



**Universidad
Zaragoza**

Trabajo Fin de Máster

Rentabilidad diagnóstica de la determinación automatizada de Anticuerpos Antinucleares (ANA) y sus patrones de Inmunofluorescencia (IFI) sobre células Hep-2 en pacientes con sospecha de Conectivopatía. Estudio comparativo respecto a las técnicas tradicionales

Diagnostic profitability of the automated determination of Antinuclear Antibodies (ANA) and their Immunofluorescence (IFI) patterns on Hep-2 cells in patients with suspected connective tissue disease. Comparative study with respect to traditional techniques

Autor/es

Elena Isabel Esteban Cabello

Director/es

José Velilla Marco

ÍNDICE

RESUMEN/ABSTRACT	4-5.
INTRODUCCIÓN	6-16.
1. LAS ENFERMEDADES AUTOINMUNES SISTÉMICAS: CONECTIVOPATÍAS.....	6-8.
1.1 Concepto.....	6.
1.2 Epidemiología.....	6.
1.3 Clínica.....	7.
1.4 Clasificación.....	7-8.
1.5 Diagnóstico.....	8.
2. LOS ANTICUERPOS ANTINUCLEARES (ANA).....	8-11.
2.1 Concepto.....	8-9.
2.2 Detección de ANA.....	9.
2.3 Inmunofluorescencia Indirecta (IFI)	9-10.
2.3.1 Patrones clásicos.....	10-11.
2.3.2 Patrones nuevos.....	11-12.
3. UTILIDAD CLÍNICA DE LA DETERMINACIÓN ANA-IFIS.....	13-16.
3.1 Significado de la positividad de ANA.....	12-13.
3.2 Implicaciones de la cuantificación del título de ANAs.....	14.
3.3 Asociaciones clínicas de los patrones ANA-IFI.....	14-16.
JUSTIFICACION, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	17-18.
1. Justificación de la elección del tema.....	17.
2. Hipótesis y objetivos del estudio.....	18.
PACIENTES, MATERIAL Y MÉTODOS	19-21.
1. Diseño.....	19.
2. Muestra.....	19-20.
3. Criterios de inclusión.....	20.
4. Criterios de exclusión.....	20.
5. Variables.....	20.
6. Metodología estadística.....	20-21.
7. Tratamiento de los datos.....	21.
8. Consideraciones éticas.....	21.
RESULTADOS	22-35.
A) DESCRIPTIVO DE LA MUESTRA.....	22-24.
B) RENTABILIDAD DIAGNÓSTICA.....	24-30.
B.1 Utilidad diagnóstica ANA IFI.....	24-28.
B.2 Estudio de ambos test diagnósticos.....	29.
B.3 Comparación de ambos métodos.....	30.
C) ESTUDIO DE LA CONCORDANCIA INTRALABORATORIO.....	30-33..
C.1 Concordancia de la determinación intralaboratorio 1.....	30-31.
C.2 Concordancia de la determinación intralaboratorio 2.....	31-33.
D) ESTUDIO DE LA CONCORDANCIA ENTER LABORATORIO.....	33-34.
D.1 Concordancia de positivities “globales” de ANA-IFI entre laboratorios.....	33.
D.2 Concordancia del grado de positividad.....	33.
D.3 Concordancia del patrón de ANA-IFI positivos.....	34.
E) RESUMEN DEL ESTUDIO DE CONCORDANCIA.....	35.
DISCUSIÓN	36-41.
CONCLUSIONES	42.
BIBLIOGRAFÍA	43-45.
ANEXO	46.

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

<u>Figura 1:</u> Esquema Patrones ANA-IFI clásicos.....	11.
<u>Figura 2:</u> Esquema Patrones ANA-IFI nuevos.....	12.
<u>Figura 3:</u> Gráfico de barras de intervalos de edad agrupado por sexo.....	22.
<u>Figura 4:</u> Histograma de edad.....	22.
<u>Figura 5:</u> Agrupación por sexo de Conectivopatía vs no Conectivopatía.....	23.
<u>Figura 6:</u> Gráfico de sectores diagnóstico de Conectivopatías.....	23.
<u>Figura 7:</u> Curva ROC: Síndrome Raynaud.....	25.
<u>Figura 8:</u> Curva ROC: Lesión cutánea.....	25.
<u>Figura 9:</u> Curva ROC: Trastorno Musculoesquelético.....	26.
<u>Figura 10:</u> Curva ROC: Trombofilia.....	26.
<u>Figura 11:</u> Curva ROC: Síndrome seco.....	26.
<u>Figura 12:</u> Curva ROC: otras sospechas clínicas.....	26.
<u>Figura 13:</u> Curva ROC para sospecha global de Conectivopatía. Todos los pacientes.....	26.
<u>Tabla 1:</u> Principales Manifestaciones Clínicas de las Conectivopatías.....	8.
<u>Tabla 2:</u> Patrones ANA-IFI clásicos, antígenos determinantes y enfermedades asociadas.....	11.
<u>Tabla 3:</u> Patrones ANA-IFI “nuevos”. Consenso internacional actual.....	12-13.
<u>Tabla 4:</u> Sospechas diagnósticas para el diagnóstico de Conectivopatías.....	23.
<u>Tabla 5:</u> Valores predictivos positivos y comparación interlaboratorio de parámetros antropométricos para el diagnóstico de Conectivopatía.....	24.
<u>Tabla 6:</u> Valores predictivos positivos y comparación interlaboratorios de sospechas diagnósticas para el diagnóstico de Conectivopatía.....	24-25.
<u>Tabla 7:</u> Áreas bajo la curva de los síndromes de sospecha clínica para el diagnóstico de Conectivopatías.....	25.
<u>Tabla 8:</u> Valores predictivos positivos y comparación interlaboratorios de patrones clásicos para el diagnósticas de Conectivopatía.....	27.
<u>Tabla 9:</u> Recuento, porcentaje de patrones ANA-IFI nuevo positivo en las Conectivopatías y VPP.....	27.
<u>Tabla 10:</u> Titulación de anticuerpos en relación al diagnóstico en ambos laboratorios.....	28.
<u>Tabla 11:</u> Estudio de el método automatizado como test diagnóstico. VPP: Valor predictivo. positivo. VPn: Valor Predictivo Negativo. IC: Intervalo de Confianza. Sens: sensibilidad. Esp: especificidad.....	29.
<u>Tabla 12:</u> Estudio del método convencional como test diagnóstico. VPP: Valor predictivo positivo. VPn: Valor Predictivo Negativo. IC: Intervalo de Confianza. Sens: sensibilidad. Esp: especificidad.....	29.
<u>Tabla 13:</u> Comparación entre ambos test diagnósticos.....	30.
<u>Tabla 14:</u> Diferencia temporal entre las dos determinaciones Laboratorio 1.....	30.
<u>Tabla 15:</u> Concordancia de positivades ANA IFI laboratorio 1.....	30.
<u>Tabla 16:</u> Concordancia del grado de positividad ANA IFI laboratorio 1.....	31.
<u>Tabla 17:</u> Concordancia de patrones ANA IFI laboratorio 1.....	31.
<u>Tabla 18:</u> Diferencia temporal entre las dos determinaciones Laboratorio 2.....	32.
<u>Tabla 19:</u> Concordancia de positivades ANA IFI laboratorio 2.....	32.
<u>Tabla 20:</u> Concordancia del grado de positividad ANA IFI laboratorio 2.....	32.
<u>Tabla 21:</u> Concordancia del patrón de positividad ANA IFI laboratorio 2.....	33.
<u>Tabla 22:</u> Concordancia de positivades ANA IFI interlaboratorios.....	33.
<u>Tabla 23:</u> Concordancia del grado de positividad ANA IFI interlaboratorios.....	34.
<u>Tabla 24:</u> Concordancia del patrón ANA IFI interlaboratorios.....	34.
<u>Tabla 25:</u> Resumen estudio de concordancia.....	35.

ABREVIATURAS

ANAs	Anticuerpos Antinucleares
Ac	Anticuerpo
Auto Ac	Autoanticuerpo
IFI	Inmunofluorescencia Indirecta
EAS	Enfermedades Autoinmunes Sistémicas
LES	Lupus Eritematoso Sistémico
ESP	Esclerosis Sistémica Progresiva
SSj	Síndrome de Sjögren
DM/PM	Dermatomiositis/Polimiositis
SAF	Síndrome Antifosfolípido
EMTC	Enfermedad Mixta del Tejido Conectivo
CI	Conectivopatía Indiferenciada
EPID	Enfermedad Pulmonar Interticial Difusa
S	Sensibilidad
E	Especificidad
VPP	Valor Predictivo Positivo
VPN	Valor Predictivo Negativo
IC	Intervalo de Confianza

RESUMEN

Introducción: Los Anticuerpos Antinucleares (ANAs) son inmunoglobulinas que reconocen componentes celulares autólogos; su determinación mediante Inmunofluorescencia indirecta (IFI) en células HEp-2 se utiliza como prueba de screening para el diagnóstico de las Conectivopatías. Esta técnica permite de forma visual evaluar los ANAs en base a su positividad, al título y a su patrón morfológico. En los últimos años se ha propuesto una taxonomía de clasificación ordenada para armonizar los nombres y las descripciones de los distintos patrones. Además, se ha intentado estandarizar las distintas técnicas de laboratorio para evitar el factor de subjetividad creando instrumentos de automatización para el procesamiento de los ANA-IFI mediante plataformas de reconocimiento basados en hardware y software sobre células HEp-2.

Objetivos: Nuestro objetivo principal fue comparar la utilidad en la práctica clínica de la determinación automatizada en pacientes con sospecha de Conectivopatía frente a una técnica convencional.

Material y métodos: Estudio descriptivo, retrospectivo y observacional sobre muestras sanguíneas de pacientes con sospecha de Conectivopatía que acudieron a consultas del Hospital Universitario Miguel Servet. Se analizó el reconocimiento de patrones ANAs mediante IFI sobre células HEp-2 de forma convencional (visual) y automatizada en dos laboratorios diferentes. Estudiamos la rentabilidad diagnóstica de ambas pruebas mediante el cálculo de su Sensibilidad (S), Especificidad (E) y Valores Predictivos Positivos (VPP) y Negativos (VPN). El contraste de hipótesis se evaluó con el test de McNemar, y la concordancia inter e intralaboratorio mediante los test kappa de Cohen y el coeficiente de correlación de Spearman, aceptando siempre una significación estadística menor de $p < 0,05$.

Resultados: El sistema convencional tiene un mayor VPP para la detección de Conectivopatías en mujeres, y menores de 65 años ($p < 0,001$). Ambas técnicas aplicadas a las sospechas diagnósticas mostraron en nuestro medio altos valores predictivos positivos, a excepción de en la trombofilia. El patrón más frecuente fue el moteado fino, con un alto VPP y diferencias significativas interlaboratorios. Destaca la relación del Lupus Eritematosos Sistémico (LES) con el patrón AC1 Homogéneo y la ESP con patrón Nucleolar discreto AC-3. La mayoría de Conectivopatías presentan ANA positivos a una titulación baja (convencional (+) automatizado 1/160), a excepción de la Esclerodermia (ESP) que lo hace con titulaciones superiores (++) y 1/640 respectivamente). La S y E fueron mejores para el diagnóstico de Conectivopatía por el método convencional (S: 0,64, E: 0,90) frente al automatizado (S 0,69, E 0,77), $p < 0,001$. La concordancia intralaboratorio 1 mostró mayor grado de acuerdo respecto al laboratorio 2 en relación a la positividad ANA-IFI y al grado de positividad en dos determinaciones. Sin embargo, el reconocimiento de patrones presentó mayor Índice Kappa en Laboratorio 2 (Kappa 0,763) a pesar de existir mayor decalaje temporal entre las determinaciones. Finalmente, la concordancia interlaboratorios fue buena (Kappa 0,627).

Conclusión: En nuestro trabajo la rentabilidad diagnóstica no parece aumentar con los sistemas de automatizado. Sin embargo, la interpretación de patrones a lo largo del tiempo parece ser más exacta que analizada de forma convencional. Se necesitan más estudios de estandarización de técnicas para el reconocimiento de patrones ANA-IFI.

Palabras clave: Anticuerpos antinucleares, Inmunofluorescencia Indirecta y Conectivopatías.

ABSTRACT

Introduction: Antinuclear Antibodies (ANAs) are immunoglobulins that recognize autologous cellular components; Its determination by indirect immunofluorescence (IFI) in HEp-2 cells is used as a screening test for the diagnosis of connective tissue diseases. This technique makes it possible to visually evaluate ANAs based on their positivity, titer, and morphological pattern. In recent years, an ordered classification taxonomy has been proposed to harmonize the names and descriptions of the different patterns. In addition, an attempt has been made to standardize the different laboratory techniques to avoid the subjectivity factor by creating automation instruments for the processing of ANA-IFIs using recognition platforms based on hardware and software on HEp-2 cells.

Objectives: Main objective has been to compare the usefulness in clinical practice of automated determination in patients with suspected connective tissue disease versus a conventional technique.

Material and methods: Descriptive, retrospective and observational study on blood samples from patients with suspected connective tissue disease who attended consultations at the Miguel Servet University Hospital. The recognition of ANAs patterns by IFI on HEp-2 cells was analyzed in a conventional (visual) and automated way in two different laboratories. Diagnostic yield has been studied for both tests by calculating their Sensitivity (S), Specificity (E) and Positive Predictive Values (PPV) and Negative (NPV). Hypothesis contrast was evaluated with the McNemar test, and inter- and intra-laboratory agreement using Cohen's kappa test and Spearman's correlation coefficient, always accepting a statistical significance of less than $p < 0.05$.

Results: The conventional system has a higher PPV for the detection of connective tissue diseases in women, and those under 65 years of age ($p < 0.001$). Both techniques applied to diagnostic suspicions showed high positive predictive values in our setting, with the exception of thrombophilia. The most frequent pattern was fine speckled, with a high PPV and significant interlaboratory differences. The relationship of Systemic Lupus Erythematosus (SLE) with the Homogeneous AC1 pattern and the ESP with the AC-3 discrete nucleolar pattern stands out. The majority of connective tissue diseases present positive ANA at a low titer (conventional (+) automated 1/160), with the exception of Scleroderma (ESP) which does so with higher titer (++ and 1/640 respectively). The S and E were better for the diagnosis of connective tissue disease by the conventional method (S: 0.64, E: 0.90) compared to the automated one (S 0.69, E 0.77), $p < 0.001$. Intra-laboratory agreement 1 showed a greater degree of agreement with respect to laboratory 2 in relation to the ANA-IFI positivity and the degree of positivity in two determinations. However, pattern recognition presented a higher Kappa Index in Laboratory 2 (Kappa 0.763) despite a greater time lag between the determinations. Finally, the interlaboratory agreement was good (Kappa: 0,627).

