

**DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS
ANTINUCLEARES POR
INMUNOFLOURECENCIA INDIRECTA (IFI)
DTC-DI-005-GA-A1**

CRELAB

**Comité Regional de Estandarización de Laboratorios
Bioquímicos - Córdoba**



CRELAB

**Comité Regional de Estandarización de
Laboratorios Bioquímicos – Córdoba**

**DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS
ANTINUCLEARES POR INMUNOFLUORESCENCIA
INDIRECTA (IFI)**

DTC-DI-005-GA-A1



	DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS ANTINUCLEARES POR INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (IFI)	DTC-DI-005-GA-A1
		Edición Fecha: 07/01/2021
		Página 3 de 41

MIEMBROS DEL COMITÉ

Dr. Gustavo Chiabrando

Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Nacional de Córdoba
Córdoba, Argentina

Bioq. Esp. Silvia Zamory

Colegio de Bioquímicos de la
Provincia de Córdoba
Córdoba, Argentina

Bioq. Esp. Diego Andreoni

Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Católica de Córdoba
Córdoba, Argentina

Bioq. Esp. César Collino

Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Nacional de Córdoba
Córdoba, Argentina

Bioq. Esp. Pablo Luján

Colegio de Bioquímicos de la
Provincia de Córdoba
Córdoba, Argentina

Mg. Bioq. Marcela Carignani

Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Católica de Córdoba
Córdoba, Argentina

Dr. Darío Ferrer

Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Nacional de Córdoba
Córdoba, Argentina

Mg. Bioq. Ana Belén Pacheco

Colegio de Bioquímicos de la
Provincia de Córdoba
Córdoba, Argentina

Dra. Maribel Martínez Wassaf

Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Católica de Córdoba
Córdoba, Argentina

Dr. Pablo F. Barcelona

Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Nacional de Córdoba
Córdoba, Argentina

Bioq. Esp. Conrado Avendaño

Colegio de Bioquímicos de la
Provincia de Córdoba
Córdoba, Argentina

	DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS ANTINUCLEARES POR INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (IFI)	DTC-DI-005-GA-A1
		Edición Fecha: 07/01/2021
		Página 4 de 41

AUTORES

Mgter. Bioq. Esp. Marcela Demarchi

DIRECTOR

Hospital Córdoba
Ministerio de Salud
Córdoba, Argentina

Bioq. Esp. Adriana Cassinerio

VICE-DIRECTOR

Hospital de Niños de la Santísima Trinidad
Ministerio de Salud
Córdoba, Argentina

Dra. Bioq. Farm. Pilar Aoki

Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e
Inmunología, Consejo Nacional de
Investigaciones Científicas y Tecnológicas
Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Nacional de Córdoba
Córdoba, Argentina

Bioq. Esp. María Cecilia García Oro

Hospital Infantil Municipal
Municipalidad de Córdoba
Córdoba, Argentina

Bioq. Esp. María Alicia Soriano

Hospital Infantil Municipal
Municipalidad de Córdoba
Córdoba, Argentina

Bioq. Esp. Cristina Acosta

Hospital Nacional de Clínicas
Facultad de Ciencias Médicas
Universidad Nacional de Córdoba
Córdoba, Argentina

Bioq. Esp. Natalia Peano

Fundación para el Progreso de la Medicina
Córdoba, Argentina

Bioq. Esp. Lucrecia Daniela Barbero

Sanatorio Mayo
Córdoba, Argentina

Bioq. Esp. Valentina Olivero

Fundación para el Progreso de la Medicina
Córdoba, Argentina

Bioq. Esp. Natalia Raimondo

Laboratorio LACE
Córdoba, Argentina

Dra. Cinthya Caula

Facultad Ciencias Químicas
Universidad Católica de Córdoba
Córdoba, Argentina

	DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS ANTINUCLEARES POR INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (IFI)	DTC-DI-005-GA-A1
		Edición Fecha: 07/01/2021
		Página 5 de 41

Para obtener copias, actualizaciones, nuevas guías o para proponer temáticas respecto a la documentación que se genera en CRELA-CBA consultar en la página web: www.crelab-cba.org; correo electrónico: comite@crelab-cba.org; info@crelab-cba.org.

Copyright ©2021. Comité Regional de Estandarización de Laboratorios Bioquímicos-Córdoba.

CITA SUGERIDA

Comité Regional de Estandarización de Laboratorios Bioquímicos-Córdoba. Determinación de anticuerpos antinucleares por inmunofluorescencia indirecta (IFI). Documento CRELAB. Primera edición enero 2021. DTC-DI-005-GA-A1

VERSIONES

Primera edición – Enero 2021

ISSN 2796-7174

	<p style="text-align: center;">DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS ANTINUCLEARES POR INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (IFI)</p>	DTC-DI-005-GA-A1
		Edición Fecha: 07/01/2021
		Página 6 de 41

RESUMEN

La detección de Anticuerpos antinucleares (ANA) es fundamental en el diagnóstico de enfermedades reumáticas autoinmunes sistémicas (ERAs) y han sido incorporados en diferentes guías sobre criterios diagnósticos.

La IFI es la técnica de *screening* utilizada para detectar una amplia variedad de ANA dirigidos a diferentes autoantígenos celulares, pudiéndose reconocer patrones de tinción nucleares, citoplasmáticos y mitóticos cuando se utiliza como sustrato células de carcinoma epidermoide laríngeo humano (células HEp-2).

Si bien el *Colegio Americano de Reumatología* (ACR) y otras entidades internacionales como *European autoimmunity standardization initiative* (EASI), *International Union of Immunologic Societies* (IUIS), Organización Mundial de la Salud (OMS), *Arthritis Foundation* (AF) y *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) coinciden en que el ensayo de IFI en células HEp-2 es la prueba estándar de oro para ANA, existen diversos factores que contribuyen a la variabilidad de los resultados de esta prueba.

El presente documento tiene como objetivo brindar recomendaciones sobre la metodología de IFI manual y la interpretación de los diferentes patrones en células HEp-2 para la determinación de ANA, contribuyendo de esta manera, a reducir la variabilidad entre laboratorios en los procedimientos diagnósticos e interpretación de los resultados.

PALABRAS CLAVES: anticuerpos antinucleares, inmunofluorescencia indirecta, patrones de inmunofluorescencia, hep-2, enfermedades reumáticas autoinmune sistémicas

	DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS ANTINUCLEARES POR INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (IFI)	DTC-DI-005-GA-A1
		Edición Fecha: 07/01/2021
		Página 7 de 41

TABLA DE CONTENIDOS

1. Introducción general sobre el uso de la determinación de anticuerpos antinucleares.....	9
2. Toma y almacenamiento de la muestra	10
3. Consideraciones metodológicas.....	12
4. Participación en Programas de Evaluación Externa de la Calidad.....	20
5. Evaluación e Interpretación.....	21
6. Informe de Resultados.....	21
7. Follow-up tests.....	30
8. Modelos de informes.....	31
9. Bioseguridad.....	33
10. Referencias.....	36

	DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS ANTINUCLEARES POR INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (IFI)	DTC-DI-005-GA-A1
		Edición Fecha: 07/01/2021
		Página 8 de 41

DEFINICIONES Y TÉRMINOS

ACR: Colegio Americano de Reumatología

AF: *Arthritis Foundation*

ANA: Anticuerpos antinucleares

CDC: *Centers for Disease Control and Prevention*

EASI: *European autoimmunity standardization initiative*

ERAs: Enfermedades reumáticas autoinmunes sistémicas

ES: Esclerosis Sistémica

EULAR: Liga Europea contra el Reumatismo

FAN: factor antinuclear

F/P: Relación Fluoresceína/Proteína

Hep-2: Carcinoma epidermoide laríngeo humano

ICAP: *International Consensus on ANA Patterns*

IFI: Inmunofluorescencia indirecta

ITCF: Isotiocianato de fluoresceína

IUIS: *International Union of Immunologic Societies*

LED: diodos emisores de luz

LES: Lupus Eritematoso Sistémico

OMS: Organización Mundial de la Salud

PBS: Buffer fosfato salino

PEEC: Programa de Evaluación Externa de la Calidad

VPP: valor predictivo positivo

	DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS ANTINUCLEARES POR INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (IFI)	DTC-DI-005-GA-A1
		Edición Fecha: 07/01/2021
		Página 9 de 41

1. Introducción general sobre el uso de la determinación de anticuerpos antinucleares

La detección de los autoanticuerpos específicos de antígenos intracelulares, es fundamental en el diagnóstico de enfermedades reumáticas autoinmunes sistémicas (ERAs), (reconocidas por las siglas en inglés SARDs, por *systemic autoimmune rheumatic diseases*), tales como Lupus Eritematoso Sistémico (LES), Síndrome de Sjögren, Enfermedad Mixta del Tejido conectivo, Esclerosis Sistémica (ES), miopatías inflamatorias idiopáticas, entre otras. El análisis de estos anticuerpos es, por lo tanto, un primer paso en la evaluación diferencial de los pacientes cuando se sospecha de una etiología autoinmune sistémica¹⁻³.

