



REVISTA BRASILEIRA DE REUMATOLOGIA

www.reumatologia.com.br



Artigo original

Detecção de anticorpos antinucleares por imunofluorescência indireta em células HEp-2: definindo a diluição de triagem adequada para o diagnóstico das doenças reumáticas autoimunes

Fabiano de Almeida Brito^{a,b,*}, Silvana Maria Elói Santos^b, Gilda Aparecida Ferreira^c, William Pedrosa^a, Janaina Gradisse^a, Lara Cristina Costa^a, Suzane Pretti Figueiredo Neves^b

^aInstituto Hermes Pardini, Belo Horizonte, MG, Brasil

^bDepartamento de Propedêutica Complementar, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, Brasil

^cDepartamento do Aparelho Locomotor, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, Brasil

INFORMAÇÕES

Histórico do artigo:

Recebido em 5 de março de 2012

Aceito em 2 de junho de 2013

Palavras-chave:

Doença reumática autoimune

Anticorpos antinucleares

Imunofluorescência indireta

Valor de referência

RESUMO

Objetivo: Definir o título anormal e a diluição de triagem adequada para o teste de FAN (fator antinúcleo) por imunofluorescência indireta em células HEp-2 (FAN HEp-2).

Métodos: Realizamos a pesquisa do FAN HEp-2 em amostras de soro de 126 indivíduos saudáveis. As amostras foram triadas na diluição de 1:80, e aquelas positivas diluídas até o título de 1:5120. O título anormal de FAN foi definido como aquele correspondente ao percentil 95 do teste nesta população. A sensibilidade dos diferentes títulos do FAN foi determinada em um grupo de 136 pacientes com diagnóstico de doença reumática autoimune, e a especificidade em um grupo de 118 pacientes com diagnóstico de outras doenças reumáticas. O valor de corte ótimo do teste foi determinado pelo estudo da curva ROC.

Resultados: A frequência de FAN positivo em indivíduos saudáveis foi de 13,2%. Não houve diferença na frequência de resultados positivos de acordo com o gênero ou a idade. O título anormal do FAN foi definido como a diluição de 1:160. A diluição dos soros de 1:80 apresentou sensibilidade de 87,7% e especificidade de 67,8%, enquanto a diluição de 1:160 apresentou sensibilidade de 82% e especificidade de 73,7%. Pela análise da curva ROC, a diluição de 1:160 correspondeu ao valor de corte ótimo.

Conclusão: O título anormal e o valor de corte ótimo do FAN HEp-2 na população avaliada foram de 1:160. A diluição de 1:160 é, portanto, a diluição de triagem ideal, com melhor especificidade, porém sem comprometimento significativo da sensibilidade diagnóstica do teste.

© 2014 Elsevier Editora Ltda. Todos os direitos reservados.

* Autor para correspondência.

E-mail: fabdoc@ig.com.br (F.A. Brito).

0482-5004/\$ - see front matter. © 2014 Elsevier Editora Ltda. Todos os direitos reservados.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.rbr.2014.01.002>

Detection of anti-nuclear antibodies by indirect immunofluorescence on HEp-2 cells: setting the appropriate screening dilution for the diagnosis of autoimmune rheumatic diseases

A B S T R A C T

Keywords:

Autoimmune rheumatic disease
Antinuclear antibodies
Indirect immunofluorescence
Reference value

Objective: To establish the abnormal title and the appropriate screening dilution for ANA (antinuclear antibodies) test by indirect immunofluorescence on HEp-2 cells (ANA HEp-2).
Methods: An analysis of ANA HEp-2 in serum samples from 126 healthy individuals was performed. The samples were screened at a dilution of 1:80, and those positive were diluted to the title of 1:5120. The abnormal title of ANA was defined as that corresponding to the 95th percentile of the test in this population. The sensitivity of the different titles of antinuclear antibodies was determined in a group of 136 patients with a diagnosis of autoimmune rheumatic disease, and the specificity was determined in a group of 118 patients with other rheumatic diseases. The optimal cutoff value of the test was determined by ROC curve analysis.

Results: The frequency of ANA positivity in healthy subjects was 13.2%. There was no difference in the frequency of positive results according to gender or age. The abnormal title of ANA was defined as the dilution of 1:160. The 1:80 dilution had sensitivity of 87.7% and specificity of 67.8%, while the 1:160 dilution had sensitivity of 82% and specificity of 73.7%. By ROC curve analysis, a dilution of 1:160 corresponded to the optimal cutoff value.

Conclusion: The abnormal title and the optimal cutoff value of ANA HEp-2 in the population was 1:160. Therefore, the dilution of 1:160 is the optimal screening dilution, with better specificity but without significantly compromising the sensitivity of the diagnostic test.

© 2014 Elsevier Editora Ltda. All rights reserved.