Conclusion: In our work, diagnostic profitability does not seem to increase with automated systems. However, the interpretation of patterns over time appears to be more accurate than conventionally. More studies are needed to standardize techniques for ANA-IFI pattern recognition.

Key words: Antinuclear Antibodies, Indirect Immunofluorescence and Connective Diseases.

INTRODUCCIÓN

1. LAS ENFERMEDADES AUTOINMUNES SISTÉMICAS: CONECTIVOPATÍAS

1.1 Concepto

Las Enfermedades Autoinmunes Sistémicas (EAS) son un grupo heterogéneo de patologías causadas por daño intrínseco del sistema inmunológico, donde se produce una pérdida de la auto tolerancia, con respuestas anormales frente a estructuras propias. Potencialmente graves, de diagnóstico difícil y relativamente desconocidas. Comparten tres características comunes: Patogenia autoinmune, afectación de dos o más órganos, aparatos o sistemas y manifestaciones inflamatorias generales. Se clasifican en tres grandes grupos:

1. Conectivopatías o “Colagenosis”
2. Vasculitis
3. Grupo misceláneas

Su etiología es desconocida y multifactorial en las que intervienen factores genéticos, ambientales y hormonales. Varios de los genes involucrados están relacionados con el reconocimiento proteico entre las superficies de las membranas celulares del sistema inmunológico y las que forman el resto del organismo. La mayor contribución se debe a los genes del sistema de histocompatibilidad (SPH) y hay múltiples ejemplos de asociación entre las enfermedades autoinmunes y determinados antígenos del SPH, ya que estos genes pueden influir en la selección de los linfocitos autorreactivos y en el desarrollo de la autotolerancia (1,2).

Dentro de las EAS, en el presente trabajo nos centraremos en las Conectivopatías, enfermedades no específicas de órgano que afectan de forma difusa al tejido conectivo y constituyen un grupo heterogéneo de entidades clínicas que se caracterizan por la alteración del sistema inmune; pueden llegar a presentarse simultáneamente, o a lo largo de su evolución, y provocar lesiones en diferentes aparatos o sistemas del organismo. Esta denominación refleja una afectación a menudo multivisceral y de presentación variable, cuyo diagnóstico es a veces difícil (3).

1.2 Epidemiología

Las Conectivopatías son enfermedades poco habituales en la infancia, con un predominio del sexo femenino y tendencia a aparecer en adolescentes o preadolescentes. Se caracterizan por una afectación multisistémica sin una causa aparente, con síntomas y signos variables que pueden aparecer de forma insidiosa durante el transcurso de semanas o meses. (4)

1.3 Clínica

Los síntomas iniciales son inespecíficos en muchos casos, fiebre, astenia, anorexia o pérdida de peso, y debe establecerse un diagnóstico diferencial con infecciones víricas y bacterianas, neoplasias (especialmente procesos linfoproliferativos) y otras enfermedades inflamatorias (vasculitis).

La aparición de ciertas manifestaciones clínicas (Tabla 1), como lesiones cutáneas (exantema malar, úlceras orales, pápulas de Gottron, fenómeno de Raynaud, esclerodactilida, trastornos musculoesqueléticos...), asociadas a síntomas constitucionales y una afectación multisistémica, debe hacernos pensar en una Conectivopatía.

El diagnóstico de confirmación se establece mediante una combinación de criterios clínicos y analíticos, como la presencia de anticuerpos antinucleares (ANA) y otros autoanticuerpos.

Es importante su reconocimiento precoz para iniciar un tratamiento adecuado sin demora, que incluye el uso de corticoides y fármacos inmunosupresores, y mejorar el pronóstico de los pacientes a largo plazo. (4)

1.4 Clasificación (2)

La clasificación de las conectivopatías fue llevada a cabo por ACR (American College of Rheumatology) en el año 1983, siguiendo los planes de la Organización Mundial de la Salud (OMS). (4)

Clasificación de enfermedades difusas del tejido conectivo

Artritis reumatoide

- Artritis juvenil
- Comienzo sistémico
- Comienzo poliarticular
- Comienzo oligoarticular

Lupus eritematoso

- Lupus eritematoso discoide
- Lupus eritematoso sistémico
- Lupus relacionado con fármacos

Esclerodermia

- Localizada
- Esclerosis sistémica
- Química o farmacológicamente inducida

Síndrome Antifosfolípido: Trombosis venosas y/o arteriales, abortos, livedo reticularis.

Polimiositis

- Polimiositis
- Dermatomiositis
- Polimiositis o dermatomiositis asociada a un tumor
- Polimiositis o dermatomiositis infantil asociada a vasculopatía

Síndrome de Sjögren

- Primario
- Secundario

Conectivopatías Indiferenciadas y Síndromes de superposición

- Enfermedad mixta del tejido conjuntivo
- Otras

Hay clasificaciones que no incluyen la Artritis Reumatoide localizada ni el síndrome antifosfolípido por poder considerarse una EA organoespecífica y por eso no cursa en su mayoría con ANAS ni con AC Anticitooplasmáticos.

1.5 Diagnóstico

El diagnóstico de las Conectivopatías es difícil y debe establecerse con ayuda de:

- Sospecha clínica: síndromes y patrones característicos
- Laboratorio: Anticuerpos ANA positivos
- Criterios diagnósticos: Propuestos por expertos, expuestos en conferencias de consenso, realizados a través de unos criterios de clasificación y con una validez diagnóstica.

MUCO-CUTÁNEAS	HEMATOLÓGICAS	NEUROLÓGICAS
Aftas orales - genitales Xerostomía Esclerodactilia S de Raynaud Fotosensibilidad Paniculitis Púrpura palpable	Neutropenia Linfopenia Trombopenia Anemia hemolítica Trombofilia	PNP/Mononeuritis Meningitis recurrentes Patología vascular atípica Convulsiones/Psicosis atípicas Demencia precoz Patología Desmielinizante atípica Mielitis transversa
RENALES	REUMÁTICAS	VARIOS
Proteinuria/hematuria Insuficiencia renal GNF no filiada	Artritis/Miositis Artralgias/mialgias	Fiebre de origen desconocido Poliserositis S. astenia crónica
OCULARES	DIGESTIVAS	PULMONARES
Xeroftalmía Uveítis posterior	Disfagia Dolor/hemorragia	Enfermedad Pulmonar Intersticial Hipertensión pulmonar

Tabla 1: Principales Manifestaciones Clínicas de las Conectivopatías

2. LOS ANTICUERPOS ANTINUCLEARES (ANA)

2.1 Concepto

Los Anticuerpos Antinucleares (ANAs) son inmunoglobulinas directas que reconocen componentes celulares autólogos (nucleares y citoplasmáticos).(5)

Su determinación es básica para el diagnóstico y posterior identificación de las diversas EAS y especialmente de las Conectivopatías y sus correspondientes subtipos, constituyendo un Criterio de Clasificación en muchas de estas entidades. (5)

La frecuencia de ANAs es alta en el lupus eritematoso sistémico (LES), síndrome de Sjögren, esclerodermia, enfermedad mixta del tejido conectivo, hepatopatías autoinmunes, entre otras. Se ha estudiado el valor diagnóstico de la determinación de ANA en diferentes enfermedades, mostrando un alto valor en el LES y la esclerodermia, discutiéndose sobre el significado de la positividad de los ANAs en otros trastornos autoinmunes, en enfermedades sin patogénesis autoinmune y en personas sanas(6).

El estudio de los ANAs se inició con la identificación en pacientes con LES de las denominadas células LE (Lupus Eritematoso), descrito por Hargraves en 1948 (7). Su detección fue durante mucho tiempo una prueba utilizada para confirmar el diagnóstico de LES. Sin embargo, años después se demostró su baja especificidad, ya que pueden estar presentes en pacientes con artritis reumatoide (25%), síndrome de Sjögren (15–20%), cirrosis pancreática (33%), hepatitis crónica activa (50–70%) y en otras enfermedades (1–2% miastenia gravis y púrpura trombocitopenia idiopática). En 1959, Holman mostró que el fenómeno de las células LE se debía a la presencia de anticuerpos que reconocen antígenos nucleares (8).

2.2 Detección de ANA

Según los consensos internacionales actuales, para la detección de ANA, debe realizarse inicialmente una Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) en líneas celulares como prueba de screening inicial debido a su alta sensibilidad. Posteriormente, un resultado positivo se confirmará mediante técnicas más sensibles y específicas como ELISA, electroinmunotransferencia (Western Blot) u otras.

Pese a los avances tecnológicos de los últimos años (desarrollo de múltiples Auto-Anticuerpos específicos de los diferentes Ag Nucleares y/o celulares), la determinación de ANAs por IFI sigue siendo un pilar básico en el proceso diagnóstico de los pacientes con EAS.

Los ANAs deben ser evaluados además, en base al patrón morfológico y al título. La detección específica de otros autoanticuerpos (anti-ENA, ADNcd...) resulta también útil en el diagnóstico y seguimiento de pacientes con enfermedades autoinmunes, pero de forma complementaria a la determinación de ANAs por IFI. Por ello, las pruebas diagnósticas deben realizarse de una forma ordenada y secuencial. (5)

2.3 Inmunofluorescencia Indirecta (IFI)

La determinación de ANA por IFI fue descrita por primera vez en 1958 y desde la década de 1970, se utiliza como sustrato estándar universal las células HEp-2, que permiten la detección de más de 50 autoanticuerpos en 30 antígenos diferentes, nucleares y citoplasmáticos. (9)

Las células HEp-2 son un tipo de células de cultivo neoplásicas inmortalizadas que se utilizan en investigación científica y como sustrato en varios test para detección de anticuerpos antinucleares. El nombre es un acrónimo acuñado por el grupo de investigación original (Toolan et al.) que proviene de *Human Epidermoid carcinoma strain* o actualmente también según la connotación *Human Epithelioma*. (5)

Recientemente los miembros del Colegio Americano de Reumatología (ACR) realizaron una guía basada en la evidencia donde se presenta la utilidad de los resultados positivos

o negativos de la IFI sobre células HEp-2 para fines de diagnósticos y pronósticos. Finalmente, se estableció como el “gold standard” para la detección de autoanticuerpos en las EAS (10).

La importancia del título de autoanticuerpos está reconocida en la guía ACR, así como en las recomendaciones emitidas por la Iniciativa Europea de Normalización de la Autoinmunidad (EASI) y el Subcomité de Normalización de Autoanticuerpos de la Unión Internacional de Sociedades Inmunológicas (IUIS), ya que niveles más altos están mejor asociados con las Enfermedades Autoinmunes Sistémicas (10).

Finalmente, el tipo de patrón morfológico detectado con la IFI sobre células HEp-2 además es clínicamente relevante. Incluyéndose algunos de ellos actualmente en los criterios diagnósticos de algunas enfermedades o incluso siendo algunos de ellos más prevalentes en la población sana (10).

Las células HEp-2 son ideales para este tipo de prueba, ya que tienen facilidad de crecimiento y crecen en forma de monocapa, lo que permite la visualización de las mismas a través del microscopio de fluorescencia. Además, tienen un núcleo más grande que cualquier célula epitelial normal lo que hace más fácil la visualización de los patrones nucleares y citoplasmáticos. Adicionalmente, estas células permiten detectar anticuerpos contra antígenos que dependen del ciclo celular. (10)

Clásicamente los distintos patrones HEp-2 de IFI, estaban asociados cada uno a determinadas EAS, y solo eran válidos si se confirmaban mediante pruebas de seguimiento.

2.3.1 Patrones clásicos de ANA-IFI

Los ANA se pueden clasificar dependiendo de las distintas estructuras que reconozcan: nucleosoma, proteínas no histonas asociadas al ADN, proteínas no histonas asociadas al ARN o antígenos extraíbles del núcleo (ENA), nucléolo y antígenos citoplasmáticos.

La IFI es un método accesible en muchos laboratorios y fácil de reproducir. Para esta prueba sólo se requiere del suero del paciente, el cual se diluye inicialmente en 1/40 o más, este se agrega sobre la preparación de las células HEp-2 permitiendo de esta forma que los anticuerpos del paciente se unan con los antígenos diana presentes en estas células.

Después se realiza un lavado con una solución buffer y se aplica una solución con IgG antihumana acoplada a un fluorocromo que se une al complejo antígeno/anticuerpo presente en la muestra.

Finalmente, después de un segundo lavado que retire los anticuerpos fluorescentes que no se unieron, se podrá observar el resultado mediante un microscopio de luz ultravioleta(11).

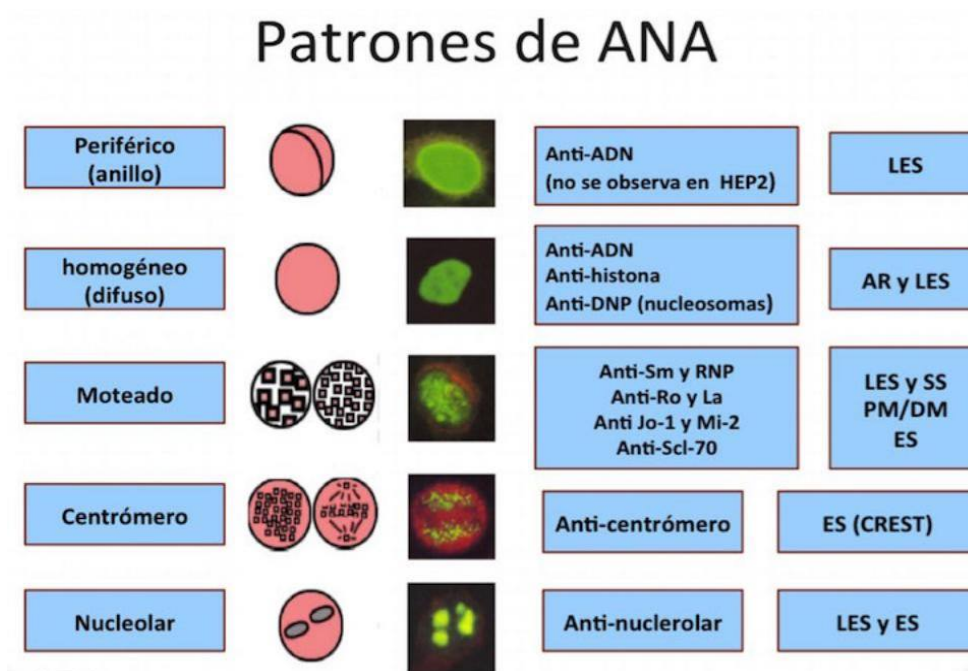


Figura 1: Patrones ANA-IFI clásicos. Fuente: “Anticuerpos Antinucleares (ANA)” por la Dra. Kelly Caba en *Lúpus: Médico y paciente*.

