaliação reumatológica, ou seja, uma população similar à do grupo 3¹¹. A prevalência de DRAI foi de 11,8%. Nos pacientes com outros diagnósticos, as doenças mais prevalentes foram fibromialgia, osteoartrite e síndromes dolorosas regionais, sendo o FAN positivo em 36,0% desses pacientes. Neste trabalho, o VPP do FAN foi de 29,0% para DRAI e de 12,0% para LES.

Emlen e colaboradores analisaram 177 amostras submetidas à pesquisa do FAN em um estudo comparativo da IFI HEp-2 e seis kits ELISAs de fabricantes diferentes, e encontraram um VPP para DRAI de 26,0% para a IFI e entre 17,0% a 64,0% para os testes ELISA⁵¹.

Os dados acima corroboram a impressão de que o teste de FAN é utilizado de maneira inapropriada pelos médicos, provavelmente com o objetivo principal de excluir o diagnóstico de DRAI em pacientes com sinais e sintomas inespecíficos. Como a prevalência de FAN na população geral é elevada e a de DRAI é pequena, grande parte dos resultados positivos não está associada com a presença de autoimunidade. Nesse contexto, o VPP do FAN tende a ser baixo, independentemente do método empregado.

Semelhantemente ao demonstrado por outros autores, quando se utiliza a clínica como padrão-ouro de comparação, o desempenho diagnóstico de alguns kits ELISA pode ser comparável ou até superior ao da IFI HEp-2, permitindo a sua utilização como uma alternativa para a triagem do FAN^{15,16,19,20}. Não há um método que seja universalmente superior ao outro, tendo em vista que nenhum teste possui 100% de sensibilidade e especificidade. A escolha entre os métodos deve ser balizada por uma série de fatores tais como custos, disponibilidade de mão de obra qualificada, número de exames realizados e o perfil clínico dos indivíduos atendidos por cada laboratório.

A IFI HEp-2 seria a melhor opção para laboratórios que têm rotinas menores, técnica bem padronizada, observadores experientes e treinados, e que atende a uma população de doentes com alta prevalência de DRAI, como é o caso dos laboratórios vinculados aos Hospitais Universitários ou Centros de Referência⁵⁰. Por outro lado, os testes do tipo ELISA seriam a melhor opção para laboratórios que processam um grande número de testes devido à possibilidade de automação, com consequente otimização do fluxo de trabalho e maior rapidez na liberação de resultados^{50,59}. É o caso de alguns laboratórios gerais de grande porte, que usualmente atendem a uma população de pacientes com baixa prevalência de DRAI e para os quais o FAN é utilizado principalmente com a finalidade de exclusão diagnóstica.

Nenhum dos kits avaliados poderia substituir completamente a IFI HEp-2. Devido à sua menor especificidade, os resultados positivos dos kits 1 e 3 deveriam ser complementados pela IFI HEp-2, para a definição do título e do padrão de fluorescência, de forma a orientar a pesquisa dos autoanticorpos específicos. Entretanto, resultados positivos no ELISA e negativos na IFI, especialmente em concentrações associadas com RV+ acima de 2, deveriam ser relatados. Na presença de sinais e sintomas sugestivos de DRAI, estes resultados podem ser clinicamente relevantes, deste modo justificando a pesquisa dos autoanticorpos específicos.

Caso opte por um teste com menor sensibilidade que a IFI, como o kit 2, o laboratório deveria deixar claro que um resultado negativo do FAN não exclui o diagnóstico de DRAI. Nos casos de alta probabilidade de doença e FAN negativo pelo ELISA, a IFI HEp-2 também deveria ser realizada.

De acordo com as recomendações do ACR e do CLSI e conforme estipulado na população saudável por nós avaliada, somente títulos da IFI HEp-2 a partir de 1:160 deveriam ser considerados “anormais” e, portanto, esta seria a diluição a ser utilizada como triagem em nosso meio. Essa conduta poderia minimizar o número de resultados falsos positivos do teste sem comprometimento da sensibilidade diagnóstica do mesmo.

Diferentes testes podem apresentar sensibilidade e especificidade variável em função da heterogeneidade na composição antigênica de cada um. Portanto, antes de serem introduzidos na rotina diagnóstica, os kits devem ser submetidos à validação clínica rigorosa, com o objetivo de estabelecer as suas características operacionais e possíveis limitações técnicas^{4,11}. Por último, o laboratório deve informar aos clínicos qual método é utilizado para a pesquisa do FAN, bem como a sua sensibilidade diagnóstica frente às diversas DRAI e possíveis limitações.

7 CONCLUSÕES

- Devido à sensibilidade diagnóstica comparável ou superior à da IFI HEp-2, os kits 1 e 3 podem ser utilizados como métodos alternativos para a triagem do FAN.
- O kit 2 pode ser empregado como uma alternativa à IFI HEp-2, em um cenário clínico de baixa probabilidade pré teste de DRAI. Entretanto, a IFI deve ser realizada na suspeita de resultado falso negativo.
- Devido a baixa sensibilidade diagnóstica, até o momento, o kit 4 não deve ser utilizado como uma alternativa à IFI HEp-2.
- Como apresentam diferentes níveis de sensibilidade e especificidade, os métodos alternativos de triagem do FAN devem ser validados antes de serem introduzidos na rotina diagnóstica.
- Os kits ELISA testados não substituem a IFI HEp-2. Esta deve ser utilizada como teste complementar, para confirmação de resultados positivos e definição do título e padrão de fluorescência.
- Somente títulos da IFI HEp-2 a partir de 1:160 devem ser considerados “anormais” e, portanto, esta seria a diluição a ser utilizada como triagem em nosso meio.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. 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. American College of Pathologists. Arch Pathol Lab Med 2000;124: 71-81.
2. Solomon DH, Kavanaugh AJ, Schur PH. Evidence-based guidelines for the use of immunologic tests: antinuclear antibody testing. Arthritis Rheum 2002;47:434-444.
3. Dellavance A, Leser PG, Andrade LEC. Análise crítica do teste de anticorpos antinúcleo (FAN) na prática clínica. Rev Bras Reumatol 2007;47:265-275.
4. Von Mühlen CA, Tan EM. Autoantibodies in the diagnosis of systemic rheumatic diseases. Semin Arthritis Rheum 1995;24:323-58.
5. Peng SL, Craft JE. Antinuclear Antibodies. In: Gary S. Firestein, Ralph C. Budd, Edward D. Harris, Jr., Iain B. McInnes, Shaun Ruddy, and John S. Sargent. Kelley's Textbook of Rheumatology, 8th ed. W.B. Saunders, 2008.
6. Gaubitz M. Epidemiology of connective tissue disorders. Rheumatology (Oxford). 2006 Oct;45 Suppl 3:iii3-4.
7. Cooper GS, Stroehla BC. The epidemiology of autoimmune diseases. Autoimmun Rev. 2003 May; 2(3):119-25.
8. Gunnarsson R, Molberg O, Gilboe IM, Gran JT; PAHNOR1 Study Group. The prevalence and incidence of mixed connective tissue disease: a national multicentre survey of Norwegian patients. Ann Rheum Dis. 2011;70(6):1047-51.
9. Dellavance et al. 3º Consenso Brasileiro para pesquisa de autoanticorpos em células HEp-2 (FAN). Recomendações para padronização do ensaio de pesquisa de autoanticorpos em células HEp-2, controle de qualidade e associações clínicas. Rev Bras Reumatol 2009;49:89-98.
10. Homburger HA. Cascade testing for autoantibodies in connective tissue diseases. Mayo Clin Proc 1995;70:183-4.
11. 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 Oct;25(10):1980-5.
12. Slater CA, Davis RB, Shmerling RH. Antinuclear antibody testing. A study of clinical utility. Arch Intern Med. 1996 Jul 8;156(13):1421-5.
13. Narain S, Richards HB, Satoh M, Sarmiento M, Davidson R, Shuster J, Sobel E, Hahn P, Reeves WH. Diagnostic accuracy for lupus and other systemic autoimmune diseases in the community setting. Arch Intern Med. 2004 Dec 13-27;164(22):2435-41.
14. Doria A, Zen M, Canova M, Bettio S, Bassi N, Nalotto L, Rampudda M, Ghirardello A, Iaccarino L. SLE diagnosis and treatment: when early is early. Autoimmun Rev. 2010 Nov;10(1):55-60.
15. Hargraves MM. Presentation of two bone marrow elements: the 'tart' cell and the 'LE' cell. Mayo Clin Proc 1948;23:25-8.
16. Rifkind RA, Godman GC. Phase contrast and interferometric microscopy of the L.E. cell phenomenon. J Exp Med 1957;106: 607-16.
17. Haserick JR, Lewis LA, Bortz DW. Blood-factor in acute systemic lupus erythematosus. I. Determination of gamma globulin as specific plasma fraction. Am J Med Sci 1950;219:660-3.
18. Schett G, Steiner G, Smolen JS. Nuclear antigen histone H1 is primarily involved in lupus erythematosus cell formation. Arthritis Rheum 1998;41:1446-55.
19. Schett G, Rubin RL, Steiner G, Hiesberger H, Muller S, Smolen J. Arthritis Rheum. 2000 Feb;43(2):420-8
20. Friou CJ. Clinical application of lupus serum nucleoprotein reaction using immunofluorescent antibody technique. J Clin Invest 1957;36:890-7.