La determinación de los anticuerpos antinucleares (ANA) ha sido incorporada en diferentes guías sobre criterios diagnósticos. Por ejemplo, un hallazgo positivo ha sido agregado a los criterios diagnósticos para LES por el Colegio Americano de Reumatología (*American College of Rheumatology–ACR-*) en los años 1980s, con la subsecuente revisión realizada en 1997⁴⁻⁵. En 2013, un comité que reunió al ACR y a la Liga Europea contra el Reumatismo (*European League Against Rheumatism–EULAR-*) estableció nuevos criterios de clasificación para el diagnóstico de la ES. Estos criterios incluyen anticuerpos antinucleares, principalmente antitopoisomerasa I, anticentrómero y anti-RNA polimerasa III⁶.

Los debates sobre la determinación de ANA por diferentes herramientas metodológicas han resultado recientemente en una declaración de posición del ACR, afirmando que IFI es el estándar "de oro" para la detección de ANA, y que los métodos alternativos deben demostrar un desempeño tan bueno como éste. Esta declaración de posición se basa principalmente en la alta sensibilidad de la IFI para ciertas enfermedades autoinmunes como LES y, en menor medida, la ES. Además, está fuertemente respaldada por la inclusión histórica de los ANA por IFI como criterio de ciertas enfermedades. Desafortunadamente, la especificidad y sensibilidad de la IFI es relativamente baja para otras enfermedades, y sus limitaciones técnicas aún no han sido superadas¹.

	DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS ANTINUCLEARES POR INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (IFI)	DTC-DI-005-GA-A1
		Edición Fecha: 07/01/2021
		Página 10 de 41

La presencia de ANA en distintas patologías tiene valor diagnóstico, pronóstico y de monitoreo, sin embargo, los mismos pueden también estar presentes en infecciones y en individuos sanos ⁷.

Cuando un paciente presenta síntomas de enfermedad sistémica, dolor de pecho tipo pleurítico, linfadenopatías, dolor en las articulaciones, debe indicarse la determinación de ANA a fines de plantear diagnósticos diferenciales entre una enfermedad infecciosa u otras enfermedades de origen autoinmune. La presencia de úlceras en mucosa oral, fotosensibilidad, alopecia, inflamación de las articulaciones, pleuresía o fenómeno de Raynaud confirman la necesidad de realizar pruebas para descartar o confirmar enfermedad reumática autoinmune ⁸⁻¹¹.

Debe considerarse que el grado de positividad indicado por el título de ANA tiene importancia diagnóstica, ya que el valor predictivo positivo (VPP) aumenta a títulos elevados. Además, un resultado negativo no implica ausencia de enfermedad, el mismo debe ser interpretado en el contexto general de cada paciente. Cuando existe una fuerte sospecha clínica podría ser necesario la realización de otras pruebas diagnósticas, aunque el test de anticuerpos sea negativo.

Es importante utilizar estas determinaciones sólo en aquellos pacientes en los que se tiene una alta sospecha clínica, y no en todos aquellos que se presentan con fatiga y dolor músculo esquelético, para no generar confusiones y derivaciones innecesarias.

2. Toma y almacenamiento de la muestra para Inmunofluorescencia Indirecta

Al momento de la toma de muestra se debe corroborar que el paciente presente el ayuno correspondiente y que sus datos sean correctos y completos. De ser necesario, solicitar información que sirva para el adecuado análisis de los resultados obtenidos tales como: sexo, edad, diagnóstico presuntivo, antecedentes familiares, toma de medicación que pueda interferir en la determinación.

	DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS ANTINUCLEARES POR INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (IFI)	DTC-DI-005-GA-A1
		Edición Fecha: 07/01/2021
		Página 11 de 41

Para minimizar los inconvenientes propios de la técnica de IFI para ANA se deben tener en cuenta diversos factores de la etapa pre analítica.

Uno de los primeros a tener en cuenta es la adecuada recolección y almacenamiento de las muestras.

- La prueba debe realizarse en suero del paciente.
- La muestra debe ser refrigerada entre 2 y 8 °C si se procesa dentro de las 72 hs; de lo contrario debe ser conservada a -20 °C o menos ⁸.
- Es importante evitar muestras hemolizadas y/o lipémicas ^{9,10}.

El correcto almacenamiento de las muestras evita la desnaturalización y contaminación que podrían llevar a falsos resultados, ya que sucesivas congelaciones y descongelaciones pueden alterarlo.

Si bien dicha determinación se realiza en suero, los ANA pueden detectarse en otros materiales (por ejemplo, líquido sinovial y pleural), pero no está totalmente demostrada la utilidad de los mismos; no siendo mencionada en las guías existentes hasta la actualidad.

Recomendación en caso de recibir muestras derivadas

En caso de recibir muestras derivadas se deben cumplir procedimientos para asegurar la calidad de las muestras enviadas desde otros laboratorios, incluyendo los criterios para el rechazo de muestras que no cumplimenten los requisitos especificados.

El laboratorio receptor, deberá enviar una copia del procedimiento de derivación de muestras a todos sus laboratorios derivantes, asegurándose de su aceptación y correcto cumplimiento por parte de los mismos. Deberán especificarse: la forma de preparación del paciente, el tipo de muestra a obtener, los conservantes (si corresponde), la identificación unívoca de la muestra y todo dato adicional relevante a remitir acompañando la muestra que permita orientar hacia la correcta interpretación de los resultados obtenidos.

	DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS ANTINUCLEARES POR INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (IFI)	DTC-DI-005-GA-A1
		Edición Fecha: 07/01/2021
		Página 12 de 41

Debe existir un registro de laboratorios derivantes y notas de aceptación del procedimiento de derivación e identificación de muestras.

El laboratorio debe poseer un procedimiento que fije el período para el almacenamiento de aquellas muestras que puedan requerir su utilización posterior (para confirmación de resultados, o para la realización de análisis adicionales). Todo esto a fines de evitar errores pre analíticos ¹¹.

3. Consideraciones metodológicas para asegurar la calidad de la determinación de ANA POR IFI

La IFI es la técnica de *screening* utilizada para detectar una amplia variedad de ANA dirigidos a diferentes autoantígenos celulares, pudiéndose reconocer patrones de tinción nucleares, citoplasmáticos y mitóticos cuando se utiliza como sustrato células de carcinoma epidermoide laríngeo humano (células HEp-2).

El presente documento tiene como objetivo brindar recomendaciones sobre la metodología de IFI manual y la interpretación de los diferentes patrones en células HEp-2 para la determinación de ANA, contribuyendo de esta manera, a reducir la variabilidad entre laboratorios en los procedimientos diagnósticos e interpretación de los resultados.