Introdução

Os anticorpos antinúcleo são importantes marcadores diagnósticos de algumas doenças reumáticas autoimunes (DRAI), especialmente do lúpus eritematoso sistêmico (LES), da síndrome de Sjögren (SS), da esclerose sistêmica (ES), da dermatomiosite/polimiosite (DM/PM) e da doença mista do tecido conjuntivo (DMTC).^{1,2}

Conhecido como fator antinúcleo (FAN), o exame para pesquisa de anticorpos antinúcleo pela técnica de imunofluorescência indireta (IFI) é atualmente denominado Pesquisa de Anticorpos contra Antígenos Celulares (PAAC-IFI), visto que o mesmo permite a detecção de uma gama de anticorpos que reagem com antígenos não apenas do núcleo, mas do nucléolo, do citoplasma e do aparelho mitótico celular.³ Entretanto, o termo FAN continua a ser largamente empregado na prática clínica por razões históricas, por isso mantivemos seu uso neste manuscrito.

Pela elevada sensibilidade diagnóstica, a IFI utilizando células HEp-2 como substrato é considerada o método padrão ouro para a pesquisa do FAN (FAN HEp-2).⁴

Contudo, uma porcentagem significativa de indivíduos portadores de várias outras doenças autoimunes, para as quais o teste não possui importância diagnóstica, pode apresentar resultados positivos no teste.^{1,2} Resultados positivos também podem ocorrer no contexto de doenças infecciosas, neoplásicas ou mesmo em indivíduos sem evidência clínico-laboratorial de doença autoimune.⁵

A presença de FAN em título anormal é um dos critérios de classificação do LES, do American College of Rheumatology (ACR).⁶ Recentemente, o Systemic Lupus International

Collaborating Clinics (SLICC) Group revisou e validou os critérios de classificação do ACR, tendo definido como um dos critérios imunológicos do LES um resultado de FAN acima do valor de referência do laboratório.⁷ No entanto, nem o ACR ou o SLICC fazem recomendações específicas sobre quais procedimentos utilizar para que o título anormal ou o valor de referência do FAN seja estabelecido.

Diferentes diluições de triagem dos soros, como 1:40, 1:80 e 1:160, têm sido frequentemente sugeridas como valor de corte para o teste de FAN HEp-2, sem levar em consideração a recomendação do ACR quanto à definição do título anormal do FAN.⁸⁻¹²

Por sua vez, muitos fabricantes de kits comerciais sugerem que a triagem do teste seja feita na diluição inicial de 1:40, geralmente com base em estudos realizados em populações europeias ou americanas saudáveis.

Em nosso país, um estudo demonstrou que 12,9% dos indivíduos saudáveis podem apresentar FAN HEp-2 positivo no título de 1:80, diluição de triagem utilizada por muitos laboratórios clínicos, um dado que reforça a importância de se estabelecer uma diluição de triagem apropriada para o diagnóstico das DRAI.¹³

O presente trabalho tem como objetivos determinar, numa população brasileira, o título anormal do teste de FAN, quando realizado por IFI em células HEp-2, estudando indivíduos aparentemente saudáveis; determinar as medidas de acurácia diagnóstica do teste, como sensibilidade, especificidade, razão de verossimilhança positiva (RV+) e negativa (RV-), estudando um grupo de pacientes com diagnóstico de DRAI e um grupo de pacientes com outras doenças reumáticas para as quais o FAN não possui importância diagnóstica, e estabelecer o valor de corte ótimo do teste

pela análise por curva ROC (Receiver Operating Characteristic).

Material e métodos

Pacientes

Dois grupos distintos de pacientes foram investigados:

Grupo 1: Para a determinação da sensibilidade do FAN HEp-2 foram avaliados 139 pacientes com diagnóstico estabelecido de DRAI, incluindo 72 com LES, 12 com SS, 31 com ES (incluindo as formas cutâneas limitada e difusa, a DMTC e as formas em sobreposição com LES, SS e PM), 10 com doença indiferenciada do tecido conjuntivo (DITC) e 14 com DM/PM, segundo os critérios de classificação específicos.^{6,14-19}

Grupo 2: Para a determinação da especificidade do FAN HEp-2 foram avaliados 118 pacientes com diagnóstico estabelecido de outras doenças reumáticas, incluindo 38 com artrite reumatoide (AR), 17 com espondiloartrites, 26 com vasculites sistêmicas, 10 com osteoartrite, 23 com fibromialgia e 4 com gota, segundo os critérios de classificação específicos.²⁰⁻²⁴

Para a determinação de intervalos de referência no laboratório clínico, o Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) preconiza a avaliação de, no mínimo, 120 indivíduos considerados saudáveis e o uso de teste estatístico não paramétrico.²⁵ Seguindo as recomendações do CLSI, foram avaliados 126 indivíduos saudáveis residentes na região metropolitana de Belo Horizonte, Minas Gerais, pareados de acordo com o gênero e as seguintes faixas etárias: 18 a 30 anos, 31 a 40 anos, 41 a 50 anos e 51 a 65 anos. Considerou-se como saudáveis indivíduos com idade entre 18 e 65 anos, que estivessem no exercício pleno e regular de suas atividades laborais e que não apresentassem qualquer condição física ou mental incapacitante, de acordo com o proposto por Tan e cols.⁸ O título anormal de FAN HEp-2 foi definido como aquele correspondente ao percentil 95 dessa população.²⁶

Todos os pacientes dos grupos 1 e 2 foram recrutados de forma consecutiva, nos Serviços de Reumatologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais e da Santa Casa de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, entre setembro de 2010 e setembro de 2011. Após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido, procedeu-se à coleta e à centrifugação do sangue. O soro obtido foi alíquotado e armazenado a -80 °C. O estudo foi aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais e da Santa Casa de Belo Horizonte.