21. Worrall JG, Snaith ML, Batchelor JR, Isenberg DA. SLE: a rheumatological view. Analysis of the clinical features, serology and immunogenetics of 100 SLE patients during long-term follow-up. *Q J Med* 1990; 74:319–30.
22. Tan EM, Cohen AS, Fries JF, et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1982;25:1271-7.
23. Isenberg DA, Manson JJ, Ehrenstein MR, Rahman A. Fifty years of anti-ds DNA antibodies: are we approaching journey's end? *Rheumatology (Oxford)*. 2007 Jul;46(7):1052-6.
24. Cairns CA, McMillan SA, Crockard AD, Meenagh GK, Duffy EM, Armstrong DJ et al. Antinucleosome antibodies in the diagnosis of systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 2003;62:272–3.
25. Suer W, Dähnrich C, Schlumberger W, Stöcker W. Autoantibodies in SLE but not in scleroderma react with protein-stripped nucleosomes. *J Autoimmun*. 2004 Jun;22(4):325-34.
26. Bradwell AR, Hughes RG, Karin AR. Immunofluorescent Antinuclear Antibody Tests. In: Barbara Detrick, Robert G. Hamilton, James D. Folds. *Manual of Molecular and Clinical Laboratory Immunology*. 7th ed. ASM PRESS, Washington, D.C, 2006.
27. Wiik AS, Høier-Madsen M, Forslid J, Charles P, Meyrowitsch J. Antinuclear antibodies: a contemporary nomenclature using HEp-2 cells. *J Autoimmun* 2010;35:276–90.
28. Wallace DJ, Linker-Israeli M. It's not the same old lupus or Sjögren's any more: one hundred new insights, approaches, and options since 1990. *Curr Opin Rheumatol*. 1999 Sep;11(5):321-9.
29. Meroni PL, Schur PH. ANA screening: an old test with new recommendations. *Ann Rheum Dis*. 2010 Aug;69(8):1420-2.
30. Bossuyt PM, Reitsma JB, Bruns DE, Gatsonis CA, Glasziou PP, Irwig LM, et al. The STARD statement for reporting studies of diagnostic accuracy: explanation and elaboration. *Clin Chem* 2003;49:7-18.
31. Bossuyt X. Clinical performance characteristics of a laboratory test. A practical approach in the autoimmune laboratory. *Autoimmun Rev*. 2009 Jun;8(7):543-8.
32. Weig MH, Campbell G. Receiver-operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine. *Clin Chem* 1993;39:561-577.
33. Jaeschke R, Guyatt G, Sackett DL, for the Evidenced-based Medicine Working Group. Users' guide to the medical literature. III. How to use an article about a diagnostic test. B. What are the results and will they help me in caring for my patients? *JAMA* 1994;271:703–7.
34. Shmerling R H. Autoantibodies in Systemic Lupus Erythematosus - There before You Know It. *N Engl J Med* 2003; 349:1499-1500.
35. Tan EM, et al. Range of antinuclear antibodies in "healthy" individuals. *Arthritis Rheum*. 1997;40(9):1601-11.
36. Mariz HA, Sato EI, Barbosa SH, Rodrigues SH, Dellavance A, Andrade LE. ANA HEp-2 pattern is a critical parameter for discriminating ANA-positive healthy individuals and patients with autoimmune rheumatic diseases. *Arthritis Rheum* 2011;63:191–200.
37. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Defining, Establishing and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory*; Approved Guideline – Third Edition. CLSI document C28-A3, 2008.
38. Tozzoli R, Bizzaro N, Tonutti E, Villalta D, Bassetti D, Manoni F, Piazza A, Pradella M, Rizzotti P; Italian Society of Laboratory Medicine Study Group on the Diagnosis of Autoimmune Diseases. Guidelines for the laboratory use of autoantibody tests in the diagnosis and monitoring of autoimmune rheumatic diseases. *Am J Clin Pathol*. 2002 Feb;117(2):316-24.
39. Sack U, Conrad K, Csernok E, Frank I, Hiepe F, Krieger T, Kromminga A, von Landenberg P, Messer G, Witte T, et al. Autoantibody detection using indirect immunofluorescence on HEp-2 cells. *Ann N Y Acad Sci*. 2009 Sep; 1173:166-73.
40. González DA, León AC, Varela AR, García MG, Rahola Mde S, Pérez Mdel C, Hernández AG, Falcón MJ, Díaz BB. Autoantibody detection with indirect immunofluorescence on HEp-2 cells: starting serum dilutions for systemic rheumatic diseases. *Immunol Lett*. 2011 Oct 30;140(1-2):30-5.

41. Bonaguri C, Melegari A, Ballabio A, Parmeggiani M, Russo A, Battistelli L, Aloe R, Trenti T, Lippi G. Italian multicentre study for application of a diagnostic algorithm in autoantibody testing for autoimmune rheumatic disease: Conclusive results. *Autoimmun Rev.* 2011 Nov;11(1):1-5.
42. Bizzaro N, Tozzoli R, Tonutti E, Piazza A, Manoni F, Ghirardello A, et al. Variability between methods to determine ANA, anti-dsDNA and anti-ENA autoantibodies: a collaborative study with the biomedical industry. *J Immunol Methods* 1998;219:99–107.
43. Pham BN, Albarede S, Guyard A, Burg E, Maisonneuve P. Impact of external quality assessment on antinuclear antibody detection performance. *Lupus.* 2005; 14(2):113-9.
44. Nossent H, Rekvig OP. Antinuclear antibody screening in this new millennium: farewell to the microscope? *Scand J Rheumatol* 2001;30:123-126.
45. Fritzler MJ. The antinuclear antibody test: last or lasting gasp? *Arthritis Rheum.* 2011 Jan;63(1):19-22.
46. <http://www.gmk-imports.com.br/coment%C3%A1rios-finais-pcqauto-9.aspx> (acessado em 18/01/2012)
47. Tozzoli R. Recent advances in diagnostic technologies and their impact in autoimmune diseases. *Autoimmunity Reviews* 2007;6: 334–340.
48. Hanly JG, Su L, Farewell V, Fritzler MJ. Comparison between multiplex assays for autoantibody detection in systemic lupus erythematosus. *J Immunol Methods.* 2010 Jun 30;358(1-2):75-80.
49. Wiik AS, Gordon TP, Kavanaugh AF, Lahita RG, Reeves W, van Venrooij WJ, et al. IUIS/WHO/AF/CDC Committee for the Standardization of Autoantibodies in Rheumatic and Related Diseases. Cutting edge diagnostics in rheumatology: the role of patients, clinicians, and laboratory scientists in optimizing the use of autoimmune serology. *Arthritis Rheum* 2004;51:291-298.
50. Bernardini S, Infantino M, Bellincampi L, Nuccetelli M, Afeltra A, et al. Screening of antinuclear antibodies: comparison between enzyme immunoassay based on nuclear homogenates, purified or recombinant antigens and immunofluorescent assay. *Clin Chem Lab Med* 2004;42:1155-1160.
51. Emlen W, O'Neill L. Clinical significance of antinuclear antibodies: comparison of detection with immunofluorescence and enzyme-linked immunosorbent assays. *Arthritis Rheum* 1997;40:1612-1618.
52. Fritzler MJ, Wiik A, Fritzler MA, Barr SG. The use and abuse of commercial kits used to detect autoantibodies. *Arthritis Res Ther* 2003;5:192-201.
53. Bossuyt X. Evaluation of two automated enzyme immunoassays for detection of antinuclear antibodies. *Clin Chem Lab Med* 2000;38:1033-1037.
54. Dahle C, Skogh T, Aberg AK, Jalal A, Olcén P. Methods of choice for diagnostic antinuclear antibody (ANA) screening. Benefit of adding antigen-specific assays to immunofluorescence microscopy. *J Autoimmunity* 2004;22:241-248.
55. Tonutti Elio, Bassetti Danila, Piazza Anna, Visentini Daniela, Poletto Monica, Bassetto Franca, Caciagli Patrizio, Villalta Danilo, Tozzoli Renato and Bizzaro Nicola. Diagnostic Accuracy of Elisa Methods as an Alternative Screening Test to Indirect Immunofluorescence for the Detection of Antinuclear Antibodies. Evaluation of Five Commercial Kits. *Autoimmunity* 2004;37:171- 176.
56. Mogens Fenger, Allan Wiik, Mimi Høier-Madsen, Jens J. Lykkegaard, Teresa Rozenfeld, Michael S. Hansen, Bente Danneskjold Samsøe, and Søren Jacobsen. Detection of Antinuclear Antibodies by Solid-Phase Immunoassays and Immunofluorescence Analysis. *Clin Chem* 2004;50:2141 - 2147.
57. Ghilani P, Rouquette AM, Desgruelles C, Hauguel N, Le Pendeven C, Piette JC, Musset L. Evaluation of the LIAISON ANA Screen Assay for Antinuclear Antibody Testing in Autoimmune Diseases. *Ann Y Acad Sci* 2007;109:407-413.
58. Maguire GA, Ginawi A, Lee J, Lim AYN, Wood G, Houghton S, Kumararatne DS, Gaston HJS. Clinical utility of ANA measured by ELISA compared with ANA measured by immunofluorescence. *Rheumatology* 2009;48:1013-1014.