Si bien ACR y otras entidades internacionales como *European autoimmunity standardization initiative* (EASI), *International Union of Immunologic Societies* (IUIS), Organización Mundial de la Salud (OMS), *Arthritis Foundation* (AF) y *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) coinciden en que el ensayo de IFI en células HEp-2 es la prueba estándar de oro para ANA, existen diversos factores que contribuyen a la variabilidad de los resultados de esta prueba. Dichos factores pueden ser clasificados en tres categorías: factores biológicos (diversidad de líneas celulares HEp-2, métodos de fijación de improntas, isotipo de conjugado, relación fluorocromo/proteína), factores procedimentales (procedimiento manual vs automatizado, tipo de lámpara de microscopio,

	DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS ANTINUCLEARES POR INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (IFI)	DTC-DI-005-GA-A1
		Edición Fecha: 07/01/2021
		Página 13 de 41

entrenamiento del observador) y factores decisivos (dilución de trabajo, nomenclatura de patrones, expresión de resultados) ¹³.

a) Elección del sustrato

- Existen diversos sustratos y agentes fijadores, cada uno con diferentes grados de sensibilidad y especificidad. El sustrato recomendado son las células HEp-2, obtenidas por cultivo asincrónico en monocapa sobre portaobjetos, ya que estas improntas presentan la ventaja de contener células en diferentes estadíos del ciclo celular (interfase, profase, metafase, anafase y telofase), y por lo tanto, la expresión de diferentes proteínas que son fuente de autoantígenos. Por otra parte, las células HEp-2 poseen una alta relación núcleo/citoplasma que favorece la visualización microscópica, permiten evaluar patrones nucleolares y tienen un citoplasma rico en fibrillas y organelas, fundamentales en el reconocimiento de los patrones citoplasmáticos ^{7,15}.
- Se recomienda que las células HEp-2 estén fijadas en acetona. En cambio, no se aconseja el uso de aquellas improntas fijadas en etanol y/o metanol, ya que dicho proceso puede eliminar el antígeno Ro (SS-A). Las empresas comerciales no revelan el tipo de fijador utilizado, por lo tanto, se recomienda evaluar las improntas con controles trazables de los distintos patrones para analizar el comportamiento de las mismas, especialmente con un suero positivo para el autoantígeno SSA/Ro ^{7, 14,17}.
- Antes de que se utilice una impronta en el laboratorio, la calidad de la misma se debe evaluar utilizando los procedimientos estandarizados.
- Ciertos criterios son importantes para juzgar la calidad de las células¹²:
 1. Densidad celular y distribución en la impronta
 2. Número de mitosis (al menos 3 a 5 mitosis por campo visual a 200x)

	DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS ANTINUCLEARES POR INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (IFI)	DTC-DI-005-GA-A1
		Edición Fecha: 07/01/2021
		Página 14 de 41

3. Expresión de antígenos relevantes para ANA.

4. Conservación de la morfología.

5. Fluorescencia basal.

La calidad de las improntas puede verse influenciada en el proceso de producción de las mismas por las condiciones del cultivo celular, preparación de portaobjetos y sustancias fijadoras.

Para una mejor conservación las improntas deben mantenerse refrigeradas entre 2 y 10 °C hasta el momento de ser utilizadas.

b) Valor de corte - Dilución del Suero:

La decisión de establecer un punto de corte en una dilución determinada debe estar basada en la población que está siendo testeada, por lo tanto:

- Se recomienda que cada laboratorio establezca el valor de corte, definido como la dilución por debajo de la cual el resultado se considera negativo, en individuos normales y teniendo en cuenta rangos etarios. Para individuos adultos, se aconseja realizar una dilución de pesquisa (*screening*) de 1/80, con una sensibilidad del 90-95%. Para individuos más jóvenes (menores de 16 años) se aconseja una dilución de corte de 1/40 ^{1, 7, 12}.
- En el caso de un resultado positivo, el ensayo se debe repetir utilizando una serie geométrica de diluciones de la muestra de acuerdo a la intensidad de fluorescencia (1/40, 1/80, 1/160, 1/320, 1/640, 1/1280, 1/5120, 1/10240) para definir el título final¹².

	DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS ANTINUCLEARES POR INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (IFI)	DTC-DI-005-GA-A1
		Edición Fecha: 07/01/2021
		Página 15 de 41

c) Conjugado fluorescente:

Los anticuerpos conjugados con isotiocianato de fluoresceína (ITCF) son los utilizados comúnmente. La sensibilidad y la especificidad de la determinación de ANA dependen, en gran medida, de la elección de un buen conjugado.

Aspectos a tener en cuenta:

- Especificidad isotópica del conjugado: aunque en la práctica se utilizan tanto conjugados polivalentes (reactivos contra IgG, IgA e IgM) como conjugados anti-IgG específicos, no se aconseja el uso de conjugados polivalentes ya que pueden producir una fluorescencia de fondo indeseada y además detectar ANA de clase IgM asociados con artritis reumatoidea, uso de ciertas drogas o la edad, que son generalmente, insignificantes desde el punto de vista clínico. Por lo tanto, se recomienda el uso de conjugados anti-IgG específicos para aumentar el valor predictivo positivo del ensayo de ANA ^{7,12}.
- Relación Fluoresceína/Proteína (F/P): se recomienda que esta relación se encuentre entre 2,5 y 4,0. Si la relación F/P es mayor, aumentará la tinción fluorescente no específica; por otro lado, si la relación F/P es menor se podrían obtener resultados falsos negativos.
- Relación Anticuerpo Específico/Proteína: debe ser aproximadamente 0,1 o mayor, si es menor disminuye la especificidad. La concentración final (dilución de trabajo) del anticuerpo específico debe estar entre 30 y 60 µg/mL.
- Dilución de trabajo del conjugado: Cada laboratorio deberá evaluar la dilución de trabajo recomendada por el fabricante, titulando el conjugado mediante la utilización de un suero positivo de título conocido (control primario o secundario) para establecer la dilución óptima de trabajo requerida ⁷.

	DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS ANTINUCLEARES POR INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (IFI)	DTC-DI-005-GA-A1
		Edición Fecha: 07/01/2021
		Página 16 de 41

Se recomienda que la dilución óptima de trabajo del conjugado sea establecida cuando:

- se cambie el sustrato (tipo, marca o lote)
- se use un nuevo lote de conjugado
- se cambie el sistema óptico de lectura
- se cambie la lámpara
- no se obtengan resultados adecuados en los controles internos o controles de calidad externo ^{7,9}.

No se recomienda utilizar conjugados pre-diluidos o listos para usar ya que las condiciones de trabajo del laboratorio pueden no ser iguales a las del fabricante; pero, en caso de hacerlo, se aconseja compararlos con conjugados estándar para chequear su performance. A veces, el conjugado es tratado con 0.01 g/L de Azul de Evans para facilitar la distinción de la señal fluorescente.

- Titulación del conjugado: El método más aceptado para determinar la dilución óptima del conjugado es la titulación en damero o tablero de ajedrez. Se debe contar con un suero de referencia o patrón primario, o en su defecto con un patrón secundario, de título conocido, y con un suero negativo. Se procede a realizar la determinación frente a diluciones seriadas del conjugado (por ejemplo 1:50, 1:100, 1:200, 1:400 y 1:800), enfrentándolas con diluciones seriadas de los controles positivos y negativos. Se define Título *plateau*, a la mayor dilución del patrón primario que es positivo en al menos tres diluciones diferentes y consecutivas del conjugado, luego el título cae abruptamente. El último título positivo a nivel del *plateau* se lo denomina punto final del *plateau*. Usualmente, la dilución de trabajo del conjugado es un cuarto de la dilución del punto final del *plateau* ⁷.

	DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS ANTINUCLEARES POR INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (IFI)	DTC-DI-005-GA-A1
		Edición Fecha: 07/01/2021
		Página 17 de 41

d) Controles internos:

- Es recomendable procesar en forma paralela a las muestras, controles de calidad internos positivos. Los sueros controles positivos deberán contener ANA típicos de diferentes enfermedades autoinmune reumáticas como: nuclear homogéneo, nuclear granular/moteado, nucleolar y centrómero u otros (Ver punto 9 - Evaluación e Interpretación), que deben usarse a intervalos regulares. Los sueros de control comercial están disponibles para este propósito, y también se pueden usar controles definidos por el propio laboratorio (*in house*). Dentro de los controles internos es recomendable incorporar un suero anti SSA/Ro positivo para determinar la presencia de este antígeno en el sustrato, en un título 2 veces superior al título de corte ^{7,9}.
- Además, se recomienda procesar paralelamente a las muestras y controles positivos, un control negativo (considerado como tal un suero en el que no se distingue un patrón de fluorescencia definido) y control de buffer, para descartar que este último no produzca fluorescencia basal ^{7, 15,16}.
- Idealmente, se deben usar sueros de control definidos de proveedores comerciales o el Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC), pero en muchas ocasiones se dificulta el acceso a los mismos ^{7,9}.
- El laboratorio deberá mantener una seroteca de muestras para control con título de reactividad mínima (1/80), a ser diluidas en 1/40, 1/80, 1/160 y 1/320. En cada procesamiento diario de IFI, se deberá procesar el control de título bajo y se considerará válido el ensayo si la variación interdiaria de títulos es de +/- una dilución. Si se observa discordancia en el título del mismo, por ejemplo, si una muestra control con un título medio de 1/80 se presenta como negativo, la técnica debe ser invalidada. Se recomienda que en estos casos se compruebe primero, si hubo un problema en dicha alícuota almacenada ⁹.

	DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS ANTINUCLEARES POR INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (IFI)	DTC-DI-005-GA-A1
		Edición Fecha: 07/01/2021
		Página 18 de 41

e) Sueros de referencia

En 1980, la AF en colaboración con el CDC en Estados Unidos, establecieron un comité de ANA con la función de almacenar y proveer sueros a los investigadores y laboratorios clínicos de Estados Unidos y otros países, que sirvieron como estándares primarios de referencia, para definir patrones de tinción según su especificidad y para que los laboratorios establecieran sus propios sueros estándares secundarios. Otro control primario disponible es el producido por el *National Institute for Biological Standards and Control*, en colaboración con la OMS. Este control tiene la particularidad de estar expresado en unidades, definido como la actividad presente en 0,186 mg de la preparación internacional de referencia que corresponde a 100 UI. De esta manera, los laboratorios deberían transformar los resultados de títulos a unidades internacionales y así disminuiría la variabilidad interlaboratorio ^{7, 9, 13, 16}.

f) Procedimiento de IFI

Procedimiento ^{1, 7, 12, 15, 16}

- Agregar los sueros diluidos con buffer PBS a la monocapa de células Hep2. Incubar en cámara húmeda 30 minutos a temperatura ambiente (20 a 24°C).
- Realizar 2 lavados con buffer PBS de 5-10 minutos, sumergiéndolos en una cubeta de lavado.
- Secar rápidamente el espacio entre los pocillos de los diferentes sueros, con la precaución de no secar los pocillos.
- Agregar el conjugado fluorescente e incubar en cámara húmeda por 30 minutos a temperatura ambiente.
- Realizar 2 lavados con buffer PBS de 5-10 minutos, sumergiéndolos en una cámara de lavado.

	DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS ANTINUCLEARES POR INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (IFI)	DTC-DI-005-GA-A1
		Edición Fecha: 07/01/2021
		Página 19 de 41

- Opcional: realizar un último lavado con PBS-Azul de Evans 0,5%, en caso de que el colorante no se hubiera incorporado previamente a la dilución del conjugado.
 - Secar rápidamente el espacio entre los pocillos de los diferentes sueros, con la precaución de no secar los pocillos.
 - Cubrir los pocillos con líquido de montaje para la observación microscópica
- Recomendaciones técnicas ⁷:
- I. Para la dilución de las muestras, de los conjugados y para la realización de los lavados se utiliza buffer fosfato salino (PBS) con un pH de 7.2 (+/-0.2).
 - II. Las improntas deben sacarse del envase sólo inmediatamente antes de la siembra.
 - III. Utilizar puntas adecuadas que se ajusten bien a la pipeta.
 - IV. Si bien los volúmenes de las diluciones de muestras, controles y conjugado a dispensar en los pocillos no están bien establecidos, se debe tener la precaución de que éstos queden completamente cubiertos con la alícuota, sin tocarlos al dispensarla, ni derramar fuera del pocillo para evitar la contaminación cruzada.
 - V. Evitar corrientes de aire que puedan secar las improntas.
 - VI. Al realizar los lavados proceder por lo menos con un lavado rápido con piseta para retirar el exceso no fijado y dos lavados posteriores de 5-10 minutos aproximadamente con agitación suave.
 - VII. No volcar el buffer directamente sobre la impronta.
 - VIII. No dejar secar las improntas.
 - IX. Evitar la luz directa sobre las improntas durante las incubaciones.
 - X. Verificar el pH del líquido de montaje (recomendado pH: 8 o mayor)
 - XI. Realizar la lectura microscópica en cuarto oscuro.
 - XII. Verificar con frecuencia concordancia de lectores por sistema doble ciego.

	DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS ANTINUCLEARES POR INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (IFI)	DTC-DI-005-GA-A1
		Edición Fecha: 07/01/2021
		Página 20 de 41

g) Microscopio

Debido a la variedad de fuentes de luz y filtros disponibles, la selección del microscopio de fluorescencia es muy importante ¹⁷. Las lámparas pueden ser halógenas o de mercurio de distintas potencias (20, 50 o 100 w) o lámparas halógenas de alta presión o sistemas LED (diodos emisores de luz). Hoy en día, los microscopios con lámpara LED se utilizan cada vez con más frecuencia como fuente de luz. Su brillo constante y vida útil larga (más de 10.000 horas de uso) las convierten en una alternativa mejorada, frente a las lámparas de mercurio (100 a 300 h de uso según el tipo y se deben realizar ajustes cuando se cambian las bombillas) ^{7, 12}.

Para asegurarse que la intensidad de la lámpara de fluorescencia es la adecuada, se requiere contar con estándares fluorescentes que cubran el mismo espectro de fluorescencia que se puede obtener en el estudio. Estos estándares fluorescentes son portaobjetos comerciales que contienen micro esferas fluorescentes pre-calibradas con distintas intensidades que permiten controlar el comportamiento del microscopio y realizar una calibración interna de lectura ^{7,17}.

La magnificación recomendada para la observación de los preparados es de 400X. La evaluación microscópica debe tener en cuenta varias mitosis para que se pueda tomar una decisión clara sobre la presencia o ausencia de fluorescencia y permita identificar el patrón básico ^{7,12}.

Se recomienda que se realice una visualización de las improntas a doble ciego, con personal capacitado y entrenado en dicha metodología ⁷.

4. Participación en Programas de Evaluación Externa de la Calidad

Hay organizaciones internacionales dedicadas a la estandarización de métodos inmunológicos de laboratorio clínico y a la armonización de resultados de todo el mundo, como OMS, IUIS, ACR y otros. Estas organizaciones impulsan el desarrollo de programas

	DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS ANTINUCLEARES POR INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (IFI)	DTC-DI-005-GA-A1
		Edición Fecha: 07/01/2021
		Página 21 de 41

de evaluación externa de la calidad ^{1,13}. En el ámbito nacional, la Fundación Bioquímica Argentina ha promovido el Programa de Evaluación Externa de la Calidad (PEEC).⁷

Estos programas permiten ¹³:

- Conocer la desviación de los resultados de cada laboratorio participante respecto de los demás y evaluar su exactitud analítica.
- Proveer información del desempeño relativo de los distintos equipos disponibles.
- Identificar factores asociados al buen o mal desempeño del laboratorio, para aplicar medidas correctivas.

Se recomienda a los laboratorios clínicos que realizan análisis de ANA por IFI, la adherencia a programas de evaluación externa de la calidad de esta determinación ^{7,13}.

5. Evaluación e Interpretación

Las células HEp-2 contienen un amplio espectro de autoantígenos detectables a través de patrones de fluorescencia. En primer lugar, la atención se dirige hacia los patrones nucleares, pero también se deben informar y especificar los patrones citoplasmáticos y del aparato mitótico cuando sea posible ^{1,12}.

Los patrones individuales deben especificarse en el informe, con detalles de diferentes títulos, si corresponde. Los patrones ANA-IFI deben informarse de acuerdo con la terminología estandarizada propuesta por ICAP (*International Consensus on ANA Patterns*)^{8,12}. En el **anexo 1** se describen los nombres consensuados de los patrones de inmunofluorescencia sobre HEp-2, considerando aquellos que deben ser de reconocimiento obligatorio por el operador. Estos patrones deben informarse de acuerdo con el algoritmo de clasificación propuesto por ICAP. En dicho consenso se definieron y resumieron 29 patrones de inmunofluorescencia distintos por IFI en células HEp-2 en tres categorías

	DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS ANTINUCLEARES POR INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (IFI)	DTC-DI-005-GA-A1
		Edición Fecha: 07/01/2021
		Página 22 de 41

principales, que comprenden 14 patrones nucleares, 9 citoplasmáticos y 5 mitóticos. A cada patrón se les asignó un código AC (patrón anti-celular) alfanumérico ⁷.

6. Informe de Resultados

Se propone que se consigne la siguiente información: nombre de la determinación, método empleado, sustrato utilizado, isotipo de conjugado, valores de referencia y resultados obtenidos, especificando la fluorescencia nuclear y citoplasmática, aclarando título/s obtenido/s y patrón/es identificado/s, dejando un lugar para observaciones. La determinación debe informarse de manera dicotómica (positivo o negativo) ⁷.