Patrón	Ag determinante	Enfermedades asociadas
Homogéneo	Histonas	LES-farmacológico
Periférico	n-DNA (bicaten.) m-DNA (monocat)	LES, específico (Nefro,SNC) LES/Conectivo. Inespecifico
Moteado-espículado	Sm U1-RNP U2-RNP Ro, La Centrómero	LES (el + específico) EMTC Formas superposición SS1º, LES, LESubagudo y neonatal Esclerodermia limitada (CREST?)
Nucleolar	Scl-70	Esclerodermia difusa
Citoplásmico	Jo-1, sintetasas	DM + EPID, artritis y Raynaud

Tabla 2: Patrones ANA-IFI clásicos, Ag determinantes y enfermedades asociadas.

2.3.2 Nuevos patrones

Para armonizar los nombres y las descripciones de los distintos patrones de HEp-2 en los últimos años, se propuso una nueva taxonomía de clasificación ordenada, elaborada posteriormente por el Consenso Internacional sobre Patrones ANA (ICAP) en 2019, iniciado en paralelo al XII Taller internacional sobre autoanticuerpos y autoinmunidad (2014) celebrado en Sao Paulo, Brasil; durante el cual se estableció un consenso sobre la nomenclatura y las definiciones de 28 patrones. A cada patrón se le asignó un código alfanumérico de AC-1 a AC-28 (12).

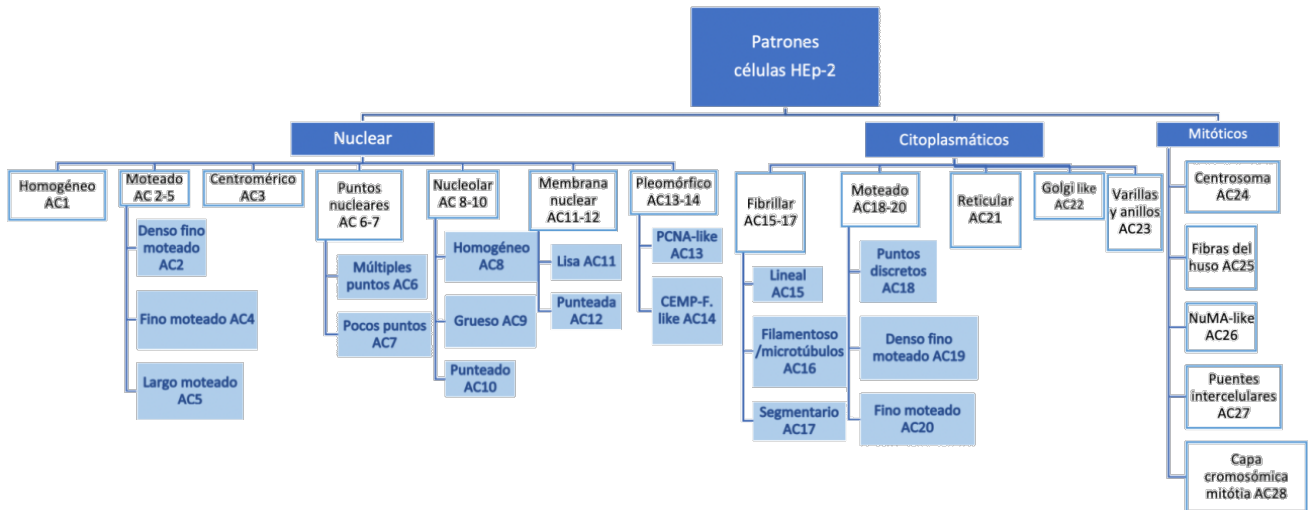


Figura 2: Patrones ANA nuevos. Adaptación, fuente: “Report of the first international consenses on standardized nomenclature of antinuclear antibody HEP-2 cell patterns 2014-2015”. (Chan et al, 2015)

Además de patrones nucleares, se pueden observar patrones citoplasmáticos y mitóticos importantes en el análisis de HEP-2 IFI. Actualmente se intenta dar importancia a la relevancia clínica de los distintos patrones(12).

Patrones Nucleares ANA-IFI	Antígeno específico relacionado	Enfermedad o condición clínica relacionada
Homogéneo		
Homogéneo (AC-1)	ADN de doble cadena, cromatina, histonas, nucleosomas	LES, lupus inducido por medicamentos, artritis idiopática juvenil
Moteado (AC-2, 4, 5)		
Moteado denso fino (AC-2)	DFS-70, LEDGF	Prevalente en individuos sanos
Moteado fino (AC-4)	SS-A/Ro, SS-B/La, ARN polimerasa ii y iii, Ku, Ki, Mi-2, topo 1(Sc1-70)	LES, SS, SSc, miopatías inflamatorias, EMTC
Moteado grueso (AC-5)	hnRNP, U1RNP, Sm, ARN polimerasa iii	LES, EMTC, SSc
Puntos nucleares discretos		
Centromérico (AC-3)	Anticentrómero CENP-A y CENP-B	Esclerosis cutánea limitada, CBP
Múltiples puntos nucleares (AC-6)	Sp100, proteína de leucemia promielocítica	CBP, enfermedades autoinmunes sistémicas, polimiositis, dermatomiositis
Pocos puntos nucleares (AC-7)	p80 coilina, SMN	LES, SSc, polimiositis, SS, asintomáticos
Nucleolar (AC-8, 9, 10)		
Homogéneo (AC-8)	PM/Sc1-75, PM/Sc1-100, Th, To, nucleolina, U3-snoRNP/fibrilarina	SSc, polimiositis con sobreposición de SSc
Grumoso (AC-9)	U3-snoRNP/fibrilarina	SSc
Punteado (AC-10)	ARN polimerasa I	SS, SSc
Membrana nuclear (AC-11, 12)		
Membrana lisa nuclear (AC-11)	Lámina A, B, C nuclear o proteínas asociadas a láminas	LES, SS, artritis seronegativa
Membrana punteada nuclear (AC-12)	Proteínas asociadas al poro nuclear	CBP
Pleomórficos (AC-13, 14)		
PCNA-like (AC-13)	PCNA	LES
CENP-F-like (AC-14)	CENP-F	Cáncer

Patrones Citoplásmicos ANA-IFI	Antígeno específico relacionado	Enfermedad o condición clínica relacionada
Fibrilar (AC-15, 16, 17)		
Actina/lineal (AC-15)	Actina, miosina no relacionada con el músculo	EMTC, hepatitis crónica activa, cirrosis hepática, miastenia gravis, enfermedad de Crohn, CBP, hemodiálisis
Filamentoso/microtúbulos. (AC-16)	Vimentina, citoqueratina	Condiciones inflamatorias o infección, hemodiálisis, hepatopatía alcohólica, psoriasis, controles sanos
Segmentario (AC-17)	Alfa-actina, vinculina, tropomiosina	Miastenia gravis, enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa
Moteado (AC-18, 19, 20)		
Puntos discretos (AC-18)	GW182, Su/Ago2, Ge-1	CBP, enfermedades autoinmunes del SNC
Moteado denso fino (AC-19)	PL-7, PL-12, proteína p ribosomal	Síndrome antisintetasa, polimiositis, dermatomiositis, LES, lupus neuropsiquiátrico
Moteado fino (AC-20)	Jo-1/histidil-ARNt sintetasa	Síndrome antisintetasa, polimiositis, dermatomiositis, esclerosis cutánea limitada
Otros Citoplásmicos		
Reticular/AMA (AC-21)	PDC-E2/M2, BCOADC-E2, OGDC-E2, E3BP/proteína X	CBP, SSc
Polar/Golgi-like (AC-22)	Giantin/macrogolgin, golgin-95/GM130, golgin-160, golgin-97, golgin-245	SS, LES, AR, EMTC, ataxia cerebelar idiopática, infecciones virales
Barras y anillos (AC-23)	IMPDH2	Hepatitis C postterapia con IFN/rivabirina, LES, tiroiditis de Hashimoto
Patrones Mitóticos ANA-IFI		
Centrosoma (AC-24)	Pericentrina, nineina, Cep250, Cep110, enolasa	SSc, fenómeno de Raynaud, infecciones (virales y micoplasma)
Fibras del huso (AC-25)	HsEg5	SS, LES
NuMA-like (AC-26)	Centrofilina	SS, LES, otros
Puente intracelular (AC-27)	Aurora cinasa B, CENP-E, MSA-2, KIF-14, MKLP-1	SSc, fenómeno de Raynaud, malignidad
Capa del cromosoma mitótico (AC-28)	Histona modificada H3, MCA-1	Lupus discoide, leucemia linfocítica crónica, SS, polimialgia

Tabla 3: Patrones ANA-IFI “nuevos”. Consenso internacional actual.

3. UTILIDAD CLÍNICA DE LA DETERMINACIÓN ANA-IFIS

3.1 Significado de la positividad de los ANAS

Los ANAs engloban a un número elevado de anticuerpos anteriormente descritos. Estos anticuerpos mediante la técnica de laboratorio de IFI, nos dice si están presentes o no, estando la presencia de los mismos asociados a la existencia de una EAS, aunque no siempre significa esto.

Estos anticuerpos tienen diferentes especificidades antigénicas, que pueden ir dirigidos contra diferentes estructuras, órganos o tejidos; por lo que la sospecha médica es lo que prima para la interpretación de los mismos. Esto es muy importante, pues estos anticuerpos pueden ser positivos en otros procesos distintos de las EAS, tal como, infecciones o neoplasias e incluso en personas sanas. Por ellos, si solicitamos estas pruebas sin criterio clínico, perderemos gran parte de su valor predictivo positivo y

aumentaremos la probabilidad de error, tanto para falsos positivos como falsos negativos. (13)

3.2 Implicaciones de la cuantificación del título de ANAs

Existe una gran controversia con respecto a la dilución inicial ideal para detectar la presencia de ANA(15). Esto se debe que hasta un 10% de la población tiene un ANA positivo, generalmente en pequeñas diluciones 1/80. Las diluciones se realizan generalmente en el siguiente orden: 1/40, 1/80, 1/160, 1/640, 1/1280 (13). En un estudio multicéntrico de voluntarios sanos de 20-60 años se detectaron anticuerpos ANA en 32% y 5% en diluciones de 1/40 y 1/160 respectivamente (16). En este mismo estudio, se determinó la prevalencia de ANA en pacientes con LES, esclerosis sistémicas y Síndrome de Sjogren. Los ANA se detectaron en una dilución de 1/40 en 97%, 100% y 84% respectivamente. En la dilución de 1/160, la sensibilidad de la prueba ANA disminuyó a 95, 87 y 74% respectivamente. Con base a estos resultados, los autores sugirieron que se debe informar los resultados positivos de ANA en una dilución de 1/40 para permitir la detección de tantos pacientes con EAS como sea posible. Desafortunadamente, esta sugerencia ha causado mucha confusión entre los médicos, debido a la alta prevalencia de ANA a esa titulación. En efecto, si se estima que la prevalencia de enfermedades asociadas a ANA en la población general es del 1%, es evidente que la mayoría de los individuos con ANA detectados a una dilución de 1/40 (aproximadamente el 30 por ciento de la población normal) tienen un falso positivo resultado.(18,19)

Debido a que la prueba de IFI para ANA tiene el potencial de dar como resultado una gran cantidad de resultados falsos positivos, un grupo internacional de expertos recomendó que la dilución de detección inicial sea definida por cada laboratorio individualmente, en base a la prueba de suero a partir de un número adecuado de resultados normales. individuos (17). Una dilución que produce un resultado positivo en el 5% de los controles normales debe considerarse la dilución de detección óptima. Sin embargo, esta recomendación aún no ha sido universalmente aceptada.

En conclusión, en la práctica clínica, los resultados con títulos inferiores a 1/160 se consideran negativos, y los iguales o superiores a 1/160 positivos. Valores por encima de 1/320 son muy relevantes e indican enfermedad autoinmune en el más del 97% de los casos.(13)

3.3 Asociaciones clínicas de los patrones ANA-IFI

Como se ha mencionado anteriormente en el taller internacional celebrado en 2015 y revisado por el Consenso Internacional sobre Patrones ANA en 2019, se estableció una nomenclatura de los patrones de tinción ANA (12).

Hay 28 patrones diferentes en la inmunofluorescencia. Cada uno describe la manera que las células humanas han sido teñidas por anticuerpos fluorescentes.

Algunos modelos son típicos de enfermedades, otros específicos y otros pueden estar presentes en personas sanas (14).

Los estándares más comunes de ANA y sus probables enfermedades asociadas son:

- **Nuclear moteado centromérico** = Esclerodermia o Cirrosis biliar primaria.
- **Nuclear homogéneo** = Lupus, Artritis Reumatoide, Artritis Idiopática Juvenil, Síndrome de Felty o Cirrosis Biliar Primaria.
- **Nuclear tipo membrana nuclear continua** = Lupus o Hepatitis autoinmune.
- **Nuclear moteado fino** = Síndrome de Sjögren Primaria, Lupus Eritematoso Sistémico o Lupus.
- **Nuclear moteado fino denso** = No específico, puede estar presente en varias enfermedades autoinmunes y también en la Cistitis Intersticial, Psoriasis, Dermatitis Atópica o Asma.
- **Nuclear moteado grueso** = Enfermedad Mixta del Tejido Conjuntivo, Lupus Eritematoso Sistémico, Esclerodermia o Artritis Reumatoide.
- **Nucleolar moteado** = Esclerosis Sistémica.
- **Citoplasmático moteado reticulado** = Cirrosis Biliar Primaria o Esclerosis Sistémica.
- **Citoplasmático moteado fino** = Polimiositis o Dermatomiositis.

Pero también se relacionan con otras enfermedades como hemos descrito en las tablas del apartado anterior.

La sensibilidad de ANA-IFI en las principales enfermedades autoinmunes es la siguiente(13):

- Lupus Eritematoso Sistémico: 95 a 100%.
- Esclerodermia: 60 a 80%.
- Enfermedad mixta del tejido conectivo: 100%.
- Polimiositis y dermatomiositis: 61%.
- Artritis reumatoide: 52%.
- Síndrome de Sjögren: 40 a 70%.
- Lupus inducido por fármacos: 100%.
- Lupus discoide: 15%.
- Tiroiditis de Hashimoto: 46%.
- Hepatitis autoinmune: 100%.
- Colangitis autoinmune primaria: 100%

Una de las grandes limitaciones de la IFI es su falta de especificidad, con un Valor Predictivo Positivo bajo. Esto, asociado a la variabilidad en la interpretación de patrones, supone una limitación para diagnosticar únicamente con esta prueba EAS. Por ello, la detección de ANA positivos debe abordarse no sólo por la presencia, sino asociar titulación, clínica y continuar realizando pruebas más específicas para llegar a un diagnóstico de confirmación.