59. Copple SS, Sawitzke AD, Wilson AM, Tebo AE, Hill HR. Enzyme-linked immunosorbent assay screening then indirect immunofluorescence confirmation of antinuclear antibodies: a statistical analysis. *Am J Clin Pathol.* 2011;135(5):678-84.
60. Op De Beeck K, Vermeersch P, Verschueren P, Westhovens R, Mariën G, Blockmans D, Bossuyt X. Detection of antinuclear antibodies by indirect immunofluorescence and by solid phase assay. *Autoimmun Rev.* 2011;10(12):801-8.
61. Parker JC, Bunn CC. Sensitivity of the Phadia ELiA connective tissue disease screen for less common disease-specific autoantibodies. *J Clin Pathol.* 2011 Jul;64(7):631-3.
62. Bonilla E, Francis L, Allam F, Ogrinc M, Neupane H, Phillips PE, and Perl A. Immunofluorescence microscopy is superior to fluorescent beads for detection of antinuclear antibody reactivity in systemic lupus erythematosus patients. *Clin Immunol* 2007;124:18-21.
63. Hochberg MC, for the Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee of the American College of Rheumatology. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus [letter]. *Arthritis Rheum* 1997;40:1725.
64. Vitali C, Bombardieri S, Jonsson R, Moutsopoulos HM, Alexander EL, Carsons SE, et al. Classification criteria for Sjogren's syndrome: a revised version of the European criteria proposed by the American-European Consensus Group. *Ann Rheum Dis* 2002;61:554-558.
65. Subcommittee for Scleroderma Criteria of the American Rheumatism Association Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee. Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). *Arthritis Rheum* 1980;23:581-590.
66. Bohan A, Peter JB. Polymyositis and dermatomyositis (first of two parts). *N Engl J Med* 1975;292:344-347;
67. Bohan A, Peter JB. Polymyositis and dermatomyositis (second of two parts). *N Engl J Med* 1975;292:403-407.
68. Amigues JM, Cantagrel A, Abbal M & Mazieres B. Comparative study of 4 diagnosis criteria sets for mixed connective tissue disease in patients with anti-RNP antibodies. Autoimmunity Group of the Hospitals of Toulouse. *The Journal of Rheumatology* 1996; 23: 2055-2062.
69. Mosca M, Neri R & Bombardieri S. Undifferentiated connective tissue diseases (UCTD): a review of the literature and a proposal for preliminary classification criteria. *Clinical and Experimental Rheumatology* 1999; 17: 615-620.
70. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988;31:315-324.
71. Wolfe F, Smythe HA, Yunus MB, Bennett RM, Bombardier C, Goldenberg DL, Tugwell P, Campbell SM, Abeles M, Clark P, et al. The American College of Rheumatology 1990 Criteria for the Classification of Fibromyalgia. Report of the Multicenter Criteria Committee. *Arthritis Rheum.* 1990 Feb;33(2):160-72.
72. Dougados M, van der Linden S, Juhlin R, et al: The European Spondyloarthropathy Study Group preliminary criteria for the classification of spondyloarthropathy. *Arthritis Rheum* 34:1218-1227, 1991.
73. Jennette J.C., Falk R.J., Andrassy K., et al: Nomenclature of systemic vasculitis: Proposal of an international consensus conference. *Arthritis Rheum* 1994; 37:187-192.
74. Rudwaleit M, van der Heijde D, Landewé R, et al. The Assessment of SpondyloArthritis International Society classification criteria for peripheral spondyloarthritis and for spondyloarthritis in general. *Ann Rheum Dis* 2011;70:25-31.
75. Zhang W, Doherty M, Pascual E, Bardin T, Barskova V, Conaghan P, Gerster J, Jacobs J, Leeb B, Lioté F, et al. EULAR evidence based recommendations for gout. Part I: Diagnosis. Report of a task force of the Standing Committee for International Clinical Studies Including Therapeutics (ESCISIT). *Ann Rheum Dis.* 2006 Oct; 65(10):1301-11. .
76. Altman R, Asch E, Bloch D, Bole G, Borenstein D, Brandt K, Christy W, Cooke TD, Greenwald R, Hochberg M. Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis. Classification of osteoarthritis of the knee. *Arthritis Rheum.* 1986 Aug; 29(8):1039-49.

77. Altman R, Alarcón G, Appelrouth D, Bloch D, Borenstein D, Brandt K, Brown C, Cooke TD, Daniel W, Feldman D. *The American College of Rheumatology criteria for the classification and reporting of osteoarthritis of the hip.* *Arthritis Rheum.* 1991 May; 34(5):505-14.
78. Altman R, Alarcón G, Appelrouth D, Bloch D, Borenstein D, Brandt K, Brown C, Cooke TD, Daniel W, Gray R. *The American College of Rheumatology criteria for the classification and reporting of osteoarthritis of the hand.* *Arthritis Rheum.* 1990 Nov; 33(11):1601-10.
79. Alvarez F., Berg P.A., Bianchi F.B., et al: *International Autoimmune Hepatitis Group Report: review of criteria for diagnosis of autoimmune hepatitis.* *J Hepatol* 31. 929-938.1999.
80. Kaplan MM, Gershwin ME. *Primary biliary cirrhosis.* *N Engl J Med.* 2005;353:1261–1273.
81. Gladman DD, Ibañez D, Urowitz MB. *Systemic lupus erythematosus disease activity index 2000.* *J Rheumatol.* 2002;29(2):288-91.
82. Yee CS, et al. *The use of Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index-2000 to define active disease and minimal clinically meaningful change based on data from a large cohort of systemic lupus erythematosus patients.* *Rheumatology (Oxford).* 2011 May;50(5):982-8.
83. *American College of Rheumatology Ad Hoc Committee on Immunologic Testing Guidelines. Guidelines for immunologic laboratory testing in the rheumatic diseases: an introduction.* *Arthritis Rheum (Arthritis Care Res)* 2002;47(4):429–33.
84. DeLong ER, DeLong DM, Clarke-Pearson DL. *Comparing the areas under two or more correlated receiver operating characteristic curves: a nonparametric approach.* *Biometrics* 1988; 44:837-845.
85. Altman DG. *Practical Statistics for Medical Research.* Chapman and Hall 1991.
86. Mahler M, You D, Baron M, Taillefer SS, Hudson M; *Canadian Scleroderma Research Group (CSRG), Fritzler MJ. Anti-centromere antibodies in a large cohort of systemic sclerosis patients: comparison between immunofluorescence, CENP-A and CENP-B ELISA.* *Clin Chim Acta.* 2011 Oct 9;412(21-22):1937-43.
87. Lijmer JG, Mol BW, Heisterkamp S, et al. *Empirical evidence of design-related bias in studies of diagnostic tests.* *JAMA* 1999;282:1061-1066.
88. Reisner BS, DiBlasi J, Goel N. *Comparison of an enzyme immunoassay to an indirect fluorescent immunoassay for the detection of antinuclear antibodies.* *Am J Clin Pathol* 1999;111:503-506.
89. Jaskowski TD, Schroder C, Martins TB, Mouristsen CL, Litwin CM, Hill HR. *Screening for antinuclear antibodies by enzyme immunoassay.* *Am J Clin Pathol* 1996;105:468-473.
90. 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;122:993-999.
91. Dellavance A, Viana VS, Leon EP, Bonfa ES, Andrade LE, Leser PG. *The clinical spectrum of antinuclear antibodies associated with the nuclear dense fine speckled immunofluorescence pattern.* *J Rheumatol* 2005;32: 2144-9.
92. Bayer PM, Bauerfeind S, Bienvenu J, Fabien N, Frei PC, Gilburd B, et al. *Multicenter evaluation study on a new HEp-2 ANA screening enzyme Immune assay.* *J Autoimmun* 1999;13:89-93.
93. Swaak AJG, Huysen V, Smeenk RJT. *Antinuclear antibodies in routine analyses: the relevance of putative clinical associations.* *Ann Rheum Dis* 1993;52:110-114.
94. Khan S, Alvi A, Holding S, Kemp ML, Raine D, Doré PC, Sewell WAC. *The clinical significance of antinucleolar antibodies.* *J Clin Pathol* 2008;61:283-286.
95. Tan EM. *Autoantibodies to nuclear antigens (ANA): their immunobiology and medicine.* *Adv Immunol.* 1982;33:167–240.
96. *Clinical and Laboratory Standards Institute ILA-2-A2. Quality Assurance of Laboratory Tests for Autoantibodies to Nuclear Antigens: (1) Indirect Fluorescence Assay for Microscopy and (2) Microtiter Enzyme Immunoassay Methods; Approved Guideline 2nd ed.,2006 CLSI Wayne, PA.*