Nombre de la determinación

Respetando el consenso argentino, se sugiere llamar a la determinación: *Anticuerpos antinucleocitoplasmáticos*, considerando que es el nombre más explicativo y adecuado ⁷. Se considera importante el agregado entre paréntesis de la aclaración “FAN/ANA” haciendo referencia a “factor antinuclear” y “anticuerpos antinucleares” respectivamente, no sólo por ser siglas con las que aún es identificada la determinación por muchos profesionales, sino también por la aceptación en el ámbito privado y coberturas de obras sociales.

Patrones de Fluorescencia

El patrón negativo se lo clasifica como AC-0 y se coloca al mismo nivel que las categorías primarias nucleares, citoplasmáticas y mitóticas, para reflejar que la

	DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS ANTINUCLEARES POR INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (IFI)	DTC-DI-005-GA-A1
		Edición Fecha: 07/01/2021
		Página 23 de 41

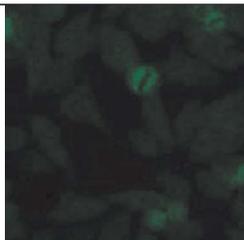
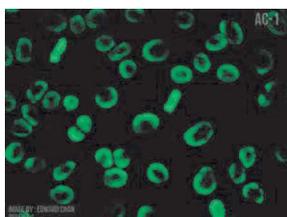
primera decisión importante en la lectura de HEp-2 IFI es decidir si el ensayo es negativo o positivo ¹⁸.

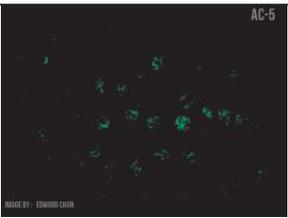
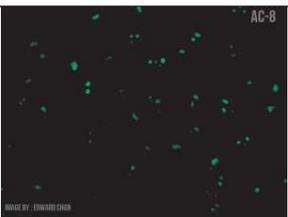
- **Definición de resultado negativo:** un resultado es considerado negativo cuando no se discrimina un patrón fluorescente definido en la dilución de corte.
- **Definición de resultado positivo:** un resultado debe ser considerado positivo cuando se observa una prueba reactiva a dilución igual o mayor del título de corte, distinguiéndose perfectamente un patrón fluorescente.

La cantidad de patrones observados con la utilización de HEp-2 se ha ido incrementando con los años, teniendo en cuenta no sólo la tinción nuclear sino también la citoplasmática y de diferentes organelas como las mitocondrias, aparato de Golgi, nucléolos y diferentes estructuras del aparato mitótico, tales como huso mitótico, centriolos, etc. Esto requiere de profesionales capacitados y entrenados, ya que el correcto informe de los diferentes patrones permitirá la correspondiente orientación en la especificidad antigénica, y la utilización de otras técnicas para demostrarla ^{21, 22, 24, 26,27}.

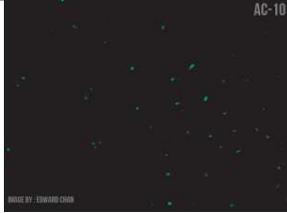
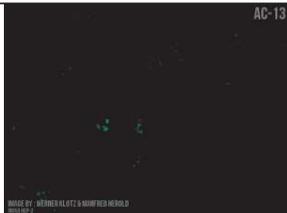
En la **tabla I** se detalla la característica de inmunofluorescencia de los distintos patrones ²⁴.

Denominación	Descripción	Fotografías
PATRONES NUCLEARES		
Negativo AC-0	Ausencia de una tinción bien definida en cualquiera de las estructuras sub celulares	

		
Homogéneo AC-1	Tinción homogénea y regular a través de todo el nucleoplasma, los nucléolos pueden o no fluorecer dependiendo del sustrato celular. Las células en mitosis (metáfase, anáfase y telófase) tienen la cromatina intensamente fluorescente de manera homogénea. AA: <i>DNA</i> dc, <i>nucleosomas</i> , <i>histonas</i> .	
Granular Fino Denso AC-2 ³⁰	Tinción granular distribuido por todo el núcleo de las células en interfase, con heterogeneidad en tamaño, brillo y distribución de los gránulos. A lo largo del núcleo en interfase, hay algunas zonas más densas y más débiles de los gránulos (rasgo muy característico). La placa metafásica muestra un fuerte patrón granular destacándose algunas manchas gruesas. AA: <i>DFS70/LEDGF</i> .	
Centrómero AC-3	Tinción granular grueso discreto dispersos en los núcleos de las células en interfase y alineados en la masa de la cromatina en las células mitóticas. AA: <i>anti-CENP-B</i>	
Granular Fino AC-4	Gránulos diminutos finos a través de todo el nucleoplasma. El nucléolo puede teñirse o no. Las células mitóticas (metáfase, anáfase y telófase) tienen la masa de la cromatina no teñida. AA: <i>anti-SS-A/Ro</i> , <i>anti-SS-B/La</i> .	

<p>Granular Grueso AC-5</p>	<p>Gránulos gruesos a través de todo el nucleoplasma. El nucléolo puede teñirse o no. Las células mitóticas (metafase, anafase y telofase) tienen la masa de la cromatina no teñida. AA: <i>anti-Sm, anti-U1 RNP</i>.</p>	 <p>AC-5</p>
<p>Puntos Nucleares Múltiples AC-6</p>	<p>Gránulos nucleares discretos contables (6 a 20 Puntos/célula). Conocido también como <i>Multiple Nuclear dots</i>. AA: <i>SP-100</i>.</p>	 <p>AC-6</p>
<p>Puntos Nucleares Escasos AC-7</p>	<p>Gránulos discretos contables (1 a 6 gránulos nucleares/célula). Estas son conocidas como cuerpos de Cajal o cuerpos enrollados. Conocido también como <i>Few Nuclear dots</i>. AA: <i>anti-p80-coilina</i>.</p>	 <p>AC-7</p>
<p>Nucleolar Homogéneo AC-8</p>	<p>Fluorescencia difusa en todo el nucléolo, mientras que la placa metafásica no muestra tinción. AA: <i>Anti-PM-Scl-, anti Th/To</i>.</p>	 <p>AC-8</p>
<p>Nucleolar Grumoso AC-9</p>	<p>Tinción irregular del nucléolo y cuerpos de Cajal, con tinción peri-cromosomal en las placas metafásicas. AA: <i>anti-fibrilarina</i>.</p>	 <p>AC-9</p>

	DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS ANTINUCLEARES POR INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (IFI)	DTC-DI-005-GA-A1
		Edición Fecha: 07/01/2021
		Página 26 de 41

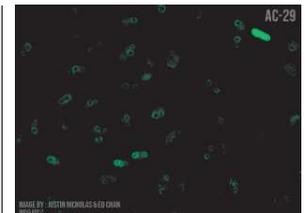
Nucleolar Granular AC-10	<p>Gránulos distinguibles densamente distribuidos en los nucléolos de las células interfásicas. Se puede observar en la cromatina de las células metafásicas hasta 5 pares brillantes de regiones organizadoras del nucléolo (NOR, por sus siglas en inglés). El citoplasma de las células mitóticas usualmente revela una leve tinción positiva. AA: <i>Anti-NOR-90, anti-ARN polimerasa I.</i></p>	
Membrana Nuclear Lisa AC-11	<p>Tinción homogénea del núcleo con mayor intensidad en la membrana nuclear externa, sin tinción en las placas de cromatina de la metafase y anafase. Se puede observar un peculiar aumento de fluorescencia en los puntos de contacto entre células adyacentes. AA: <i>Anti-lámina B.</i></p>	
Membrana Nuclear Granular AC-12	<p>La membrana nuclear revela tinción punteada en células interfásicas, con peculiar aumento de fluorescencia en los puntos de contacto entre células adyacentes. No hay tinción en las placas de cromatina de la metafase y anafase. AA: <i>Anti-gp210.</i></p>	
Pleomórfico Parecido a PCNA AC-13	<p>Tinción nucleoplásmica granular pleomórfica, con variabilidad en el tamaño y brillo de los gránulos. Durante la interfase, algunas células son negativas (fase G1), algunas están intensamente teñidas (fase S), y otras presentan gránulos dispersos con ocasional tinción nucleolar (fases S tardía y temprana G2). Las células mitóticas no muestran tinción. AA: <i>PCNA.</i></p>	
Pleomórfico Parecido a CENP-F AC-14	<p>Patrón nuclear granular con sorprendente variabilidad en intensidad. La tinción nuclear es negativa o débil en la fase G1, pero intensa en la fase G2. Los centrómeros muestran tinción positiva solamente en la profase y la metafase, revelando múltiples puntos alineados en la placa metafásica. Células en profase frecuentemente revelan una tinción débil de la membrana nuclear, mientras que el citoplasma de células mitóticas revela una tinción difusa débil. Durante la anafase y la telofase se puede observar una tinción intensa en el anillo del plano medio que divide las dos células hijas. AA: <i>CENP-F.</i></p>	