JUSTIFICACIÓN

Existen diferentes técnicas de determinación de ANAs por IFI, todas basadas en su identificación sobre distintos preparados celulares y la posterior valoración cualitativa del patrón observado, lo que conlleva un factor de subjetividad, que, unido a la heterogeneidad en las técnicas de los distintos laboratorios y a la ausencia de consensos universalmente aceptados, ha determinado una gran variabilidad interlaboratorios, con la consecuente limitación en la práctica clínica asistencial.

En los últimos años, diversos laboratorios y entidades científicas han realizado un esfuerzo de estandarización de las técnicas de laboratorio y de identificación objetiva de los patrones de ANA, lo que previsiblemente va a facilitar la homogeneización de su determinación y su aplicación objetiva a los distintos algoritmos diagnósticos en la EAS.

Como reflejo del mismo, existen instrumentos de automatización para el procesamiento de IFI, que consisten en plataformas automatizadas de reconocimiento de patrones basados en hardware y software, sobre células HEp-2.

Así, hoy se acepta universalmente:

1. Sustrato de referencia células HEp2
2. Patrones ANA

En nuestro medio, actualmente tenemos un Laboratorio de Inmunología que ha venido utilizando en el último año dichas técnicas y criterios, y un segundo Laboratorio de Inmunología en otro Centro de referencia, que realiza las determinaciones por otras técnicas que ha ido modificando para adaptarse a los últimos consensos internacionales. Además, disponemos de una serie de determinaciones simultáneas realizadas en ambos laboratorios por las distintas técnicas, convencional y automatizada, por lo que intentaremos realizar un estudio para validar nuestros resultados en nuestra práctica clínica habitual.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1.HIPÓTESIS: El reconocimiento automatizado mejora la rentabilidad diagnóstica para la detección de Anticuerpos Antinucleares (ANA) por IFI respecto al método convencional de valoración cualitativa visual.

2.OBJETIVOS:

- Objetivo principal: Comparar la utilidad práctica de dicha determinación en pacientes con sospecha de conectivopatía frente a las técnicas actuales.
- Objetivos secundarios: Valorar su rentabilidad diagnóstica en los diferentes subgrupos de pacientes. Diseñar algoritmos diagnósticos más eficientes en la práctica clínica

MATERIAL Y MÉTODOS

1.Diseño del estudio: se realizó un estudio epidemiológico, retrospectivo, observacional y no intervencionista sobre muestras sanguíneas de pacientes que acudieron a Consultas de Enfermedades Autoinmunes de Hospital Universitario Miguel Servet en el periodo de tiempo 20/01/2018 y el 27/12/2019, y a los que se les solicitó un estudio para el reconocimiento de patrones ANA de forma convencional (visual, Laboratorio 1) y de forma automatizada por Inmunofluorescencia indirecta sobre células Hep-2 (Laboratorio 2), para el diagnóstico de Conectivopatías: LES, SSj, DM/PM, ESP, EMTC, SAF 2º y Conectivopatía Indiferenciada. Para el diagnóstico de cada Conectivopatía se utilizaron los Criterios de Clasificación más actuales elaborados por las Sociedades Científicas de referencia: EULAR/ACR.

Las muestras han sido analizadas en dos laboratorios diferentes, denominados en el presente trabajo como “Laboratorio 1” y “Laboratorio 2”, siendo el laboratorio 2 el único que analizaba las muestras de sangre de forma automatizada. Se estableció como “gold standard” para el diagnóstico de Conectivopatía la positividad ANA por IFI más la valoración médica reflejada en la historia clínica y corroborada por dos revisiones independientes, para el diagnóstico de una Conectivopatía de las anteriormente descritas.

Los datos clínicos y analíticos se obtuvieron a partir de la información disponible en la Historia Clínica electrónica del Hospital Universitario Miguel Servet.

2.Muestra:

Para obtener los resultados postulados en los objetivos del presente estudio, a partir de un registro inicial de 3519 extracciones analíticas de Autoinmunidad realizadas en el HUMS entre el 20/1/2018 y el 27/12/2019, construimos 3 FICHEROS DE DATOS, que agrupaban las siguientes DETERMINACIONES ANALÍTICAS

- FICHERO A: 364 determinaciones analizadas SIMULTANEAMENTE en los dos laboratorios (se eliminaron 5 casos con codificación incorrecta) a partir de una única extracción de sangre de cada paciente (N=364) y procesada en los dos laboratorios de forma independiente entre el 3/10/2018 y el 18/11/2019. Este fichero permite el estudio de Concordancias entre las determinaciones simultáneas en los dos laboratorios y además permitió, comparar las rentabilidades diagnósticas de los dos Laboratorios.
- FICHERO B: Agrupaba 1252 determinaciones correspondientes a 626 pacientes distintos que tienen 2 determinaciones de ANA realizadas en el Laboratorio 1 en distintos momentos temporales. Su utilidad fue analizar el grado de concordancia intralaboratorio 1
- FICHERO C: Recoge 62 determinaciones correspondientes a 31 pacientes distintos que tenían 2 determinaciones de ANA realizadas en el Laboratorio 2 en

distintas fechas, que nos permitió analizar el grado de concordancia intralaboratorio 2.

3.Criterios de inclusión:

- Pacientes que tengan un análisis realizado de Inmunofluorescencia Indirecta para reconocimiento de patrones ANA sobre células HEp-2 de forma convencional visual y/o de forma automatizada.
- La solicitud de la determinación ha sido realizada por nuestro centro y por sospecha de Conectivopatía.

4.Criterios exclusión

- Pacientes que tengan solicitadas tres o más determinación sanguíneas de anticuerpos ANA.
- Determinaciones que no estén en el periodo de tiempo comprendido entre 20/1/2018 y el 27/12/2019.

5.VARIABLES:

Se analizarán variables epidemiológica (sexo/edad), clínicas (sospecha diagnóstica y diagnóstico) y analíticas (Anticuerpos ANA, patrones ANA, grado de positividad ANA).

6.Metodología estadística:

El análisis de concordancia entre **positividades** de ANAs intra e interlaboratorios se realizó mediante el “**coeficiente kappa de Cohen**”, utilizando como Tabla orientativa de valoración del estadístico la sugerida por Landis y Koch (20,21):

- <0,0 No acuerdo
- 0,0-0,2 Insignificante
- 0,2-0,4 bajo
- 0,4-0,6 moderado
- 0,6-0,8 bueno
- 0,8-1,0 muy bueno

El análisis de concordancia entre los **títulos** de ANAs en ambos laboratorios se realizó mediante el **coeficiente de correlación “ ρ ” (rho) de Spearman**, al tratarse de variables ordinales, tanto la titulación en “cruces” del laboratorio 1 (negativo,+, ++ y +++) como la de dilución automatizada del laboratorio 2 (<1/160,1/160, 1/320, 1/640, 1/1280 , > 1/1280).

El análisis de concordancia entre los **patrones** de ANAs identificados en ambos laboratorios se realizó también mediante el “**coeficiente kappa de de Cohen**”, en los casos que fueron ANA positivos en las dos determinaciones comparadas. Para el estudio de la concordancia de patrones entre los dos laboratorios, se adaptaron los patrones

identificados en el laboratorio 2 por la nueva técnica (que incluye un mayor número de patrones distintos) a los “patrones clásicos” que interpreta el laboratorio 1.

En cuanto a las **rentabilidad de los test diagnósticos** se calcularon la sensibilidad, la especificidad, el valor predictivo positivo, el valor predictivo negativo, la razón de verosimilitud positiva, razón de verosimilitud negativa y el área bajo la curva. Los intervalos de confianza de sensibilidad y especificidad se han calculado mediante el **método de Clopper-Pearson y los de los valores predictivos mediante el método de los asymptotic standard logit intervals**. El contraste de hipótesis entre los test se ha realizado mediante el **test de McNemar**. La concordancia entre test se ha valorado mediante el test de **Kappa de Cohen**.

7.Tratamiento de los datos: Se recogieron los datos en una base anónima en formato EXCEL, a partir de la cual se codificaron las distintas variables para su posterior estudio estadístico con el programa SPSS, v21.00.

8.Consideraciones éticas: Este proyecto de investigación ha solicitado al Comité de Ética de la Investigación de Aragón (CEICA) un dictamen favorable por parte del Comité para confirmar que se ajusta a los requisitos de la Ley 14/2007, del 3 de julio, de Investigación Biomédica y los principios éticos aplicables, el cual fue aceptado el día 1 de abril de 2020.

Anexo 1.

Se acepta el Acuerdo de Confidencialidad y No Divulgación donde se asume que este proyecto de Investigación está sujeto al deber de secreto con respecto a los datos a los que tenga acceso y, por tanto, estará obligado a no reproducir, modificar, hacer pública o divulgar a terceros la información a la que pueda tener conocimiento con motivo de la realización de un proyecto de investigación dentro del Sector Zaragoza II. Solo podrán divulgarse, en medios y con fines exclusivamente científicos los resultados derivados de los objetivos propios de la investigación, aunque siempre asegurando que no existe posibilidad alguna, bien directa o indirectamente, de identificar personalmente a los pacientes de Información en base a las siguientes.

Por otra parte, todos los pacientes visitados en las Consultas de EAS del HUMS, de donde provienen todas las muestras, tienen firmada una autorización de utilización de sus datos con fines investigadores, conforme a lo recogido en la vigente Ley de Protección de Datos española

RESULTADOS

A) DESCRIPTIVO DE LA MUESTRA

Nuestra muestra está compuesta por 364 pacientes, el 83,5% eran mujeres y el 16,5% hombres. Con una edad media de 50 años +/- 15,3 años.

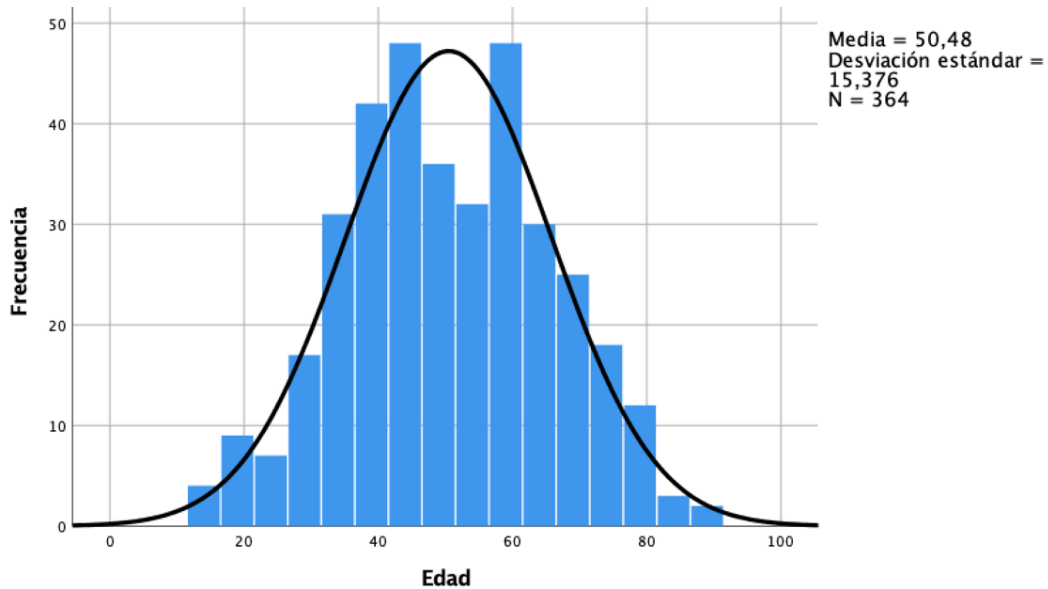


Figura 3: Gráfico de barras de intervalos de edad agrupado por sexo

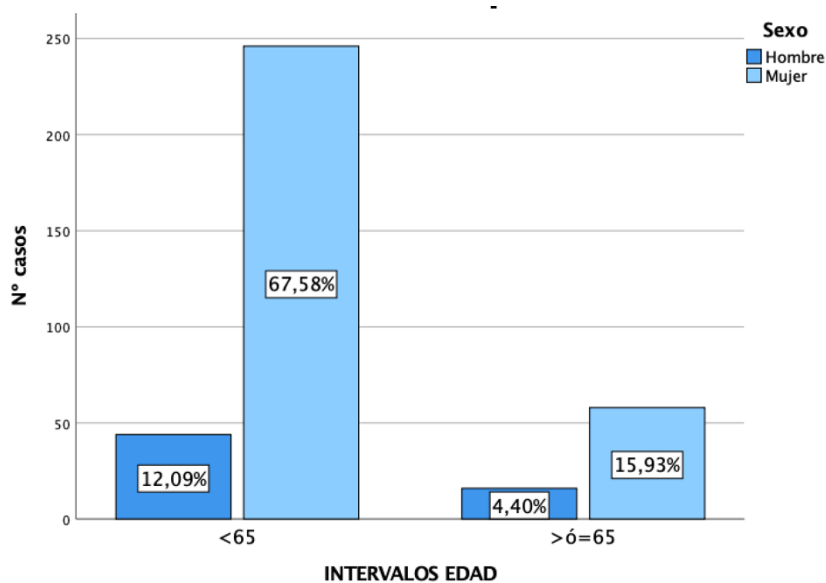


Figura 4: Histograma de edad.

DIAGNÓSTICO

Diagnóstico de Enfermedades Autoinmunes Sistémicas:

El 48,35% de la muestra tenía una Conectivopatía y el 51,65% de la muestra no padecía una Conectivopatía.

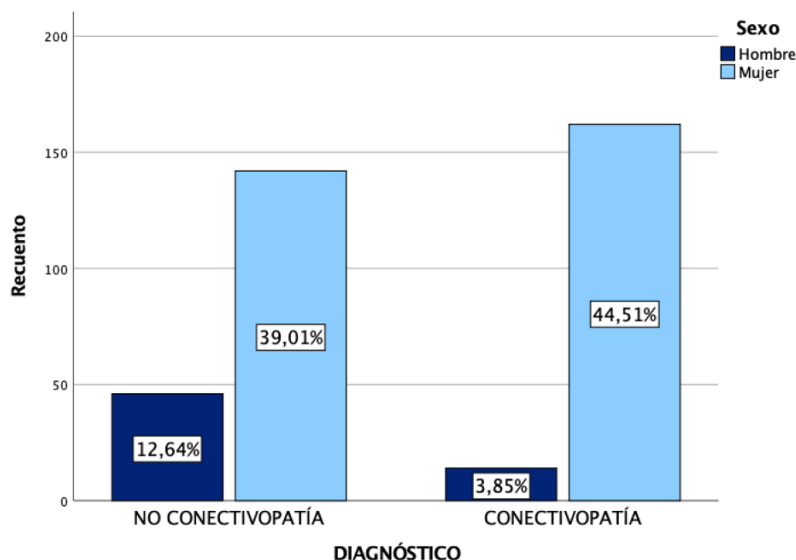


Figura 5: Agrupación por sexo de Conectivopatía vs no Conectivopatía

Las sospechas diagnósticas iniciales que justificaron la solicitud de los test diagnósticos de Anticuerpos ANA fueron:

SOSPECHA DIAGNÓSTICA (Sospecha DX)	Frecuencia (N 364)	% (N 364)	% dentro de Sospecha DX	
			No Conectivopatía (N204)	Conectivopatía (N160)
Raynaud	57	15,7%	13,3%	18,2%
Lesión cutánea	75	20,6%	14,4%	27,8%
Tr.Musculoesquelético	84	23,1%	20,2%	26,1%
Trombofilia	68	18,7%	26,1%	10,8%
Ojo seco/Sd. Seco	15	4,5%	3,2%	5,2%
Otros	43	17,4%	22,9%	11,9%

Tabla 4: Sospechas diagnósticas para el diagnóstico de Conectivopatías.