97. Puritz EM, Yount WJ, Newell M, Utsinger PD. Immunoglobulin classes and IgG subclasses of human antinuclear antibodies. A correlation of complement fixation and the nephritis of systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol Immunopathol.* 1973 Nov; 2(1):98-113.
98. Gonzalez EN, Rothfield NF. Immunoglobulin class and pattern of nuclear fluorescence in systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med.* 1966 Jun 16;274(24):1333-8.
99. Ho KT, Reveille JD. The clinical relevance of autoantibodies in scleroderma. *Arthritis Res Ther.* 2003; 5(2):80-93. Epub 2003 Feb 12.
100. Steen VD. Autoantibodies in systemic sclerosis. *Semin Arthritis Rheum.* 2005 Aug; 35(1):35-42.
101. Steen VD, Lucas M, Fertig N, Medsger TA Jr. Pulmonary arterial hypertension and severe pulmonary fibrosis in systemic sclerosis patients with a nucleolar antibody. *J Rheumatol* 2007 34(11):2230-5.
102. Shanmugam VK, Swistowski DR, Saddic N, Wang H, Steen VD. Comparison of indirect immunofluorescence and multiplex antinuclear antibody screening in systemic sclerosis. *Clin Rheumatol.* 2011 Oct;30(10):1363-8.
103. Villalta D, Morozzi G, Tampoia M, Alpini C, Brusca I, Salgarolo V, Papisch W, Bizzaro N. Antibodies to fibrillarin, PM-Scl and RNA polymerase III detected by ELISA assays in patients with systemic sclerosis. *Clin Chim Acta.* 2010 May 2;411(9-10):710-3.
104. Garcia J, Osuna M, Castrejon F, Enriquez L, Reyes P, Hermosillo J. Methods to detect antifibrillarin antibodies in patients with systemic sclerosis (SSc): a comparison. *J Clin Lab Anal* 2004;18:19–26.
105. Targoff IN: Laboratory testing in the diagnosis and management of idiopathic inflammatory myopathies. *Rheum Dis Clin North Am* 2002, 28:859-890.
106. Reichlin M, Arnett FC Jr: Multiplicity of antibodies in myositis sera. *Arthritis Rheum* 1984, 27:1150-1156.
107. Koenig M, Fritzier MJ, Targoff IN, Troyanov Y, Sénécal JL. Heterogeneity of autoantibodies in 100 patients with autoimmune myositis: insights into clinical features and outcomes. *Arthritis Res Ther.* 2007;9(4):R78.
108. Love LA, Leff RL, Fraser DD, Targoff IN, Dalakas M, Plotz PH, Miller FW. A new approach to the classification of idiopathic inflammatory myopathy: myositis-specific autoantibodies define useful homogeneous patient groups. *Medicine (Baltimore).* 1991 Nov; 70(6):360-74.
109. Vánca A, Gergely L, Ponyi A, Lakos G, Németh J, Szodoray P, Dankó K. Myositis-specific and myositis-associated antibodies in overlap myositis in comparison to primary dermatomyositis: Relevance for clinical classification: retrospective study of 169 patients. *Joint Bone Spine.* 2010 Mar; 77(2):125-30.
110. Troyanov Y, Targoff IN, Tremblay JL, Goulet JR, Raymond Y, Sénécal JL. Novel classification of idiopathic inflammatory myopathies based on overlap syndrome features and autoantibodies: analysis of 100 French Canadian patients. *Medicine (Baltimore).* 2005 Jul; 84(4):231-49.
111. Kalluri M, Sahn SA, Oddis CV, Gharib SL, Christopher-Stine L, Danoff SK, Casciola-Rosen L, Hong G, Dellaripa PF, Highland KB. Clinical profile of anti-PL-12 autoantibody. Cohort study and review of the literature. *Chest.* 2009 Jun; 135(6):1550-6.
112. Fischer A, Swigris JJ, du Bois RM, Lynch DA, Downey GP, Cosgrove GP, Frankel SK, Fernandez-Perez ER, Gillis JZ, Brown KK. Anti-synthetase syndrome in ANA and anti-Jo-1 negative patients presenting with idiopathic interstitial pneumonia. *Respir Med.* 2009 Nov;103(11):1719-24.

113. Ghirardello A, Rampudda M, Ekholm L, Bassi N, Tarricone E, Zampieri S, Zen M, Vattemi GA, Lundberg IE, Doria A. Diagnostic performance and validation of autoantibody testing in myositis by a commercial line blot assay. *Rheumatology (Oxford)*. 2010 Dec;49(12):2370-4.
114. Rönnelid J, Barbasso Helmers S, Storfors H, Grip K, Rönnblom L, Franck-Larsson K, Nordmark G, Lundberg IE. Use of a commercial line blot assay as a screening test for autoantibodies in inflammatory myopathies. *Autoimmun Rev*. 2009 Sep; 9(1):58-61.
115. Targoff IN. Myositis Autoantibodies: Aminoacyl-tRNA Synthetase, Signal Recognition Particle, Mi-2, and PM/Scl Autoantibodies. In: Y. Shoenfeld, M.E. Gershwin, P.L. Meroni. *Autoantibodies*. 2nd Edition, Elsevier, 2007.
116. Al-Allaf AW, Ottewell L, Pullar T. The prevalence and significance of positive antinuclear antibodies in patients with fibromyalgia syndrome: 2-4 years' follow-up. *Clin Rheumatol*. 2002 Nov; 21(6):472-7.
117. Kötter I, Neuscheler D, Günaydin I, Wernet D, Klein R. Is there a predisposition for the development of autoimmune diseases in patients with fibromyalgia? Retrospective analysis with long term follow-up. *Rheumatol Int*. 2007 Sep;27(11):1031-9.
118. Nishimura K, Sugiyama D, Kogata Y, Tsuji G, Nakazawa T, Kawano S, Saigo K, Morinobu A, Koshiba M, Kuntz KM, et al. Meta-analysis: diagnostic accuracy of anti-cyclic citrullinated peptide antibody and rheumatoid factor for rheumatoid arthritis. *Ann Intern Med*. 2007 Jun 5; 146(11):797-808.
119. Jaskowski TD, Hill HR, Russo KL, Lakos G, Szekanecz Z, Teodorescu M. Relationship between rheumatoid factor isotypes and IgG anti-cyclic citrullinated peptide antibodies. *J Rheumatol*. 2010 Aug 1; 37(8):1582-8.
120. da Mota LM, Santos Neto LL, Pereira IA, Burlingame R, Ménard HA, Laurindo IM. Autoantibodies in early rheumatoid arthritis: Brasília cohort: results of a three-year serial analysis. *Rev Bras Reumatol*. 2011 Dec; 51(6):564-71.
121. Barnett EV, North AF, Condemi JJ, et al: Antinuclear factors in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Ann Intern Med* 1965;63:100.
122. Doria A, Zampieri S, Sarzi-Puttini P. Exploring the complex relationships between infections and autoimmunity. *Autoimmun Rev*. 2008 Dec;8(2):89-91.
123. Elkayam O, Caspi D, Lidgi M, Segal R. Auto-antibody profiles in patients with active pulmonary tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2007 Mar;11(3):306-10.
124. Isenberg D A, Maddison P, Swana G, et al. Profile of autoantibodies in the serum of patients with tuberculosis, klebsiella and other gram-negative infections. *Clin Exp Immunol* 1987; 76: 516–523.
125. Berman A, Espinoza LR, Diaz JD, et al.: Rheumatic manifestations of human immunodeficiency virus infection. *Am J Med* 1988, 85:59–64.
126. Massabki PS, Accetturi C, Nishie JA, et al. Clinical implications of autoantibodies in HIV infection. *AIDS* 1997;11:1845–50.
127. Antico A, Platzgummer S, Bassetti D, Bizzaro N, Tozzoli R, Villalta D; Study Group on Autoimmune Diseases of the Italian Society of Laboratory Medicine (SIMEI). Diagnosing systemic lupus erythematosus: new-generation immunoassays for measurement of anti-dsDNA antibodies are an effective alternative to the Farr technique and the Crithidia luciliae immunofluorescence test. *Lupus*. 2010 Jul;19(8):906-12.
128. Narciso-Schiavon JL, Freire FC, Suarez MM, Ferrari MV, Scanhola GQ, Schiavon Lde L, de Carvalho Filho RJ, Ferraz ML, Silva AE. Antinuclear antibody positivity in patients with chronic hepatitis C: clinically relevant or an epiphenomenon? *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2009 Apr;21(4):440-6.

129. Gatselis NK, Georgiadou SP, Koukoulis GK, Tassopoulos N, Zachou K, Liaskos C, Hatzakis A, Dalekos GN. Clinical significance of organ- and non-organ-specific autoantibodies on the response to anti-viral treatment of patients with chronic hepatitis C. *Aliment Pharmacol Ther.* 2006 Dec;24(11-12):1563-73.
130. Medei EH, Nascimento JH, Pedrosa RC, Carvalho AC. Role of autoantibodies in the physiopathology of Chagas' disease. *Arq Bras Cardiol.* 2008 Oct;91(4):257-62, 281-6.
131. Levin MJ, Mesri E, Benarous R, Levitus G, Schijman A, Levy-Yeyati P, et al. Identification of major T cruzi antigenic determinants in Chronic Chagas' Heart Disease. *Am J Trop Med Hyg.* 1989; 41: 530-8.
132. Froelich CJ, Wallman J, Skosey JL, Teodorescu M. Clinical value of an integrated ELISA system for the detection of 6 autoantibodies (ssDNA, dsDNA, Sm, RNP/Sm, SSA, and SSB). *J Rheumatol*1990;17:192–200.
133. Ravirajan CT, Rowse L, MacGowan JR, Isenberg DA. An analysis of clinical disease activity and nephritis-associated serum autoantibody profiles in patients with systemic lupus erythematosus: a cross-sectional study. *Rheumatology (Oxford).* 2001 Dec; 40(12):1405-12.
134. Ignat GP, Rat AC, Sychra JJ, Vo J, Varga J, Teodorescu M. Information on diagnosis and management of systemic lupus erythematosus derived from the routine measurement of 8 nuclear autoantibodies. *J Rheumatol*2003;30:1761–1769.
135. Gutiérrez-Adrianzén OA, Koutouzov S, Mota RM, das Chagas Medeiros MM, Bach JF, de Holanda Campos H. Diagnostic value of anti-nucleosome antibodies in the assessment of disease activity of systemic lupus erythematosus: a prospective study comparing anti-nucleosome with anti-dsDNA antibodies. *J Rheumatol.* 2006 Aug;33(8):1538-44.
136. Teodorescu M. Clinical value of anti-ssDNA (denatured DNA) autoantibody test: beauty is in the eyes of the beholder. *Clin Appl Immunol Rev*2001;2:115–128.
137. McCloskey LJ, Christner P, Jacobs-Kosmin D, Jaskowski TD, Hill HR, Lakos G, Teodorescu M. Myth and reality: practical test system for the measurement of anti-DNA antibodies in the diagnosis of systemic lupus erythematosus (SLE). *J Clin Lab Anal* 2010;24(2):77-84.
138. Fritzler MJ, Miller BJ. Detection of autoantibodies to SS-A/Ro by indirect immunofluorescence using a transfected and overexpressed human 60 kD Ro autoantigen in HEp-2 cells. *J Clin Lab Anal.* 1995;9(3):218-24.
139. Bossuyt X, Luyckx L. Antibodies to Extractable Nuclear Antigens in Antinuclear Antibody–Negative Samples. *Clin Chem*2005;51:2426-2427.
140. Hoffman E, Peene I, Veys E, De Keyser F. Detection of specific nuclear reactivities in patients with negative nuclear antibody immunofluorescence screening tests. *Clin Chem* 2002;48:2171–6.
141. Mahler M, Rajmakers R, Dähnrich C, Blüthner M, Fritzler MJ. Clinical evaluation of autoantibodies to a novel PM/Scl peptide antigen. *Arthritis Res Ther.* 2005;7(3):R704-13.
142. Kang I, Siperstein R, Quan T, Breitenstein ML. Utility of age, gender, ANA titer and pattern as predictors of anti-ENA and -dsDNA antibodies. *Clin Rheumatol.* 2004 Dec; 23(6):509-15.
143. Almeida González D, Cabrera de León A, Rodríguez Pérez Mdel C, Brito Díaz B, González Hernández A, García García D, Vázquez Moncholi C, Aguirre Jaime A. Efficiency of different strategies to detect autoantibodies to extractable nuclear antigens. *J Immunol Methods.* 2010 Aug 31;360(1-2):89-95.
144. Craig WY, Ledue TB. The relationship between antinuclear antibody data and antibodies against extractable nuclear antigens in a large laboratory cohort. *Clin Chem Lab Med.* 2011 Nov 18.