**DNA-
Topoisomera-
sa I similar a
(topo-I)
AC-29**²⁸

El patrón similar a Topo-I incluye la tinción de cinco regiones sub-celulares:

- 1) Un moteado fino prominente tipo AC-4, con fluorescencia nuclear en las células en interfase.
- 2) Una tinción moteada fina e intensa de la cromatina condensada en las células en mitosis. Dependiendo de la dilución del suero utilizada, la tinción de la cromatina en mitosis puede parecer homogénea.
- 3) Fluorescencia intensa de la región organizadora de los nucléolos (NOR) asociada en los cromosomas condensados de las células en mitosis. Esta fluorescencia NOR puede estar oculta por la tinción brillante de los cromosomas, ya que los NORs no siempre están en el mismo plano focal (vea la figura abajo).
- 4) Fluorescencia del citoplasma, débil en las células en interfase (y en mitosis) representando una malla delicada que se extiende desde el área perinuclear hasta la membrana plasmática; en general, durante la titulación de los sueros, a mayores diluciones se puede observar una fluorescencia relativamente más prominente del citoplasma.
- 5) Fluorescencia nucleolar variable que puede aparecer como tinción punteada en el nucléolo o tinción perinuclear en las células en interfase. La tinción del nucléolo no es un dato universal de este patrón.

AA: *topoisomerasa I*.

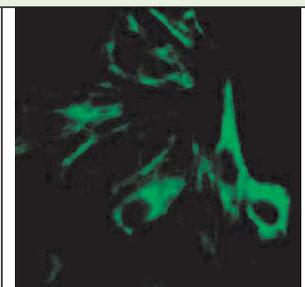


PATRONES CITOPLASMÁTICOS

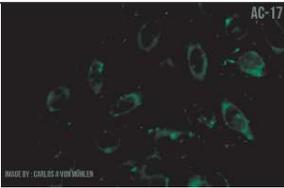
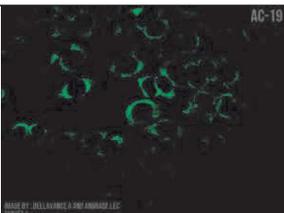
**Fibrilar
Lineal
AC-15**

Tinción de las fibras del citoesqueleto, que puede observarse con depósitos granulares pequeños y discontinuos. La tinción típica muestra fibras de actina estriadas que abarcan todo el largo del eje de la célula.

AA: *actina, miosina no muscular*



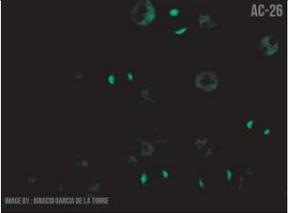
	DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS ANTINUCLEARES POR INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (IFI)	DTC-DI-005-GA-A1
		Edición Fecha: 07/01/2021
		Página 28 de 41

Fibrilar Filamentoso AC-16	Tinción de microtúbulos y filamentos intermedios que se extienden desde la membrana nuclear. AA: <i>vimentina, tropomiosina, citoqueratina.</i>	
Fibrilar Segmentado AC-17	Tinción de pequeños segmentos, cuerpos densos periódicos a lo largo de las fibras. AA: <i>alfa actina, vinculina.</i>	
Granular Discreto AC-18	Tinción de los cuerpos GW en el citoplasma de las células en interfase con un número alto en la fase final del ciclo celular S/G2. AA: <i>GW182, Su/Ago2. No hay evidencia molecular para sustentar que este patrón, esté asociado a objetivos lisosomales.</i>	
Granular fino denso AC-19	Tinción símil homogénea en todo el citoplasma. AA: <i>PL-7, PL12, proteína ribosomal P.</i>	
Granular Fino AC-20	Se observan pequeños gránulos dispersos en el citoplasma, en su mayoría con fondo homogéneo o granular fino denso. AA: <i>Jo-1/sintetasa del Histidil del ARNt.</i>	

	DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS ANTINUCLEARES POR INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (IFI)	DTC-DI-005-GA-A1
		Edición Fecha: 07/01/2021
		Página 29 de 41

Reticular AC-21	Tinción de filamentos granulares gruesos que se extienden a través del citoplasma. AA: <i>PDC-E2 / M2, BCOADC-E2, OGDC-E2, subunidad E1α de PDC, E3BP/proteína X.</i>	
Granular Polar AC-22	Tinción granular discontinua, o como listón granular perinuclear con distribución polar en el citoplasma. AA: <i>Giantina/macrogolgina, golgina-95/GM130, golgina-160, golgina-97, golgina 245.</i>	
Bastones y anillos AC-23	Se observan corpúsculos con formas de anillos, comas o bastones en el citoplasma de células en interfase. A veces puede ser visible también en el núcleo. AA: <i>IMPDH2.</i>	
PATRONES MITÓTICOS		
Centrosoma AC-24	Tinción de centriolos que se observa como 1-2 puntos nítidos en citoplasma o en los polos del huso mitótico. AA: <i>Pericentrina, nineína, Cep250, Cep110.</i>	

	DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS ANTINUCLEARES POR INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (IFI)	DTC-DI-005-GA-A1
		Edición Fecha: 07/01/2021
		Página 30 de 41

Huso Mitótico AC-25	Tinción en las fibras del huso entre los polos en células en mitosis, junto con una tinción con forma de pequeños conos en los polos. Las fibras del huso pueden teñirse tanto en patrones parecidos a NuMA como en algunos no-NuMA. Los patrones parecidos a NuMA conllevan tinciones moteadas en el núcleo. En este apartado solo se incluyen patrones no-NuMA, los patrones <i>NuMA-like</i> se incluyen en el siguiente grupo. Conocido también como NuMa 2 AA: <i>HsEg5</i> .	
Parecido a NuMa AC-26	Tinción nuclear granular con tinción de fibras del huso mitótico. Conocido también como NuMa 1 AA: <i>NuMa</i> .	
Puente intercelular AC-27	Tinción del puente que une a dos células hijas al final de la división celular, pero antes de que se separen totalmente. AA: <i>Ninguna</i> .	
Envoltura Cromosómica Mitótica AC-28	Tinción punteada en el borde de los cromosomas de células en profase y metafase, sin ninguna tinción en células en interfase. AA: <i>histona H3 modificada, MCA-1</i> .	

****Imágenes obtenidas de ANA PATTERNS****

AA: asociación antigénica

Nivel Competente: Naranja

Nivel Especialista: Verde

Puede existir superposición de patrones nucleares de fluorescencia que se hacen evidentes al realizar diluciones crecientes del suero. Cada patrón de fluorescencia

	<p style="text-align: center;">DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS ANTINUCLEARES POR INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (IFI)</p>	DTC-DI-005-GA-A1
		Edición Fecha: 07/01/2021
		Página 31 de 41

debe ser informado con su respectivo título. Se sugiere informar como máximo una dilución de 1/1280 ^{23,25}, por lo cual en caso de continuar positivo se deberá informar como “Mayor de 1/1280”. También pueden existir patrones mixtos: nucleares-citoplasmáticos-mitóticos. Se sugiere informar primero el de mayor título.

La demostración de un determinado autoanticuerpo con la correcta interpretación de los hallazgos clínicos es muy importante para lograr el diagnóstico de diversas enfermedades, pronóstico o respuesta a terapias ¹.

Se debe considerar que un resultado negativo no implica ausencia de enfermedad. Esto puede observarse en pacientes con Síndrome de Sjögren, polimiositis, artritis reumatoidea, esclerodermia, lupus eritematoso sistémico, entre otras entidades autoinmunes que pueden ser negativas para los anticuerpos antinucleares pero positivas para los anticuerpos Anti-SSA/Ro, Anti-ribosomal P, y Anti-Jo-1 cuando estos son investigados por metodologías específicas para los mismos. Es importante entonces que frente a un resultado negativo para ANA, si aún perdura la sospecha clínica, sugerir la realización de otras metodologías como ELISA u otras antígeno-específicas ²⁸.