Establecimos los diagnósticos siguiendo la definición de Conectivopatía, y las clasificamos en: el lupus eritematoso sistémico, la esclerosis sistémica progresiva o esclerodermia, la enfermedad mixta del tejido conectivo, el síndrome de Sjogren, Síndrome Antifosfolípido Secundario, Dermatomiositis y Conectivopatía Indiferenciada.

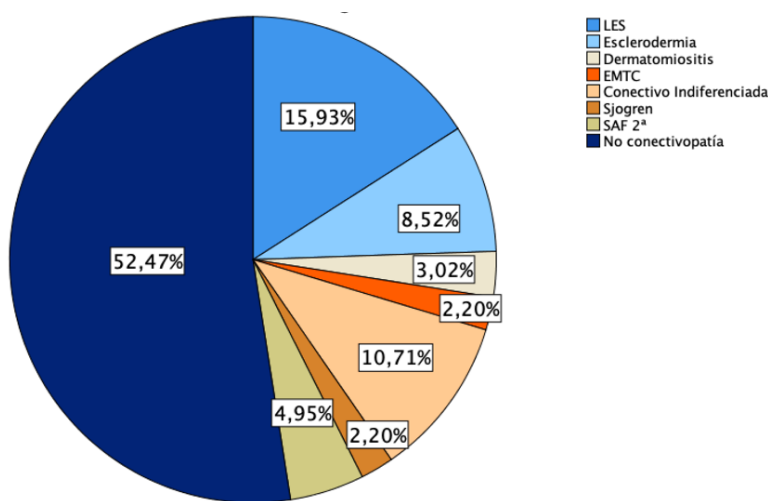


Figura 6: Gráfico de sectores diagnóstico de Conectivopatías.

DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ANA

De las 364 determinaciones solicitadas de anticuerpos ANA para el diagnóstico de sospecha de Conectivopatía, por el método convencional 132 (36,3%) fueron positivas, siendo de estas 113(85,61%) Conectivopatías. Y por el método automatizado se detectaron 164(45,1%) ANA positivos, de los cuales 121 (73,78%) tenían diagnóstico de Conectivopatía.

B) RENTABILIDAD DIAGNÓSTICA COMPARADA DE LAS 2 TÉCNICAS DE DETERMINACIÓN DE ANAS**B.1 Utilidad diagnóstica de la determinación de ANA-IFI**

Se tomaron 364 muestras sanguíneas para determinar la presencia de Anticuerpos ANA, mediante el Sistema Convencional y el Sistema de Automatizado.

Utilidad diagnóstica por parámetros antropométricos

		Conectivopatía		
		Convencional	Automatizado	p
<65 años	VPP	88 [81;94]	76 [69;84]	<0,001
<65 años	VPN	89 [85;93]	93 [89;97]	0,11
>=65 años	VPP	79 [65;93]	65 [49;80]	NC
>=65 años	VPN	100 [99;100]	95 [87;100]	0,07
Mujeres	VPP	89 [83;95]	79 [72;86]	0,001
Mujeres	VPN	90 [86;94]	92 [87;97]	0,362
Hombres	VPP	54 [27;81]	39 [19;59]	0,021
Hombres	VPN	93 [86;100]	97 [92;100]	0,625

Tabla 5: Valores predictivos y comparación interlaboratorio de parámetros antropométricos para el diagnóstico de Conectivopatía.

Utilidad diagnóstica para Sospecha diagnóstica

		Conectivopatía		
		Convencional	Automatizado	p
Lesión Cutánea	VPP	88 [77;98]	87 [77;98]	NC
	VPN	83 [71; 95]	81 [68;93]	NC
Tr.Múculo Equelético	VPP	93 [84; 100]	80 [67; 93]	0,063
	VPN	93 [86;99]	94 [87; 100]	1
Síndrome Seco	VPP	100 [99;100]	83 [53;100]	NC
	VPN	90 [71;100]	89 [68;100]	1

		Conectivopatía		
		Convencional	Automatizado	p
Raynaud	VPP	100 [99;100]	88 [77;99]	NC
	VPN	88 [77;99]	100[99;100]	NC
Trombofilia	VPP	50 [10;90]	32 [11;52]	0,002
	VPN	93 [87; 99]	98 [94;100]	0,375
Otros	VPP	63 [43;82]	58 [40;75]	0,289
	VPN	90 [81;99]	97 [91;100]	0,375

Tabla 6: Valores predictivos y comparación interlaboratorios de sospechas diagnósticas para el diagnóstico de Conectivopatía.

A continuación se añade las curvas ROC analizadas para los síndromes de sospecha clínica de Conectivopatía. Esta área posee un valor comprendido entre 0,5 y 1, donde 1 representa un valor diagnóstico perfecto y 0,5 es una prueba sin capacidad discriminadora diagnóstica.

Sospecha clínica	N	Conectivopatía	No Conectivopatía	Área bajo la curva Lab1	Área bajo la curva Lab2
Raynaud	57	32	25	0.938	0.889
Lesión cutánea	76	49	27	0.765	0.754
Tr.Musculoesquelético	84	46	38	0.767	0.712
Trombofilia	68	18	50	0.553	0.499
Otras	64	21	43	0.752	0.777
Síndrome seco	15	8	7	0.813	0.741
Total	364	176	188	0.775	0.729

Tabla 7: Áreas bajo la curva para los síntomas de sospecha clínica.

Leyenda: la Línea azul representa detección de ANA-IFI del laboratorio 1 y la línea roja del laboratorio 2.

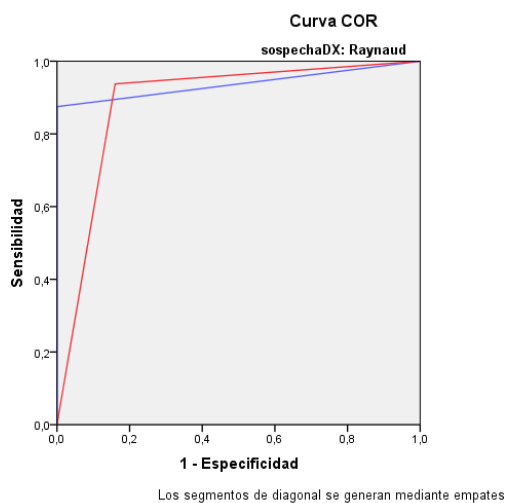


Figura 7: Curva ROC: Síndrome Raynaud

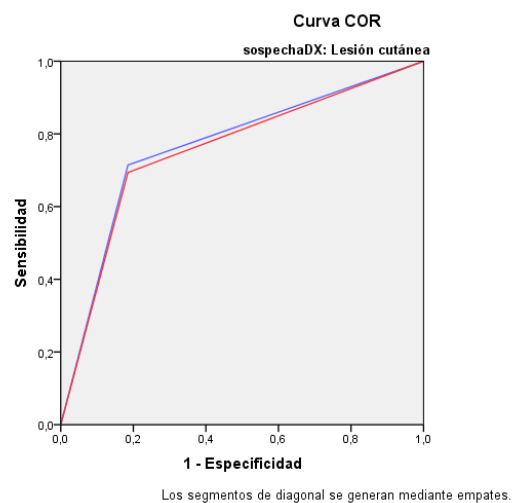


Figura 8: Curva ROC: Lesión cutánea.

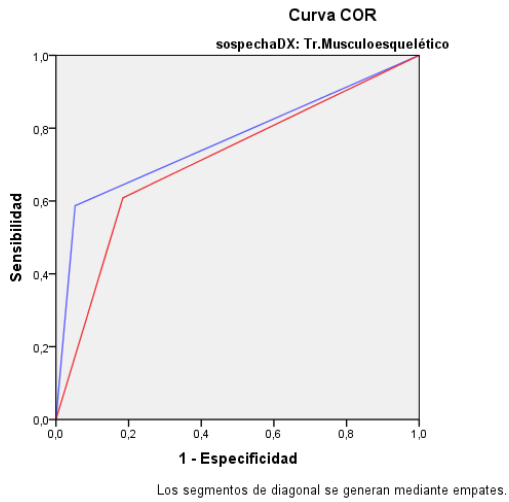


Figura 9: Curva ROC: Tr. Musculoquelético.

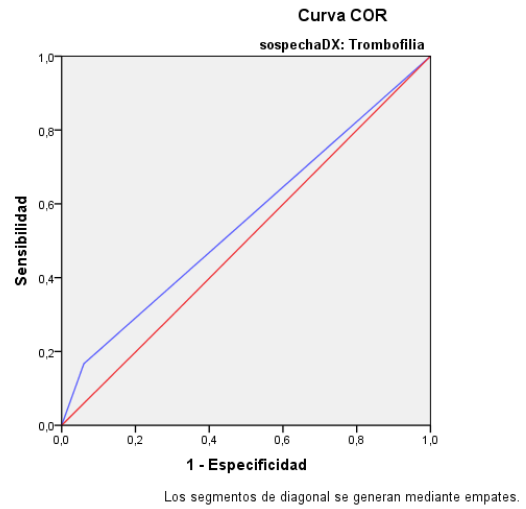


Figura 10: Curva ROC: Trombofilia

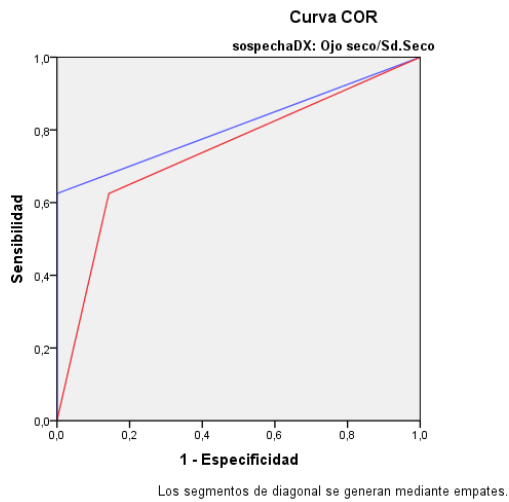


Figura 11: Curva ROC: Síndrome seco

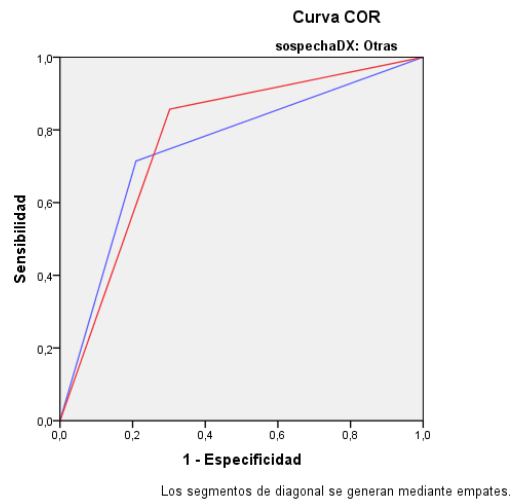


Figura 12: Curva ROC: otras sospechas.

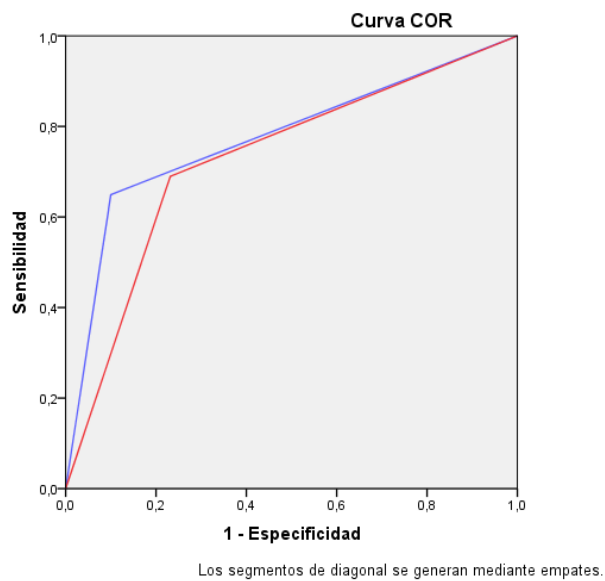


Figura 13: Curva ROC para sospecha global de Conectivopatía. Todos los pacientes.

Utilidad diagnóstica patrones IFI

El patrón más frecuente detectado tanto por el método convencional como por el método automatizado fue el patrón moteado, 34,7% y 46% respectivamente.

Patrones clásicos

		Conectivopatía		
		Convencional	Automatizado	p
Homogéneo	VPP	87 [73;100]	68 [47;89]	0,092
	VPN	66 [61;72]	65 [60;70]	0,453
Moteado fino	VPP	83 [75;92]	72 [64;81]	0,001
	VPN	74 [70;80]	79 [74; 84]	0,002
Nucleolar	VPP	80 [60;70]	73 [57;89]	0,013
	VPN	65 [60;70]	66 [61;72]	0,063
Centromérico	VPP	100 [99;100]	100 [99;100]	1
	VPN	66 [61;71]	66 [61;71]	0,219

Tabla 8: Valores predictivos positivos y comparación interlaboratorios de patrones clásicos para el diagnósticas de Conectivopatía.