145. Bossuyt X, Frans J, Hendrickx A, Godefridis G, Westhovens R, Mariën G. Detection of anti-SSA antibodies by indirect immunofluorescence. *Clin Chem* 2004;50:2361–9.
146. Conrad K, Roggenbuck D, Reinhold D, Sack U. Autoantibody diagnostics in clinical practice. *Autoimmun Rev.* 2012 Jan;11(3):207-11.
147. Beck ST, Silva JCN, Schimit S, Fleck J, Santos RS. Taxa de probabilidade como guia de interpretação do FAN-HEp-2 na pesquisa de autoanticorpos no lúpus eritematoso sistêmico. *J. Bras. Patol. Med. Lab.* 2009;45(4):275-283.
148. Fernandez SA, Lobo AZ, Prado de Oliveira ZN, Fukumori LM, Perigo AM, Rivitti EA. Prevalence of antinuclear autoantibodies in the serum of normal blood donors. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo* 2003;58:315–9.
149. Marin GG, Cardiel MH, Cornejo H, Viveros ME. Prevalence of antinuclear antibodies in 3 groups of healthy individuals: blood donors, hospital personnel, and relatives of patients with autoimmune diseases. *J Clin Rheumatol.* 2009 Oct;15(7):325-9.
150. Hayashi N, Koshiba M, Nishimura K, Sugiyama D, Nakamura T, Morinobu S, Kawano S, Kumagai S. Prevalence of disease-specific antinuclear antibodies in general population: estimates from annual physical examinations of residents of a small town over a 5-year period. *Mod Rheumatol.* 2008;18(2):153-60.
151. ArbuckleMR, McClainMT, RubertoneMV, et al. Development of autoantibodies before the clinical onset of lupus erythematosus. *N Engl J Med*2003;349:1526-33.
152. Li QZ, Karp DR, Quan J, Branch VK, Zhou J, Lian Y, Chong BF, Wakeland EK, Olsen NJ. Risk factors for ANA positivity in healthy persons. *Arthritis Res Ther.* 2011 Mar 2;13(2):R38.
153. Sjöwall C, Sturm M, Dahle C, Bengtsson AA, Jönsen A, Sturfelt G, Skogh T. Abnormal antinuclear antibody titers are less common than generally assumed in established cases of systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol.* 2008 Oct;35(10):1994-2000.
154. Salonen EM, Miettinen A, Walle TK, Koskenmies S, Kere J, Julkunen H. Antitelomereantibodies in systemic lupus erythematosus (SLE): a comparison with five antinuclear antibody assays in 430 patients with SLE and other rheumatic diseases. *Ann Rheum Dis.* 2004 Oct;63(10):1250-4.
155. Faria AC, Barcellos KS, Andrade LE. Longitudinal fluctuation of antibodies to extractable nuclear antigens in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol.* 2005 Jul;32(7):1267-72.
156. Ippolito A, Wallace DJ, Gladman D, et al. Autoantibodies in systemic lupus erythematosus: comparison of historical and current assessment of seropositivity. *Lupus.* 2011 Mar;20(3):250-5.
157. Mahler M, Ngo JT, Schulte-Pelkum J, et al. Limited reliability of the indirect immunofluorescence technique for the detection of anti-Rib-P antibodies. *Arthritis Res Ther* 2008;10:R131.
158. Bonfa E, Elkon KB. Clinical and serologic associations of the antiribosomal P protein antibody. *Arthritis Rheum.* 1986 Aug;29(8):981-5.
159. Kim K-H, et al, Correlation between enzyme immunoassay and indirect immunofluorescence test for high titer of anti-ribosomal-P antibodies. *Clin Chim Acta* (2011).
160. Mahler M, Kessenbrock K, Szmyrka M, et al. International multicenter evaluation of autoantibodies to ribosomal P proteins. *Clin Vaccine Immunol* 2006;13:77–83.
161. Barkhudarova F, Dährnich C, Rosemann A, Schneider U, Stöcker W, Burmester GR, Egerer K, Schlumberger W, Hiepe F, Biesen R. Diagnostic value and clinical laboratory associations of antibodies against recombinant ribosomal P0, P1 and P2 proteins and their native heterocomplex in a Caucasian cohort with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther.* 2011 Feb 10;13(1):R20.

162. Miyachi K, Tan EM: Antibodies reacting with ribosomal ribonucleoprotein in connective tissue diseases. *Arthritis Rheum* 1979, 22:87-93.
163. Radice A, Sinico RA. A new oligonucleotide-based ELISA for the detection of anti-double-stranded DNA antibodies. *Autoimmunity*. 2006 Mar;39(2):113-9.
164. Stollar BD. Molecular analysis of anti-DNA antibodies. *FASEB J*. 1994 Mar 1;8(3):337-42.
165. Smeenk RJT. DNA as antigen in SLE. In: van Verookij WM, RN, editor. *Manual Biological Markers of Disease*, 2ed, Netherkands, Kluwer Academic Publishers, 1993.
166. Morozzi G, Bellisai F, Simpatico A, Pucci G, Bacarelli MR, Campanella V, Marcolongo R, Galeazzi M. Comparison of different methods for the detection of anti-Ro/SSA antibodies in connective tissue diseases. *Clin Exp Rheumatol*. 2000 Nov-Dec;18(6):729-31.
167. Schulte-Pelkum J, Fritzler M, Mahler M. Latest update on the Ro/SS-A autoantibody system. *Autoimmun Rev*. 2009 Jun; 8(7):632-7.
168. 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 Jun;51(6):612-7.

9 ANEXOS

Anexo I

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Pessoa com Doença Reumática

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

PESSOA COM DOENÇA REUMÁTICA

ESTUDO: AVALIAÇÃO DIAGNÓSTICA DOS MÉTODOS ELISA QUIMIOLUMINESCÊNCIA COMO TESTES DE TRIAGEM ALTERNATIVOS IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA PARA A DETECÇÃO DE ANTICORPO ANTINUCLEARES

O exame para a pesquisa de anticorpos contra antígenos celulares, também conhecido como fator antinúcleo (FAN), é um importante auxílio para o diagnóstico de alguns tipos de reumatismo. Atualmente, existem vários testes laboratoriais diferentes que podem ser utilizados para a realização do exame de FAN. Para saber qual teste é mais adequado para a pesquisa do FAN, todo laboratório deve avaliar o desempenho dos testes. Essa avaliação é feita testando-se amostras de sangue de pacientes com diagnóstico de vários tipos de reumatismos e amostras de sangue de pessoas saudáveis.

Você está sendo convidado a participar do estudo acima citado. O documento abaixo contém todas as informações necessárias sobre a pesquisa que estamos fazendo. Sua colaboração neste estudo será de muita importância para nós, mas se desistir a qualquer momento, isso não causará nenhum prejuízo a você.

Estou ciente que:

- Este estudo destina-se a homens e mulheres com idade a partir de 18 anos que tenham preenchido as condições necessárias em formulário anexo.
- Responderei perguntas sobre meu estado de saúde e hábitos de vida.
- Realizarei a coleta de sangue em uma das unidades do Hermes Pardini ou no Laboratório Central do Hospital das Clínicas da UFMG para pesquisa do FAN. Estou ciente que se trata de um procedimento rotineiro de coleta de sangue podendo apresentar dor local e, raramente, outras complicações como hematoma e traumatismo.
- Caso ocorra algum tipo de complicação da coleta de sangue, toda a assistência será de responsabilidade do HP ou do Hospital das Clínicas da UFMG, sem acarretar nenhuma despesa financeira para mim.
- Essa dosagem laboratorial será utilizada exclusivamente para o estudo.
- A participação neste estudo não me acarretará qualquer despesa financeira com relação aos procedimentos efetuados.
- Receberei ressarcimento equivalente aos custos do meu transporte até a unidade mais próxima do Hermes Pardini (ônibus ou metrô).
- Tenho a liberdade de desistir ou de interromper a colaboração neste estudo no momento em que desejar, sem necessidade de qualquer explicação.
- A desistência não causará nenhum prejuízo à minha saúde ou bem estar físico, e não resultará em nenhum tipo de punição para mim.
- Os resultados obtidos durante esse estudo serão mantidos em segredo, mas concordo que sejam divulgados em revistas científicas, desde que meus dados pessoais não sejam mencionados. Os resultados impressos serão disponibilizados de acordo com o fluxo usual do Hermes Pardini.
- Os casos que apresentarem resultados positivos receberão comunicação escrita e orientação dos pesquisadores responsáveis.