Por otro lado, un resultado positivo no siempre implica enfermedad, siendo posible su hallazgo en individuos sanos ^{1, 25, 29}.

7. Follow-up tests

Ciertos patrones en IFI indican especificidades de ANA relevantes para la enfermedad y son una indicación para el uso de inmunoensayos específicos. Por lo tanto, en un proceso diagnóstico de múltiples etapas, es necesario identificar los autoanticuerpos que generalmente son responsables de un patrón particular ^{19,20}.

	DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS ANTINUCLEARES POR INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (IFI)	DTC-DI-005-GA-A1
		Edición Fecha: 07/01/2021
		Página 32 de 41

La relevancia clínica de los distintos patrones se establece principalmente dentro del contexto de los signos y síntomas de la enfermedad. Por ello, para orientar y/o beneficiar el diagnóstico médico pueden incluirse recomendaciones de pruebas específicas de identificación del/los autoanticuerpo/s o pruebas complementarias (Sugerencias propuestas en el Taller “Hacia la Armonización del Informe de Anticuerpos anti Nucleares por Inmunofluorescencia Indirecta”, II Congreso Bioquímico Científico Profesional. 5 al 7 de junio de 2019, Córdoba).

Se pueden encontrar varias sugerencias en el “*Consensus on ANA Patterns (ICAP) perspective*” del año 2018 ⁸.

No es recomendable agregar asociaciones clínicas a los resultados obtenidos.

8. Modelos de informes

Ejemplo 1:

Determinación	Resultado	Referencia
Anticuerpos anti-nucleocitoplasmáticos	Positivo	0 a 16 años: Positivo Mayor de 1/40 Adultos: Positivo Mayor de 1/80
Método: Inmunofluorescencia indirecta en Hep-2		
Conjugado: Anti IgG marcada con FITC		
Nuclear	Positivo	
<i>Patrón</i>	Granular grueso	
<i>Título</i>	1/80	
Citoplasmático	Positivo	
<i>Patrón</i>	Reticular	
<i>Título</i>	1/320	
Observaciones:		

Ejemplo 2:

 <p>Comité Regional de Estandarización de Laboratorios Bioquímicos Córdoba</p>	DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS ANTINUCLEARES POR INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (IFI)	DTC-DI-005-GA-A1
		Edición Fecha: 07/01/2021
		Página 33 de 41

Determinación	Resultado	Referencia
Anticuerpos anti-nucleocitoplasmáticos Método: Inmunofluorescencia indirecta en Hep-2 Conjugado: Anti IgG marcada con FITC	Positivo	0 a 16 años: Positivo Mayor de 1/40 Adultos: Positivo Mayor de 1/80
Nuclear <i>Patrón</i> <i>Título</i>	Negativo	
Citoplasmático <i>Patrón</i> <i>Título</i>	Negativo	
Observaciones:	Se observa en mitosis un patrón NuMa título 1/160.	

Ejemplo 3:

Determinación	Resultado	Referencia
Anticuerpos anti-nucleocitoplasmáticos Método: Inmunofluorescencia indirecta en Hep-2 Conjugado: Anti IgG marcada con FITC	Positivo	0 a 16 años: Positivo Mayor de 1/40 Adultos: Positivo Mayor de 1/80
Nuclear <i>Patrón</i> <i>Título</i>	Negativo	
Citoplasmático <i>Patrón</i> <i>Título</i>	Positivo Granular fino denso 1/320	
Observaciones:		

	DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS ANTINUCLEARES POR INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (IFI)	DTC-DI-005-GA-A1
		Edición Fecha: 07/01/2021
		Página 34 de 41

9. BIOSEGURIDAD

Al ser el suero una muestra biológica, su manipulación implica riesgo de transmisión de enfermedades para el operador. Para evitar esto, el operador debe minimizar el riesgo de contacto de la muestra con la piel y las mucosas, para lo cual se debe utilizar guardapolvo y guantes, además de gafas protectoras en aquellos procedimientos que pueden producir salpicaduras (como por ej. al centrifugar, agitar, verter, abrir tapas fuertemente ajustadas). Cualquier derrame de sangre debe descontaminarse adecuadamente con un desinfectante, como agua lavandina al 10% v/v (o hipoclorito de sodio al 0.5% m/v) recién preparada (preparar fresca todos los días). Todos los materiales descartables que hayan estado en contacto con la sangre deben eliminarse como material patógeno en bolsas rojas aprobadas para tal fin.

Se debe cumplir con las recomendaciones de manejo de elementos corto-punzantes:

	DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS ANTINUCLEARES POR INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (IFI)	DTC-DI-005-GA-A1
		Edición Fecha: 07/01/2021
		Página 35 de 41

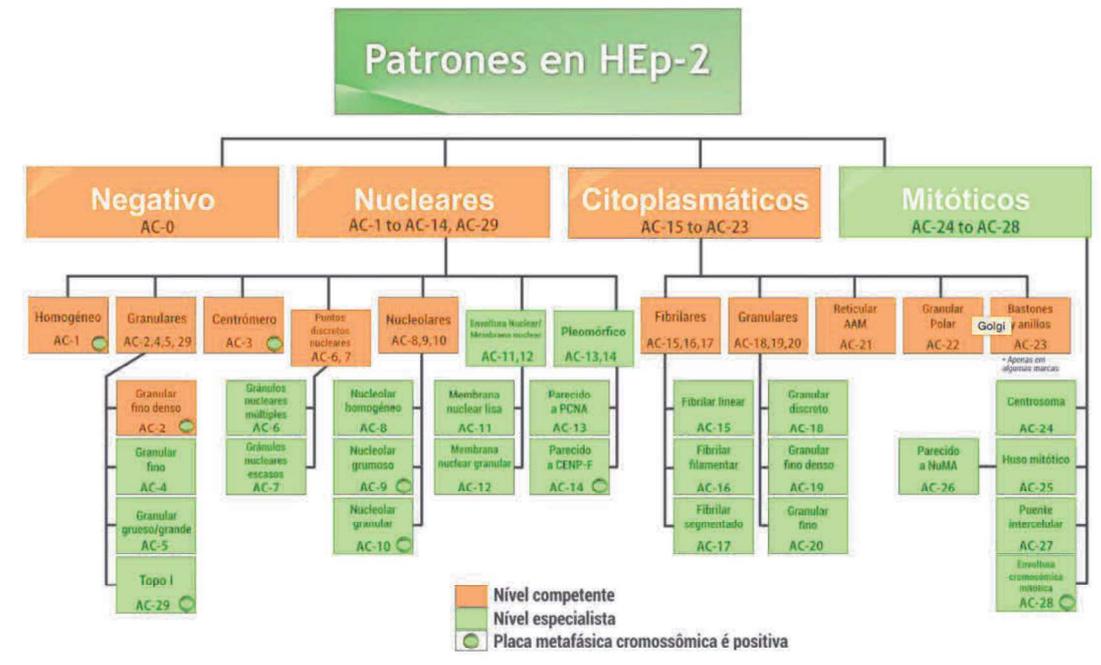
-No re-enfundar agujas.

-Disponer y utilizar adecuadamente el contenedor para corto-punzantes.

-No transportar jeringas con agujas.

Todas las personas que trabajan con muestras biológicas deben conocer los riesgos potenciales y estar capacitadas en las prácticas y técnicas requeridas para manipularlas en forma segura. La persona a cargo del laboratorio es responsable de brindar u organizar la capacitación adecuada del personal. Se recomienda el desarrollo o la adopción de un manual de operaciones y de bioseguridad que identifique los riesgos que puedan producirse, y que especifique las prácticas y los pasos a seguir en caso de que un operador se haya expuesto a una situación de riesgo biológico.

Anexo 1: Patrones de inmunofluorescencia propuestos por ICAP



1. Nucleares

- a) Homogéneo.
- b) Granulares o moteados: Fino Denso, Fino, Grueso, Topo I.
- c) Centrómero.
- d) Puntos Nucleares Discretos: Múltiples o Escasos.
- e) Nucleolares: Homogéneos, Grumosos o Granulares.
- f) Envoltura Nuclear/Membrana Nuclear: Lisa o Granular.
- g) Pleomórfico: parecido a PCNA o parecido a CENP-F.

2. Citoplasmáticos

- a) Fibrilares: Linear, Filamentar, Segmentado.
- b) Granulares: Discreto, Fino Denso, Fino.
- c) Reticular (AMA).

	DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS ANTINUCLEARES POR INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (IFI)	DTC-DI-005-GA-A1
		Edición Fecha: 07/01/2021
		Página 37 de 41

- d) Granular Polar.
- e) Bastones y Anillos.

3. Mitóticos

- a) Centrosoma.
- b) Huso Mitótico.
- c) Puente intercelular.
- d) Envoltura Cromosómica mitótica.

REFERENCIAS

	DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS ANTINUCLEARES POR INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (IFI)	DTC-DI-005-GA-A1
		Edición Fecha: 07/01/2021
		Página 38 de 41

1. Agmon-Levin N, Damoiseaux J, Kallenberg C, Sack U, Witte T, Herold M, et al. International recommendations for the assessment of autoantibodies to cellular antigens referred to as antinuclear antibodies. *Ann Rheum Dis* 2014; 73:17–23.
2. Meroni PL, Schur PH. ANA screening an old test with new recommendations. 2010; *Ann Rheum Dis* 69:1420 –1422.
3. Pisetsky DS. 2017. Antinuclear antibody testing: misunderstood or misbegotten? *Nat Rev Rheumatol* 13:495–502.
4. Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1982; 25:1271–1277
5. Hochberg MC. 1997. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*.1997; 40:1725.
6. van den Hoogen F, Khanna D, Fransen J et al. 2013 classification criteria for systemicsclerosis: an American College of Rheumatology/European LeagueAgainst Rheumatism collaborative initiative.2013; *Ann Rheum Dis* 72:1747–1755.
7. Orlando Gabriel Carballo, Fernanda Beatriz Ingénito, Alejandra Andrea Ginaca, Patricia Carabajal, Marta Alicia Costa, Jeannette Balbaryski. Primer Consenso Argentino para la Estandarización de la Determinación de Anticuerpos Anti-Nucleares por Inmunofluorescencia Indirecta–HEp-2. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 2012; 46 (1): 3-13.
8. Damoiseaux J, Cohelo Andrade LE, Carballo OG et al. Clinical relevance of HEp-2 indirect immunofluorescent patterns: the International Consensus on ANA patterns (ICAP) perspective. *Ann Rheum Dis* 2019; 78:879-89.
9. Dellavance A, Júnior AG, Nuccitelli B, Taliberti BH, von Mühlen CA, AraújoBichara CD. Third Brazilian Consensus for autoantibodies in HEp-2 cells (ANA). Recommendations for standardization of autoantibodies screening Trial in HEp-2 cell, quality control and clinical associations. *Rev Bras Reumatol* 2009; 49 (2): 89-109

	DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS ANTINUCLEARES POR INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (IFI)	DTC-DI-005-GA-A1
		Edición Fecha: 07/01/2021
		Página 39 de 41

10. C. Peruzzetto; C. Valdata; J. P. Grammatico. Manual de Acreditación N° 3, elaborado por el Comité Ejecutivo del Programa de Acreditación de Laboratorios. Ed. Fundación Bioquímica Argentina, Programa de Acreditación de Laboratorios. Abril de 2012
11. Tebo A. Recent approaches to Optimize Laboratory Assessment of Antinuclear Antibodies. Clin Vaccine Immunology 2017 ; 24(12): e00270-17
12. [Sack U, Conrad K, Csernok E, Frank I, Hiepe F, Krieger T et al. Autoantibody detection using indirect immunofluorescence on HEp-2 Cells. Ann N.Y. Acad. Sci. 2009; 1173: 166-73.](#)
13. Munujos P. Autoimmune diagnostics by immunofluorescence: variability and harmonization. Autoimmunity [Internet].2016- clinlabint.com [1 de Julio de 2020]. <https://www.clinlabint.com/fileadmin/sponsored-links/2017/biosystems-spons-link-cli-nov2016.pdf> CCE
14. [Kavanaugh A, Tomar R, Reveille J, Solomon DH, Homburger HA](#), Guidelines for Clinical Use of the Antinuclear Antibody Test and Tests for Specific Autoantibodies to Nuclear Antigens. Arch Pathol Lab Med 2000; 124: 71-81.
15. Dellavance A, Júnior A, Cintra A, Ximenes A et al. I Consenso Nacional para Padronização dos Laudos de FAN HEp-2. J. Bras Patol e Med Lab 2002; 38: 207-16.
16. Dellavance A, Júnior A, Nuccitelli B et al. 3er 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 (2): 89-109.
17. Quality assurance of Laboratory Tests for Autoantibodies to Nuclear Antigens: (1) Indirect Fluorescence Assay for Microscopy and (2) Microtiter Enzyme Immunoassay Methods; Approved Guideline – Second Edition CLSI. <https://clsi.org/standards/products/immunology-and-ligand-assay/documents/ila02/>

	DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS ANTINUCLEARES POR INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (IFI)	DTC-DI-005-GA-A1
		Edición Fecha: 07/01/2021
		Página 40 de 41

18. Manfred H, Klotz W, Andrade L, et al. "International Consensus on Antinuclear Antibody Patterns: defining negative results and reporting unidentified patterns" *Clin Chem Lab Med (CCLM)* – 2018. doi:10.1515/cclm-2018-0052.
19. Meroni P.L. et al. Standardization of autoantibody testing: a paradigm for serology in rheumatic diseases. *Nat. Rev. Rheumatol.* 2014; 10: 35–43.
20. Damoiseaux J, Andrade LE, Fritzler MJ, Shoenfeld Y. Autoantibodies 2015: From diagnostic biomarkers toward prediction, prognosis and prevention. *Autoimmunity Reviews.* 2015; 14 (6):555-563.
21. Damoiseaux J, Olschowka N, Shoenfeld Y. EASI - European Autoimmunity Standardisation Initiative: facing the challenges of diagnostics in autoimmunity. *Clin Chem Lab Med.* 2018; 56(10):1620-1623.
22. Chan EK, Damoiseaux J, Carballo OG, et al. Report of the First International Consensus on Standardized Nomenclature of Antinuclear Antibody HEp-2 Cell Patterns 2014-2015. *Frontiers in Immunology.* 2015; 6:412.
23. BQ. Hugo Moscoso E, BQ. Carolina Valenzuela B. "Recomendaciones para la determinación de autoanticuerpos en el laboratorio de Inmunología". Documento técnico. Instituto de Salud Pública – Ministerio de Salud – Gobierno de Chile (2016).
24. Chan EK, Damoiseaux J, Carballo OG, et al. Report of the First International Consensus on Standardized Nomenclature of Antinuclear Antibody HEp-2 Cell Patterns 2014-2015. *Frontiers in Immunology.* 2015; 6:412.
25. Daves M, Blecken J, Matthias T, et al. New automated indirect immunofluorescent antinuclear antibody testing compares well with established manual immunofluorescent screening and titration for antinuclear antibody on HEp-2 cells. *Immunol Res.* 2017; 65(1):370-374.
26. Wiik AS, Høier-Madsen M, Forslid J, Charles P, Meyrowitsch J. Antinuclear antibodies: a contemporary nomenclature using HEp-2 cells. *Journal of Autoimmunity.* 2010; 35 (3):276-290.
27. Cruvinel et al. "V Brazilian consensus guidelines for detection of anti-cell autoantibodies on hep-2 cells". *Advances in Rheumatology.* 2019; 59:28-39.

	DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS ANTINUCLEARES POR INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (IFI)	DTC-DI-005-GA-A1
		Edición Fecha: 07/01/2021
		Página 41 de 41

28. Luis E.C. Andrade*, Werner Klotz, Manfred Herold, Karsten Conrad, Johan Rönnelid, Marvin J. Fritzler, Carlos A. von Mühlen, Minoru Satoh, Jan Damoiseaux, Wilson de Melo Cruvinel and Edward K.L. Chan, on behalf of the Executive Committee of ICAP. "International consensus on antinuclear antibody patterns: definition of the AC-29 pattern associated with antibodies to DNA topoisomerase I". Clin Chem Lab Med 2018; 56(10): 1783–1788
29. Infantino M, Meacci F, Grossi V, et al. The burden of the variability introduced by the HEp-2 assay kit and the CAD system in ANA indirect immunofluorescence test. Immunol Res. 2017;65(1):345-354
30. Bentow C, Fritzler MJ, Mummert E, Mahler M. Recognition of the dense fine speckled (DFS) pattern remains challenging: results from an international internet-based survey. Auto Immun Highlights. 2016; 7(1):8. doi: 10.1007/s13317-016-0081-2. Epub 2016 Jul 9.