Patrones nuevos

Patrón	AC	LES(58)	ESP (18)	DM/PM (11)	EMTC (8)	CI (39)	Ssj (8)	SAF 2º (18)	No Conect. (204)	
Nuclear										
Homogéneo	1	nº	8	1	0	1	3	0	0	6
		VP%	42,1	5,3	0	5,3	15,8	0	0	31,6
		%(Dx)	13,7	5,55	0	12,5				
Moteado	2	nº	0	1	0	0	0	0	0	0
		VP%	0	100	0	0	0	0	0	0
		%(Dx)								
	4	nº	11	4	5	2	13	3	3	16
		VP%	19,3	7	8,8	3,5	22,8	5,3	5,3	28,1
		%(Dx)								
5	nº	9	2	1	3	2	2	1	6	
	VP%	4,6	7,7	3,8	11,5	7,7	7,7	3,8	23,1	
	%(Dx)									
Puntos nucleares discretos	3	nº	2	12	0	0	0	0	0	0
		VP%	14,3	85,7	0	0	0	0	0	0
		%(Dx)			0	0	0	0	0	0
	6	nº	2	0	1	0	0	0	0	2
		VP%	40	0	20	0	0	0	0	40
		%(Dx)		0	0	0	0	0	0	0
Nucleolar	8	nº	1	3	1	1	1	1	0	4
		VP%	8,3	25	8,3	8,3	8,3	8,3	0	33,3
		%(Dx)								
	9	nº	0	2	0	0	2	0	0	0
		VP%	0	50	0	0	50	0	0	0
		%(Dx)	0		0	0		0	0	0
10	nº	1	1	0	0	0	0	0	0	
	VP%	50	50	0	0	0	0	0	0	
	%(Dx)			0	0	0	0	0	0	

Patrón	AC		LES(58)	ESP (18)	DM/PM (11)	EMTC (8)	CI (39)	Ssj (8)	SAF 2º (18)	No Conect. (204)
Membrana nuclear	12	nº	1	0	0	0	0	0	0	1
		VP%	50	0	0	0	0	0	0	50
		%(Dx)		0	0	0	0	0	0	
Citoplasmáticos										
Moteado	18	nº	0	1	0	0	0	0	0	1
		VP%	0	50	0	0	0	0	0	50
		%(Dx)	0		0	0	0	0	0	
	19	nº	1	0	0	0	0	0	0	0
		VP%	100	0	0	0	0	0	0	0
		%(Dx)		0	0	0	0	0	0	0
	20	nº	1	0	0	0	0	0	0	0
		VP%	100	0	0	0	0	0	0	0
		%(Dx)		0	0	0	0	0	0	0
Reticular	21	nº	0	0	1	0	0	0	0	2
		VP%	0	0	33,3	0	0	0	0	67,3
		%(Dx)	0	0		0	0	0	0	
Polar/ Golgi-like	22	nº	0	0	0	0	0	0	0	1
		VP%	0	0	0	0	0	0	0	100
		%(Dx)	0	0	0	0	0	0	0	
Mitóticos										
Fibras del huso	25	nº	1	0	0	0	0	0	0	0
		VP%	100	0	0	0	0	0	0	0
		%(Dx)		0	0	0	0	0	0	0

Tabla 9: Recuento, porcentaje de verdaderos positivos (VP) y frecuencia de patrones ANA-IFI nuevos en las Conectivopatías.

En cuanto a los patrones nuevos en la tabla 8 se muestran el recuento de positivos en las distintas Conectivopatías (nº), la frecuencia de verdaderos positivos dentro cada patrón (AC) y el porcentaje que suponen dentro de cada diagnóstico, %(Dx).

Utilidad diagnóstica titulación de patrones

Título	Conectivopatía (N,%)								No conectivo patía
	LES	CI	ESP	EMTC	SSj	SAF2º	DM/PM	Miositis	
Laboratorio 1 (Convencional)									
Neg	18(31)	21(53,3)	3(9,7)	1(12,5)	2(25)	13(72,2)	0(0)	5(62,5)	169(89,9)
+	21(36,2)	11(28,2)	6(19,4)	1(12,5)	4(50)	4(22,2)	3(100)	0(0)	14(7,4)
++	15(25)	7(17,9)	18(58,1)	2(25)	2(25)	1(5,6)	0(0)	2(25)	5(2,7)
+++	4(6,9)	0(0)	4(12,9)	4(50)	0(0)	0(0)	0(0)	1(12,5)	0(0)
Laboratorio 2 (Automatizado)									
<1/80	17(29,3)	17(43,6)	2(6,5)	2(25)	2(25)	12(66,7)	0(0)	4(50)	145(77,1)
1/80	0	2(5,1)	0	0	0	0(0)	0(0)	0(0)	1(0,5)
1/160	18(31)	12(30,8)	2(6,5)	1(12,5)	4(50)	5(27,8)	1(33,3)	1(12,5)	34(18,1)
1/320	11(19)	3(7,7)	7(22,6)	1(12,5)	1(12,5)	0(0)	0(0)	1(12,5)	3(1,6)
1/640	3(5,2)	3(7,7)	11(35,5)	1(12,5)	1(12,5)	0(0)	2(66,7)	1(12,5)	1(0,5)
>640	9(15,5)	2(5,1)	9(29)	1(12,5)	0(0)	1(5,6)	0(0)	1(12,5)	4(2,1)

Tabla 10: Titulación de anticuerpos en relación al diagnóstico en ambos laboratorios.

B.2 Estudio de ambos test diagnósticos

Realizamos el estudio de ambos test diagnósticos para analizar la validez interna y externa de ambas pruebas y comparar ambos test entre sí. Así como analizar el índice de concordancia mediante el Coeficiente de correlación Kappa. Obteniendo los siguientes resultados:

MÉTODO

AUTOMATIZADO

Laboratorio 2	Conectivopatía	No Conectivopatía			
ANA+	121	43	164		
ANA-	55	145	200		
	176	188			IC95%
SENSIBILIDAD	0,69	Tasa de falsos negativos	0,31	IC Sens	61,90-75.60
ESPECIFICIDAD	0,77	Tasa de falsos positivos	0,23	IC Espec	71.12-83.13
VPP	0,74	Razón de probabilidad +	3,01	IC VPP	67.05-80.51
VPN	0,73	Razón de probabilidad -	0,41	IC VPN	33.31-78.69

Valor global de la eficiencia de un test **0,73**

Tabla 11: Estudio de el método automatizado como test diagnóstico. VPP: Valor predictivo positivo. VPN: Valor Predictivo Negativo. IC: Intervalo de Confianza. Sens: sensibilidad. Esp: especificidad.

MÉTODO CONVENCIONAL

Laboratorio 1	Conectivopatía	No Conectivopatía			
ANA+	113	19	132		
ANA-	63	169	232		
	176	188			IC95%
SENSIBILIDAD	0,64	Tasa de falsos negativos	0,36	IC Sens	57.12-71.29
ESPECIFICIDAD	0,90	Tasa de falsos positivos	0,10	IC Espec	85.58-94.20
VPP	0,86	Razón de probabilidad +	6,35	IC VPP	79.62-91.59
VPN	0,73	Razón de probabilidad -	0,40	IC VPN	67.12-78.57

Valor global de la eficiencia de un test **0,77**

Tabla 12: Estudio del método convencional como test diagnóstico. VPP: Valor predictivo positivo. VPN: Valor Predictivo Negativo. IC: Intervalo de Confianza. Sens: sensibilidad. Esp: especificidad

B.3 Comparación entre ambos Métodos

		Ana Automatizado		Total
		Negativo	Positivo	
ANA Convencional	Negativo	183	49	232
	Positivo	17	115	132
Total		200	164	364

Prueba de McNemar Significación exacta (bilateral): **<0,001*** .

Tabla 13: Comparación entre ambos test diagnósticos.

C) ESTUDIO DE LA CONCORDANCIA INTRALABORATORIOS

C.1 Concordancia de la determinación intra-laboratorio 1

En el presente estudio, el análisis de la concordancia interna en el Laboratorio 1 los realizamos comparando los resultados obtenidos en 626 pacientes distintos a los que se les solicitaron, en distintos momentos temporales, al menos 2 determinaciones de ANA-IFI en dicho laboratorio. En la siguiente Tabla se exponen los estadísticos de la diferencia temporal entre las dos determinaciones

N pacientes	N determinaciones	Meses entre determinaciones Media (Desv. Estandar)	Meses entre determinaciones Mediana (Rango intercuartil)
626	1252	6,9 meses (4,8)	6 meses (3-101)

Tabla 14: Diferencia temporal entre las dos determinaciones Laboratorio 1.

C.1.1 Concordancia de positividad ANA-IFI: La concordancia de positividad entre las dos determinaciones de ANA realizadas en el Laboratorio 1 a los mismos pacientes en dos momentos temporales distintos fue elevado (kappa casi de 0,8) como queda recogida en la siguiente Tabla:

		ANA 2ª deter		Total
		Negativo	Positivo	
ANA 1ª deter	Negativo	336	25	361
	Positivo	36	229	265
Total		372	254	626

Medida de acuerdo **Kappa 0,799** Concordancia buena

Tabla 15: Concordancia de positividad ANA IFI laboratorio 1.

C.1.2 Concordancia del grado de positividad ANA-IFI: La concordancia en el grado de positividad entre las dos determinaciones de ANA realizadas en el Laboratorio 1 a los mismos pacientes en dos momentos temporales distintos fue muy elevado (Rho de Spearman de 0,8) como queda recogida en la siguiente Tabla:

		ANA 2ªdeter ordinal				Total
		Negativo	+	++	+++	
ANA 1ª deter ordinal	Negativo	336	21	3	1	361
	+	33	68	23	0	124
	++	3	17	92	7	119
	+++	0	0	9	13	22
Total		372	106	127	21	626

Correlación de **Spearman 0,853**

Tabla 16: Concordancia del grado de positividad ANA IFI laboratorio 1.

C.1.3 Concordancia del patrón de ANA-IFI positivos: La concordancia en el patrón de ANA-IFI identificado en el Laboratorio 1 en dos momentos temporales distintos fue “moderada” (índice Kappa de 0,592). Dado que los patrones de ANA-IFI no suelen cambiar en el tiempo en los mismos pacientes, este hecho traduciría sesgos de interpretación de las imágenes observadas por el microscopio óptico por parte del técnico responsable.

Podemos ver cómo La discordancia fue mínima en la identificación de los Patrones Nucleolar (1 de 13 pacientes) y Centroméricos (4 en 17 pacientes). Las mayores discordancias se dieron al identificar los patrones Homogéneo y Moteado entre sí (43 discordancias en 193 pacientes). El patrón periférico se identificó en 2 ocasiones, siendo discordante en 1.

ANA 1ª deter Lab1 patrón	ANA 2ª determinación Laboratorio 1 patrón					
	Periférico	Homogéneo	Moteado	Nucleolar	Centrom.	Total
Periférico	1	0	1	0	0	2
Homogéneo	0	35	23	0	0	58
Moteado	0	20	115	0	3	138
Nucleolar	0	0	0	12	1	13
Centromérico	0	1	2	0	13	16
Total	1	56	141	12	17	227

Medida de acuerdo **Kappa 0,592** Concordancia moderada

Tabla 17: Concordancia de patrones ANA IFI laboratorio 1.

C.2 Concordancia de la determinación intra-laboratorio 2

En el presente estudio, el análisis de la concordancia interna en el Laboratorio 2 lo realizamos comparando los resultados obtenidos en 31 pacientes distintos, a los que se les solicitaron, en distintos momentos temporales, al menos 2 determinaciones de ANA-IFI en dicho laboratorio. Dichas determinaciones fueron 62. En la siguiente Tabla se exponen los estadísticos de la diferencia temporal entre las dos determinaciones :

N pacientes	N determinaciones	Meses entre las determinaciones Media (Desv. Estandar)	Meses entre las determinaciones Mediana (Rango intercuartil)
31	62	5,4 meses (3,6)	5 meses (3-7)

Tabla 18: Diferencia temporal entre las dos determinaciones Laboratorio 2.

C.2.1 Concordancia de positividades ANA-IFI

		ANA 2ª determinación		Total
		Negativo	Positivo	
ANA 1ª determinación	Negativo	18	4	22
	Positivo	8	30	38
Total		26	34	60

Medida de acuerdo **Kappa 0,585** Concordancia moderado

Tabla 19: Concordancia de positivades ANA IFI laboratorio 2.

C.2.2: Concordancia del grado de positividad ANA-IFI

		ANA 2ª determinación				Total
		Negativo	Débil (1/160)	Moderado (1/320-640)	Fuerte (>640)	
ANA 1ª determinación	Negativo	22	4	0	0	26
	Débil(1/160)	5	9	3	0	17
	Mod (320-640)	0	1	2	5	8
	Fuerte (>640)	0	2	0	7	9
Total		27	16	5	12	60

Correlación de **Spearman 0,800**

Tabla 20: Concordancia del grado de positividad ANA IFI laboratorio 2.

C.2.3: Concordancia del patrón de ANA-IFI positivos: La concordancia entre patrones se analizó en los 30 pacientes ANA-positivos con 2 determinaciones en el Laboratorio 2 y que tenían patrones de IFI definidos . Dado que corresponden a dos técnicas de identificación del patrón similar (subjetivas y por el mismo identificador), para poder compararlas con las obtenidas en el Laboratorio 1, se agrupan los resultados considerando los 4 patrones “clásicos” como podemos observar en la siguiente Tabla.. La concordancia en el patrón de ANA-IFI identificado en el Laboratorio 1 en dos momentos temporales distintos fue “muy alta” (índice Kappa de 0,944). Dado que los patrones de ANA-IFI no suelen cambiar en el tiempo en los mismos pacientes, este hecho traduciría una identificación “perfecta” y reproducible de las imágenes procesadas e interpretadas por parte del técnico responsable.

ANA Patrón Adaptado					
ANA Patrón	Homogéneo	Moteado	Centromérico	Nucleolar	Total
Homogéneo	2	0	0	0	2
Moteado	0	17	0	0	17
Centromérico	0	0	4	0	4
Nucleolar	0	1	0	6	7
Total	2	18	4	6	30

Medida de acuerdo **Kappa 0,944** Concordancia muy buena

Tabla 21: Concordancia del patrón de positividad ANA IFI laboratorio 2.

Observamos un elevado nivel de concordancia en la identificación de los patrones “clásicos” intralaboratorio en el laboratorio (Kappa de 0,944), que fue máxima para los patrones moteado (1 discordancia de 18 pacientes), homogéneo (0 discordancias de 2 casos), centromérico (0 de 4) y Nucleolar (1 de 7).

D) ESTUDIO DE LA CONCORDANCIA ENTRE LABORATORIOS

D.1 Concordancia de positivities “globales” de ANA-IFI entre laboratorios

Se estudia analizando los resultados obtenidos en las 364 determinaciones comunes realizadas en ambos Laboratorio 1 y 2, a partir de una única extracción analítica y por tanto en la misma fecha y queda recogido en la siguiente Tabla, en la que podemos comprobar que el grado de concordancia entre ambos laboratorios es bueno (Kappa > 0,6).

		ANA Laboratorio 2		Total
		Negativo	Positivo	
ANA Laboratorio 1	Negativo	183	49	232
	Positivo	17	115	132
Total		200	164	364

Obtenemos una concordancia buena (**kappa = 0,627**)

Tabla 22: Concordancia de positivities ANA IFI interlaboratorios

D.2 Concordancia del grado de positividad:

Se estudia en las mismas 364 determinaciones comunes analizadas en el apartado anterior, adaptando la cuantificación del HCU (que se titula según positividad de diluciones, más objetiva) considerando los valores de 1/160 como positividad “débil”, los de 1/320 y 1/640 como positividad “Media o moderada” y los > 1/640 como positivities “fuertes”. Como podemos ver en la Tabla inferior, el grado de concordancia es “bueno” con una correlación moderada-alta con valores de rho de Spearman superiores a 0,7.