- A minha participação é voluntária, portanto, não receberei nenhuma forma de remuneração.
- Posso entrar em contato com os pesquisadores responsáveis ou com o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (COEP-UFMG) para esclarecimento de qualquer dúvida.

Eu _____,
 residente no endereço _____,
 portador(a) da carteira de identidade _____, nascido(a) em
 ____/____/____ e inscrito(a) no CPF _____, abaixo
 assinado(a), concordo de livre e espontânea vontade em participar como voluntário(a)
 do estudo “AVALIAÇÃO DIAGNÓSTICA DOS MÉTODOS ELISA E QUIMIOLUMINESCÊNCIA
 COMO TESTES DE TRIAGEM ALTERNATIVOS À IMUNOFLOURESCÊNCIA INDIRETA PARA A
 DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTINUCLEARES”.

Belo Horizonte, _____ de _____ de 2011.

_____ Data ____/____/____
 Assinatura do voluntário

_____ Data ____/____/____
 Dr. Fabiano de Almeida Brito

_____ Data ____/____/____
 Dra. Silvana Maria Elói Santos

Pesquisadores responsáveis:

Dr. Fabiano de Almeida Brito. Endereço: Avenida do Contorno 3825, 4º Andar. Bairro Funcionários. Belo Horizonte, MG. CEP: 30110-021. Telefone (31) 3228-6713. E-mail: fabdoc@ig.com.br

Professora Dra. Silvana Maria Elói Santos. Endereço: Avenida Alfredo Balena 190, 4º andar. Bairro Santa Efigênia. Belo Horizonte, MG. CEP 30130-100. Telefone: (31) 3409-9774. E-mail: eloisil@medicina.ufmg.br

COEP/UFMG: Avenida Presidente Antônio Carlos, 6627 – Unidade administrativa II, 2º Andar – Sala 2005. Belo Horizonte, MG. CEP: 31270-901. Telefax (31) 3409-4592. e-mail: coep@prpq.ufmg.br

COEP/Santa Casa: Avenida Francisco Sales 1111, 9º andar – ala D. Bairro Santa Efigênia. Belo Horizonte, MG. CEP: 30150-221. Telefone (31) 3238-8838. e-mail: cep@santacasabh.org.Br

Anexo II

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Pessoa Saudável

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

PESSOA SAUDÁVEL

ESTUDO: AVALIAÇÃO DIAGNÓSTICA DOS MÉTODOS ELISA QUIMIOLUMINESCÊNCIA COMO TESTES DE TRIAGEM ALTERNATIVOS IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA PARA A DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTINUCLEARES

O exame para a pesquisa de anticorpos contra antígenos celulares, também conhecido como fator antinúcleo (FAN), é um importante auxílio para o diagnóstico de alguns tipos de reumatismo. Atualmente, existem vários testes laboratoriais diferentes que podem ser utilizados para a realização do exame de FAN.

Além dos pacientes com reumatismo, algumas pessoas saudáveis também podem apresentar o exame de FAN positivo, mesmo não tendo nenhuma doença. De cada 100 pessoas saudáveis, espera-se que no máximo quatro pessoas tenham o exame de FAN positivo. Por isso, o laboratório deve fazer este exame em pessoas saudáveis, para verificar se os resultados estão dentro do esperado.

Você está sendo convidado a participar do estudo acima citado. O documento abaixo contém todas as informações necessárias sobre a pesquisa que estamos fazendo. Sua colaboração neste estudo será de muita importância para nós, mas se desistir a qualquer momento, isso não causará nenhum prejuízo a você.

Estou ciente que:

- Este estudo destina-se a homens e mulheres com idade a partir de 18 anos que tenham preenchido as condições necessárias em formulário anexo.
- Responderei perguntas sobre meu estado de saúde e hábitos de vida.
- Realizarei a coleta de sangue em uma das unidades do Hermes Pardini ou no Laboratório Central do Hospital das Clínicas da UFMG para pesquisa do FAN. Estou ciente que se trata de um procedimento rotineiro de coleta de sangue podendo apresentar dor local e, raramente, outras complicações como hematoma e traumatismo.
- Caso ocorra algum tipo de complicação da coleta de sangue, toda a assistência será de responsabilidade do HP ou do Hospital das Clínicas da UFMG, sem acarretar nenhuma despesa financeira para mim.
- Essa dosagem laboratorial será utilizada exclusivamente para o estudo.
- A participação neste estudo não me acarretará qualquer despesa financeira com relação aos procedimentos efetuados.
- Receberei ressarcimento equivalente aos custos do meu transporte até a unidade mais próxima do Hermes Pardini (ônibus ou metrô).
- Tenho a liberdade de desistir ou de interromper a colaboração neste estudo no momento em que desejar, sem necessidade de qualquer explicação.
- A desistência não causará nenhum prejuízo à minha saúde ou bem estar físico, e não resultará em nenhum tipo de punição para mim.
- Os resultados obtidos durante esse estudo serão mantidos em segredo, mas concordo que sejam divulgados em revistas científicas, desde que meus dados pessoais não sejam mencionados. Os resultados impressos serão disponibilizados de acordo com o fluxo usual do Hermes Pardini.
- Os casos que apresentarem resultados positivos receberão comunicação escrita e orientação dos médicos responsáveis.

- A minha participação é voluntária, portanto, não receberei nenhuma forma de remuneração.
- Posso entrar em contato com os médicos responsáveis ou com o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (COEP-UFMG) para esclarecimento de qualquer dúvida.

Eu _____,
 residente no endereço _____,
 portador(a) da carteira de identidade _____, nascido(a) em
 ____/____/____ e inscrito(a) no CPF _____, abaixo
 assinado(a), concordo de livre e espontânea vontade em participar como voluntário(a)
 do estudo “AVALIAÇÃO DIAGNÓSTICA DOS MÉTODOS ELISA E QUIMIOLUMINESCÊNCIA
 COMO TESTES DE TRIAGEM ALTERNATIVOS À IMUNOFLOUORESCÊNCIA INDIRETA PARA A
 DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTINUCLEARES”.

Belo Horizonte, _____ de _____ de 2011.

_____ Data ____/____/____
 Assinatura do voluntário

_____ Data ____/____/____
 Fabiano de Almeida Brito

_____ Data ____/____/____
 Silvana Maria Elói Santos

Pesquisadores responsáveis:

Dr. Fabiano de Almeida Brito. Endereço: Avenida do Contorno 3825, 4º Andar. Bairro Funcionários. Belo Horizonte, MG. CEP: 30110-021. Telefone (31) 3228-6713. E-mail: fabdoc@iq.com.br

Professora Silvana Maria Elói Santos. Endereço: Avenida Alfredo Balena 190, 4º andar. Bairro Santa Efigênia. Belo Horizonte, MG. CEP 30130-100. Telefone: (31) 3409-9774. E-mail: eloisil@medicina.ufmg.br

COEP/UFMG: Avenida Presidente Antônio Carlos, 6627 – Unidade administrativa II, 2º Andar – Sala 2005. Belo Horizonte, MG. CEP: 31270-901. Telefax (31) 3409-4592. e-mail: coep@prpq.ufmg.br

COEP/Santa Casa: Avenida Francisco Sales 1111, 9º andar – ala D. Bairro Santa Efigênia. Belo Horizonte, MG. CEP: 30150-221. Telefone (31) 3238-8838. e-mail: cep@santacasabh.org.Br

Anexo III

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Pessoa com Doença Infecciosa

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

PESSOA COM DOENÇA INFECCIOSA

ESTUDO: AVALIAÇÃO DIAGNÓSTICA DOS MÉTODOS ELISA QUIMIOLUMINESCÊNCIA COMO TESTES DE TRIAGEM ALTERNATIVOS IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA PARA A DETECÇÃO DE ANTICORPO ANTINUCLEARES

O exame para a pesquisa de anticorpos contra antígenos celulares, também conhecido como fator antinúcleo (FAN), é um importante auxílio para o diagnóstico de alguns tipos de reumatismo. Atualmente, existem vários testes laboratoriais diferentes que podem ser utilizados para a realização do exame de FAN. Para saber qual teste é mais adequado para a pesquisa do FAN, todo laboratório deve avaliar o desempenho dos testes. Essa avaliação é feita testando-se amostras de sangue de pacientes com diagnóstico de vários tipos de reumatismos, doenças infecciosas crônicas e amostras de sangue de pessoas saudáveis.

Algumas pessoas portadoras de infecções crônicas também podem apresentar o exame de FAN positivo, mesmo não tendo nenhum reumatismo. É importante que o laboratório saiba se a quantidade de pessoas com doença infecciosa crônica e FAN positivo é diferente entre os vários testes que serão estudados.

Você está sendo convidado a participar do estudo acima citado. O documento abaixo contém todas as informações necessárias sobre a pesquisa que estamos fazendo. Sua colaboração neste estudo será de muita importância para nós, mas se desistir a qualquer momento, isso não causará nenhum prejuízo a você.