		ANA Lab 2				Total
		Negativo ó 1/80	Débil (1/160)	Moderado (320-640)	fuerte (>640)	
ANA Lab 1	Negativo	185	41	5	1	232
	Débil (+)	16	25	18	5	64
	Moderado (++)	2	13	25	13	53
	Fuerte (+++)	0	0	4	11	15
Total		203	79	52	30	364

Correlación de Spearman **0,739**

Tabla 23: Concordancia del grado de positividad ANA IFI interlaboratorios.

D.3 Concordancia del patrón de ANA-IFI positivos

La concordancia entre patrones se analizó en 114 muestras que eran ANA-IFI positivas simultáneamente en ambos centros (de los 121 ANA-IFI positivos simultáneamente en ambos centros, se excluyeron para este análisis 3 determinaciones de patrones “periféricos” del Laboratorio 1 y 4 “mixtos o mal definidos” del Laboratorio 2.

Para homogeneizar los resultados obtenidos en ambos Laboratorios, en la siguiente Tabla se comparan los 4 patrones “clásicos” identificados en el Laboratorio del Servet (Homogéneo, Moteado, Nucleolar y Centromérico), con la adaptación de los “nuevos patrones” identificados en el Laboratorio 2 a los anteriores patrones “clásicos” (por ejemplo: no se considera la diferenciación del patrón moteado en moteado grueso, moteado fino y puntos nucleares múltiples y los patrones moteado+nucleolar y homogéneo+nucleolar identificados en el Laboratorio 2 se consideran coincidentes con cualquiera de los patrones individuales que identificara el Laboratorio 1). Ello conlleva una valoración más conservadora de las discrepancias y una infravaloración de la aportación de las identificaciones del Laboratorio 2, ajustadas a los criterios actuales e internacionalmente aceptados.

ANA Lab 1 Patrón		ANA Lab 2 Patrón adaptado					Total	
		Homogéneo	Moteado	Nucleolar	Centromérico	Otro		
Homogéneo	Nº	11	6	0	1	1	19	
Moteado	Nº	4	58	0	1	1	63	
Nucleolar	Nº	0	0	13	0	1	14	
Centromérico	Nº	0	1	1	13	1	16	
Otro	Nº	0	0	0	0	2	2	
Total		Nº	15	65	14	14	6	114

Medida de acuerdo **Kappa 0,763** Concordancia buena

Tabla 24: Concordancia del patrón ANA IFI interlaboratorios

Podemos ver en la Tabla anterior que aunque las disparidades no son muy acusadas, existe diferencias en la identificación de los patrones homogéneos (11 disparidades y 11 coincidencias), moteado (12 disparidades y 58 coincidencias) y Centrómero (4 disparidades y 13 coincidencias), mientras que en el patrón Nucleolar la coincidencia es casi completa (1 disparidad y 13 coincidencias).

E) RESUMEN DEL ESTUDIO DE CONCORDANCIA

	Estadístico	Laboratorio 1		Laboratorio 2		Laboratorio 1 vs Laboratorio2	
		N	estadístico	N	estadístico	N	estadístico
Positividad de ANAs	kappa	626	0,799	31	0,665	364	0,627
Cuantificación ANAs	rho	626	0,853	31	0,849	364	0,739
Patrón de ANAs	kappa	227	0,592	30*	0,944	114	0,763

Tabla 25: Resumen estudio de concordancia.

(*) incluye casos interpretados por el mismo observador desde 6 meses antes de la puesta a punto de la nueva técnica.

DISCUSIÓN

Nuestro estudio retrospectivo quiere apoyar la fuerte asociación entre la presencia de Conectivopatías y la positividad de ANAs detectados mediante IFI, dando importancia tanto al grado de positividad, como a la titulación y al patrón morfológico observado. Además, pretende analizar y comparar los métodos utilizado para la detección de los mismos. En la literatura actual no hay muchos trabajos respecto a este tema, por ello, la revisión para discutir nuestros resultados ha sido algo complicada.

Como hemos comentado previamente, los ANAs son un amplio grupo de anticuerpos que reconocen macromoléculas integradas en la estructura del núcleo celular y algunos componentes citoplasmáticos (13). Hasta ahora el método utilizado para la detección de ANA es IFI en células HEp-2 como prueba de screening debido a su alta sensibilidad, considerándose el patrón oro (14). Los patrones nos guiarán a la interpretación clínica de la prueba y la conducta a seguir.

En nuestro estudio el diagnóstico de Conectivopatía se estableció con la positividad de los ANA-IFI y el diagnóstico de Lupus Eritematoso Sistémico, Esclerodermia, Enfermedad mixta del tejido conectivo, Miositis, Dermatomiositis , síndrome de Sjogren, Síndrome Antifosfolípido Secundario y Conectivopatía Indiferenciada por los criterios de la EULAR/ACR.

Discutiremos los resultados de manera ordenada en función de la estructura del trabajo:

A) Características Generales de nuestra muestra

Se seleccionaron las muestras de 364 pacientes que acudían por primera vez a nuestra Unidad de Enfermedades Autoinmunes sin detección de Anticuerpos ANA previa. El 48,35% de los pacientes fueron diagnosticados de una Conectivopatía, siendo la distribución por sexos (44,5% mujeres, 3,85% hombres), con una edad media de 50 años, hecho descrito frecuentemente en la literatura, ya que el diagnóstico de Conectivopatía es más frecuente en mujeres y de mediana edad (15).

Dentro del grupo de pacientes con Conectivopatía, las sospechas diagnósticas por las que se solicitó la detección de anticuerpos ANA por orden de frecuencia fueron, lesión cutánea, trastorno músculo-esquelético, Raynaud, trombofilia y ojo seco. Resultados que nos concuerdan con los diagnósticos principales, ya que el LES fue el diagnóstico más frecuente (15,93%), seguido de la Conectivopatía indiferenciada (10,71%), y de la Esclerodermia (8,52%). Como ya conocemos, el LES es una de las enfermedades inflamatorias del tejido conectivo más comunes, con una incidencia de 5,5/100.000 habitantes/año y una prevalencia de 122/100.000 habitantes (16). Sus manifestaciones clínicas como lesiones cutáneas, fenómeno de Raynaud y trastornos musculoesqueléticos son frecuentes. (17).

Dentro de la práctica asistencial habitual de la UEAS del Hospital Universitario Miguel Servet de Zaragoza, solicitamos los ANA como prueba de screening para el diagnóstico de las Conectivopatías. Dentro de las Conectivopatías, como hemos mencionado anteriormente existen diferentes técnicas de determinación de ANAs por IFI, todas basadas en su identificación sobre distintos preparados celulares y la posterior valoración cualitativa del patrón observado, lo que conlleva un factor de subjetividad, que, unido a la heterogeneidad en las técnicas de los distintos laboratorios y a la ausencia de consensos universalmente aceptados, ha determinado una gran variabilidad interlaboratorios, con la consecuente limitación en la práctica clínica asistencial.

En nuestro estudio hemos comparado dos técnicas diferentes utilizadas en nuestro medio, la técnica convencional, y la técnica automatizada mediante plataformas automatizadas de reconocimiento de patrones.

De las 364 determinaciones solicitadas de anticuerpos ANA para el diagnóstico de sospecha de Conectivopatía, por el método convencional 132 (36,3%) fueron positivas, siendo de estas 113(85,61%) Conectivopatías. Y por el método automatizado, se detectaron 164(45,1%) ANA positivos, de los cuales 121 (73,78%) tenían diagnóstico de Conectivopatía. Estos resultados se explican inicialmente en el punto de corte de la detección de anticuerpos, ya que por el método convencional se consideran positivo un valor 1/160 y por el método automatizado 1/80.

Además, encontramos un numeroso grupo de casos ANA positivos sin Conectivopatía, dentro de los que se encuentran pacientes sin EAS, y otras EAS no relacionada con el tejido conectivo, tales como Hepatitis Autoinmune, Cirrosis Biliar Primaria, Artritis Reumatoide... hallazgo ya descrito en la literatura en varios trabajos realizado en poblaciones diferentes a la de nuestro estudio (18,19,22). Este hecho puede explicarse por el número elevado de pacientes que quedan derivados a nuestras consultas de EAS, dado que las Conectivopatías en España representan el 19% de las consultas de Medicina Interna(23). Y en otra instancia, por el inicio insidioso de las patologías de reumatológicas que pueden simular a enfermedades del tejido conectivo, con la conocida positividad de anticuerpos ANA en enfermedades como Artropatía Psoriásica, Artritis Reumatoide y fibromialgia. (24,25,26,27)

B) Rentabilidad diagnóstica de los ANA-IFI

Analizamos la rentabilidad diagnóstica de ambos métodos estudiando diferentes parámetros, antropométricos, clínicos y valores predictivos. El método convencional presenta un mayor valor predictivo positivo para el diagnóstico de Conectivopatía en pacientes mujeres y >65 años, siendo las diferencias con el test automatizado estadísticamente significativas. Estos resultados pueden explicarse de nuevo a la titulación de 1/80 como punto de corte en el test automatizado. En cuanto al patrón, existieron diferencias significativas para el moteado fino, con un VPP detectado por el

método convencional del 83% vs método automatizado 72%. Y para el Nucleolar, el método convencional (VPP 80%) vs automatizado (VPP 73%). Estos hallazgos muestran la variabilidad interobservador vs reconocimiento automatizado de patrones, presentando el método convencional mayor valor predictivo positivo, por lo tanto, más rentable el diagnóstico a partir de un observador que por un sistema automatizado en una primera determinación.

En relación a la utilidad de la sospecha diagnóstica para el diagnóstico de Conectivopatías, en nuestro trabajo, no existieron diferencias significativas para la mayoría de ellas, a excepción de la trombofilia, donde el valor predictivo positivo por el método convencional fue del 50% vs 32% método automatizado. En general, ambos VPP presentan un pequeño porcentaje dado que la trombofilia generalmente se estudia en nuestra Unidad por sospecha de Síndrome Antifosfolípido primario, no en relación con ANA. Destacando dentro de la misma, los abortos, como sospecha de SAF Obstétrico, entidad frecuentemente detectada en nuestra Consulta. Como podemos observar en las Curvas ROC los síndromes clínicos establecidos para la sospecha de Conectivopatía en nuestro hospital presenta un alto valor diagnóstico a excepción de trombofilia por lo que hemos comentado anteriormente.

Aunque en la literatura se ha descrito mayor significación clínica en patrones homogéneos, centromérico y citoplasmático para el diagnóstico de enfermedades del tejido conectivo (25), en nuestros pacientes con Conectivopatía el patrón más frecuente fue el moteado fino. En cuanto a los nuevos patrones, dentro de los patrones nucleares, destaca la relación para el diagnóstico de LES con el patrón AC1 Homogéneo, y en pacientes sin Conectivopatía, o con diagnóstico de LES o Conectivopatía indiferenciada, la detección de AC4-5 Moteado. Sin embargo, para el diagnóstico de Esclerodermia destacó el patrón Nucleolar discreto (AC-3). Todas estas relaciones están descritas y apoyadas por diferentes artículos utilizados para la realización de la nomenclatura de patrones ANA por el Consenso Internacional sobre Patrones ANA (ICAP). (28,29,230)

Respecto a los títulos de diluciones para la prueba de ANA, estudiamos la relación de la titulación de anticuerpos para el diagnóstico de las distintas Conectivopatías (LES, Conectivopatía Indiferenciada, Esclerodermia, Enfermedad Mixto del Tejido Conectivo, Síndrome Antifosfolípido Secundario, Dermatomiositis y Miositis) en ambos laboratorios. Dentro del laboratorio 1 los resultados se midieron de forma cualitativa mediante cruces. Negativo: título < 1/180, y positivo mayor o igual a esa titulación. En función de la intensidad de la titulación, se interpreta de forma cualitativa: +, ++ y +++. Sin embargo, el sistema automatizado cuantificaba exactamente la titulación: siendo desde 1/80 positivo, y con las siguientes diluciones 1/160, 1/320, 1/640 y >1/640.

En los estudios realizados sobre la utilidad de la prueba ANA en la población general, diluciones por >1/160 establecieron el valor a partir del cual hay una mayor frecuencia de asociación con conectivopatías de afectación multiorgánica (14,31,32)

De los pacientes con Conectivopatía en el método convencional la mayoría de enfermedades del tejido conectivo presentan ANA positivos para titulación 1/160, a excepción el diagnóstico de Esclerodermia que fue más preciso para titulaciones más elevadas (++, método convencional; 1/640 método automatizado). La tabla de "Titulación de anticuerpos en relación al diagnóstico de ambos laboratorios", refleja la poca utilidad de la titulación 1/80 considerada como screening positivo por el método automatizada para el diagnóstico de Conectivopatía.

En una comparación del nivel de titulaciones para la prueba de ANA en nuestra Unidad de Enfermedades Autoinmunes con estudios previos, se muestra un VPP en las Conectivopatías superior en diluciones más bajas (1/160 en torno 47% vs. 10%), y similar para diluciones altas (1/640 aproximadamente 30,0% vs. 38,9%)(31-33). Estos resultados se hacen más evidentes en el subestudio para LES, donde el VPP es del 31% en una dilución 1/160 por el método automatizado y 36,2% por el método convencional. Sin embargo, para el diagnóstico de Esclerodermia se requieren titulaciones más elevadas 1/640 para detectar el 58,1% por el método convencional y 35,5% por el método automatizado, quizás por una evolución más insidiosa.

Para comparar las dos técnicas analizamos la sensibilidad (S), especificidad (E), Valor Predictivo Positivo (VPP) y Valor Predictivo Negativo (VPN) de ambos test diagnósticos y realizamos un estudio de concordancia intra e interlaboratorios.

En relación al estudio de ambos test diagnósticos se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.001$). Ya que la S y E del test convencional fue del 64% y 90% respectivamente, con un VPP 73% y VPN 73% por el método clásico frente al test automatizado, S 69%, E 77%, VPP 86% y VPN 73%. La sensibilidad es la probabilidad de clasificar correctamente a un individuo enfermo, y la especificidad la probabilidad de clasificar correctamente a un individuo sano. En general, las pruebas de Screening deben ser de alta sensibilidad para captar a todos los enfermos (34). Y posteriormente realizarse pruebas con alta especificidad, para evitar falsos positivos. En nuestro trabajo ambos test presentan alta sensibilidad en torno 70%, por lo que son buenos test de Screening para el diagnóstico de Conectivopatías. Aunque su especificidad en nuestro estudio, además, presenta altos valores sobre todo con el sistema automatizado, disminuyendo entonces los resultados falsos positivos y presentando mayor validez diagnóstica.

C) Estudio de concordancias intra e interlaboratorios.