Estou ciente que:

- Este estudo destina-se a homens e mulheres com idade a partir de 18 anos que tenham preenchido as condições necessárias em formulário anexo.
- Responderei perguntas sobre meu estado de saúde e hábitos de vida.
- Realizarei a coleta de sangue em uma das unidades do Hermes Pardini ou no Laboratório Central do Hospital das Clínicas da UFMG para pesquisa do FAN. Estou ciente que se trata de um procedimento rotineiro de coleta de sangue podendo apresentar dor local e, raramente, outras complicações como hematoma e traumatismo.
- Caso ocorra algum tipo de complicação da coleta de sangue, toda a assistência será de responsabilidade do HP ou do Hospital das Clínicas da UFMG, sem acarretar nenhuma despesa financeira para mim.
- Essa dosagem laboratorial será utilizada exclusivamente para o estudo.
- A participação neste estudo não me acarretará qualquer despesa financeira com relação aos procedimentos efetuados.
- Receberei ressarcimento equivalente aos custos do meu transporte até a unidade mais próxima do Hermes Pardini (ônibus ou metrô).
- Tenho a liberdade de desistir ou de interromper a colaboração neste estudo no momento em que desejar, sem necessidade de qualquer explicação.
- A desistência não causará nenhum prejuízo à minha saúde ou bem estar físico, e não resultará em nenhum tipo de punição para mim.
- Os resultados obtidos durante esse estudo serão mantidos em segredo, mas concordo que sejam divulgados em revistas científicas, desde que meus dados pessoais não sejam mencionados. Os resultados impressos serão disponibilizados de acordo com o fluxo usual do Hermes Pardini.

- Os casos que apresentarem resultados positivos receberão comunicação escrita e orientação dos médicos responsáveis.
- A minha participação é voluntária, portanto, não receberei nenhuma forma de remuneração.
- Posso entrar em contato com os médicos responsáveis ou com o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (COEP-UFMG) para esclarecimento de qualquer dúvida.

Eu _____,
 residente no endereço _____,
 portador(a) da carteira de identidade _____, nascido(a) em
 ____/____/____ e inscrito(a) no CPF _____, abaixo
 assinado(a), concordo de livre e espontânea vontade em participar como voluntário(a)
 do estudo “AVALIAÇÃO DIAGNÓSTICA DOS MÉTODOS ELISA E QUIMIOLUMINESCÊNCIA
 COMO TESTES DE TRIAGEM ALTERNATIVOS À IMUNOFLOURESCÊNCIA INDIRETA PARA A
 DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTINUCLEARES”.

Belo Horizonte, _____ de _____ de 2011.

_____ Data ____/____/____
 Assinatura do voluntário

_____ Data ____/____/____
 Fabiano de Almeida Brito

_____ Data ____/____/____
 Silvana Maria Elói Santos

Pesquisadores responsáveis:

Dr. Fabiano de Almeida Brito. Endereço: Avenida do Contorno 3825, 4º Andar. Bairro Funcionários. Belo Horizonte, MG. CEP: 30110-021. Telefone (31) 3228-6713. E-mail: fabdoc@ig.com.br

Professora Silvana Maria Elói Santos. Endereço: Avenida Alfredo Balena 190, 4º andar. Bairro Santa Efigênia. Belo Horizonte, MG. CEP 30130-100. Telefone: (31) 3409-9774. E-mail: eloisil@medicina.ufmg.br

COEP/UFMG: Avenida Presidente Antônio Carlos, 6627 – Unidade administrativa II, 2º Andar – Sala 2005. Belo Horizonte, MG. CEP: 31270-901. Telefax (31) 3409-4592. e-mail: coep@prpq.ufmg.br

Anexo IV

Questionário do Grupo 1

PROJETO: AVALIAÇÃO DIAGNÓSTICA DOS MÉTODOS ELISA E QUIMIOLUMINESCÊNCIA
COMO TESTES DE TRIAGEM ALTERNATIVOS À IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA PARA
A DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTINUCLEARES

QUESTIONÁRIO GRUPO 1

NOME: _____ DATA: ___/___/___

TELEFONE: _____ DATA DE NASCIMENTO: ___/___/___

SEXO: M F

PACIENTE Nº

PRONTUÁRIO: _____

SOROTECA: _____

RAÇA: BRANCO NEGRO PARDO OUTRO: _____

1- DIAGNÓSTICO:

LES Esclerodermia limitada Esclerodermia difusa

Síndrome de Sjögren Doença mista do tecido conjuntivo Síndrome de sobreposição

Polimiosite/Dermatomiosite Doença indiferenciada do tecido conjuntivo

2- DATA DO DIAGNÓSTICO:

___/___/___

3- FAN HEp-2 POSITIVO NA ÉPOCA DO DIAGNÓSTICO?

Sim Não



Padrão: _____

Título: _____

4- AUTOANTICORPOS ESPECÍFICOS POSITIVOS NA ÉPOCA DO DIAGNÓSTICO?

Sim Não Não testados



SSA/Ro SSB/La Sm RNP Jo-1 Scl-70 DNA

Cromatina/Nucleosomo Mitocôndria Músculo liso

Técnicas: _____

5- DOENÇA EM ATIVIDADE NO MOMENTO?

Sim Não Não se aplica



No caso de LES: (SLEDAI-2K): Escore total: _____/_____

[1] leucopenia	[2] pericardite	[4] proteinúria	[4] artrite	[8] dist.visual
[1] plaquetopen.	[2] pleurite	[4] piúria	[5] vasculite	[8] s cerebral org
[1] febre	[2] úlc.mucosa	[4] hematuria	[8] AVC	[8] psicose
[2] ↓ complement	[2] alopecia	[4] cilindros	[8] cefaléia lupica	[8] convulsão
[2] ↓ anti-DNA	[2] erup.cutânea	[4] moosite	[8] alteração par craniano	

6- MEDICAMENTOS EM USO NO MOMENTO:

7- POSSUI ALGUMA COMORBIDADE?

Sim Não



Qual(is)?

8- CRITÉRIOS DIAGNÓSTICOS DE LES NO MOMENTO DO DIAGNÓSTICO E ATUALMENTE:

Eritema malar	<input type="checkbox"/> Diagnóstico	<input type="checkbox"/> Posterior
Lesão cutânea discóide	<input type="checkbox"/> Diagnóstico	<input type="checkbox"/> Posterior
Fotossensibilidade	<input type="checkbox"/> Diagnóstico	<input type="checkbox"/> Posterior
Úlceras orais/nasais	<input type="checkbox"/> Diagnóstico	<input type="checkbox"/> Posterior
Artrite não erosiva	<input type="checkbox"/> Diagnóstico	<input type="checkbox"/> Posterior

Serosite	<input type="checkbox"/> Diagnóstico	<input type="checkbox"/> Posterior
Acometimento renal	<input type="checkbox"/> Diagnóstico	<input type="checkbox"/> Posterior
Convulsão ou psicose	<input type="checkbox"/> Diagnóstico	<input type="checkbox"/> Posterior
Alteração hematológica	<input type="checkbox"/> Diagnóstico	<input type="checkbox"/> Posterior
Alteração imunológica	<input type="checkbox"/> Diagnóstico	<input type="checkbox"/> Posterior
FAN	<input type="checkbox"/> Diagnóstico	<input type="checkbox"/> Posterior

Descrever serosite, alteração renal (classe nefrite), neurológica, hematológica e imunológica:

Anexo V

Questionário do Grupo 2 - Pessoa com Doença Reumática

PROJETO: AVALIAÇÃO DIAGNÓSTICA DOS MÉTODOS ELISA E QUIMIOLUMINESCÊNCIA
COMO TESTES DE TRIAGEM ALTERNATIVOS À IMUNOFLOURESCÊNCIA INDIRETA PARA
A DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTINUCLEARES

QUESTIONÁRIO GRUPO 2

NOME: _____ DATA: ___/___/___

TELEFONE: _____ DATA DE NASCIMENTO: ___/___/___

SEXO: M F PACIENTE Nº PRONTUÁRIO:

_____ SOROTECA: _____

RAÇA: BRANCO NEGRO PARDO OUTRO: _____

1- DIAGNÓSTICO:

- Artrite Reumatóide Espondilite Anquilosante Artrite Reativa Gota
 Artrite psoriásica Osteoartrite Fibromialgia Osteoporose
 Granulomatose de Wegener Poliarterite nodosa Síndrome de Churg-Strauss
 Arterite de Takayasu Arterite Temporal Vasculite indiferenciada
 Reumatismo de partes moles Outro: _____

2- DATA DO DIAGNÓSTICO:

___/___/___

3- DOENÇA EM ATIVIDADE NO MOMENTO?

Sim Não Não se aplica

4- POSSUI ALGUMA COMORBIDADE?

Sim Não



Qual(is)?

5- MEDICAMENTOS EM USO NO MOMENTO:

Anexo VI

Questionário do Grupo 2 - Pessoa com Doença Infecciosa

PROJETO: AVALIAÇÃO DIAGNÓSTICA DOS MÉTODOS ELISA E QUIMIOLUMINESCÊNCIA COMO TESTES DE TRIAGEM ALTERNATIVOS À IMUNOFLOURESCÊNCIA INDIRETA PARA A DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTINUCLEARES

QUESTIONÁRIO GRUPO 2 – Doenças infecciosas

NOME: _____ DATA: ___/___/___

TELEFONE: _____ DATA DE NASCIMENTO: ___/___/___

SEXO: M F PACIENTE Nº _____

PRONTUÁRIO: _____ SOROTECA: _____

RAÇA: BRANCO NEGRO PARDO OUTRO: _____

1- DIAGNÓSTICO:

Hepatite B Hepatite C aids

2- DATA DO DIAGNÓSTICO:

___/___/___

3- POSSUI ALGUMA COMORBIDADE?

Sim Não



Qual(is)?

4- MEDICAMENTOS EM USO NO MOMENTO:

Anexo VII

Questionário do Grupo 3

PROJETO: AVALIAÇÃO DIAGNÓSTICA DOS MÉTODOS ELISA E QUIMIOLUMINESCÊNCIA COMO TESTES DE TRIAGEM ALTERNATIVOS À IMUNOFLOURESCÊNCIA INDIRETA PARA A DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTINUCLEARES

QUESTIONÁRIO GRUPO 3

NOME: _____ DATA: ___/___/___

TELEFONE: _____ DATA DE NASCIMENTO: ___/___/___

SEXO: M F PACIENTE Nº

PRONTUÁRIO: _____ SOROTECA: _____

RAÇA: BRANCO NEGRO PARDO OUTRO: _____

DATA DO INÍCIO DOS SINTOMAS: ___/___/___ DATA DO DIAGNÓSTICO: ___/___/___

ESPECIALIDADE DO MÉDICO QUE ENCAMINHOU O PACIENTE:

- ANGIOLOGIA/CIRURGIA VASCULAR CLÍNICA MÉDICA GINECOLOGIA
 INFECTOLOGIA CARDIOLOGIA GASTROENTEROLOGIA ENDOCRINOLOGIA
 NEUROLOGIA NEFROLOGIA GERIATRIA OUTRO: _____

HIPÓTESE DIAGNÓSTICA INICIAL:

DIAGNÓSTICO FINAL:

POSSUI ALGUMA COMORBIDADE?

Sim Não



Qual(is)?

MEDICAMENTOS EM USO NO MOMENTO:

QUESTÕES RELACIONADAS AO DIAGNÓSTICO DE LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO

Você apresentou queda rápida de grande quantidade de cabelo?

Sim Não

Algum profissional de saúde lhe comunicou que você apresenta anemia, baixa de plaquetas ou baixa de glóbulos brancos?

Sim Não

Os seus dedos ficam esbranquiçados, dormentes ou desconfortáveis quando em contato com o frio?

Sim Não

Você já apresentou algum episódio de dor no peito relacionada à respiração profunda, com duração de alguns dias?

Sim Não

Você apresenta, com frequência, episódios de úlceras na boca?

Sim Não

Quando você toma sol, a sua pele fica sensível e avermelhada?

Sim Não

Você já teve episódios de epilepsia ou convulsão?

Sim Não

Algum profissional de saúde lhe comunicou que você apresenta proteína na urina?

Sim Não

Você já apresentou mancha vermelha nas bochechas com duração de mais de 1 mês?

Sim Não

Suas juntas já ficaram inchadas e doloridas?

Sim Não

Presença de 4 ou mais respostas positivas:

Sim Não

QUESTÕES RELACIONADAS AO DIAGNÓSTICO DE OUTRAS DOENÇAS REUMÁTICAS AUTO-IMUNES

Você se sente muito cansado ao final do dia?

Sim Não

Ao acordar, você sente que as suas juntas estão rígidas (endurecidas)?

Sim Não

Você apresenta episódios freqüentes de febre sem explicação?

Sim Não

Quando você come, sente alguma dificuldade para engolir o alimento?

Sim Não

Você sente dor de cabeça forte?

Sim Não

Você já sofreu algum derrame?

Sim Não

Você já teve algum aborto?

Sim Não

Você já teve trombose?

Sim Não

Você já teve embolia pulmonar?

Sim Não

Você sente dormência e/ou formigamento nos braços e/ou nas pernas?

Sim Não

Você tem sensação de secura nos olhos (areia ou coceira)?

Sim Não

Você tem sensação de boca seca?

Sim Não

QUESTÕES CONTROLE

Você sofre de dor nas costas?

Sim Não

Você tem intolerância alimentar?

Sim Não

Você apresenta gases e desconforto na barriga após as refeições?

Sim Não

Anexo VIII

Questionário do Grupo 4

Projeto: AVALIAÇÃO DIAGNÓSTICA DOS MÉTODOS ELISA E QUIMIOLUMINESCÊNCIA COMO TESTES DE TRIAGEM ALTERNATIVOS À IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA PARA A DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTINUCLEARES

Questionário grupo 4

O objetivo dessa etapa do estudo é avaliar se pessoas saudáveis, como você, apresentam o teste de FAN positivo. Este exame pode ser positivo mesmo em pessoas saudáveis. Responda a cada uma das perguntas. Se você for portador de alguma doença autoimune como lúpus eritematoso sistêmico, hepatite autoimune, artrite reumatóide, esclerodermia ou Síndrome de Sjögren, a coleta de sangue não poderá ser realizada e sua participação no estudo não será possível.

NOME: _____ DATA: __/__/__

TELEFONE: _____ DATA DE NASCIMENTO: __/__/__

SEXO: M F PACIENTE Nº PRONTUÁRIO: _____

SOROTECA: _____

RAÇA: BRANCO NEGRO PARDO OUTRO: _____

1- Você toma algum medicamento todos os dias?

Sim Não



Qual(is) medicamento(s)? _____

2- Você tem algum parente de primeiro grau (pais, irmãos ou tios) com diagnóstico de lúpus, artrite reumatóide, síndrome de Sjögren, esclerodermia ou miosite?

Sim Não

3- Você é portador de hepatite B, hepatite C, HIV ou outra doença viral crônica?

Sim Não



Qual a doença? _____

4- Você é portador de alguma doença do fígado?

Sim Não



Qual a doença? _____

5- Você ficou internado alguma vez no último ano?

Sim Não



Por que motivo? _____

6- Você tirou licença médica do trabalho alguma vez no último ano?

Sim Não



Por que motivo? _____

7- Você já teve artrite ou algum reumatismo, com duração de mais de 3 meses, diagnosticado por um médico?

Sim Não

8- Os seus dedos ficam pálidos, arroxeados, dormentes ou desconfortáveis no frio?

Sim Não

9- Durante algum exame de sangue alguém lhe disse que a contagem de glóbulos vermelhos, glóbulos brancos ou plaquetas estava baixa (exceto no caso de dengue)?

Sim Não

10- Você já teve feridinhas (aftas) na boca ou nariz, com duração de mais de 15 dias?

Sim Não

11- Alguma mancha vermelha surgiu no seu rosto, sobre o nariz e bochechas, com duração de mais de 1 mês?

Sim Não

12- Sua pele fica com manchas vermelhas e irritada, principalmente no rosto, quando você toma sol (não é queimadura solar)? É pior em comparação com outras pessoas?

Sim Não

13- Você já sentiu dor no peito que piorava com a respiração, com duração de alguns dias (pleurite) ?

Sim Não

14- Você já teve perda de proteína na urina?

Sim Não

15- Você já teve convulsão ou epilepsia?

Sim Não

Anexo IX

Lista de verificação do STARD

STARD checklist for the reporting of studies of diagnostic accuracy.
First official version, January 2003.

Section and Topic	Item #		On page #
TITLE/ABSTRACT/ KEYWORDS	1	Identify the article as a study of diagnostic accuracy (recommend MeSH heading 'sensitivity and specificity').	
INTRODUCTION	2	State the research questions or study aims, such as estimating diagnostic accuracy or comparing accuracy between tests or across participant groups.	
METHODS			
<i>Participants</i>	3	Describe the study population: The inclusion and exclusion criteria, setting and locations where the data were collected.	
	4	Describe participant recruitment: Was recruitment based on presenting symptoms, results from previous tests, or the fact that the participants had received the index tests or the reference standard?	
	5	Describe participant sampling: Was the study population a consecutive series of participants defined by the selection criteria in items 3 and 4? If not, specify how participants were further selected.	
	6	Describe data collection: Was data collection planned before the index test and reference standard were performed (prospective study) or after (retrospective study)?	
<i>Test methods</i>	7	Describe the reference standard and its rationale.	
	8	Describe technical specifications of material and methods involved including how and when measurements were taken, and/or cite references for index tests and reference standard.	
	9	Describe definition of and rationale for the units, cutoffs and/or categories of the results of the index tests and the reference standard.	
	10	Describe the number, training and expertise of the persons executing and reading the index tests and the reference standard.	
	11	Describe whether or not the readers of the index tests and reference standard were blind (masked) to the results of the other test and describe any other clinical information available to the readers.	
<i>Statistical methods</i>	12	Describe methods for calculating or comparing measures of diagnostic accuracy, and the statistical methods used to quantify uncertainty (e.g. 95% confidence intervals).	
	13	Describe methods for calculating test reproducibility, if done.	
RESULTS			
<i>Participants</i>	14	Report when study was done, including beginning and ending dates of recruitment.	
	15	Report clinical and demographic characteristics of the study population (e.g. age, sex, spectrum of presenting symptoms, comorbidity, current treatments, recruitment centers).	
	16	Report the number of participants satisfying the criteria for inclusion that did or did not undergo the index tests and/or the reference standard; describe why participants failed to receive either test (a flow diagram is strongly recommended).	
<i>Test results</i>	17	Report time interval from the index tests to the reference standard, and any treatment administered between.	
	18	Report distribution of severity of disease (define criteria) in those with the target condition; other diagnoses in participants without the target condition.	
	19	Report a cross tabulation of the results of the index tests (including indeterminate and missing results) by the results of the reference standard; for continuous results, the distribution of the test results by the results of the reference standard.	
	20	Report any adverse events from performing the index tests or the reference standard.	
<i>Estimates</i>	21	Report estimates of diagnostic accuracy and measures of statistical uncertainty (e.g. 95% confidence intervals).	
	22	Report how indeterminate results, missing responses and outliers of the index tests were handled.	
	23	Report estimates of variability of diagnostic accuracy between subgroups of participants, readers or centers, if done.	
	24	Report estimates of test reproducibility, if done.	
DISCUSSION	25	Discuss the clinical applicability of the study findings.	