Para valorar el grado de significación de los anteriores hallazgos, hemos considerado importante analizar la concordancia que hemos obtenido intralaboratorio e interlaboratorio. La diferencia de fechas entre las dos determinaciones, en Laboratorio 1, claramente inferior a la del Laboratorio 2 (6 meses frente a 9-12 meses) nos predispone a obtener un mayor grado de concordancia intralaboratorio 1 en la positividad y el título; como veremos, lo importante será ver si la identificación de patrones, que debería no variar mucho, es igualmente concordante.

El índice kappa para identificación de patrones en el Laboratorio 1 fue de 0,59, resultados que nos sugieren que debemos mejorar en este aspecto, ya que dichos patrones deben permanecer típicamente iguales en el mismo individuo a lo largo del tiempo y en este caso, la interpretación “subjetiva” del laboratorio 1, varía en distintos momentos para un mismo paciente, especialmente para los patrones homogéneo y moteado.

En cuando al Laboratorio 2, el índice Kappa para la positividad de anticuerpos fue de 0,585, concordancia moderada, incluso tratándose de un estudio sesgado, ya que entre las dos determinaciones de cada paciente existe un decalaje temporal importante, que puede influir tanto en la positividad o negatividad, como, especialmente, en el título y en menor ,medida, en el patrón de ANA-IFI obtenido. Sin embargo, a pesar de lo dicho, la concordancia es muy aceptable, similar que la concordancia entre los títulos de anticuerpos, teniendo en cuenta que la identificación en fases diagnósticas iniciales, pre y postratamiento modifican la cuantificación del mismo, se obtuvo una Rho de 0,80, muy buena concordancia. Por otra parte, hay que decir que la cuantificación en este laboratorio 2 es más objetiva que en el 1 (ya que se basa en diluciones 1/160, 1/320...) mientras que la del Laboratorio 1 está basada en apreciaciones (negativo, +, ++, etc).

Finalmente, es de destacar que la concordancia en la identificación del patrón de ANA-IFI intralaboratorio 2 presenta un índice kappa de 0,94, casi perfecto, ya que los patrones permanecen típicamente iguales en el mismo individuo, lo que traduce un alto grado de fiabilidad de los resultados, que se mantienen en el individuo a lo largo del tiempo.

En el análisis de la concordancia entre los dos laboratorios, convencional vs automatizado, el resultado fue bueno (Índice de Kappa 0,627). El grado de concordancia se influye por el punto de corte, el Laboratorio 1, considera positivo títulos 1/160, mientras que el laboratorio 2, 1/80. Sin embargo, si utilizáramos el punto de corte en 1/80 en ambos, aumentarían las discordancias, por lo que como se ha descrito anteriormente en la literatura, diluciones por >1/160 establecen el valor a partir del cual hay una mayor frecuencia de asociación con Conectivopatías(14,29,30).

Finalmente analizamos la concordancia para la identificación de patrones entre laboratorios, Kappa 0,763, buena concordancia, por lo que esto revela que la concordancia en el patrón, interpretada subjetivamente en los dos centros, es alta, pero en este estudio se infravalora las aportaciones de la nueva identificación de los distintos patrones en el laboratorio 2, que ofrece información adicional de subtipos de patrones, al identificar nuevos patrones (puntos, citoplásmicos, etc) y que se deben de realizar más estudios sobre la aportación a la práctica clínica de dichos patrones para el diagnóstico de Conectivopatías.

Hasta la actualidad los clínicos utilizamos criterios de clasificación consensuados en reuniones de expertos para diagnosticar a los pacientes con EAS. Estos criterios cambian a lo largo del tiempo, al igual que los conceptos de las propias enfermedades. Existe por ello un paradigma actual, en el que comienza a cambiar el objetivo para el desarrollo de una clasificación, sin mostrar tanta importancia a las características clínicas de los pacientes, si no centrándonos, en qué pacientes pueden ser relevantes para un tratamiento específico. Por tanto, el desafío será reclasificar las enfermedades multifactoriales sobre la base de sus mecanismos biológicos más que de su fenotipo

clínico. Todo esto demuestra que la bioinformática y las nuevas tecnologías, como la inteligencia artificial, en un futuro cercano, modificará los algoritmos, y los sistemas de aprendizaje automático podrían conducir a nuevos modelos de clasificación, no solo basados en un fenotipo clínico, sino también en un perfil biológico complejo y una sensibilidad común al tratamiento dirigido(36). Por ello, necesitamos avanzar y realizar estudios de comparación con nuestros sistemas convencionales, para poder evidenciar que estos nuevos avances no sólo supondrían una rentabilidad económica sino además, diagnóstica y terapéutica.

CONCLUSIONES

- 1) La detección de anticuerpos ANA por IFI en células HEp-2 automatizado es según nuestro estudio un buen “test de Screening” para el diagnóstico de Conectivopatías, con una sensibilidad del 70%.
- 2) Actualmente, la rentabilidad diagnóstica de Conectivopatía mediante la determinación ANA-IFI por el método convencional es ligeramente superior al automatizado, especialmente en menores de 65 años de ambos sexos.
- 3) Respecto a la rentabilidad diagnóstica de Conectivopatía de las determinaciones de ANA-IFI en los síndromes de sospecha clínica (manifestaciones cutáneas, musculoesqueléticas, Raynaud y Síndrome seco) los dos métodos presentaron altos VPP, a excepción de los casos con Trombofilia, posiblemente debido a sesgos de nuestra muestra (elevado número de casos de SAF obstétrico no relacionado con positividad de ANA).
- 4) La titulación 1/80 utilizada en nuestro sistema automatizado, no aumenta la sensibilidad del test, sino que aumenta el falso positivo, por lo que disminuye su validez diagnóstica.
- 5) El patrón morfológico detectado de forma cualitativa sigue siendo muy rentable para el diagnóstico de Conectivopatía, especialmente si se detecta un patrón moteado fino.
- 6) La concordancia del patrón observado en dos determinaciones por el sistema automatizado presenta un índice kappa de 0,94, mayor que el detectado por el sistema convencional, lo que traduce un mayor grado de fiabilidad de los resultados a lo largo del tiempo.
- 7) Globalmente nuestro test automatizado mantiene una rentabilidad diagnóstica similar al manual; aunque existe un alto grado de concordancia entre ambos test, todavía persiste un porcentaje no despreciable de pacientes con resultados dispares, por lo que puede concluirse que es necesario seguir avanzando en la objetividad de las nuevas técnicas automatizadas antes de abandonar los métodos cualitativos de ANA-IFI clásico.

BIBLIOGRAFÍA

1. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Inmunología celular y molecular. Madrid: Elsevier Saunders; 2008. pp. 432-439.
2. Salamuniae I. Laboratory diagnosis of autoimmune diseases new technologies, old dilemmas. *Biochemia Medica*. 2010; 20(1):45-56.
3. Turrión Nievesa AI, Martín Holguerab R, Sánch AI, Pérez Gómez A, Cuende Quintana E. Conectivopatías. Concepto. Clasificación. Formas clínicas. Lupus eritematoso sistémico (I). Concepto. Etiopatogenia. Clasificación. Epidemiología. Manifestaciones clínicas. *Medicine*. 2009; 10(32):2117-2127.
4. Kumar TS, Aggarwal A. Approach to a patient with connective tissue disease. *Indian J Pediatr*. 2010; 77: 1157-6
5. Cabiedes J, Núñez Álvarez CA. Anticuerpos antinucleares. *Reumatol Clin*. 2010; 6:224-30.
6. Baleva M, Lesichkova S, Gesheva N, et al. Diagnostic significance of the titer of antinuclear antibodies. *Inmunologia clínica*. 2017; 1:83-99.
7. Hargraves M, Richmond H, Morton R. Presentation of two bone marrow elements; the tart cell and L.E cell. *Proceedings of the staff meetings Mayo Clinic*. 1948; 23(2):25-28.
8. Holman H, Deicher H. The reaction of the lupus erythematosus (LE) cell factor with deoxyribonucleoprotein of the cell nucleus. *J Clin Invest*. 1959; 38: 2059-2072.
9. Coons A, Kaplan M. Localization of antigen in tissue cells; improvements in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody. *Journal of Experimental Medicine*. 1950; 91(1):1-13.
10. Méndez Rayo T, Ochoa Zárate L, Posso Osorio I, Ortiz E, Naranjo Escobar J, Tobón GJ. Interpretación de los autoanticuerpos en enfermedades reumatológicas. *Rev Colomb Reumatol*. 2018 (25)2: 112-125.
11. 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. *Front Immunol*. 2015;6:412
12. Damoiseaux J, Andrade LEC, 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(7):879-889.
13. Fonollosa P, Labrador M, Vilardell T. Anticuerpos antinucleares en la práctica clínica. *Form Médica Contin en Atención Primaria*. 2002;9: 711-718.

14. M. O'Sullivan, A. McLean-Tookey, R.K. Loh. Antinuclear antibody test. *Aust Fam Physician*. 2013; 42: 718-721
15. Muñoz Gómez J. Compendio de las enfermedades reumáticas. En: Shumacher JR, Klippel MD, editors. *Compendio de las enfermedades reumáticas*. Atlanta: ArthritisFoundation; 1993. 85-9.
16. Gladman DD, Urowitz MB. Clinical features. *Connective tissue disorders. Systemic lupus erythematosus*. En: Hochberg MC, Silman AJ, Smolen JS, editors. *Rheumatology*. 3th ed. Vol 2. London: Mosby; 2003.1359-80
17. Chiewchengchol D, Murphy R, Edwards SW, et al. Mucocutaneous manifestations in juvenile-onset systemic lupus erythematosus: a review of the literature. *Pediatr Rheumatol Online J*. 2015; 13: 1
18. E.M. Tan, T.E. Feltkamp, J.S. Smolen, B. Butcher, R. Dawkins, M.J. Fritzler, et al. Range of antinuclear antibodies in healthy individuals. *Arthritis Rheum*. 1997;40: 1601-1611.
19. Rosas I, Gómez EI, Núñez CA, Huerta MT, Alvarado A, Cabiedes J. Prevalencia de anticuerpos antinucleares (ANA) en donadores sanos del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. *Rev Mex Reumatol*. 2005; 20: 72.
20. Cohen J: A coefficient of agreement for nominal scales. *Educational and psychological measurement* 1960; 20: 37-46.
21. Landis J, Koch G: The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 1977; 33: 159-74
22. Marin G, 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; 15: 325-329.
23. Rodríguez M, Gómez J, Galdo M, González I. Hernández J. Grupo Gallego de Estudio Epidemiológico de Enfermedades Reumáticas. Actividad asistencial en las consultas externas de las unidades de reumatología de Galicia. *Reumatol Clin*. 2006; 2:239-246.
24. Volkmann ER, Taylor M, Ben M. Using the antinuclear antibody test to diagnose rheumatic diseases: When does a positive test warrant further investigation?. *South Med J*. 2012; 105: 100-104.
25. Nishimura S, Nishiya K, Hisakawa N, Chikazawa H, Ookubo S, Nakatani K, et al. Positivity for antinuclear antibody in patients with advanced rheumatoid arthritis. *Acta Med Okayama*. 1996;50: 261-265.
26. Calzavara PG, Cattaneo R, Franceschini F, Tosoni C, Martinelli M, Carlino A. Antinuclear antibodies in psoriatic arthritis and its subgroups. *Acta Derm Venereol Suppl (Stockh)*. 1989; 146: 31-32.

27. I. Kötter, D. Neuscheler, I. Günaydin, D. Wernet, R. Klein. Is there a predisposition for the development of autoimmune diseases in patients with fibromyalgia? Retrospective analysis with long term follow-up. *Rheumatol Int.*, 2007; 27: 1031-1039.
28. Conrad K, Schössler W, Hiepe F. *Autoantibodies in systemic autoimmune diseases: a diagnostic reference*. 3ª Ed. Alemania: Autoantigens autoantibodies autoimmunity; 2015.
29. Petri M, Orbai AM, Alarcón GS, *et al*. Derivation and validation of the systemic lupus international collaborating clinics classification criteria for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2012; 64:2677–86.
30. Johnson SR, Fransen J, Khanna D, *et al*. Validation of potential classification criteria for systemic sclerosis. *Arthritis Care Res*. 2012; 64:358–67.
31. Abeles AM, Abeles M. The clinical utility of a positive antinuclear antibody test result. *Am J Med*. 2013; 126: 342-348
32. Satoh M, Vázquez-del Mercado M, Chan EK. Clinical interpretation of antinuclear antibody tests in systemic rheumatic diseases. *Mod Rheumatol*. 2009; 9: 219-228.
33. Menor Almagro R, Rodríguez Gutiérrez JF, Martín Martínez A, Rodríguez Valls, MJ, Aranda Valera C, De la Iglesia Salgado JL. Asociación entre títulos de anticuerpos antinucleares y conectivopatías sistémicas en una Unidad de Reumatología. *Reumatol Clin*; 2017 (13): 150-155
34. Pita Fernández S, Pértegas Díaz S. Pruebas diagnósticas. *Cad Aten Primaria*. 2003; 10: 120-124.
35. Naranjo L, Shovman O, Pérez D, *et al*. Algorithm for antinuclear antibodies in subjects with clinical suspicion of autoimmune diseases. *Clin Exp Rheumatol*. 2020;38(4):633-639.
36. Foulquier N, Redou P, Pers JO, Saraux A. New criteria and new methodological tools for devising criteria sets of inflammatory rheumatic diseases. *Clin Exp Rheumatol*. 2020;38(4):776-782

ANEXO



Informe Dictamen Favorable Trabajos académicos

C.P. - C.I. PI20/138

1 de abril de 2020

Dña. María González Hinjos, Secretaria del CEIC Aragón (CEICA)

CERTIFICA

1º. Que el CEIC Aragón (CEICA) en su reunión del día 01/04/2020, Acta Nº 07/2020 ha evaluado la propuesta del Trabajo:

Título: Rentabilidad diagnóstica de la determinación automatizada de anticuerpos antinucleares (ANA) y sus patrones de inmunofluorescencia (IFI) sobre células hep-2 en pacientes con sospecha de conectivopatía. Estudio comparativo respecto a las Técnicas tradicionales.

Alumna: Elena Isabel Esteban Cabello

Director: José Velilla Marco

Versión protocolo: v1. marzo 2020

2º. Considera que

- El proyecto se plantea siguiendo los requisitos de la Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación Biomédica y los principios éticos aplicables.
- El Tutor/Director garantiza la confidencialidad de la información, la obtención de los permisos necesarios para el acceso a los datos, el adecuado tratamiento de los datos en cumplimiento de la legislación vigente y la correcta utilización de los recursos materiales necesarios para su realización.

3º. Por lo que este CEIC emite **DICTAMEN FAVORABLE a la realización del proyecto.**

Lo que firmo en Zaragoza

María González Hinjos
Secretaria del CEIC Aragón (CEICA)