FAN HEp-2

Amostras de soro de todos os participantes foram analisadas quanto à presença de anticorpos contra constituintes celulares pelo método da imunofluorescência indireta utilizando lâminas contendo células HEp-2, de acordo com as recomendações do fabricante (BION Enterprises, Des Plaines, IL, USA), utilizando a diluição de 1:80 como triagem. As análises foram feitas por dois observadores experientes, sem conhecimento prévio do diagnóstico dos pacientes e do resultado emitido pelo outro colega, em microscópio de epifluorescência (Nikon Eclipse E400), no aumento de 400x, e os padrões de fluorescência foram clas-

sificados de acordo com as recomendações do 3º Consenso Brasileiro para a Pesquisa de Autoanticorpos contra Constituintes Celulares - FAN HEp-2.³ As amostras foram classificadas como positivas quando apresentavam uma intensidade de fluorescência igual ou superior à do controle positivo de reatividade mínima (1+/4+), em qualquer compartimento celular (núcleo, nucléolo, citoplasma ou aparelho mitótico). Amostras positivas na triagem foram diluídas sucessivamente em salina fosfatada tamponada (PBS) até o título de 1:5120, sendo considerado o título final aquele em que ainda era possível identificar um padrão morfológico bem definido e de intensidade mínima de fluorescência. Todos os casos com resultados divergentes de título e/ou padrão de fluorescência foram reanalisados e classificados após consenso entre os observadores.

Análise estatística

As variáveis contínuas com distribuição normal foram apresentadas como média e desvio padrão, e as de distribuição não paramétrica como mediana e intervalo interquartil. As variáveis categóricas foram apresentadas como frequência e porcentagem. Para análise das variáveis categóricas foi usado o teste do qui-quadrado (χ^2) ou o teste exato de Fisher. O nível de significância estatística adotado foi de 5% ($p < 0,05$). O estudo da concordância interobservadores foi realizado pela estatística kappa. A sensibilidade e a especificidade, com os respectivos intervalos de confiança de 95%, foram calculados como a porcentagem de resultados positivos em pacientes do grupo 1 e a porcentagem de resultados negativos em pacientes do grupo 2. As RV foram calculadas pela análise dos resultados dos pacientes do grupo 1, tanto em comparação com os resultados dos pacientes do grupo 2 quanto com os dos indivíduos saudáveis. A capacidade discriminativa do FAN HEp-2 foi avaliada pela análise por curva ROC de duas maneiras distintas: como a capacidade do teste de discriminar entre os pacientes do grupo 1 e do grupo 2, bem como entre os pacientes do grupo 1 e os indivíduos saudáveis. Por meio do estudo pela curva ROC também foi estabelecida a diluição de triagem do FAN HEp-2 com o melhor compromisso entre sensibilidade e especificidade (valor de corte ótimo). A análise estatística foi executada pelo pacote estatístico Medcalc para Windows versão 12.1.3 (Medcalc Software, Mariakerke, Bélgica).

Resultados

A média de idade do grupo 1 foi de 42 anos ($\pm 11,7$), a proporção de pacientes do gênero feminino de 88,5% e a mediana do tempo de doença foi de 6,7 anos (3,2 a 12,7). A média de idade do grupo 2 foi de 50 anos ($\pm 13,8$), a proporção de pacientes do gênero feminino 71,2% e a mediana do tempo após o diagnóstico foi de 5 anos (2 a 10). A média de idade dos indivíduos saudáveis foi de 39,7 anos ($\pm 10,8$), e a proporção de pacientes do gênero feminino de 54%.

Inicialmente, avaliou-se a concordância entre os observadores para classificação das amostras como positivas ou negativas, no momento da triagem, sendo constatada concordância de boa a muito boa ($kappa = 0,783$; IC95% 0,640 a 0,925). Em um segundo momento estudou-se a concordância quanto ao título final e ao padrão de fluorescência. A estatística ka-

ppa para o título foi de 0,762 (kappa ponderado linear; IC95% 0,681 a 0,844), e para o padrão foi de 0,894 (kappa ponderado quadrático; IC95% 0,780 a 1,000), denotando grau de concordância de bom a muito bom.

Admitindo-se uma variação na definição do título de até ± 1 diluição, a concordância absoluta foi de 95,7%. Divergências de definição entre os padrões nuclear homogêneo e nuclear pontilhado fino denso foram a principal causa de discordância na classificação dos padrões de fluorescência.

Frequência de FAN positivo na população saudável

De 126 indivíduos saudáveis avaliados, 17 apresentaram resultado positivo de FAN HEp-2 (13,5%) (tabela 1), sem diferença na frequência entre os gêneros feminino e masculino (16,1% e 10,3%, respectivamente; $p = 0,489$) ou de acordo com a idade ($p = 0,888$).

A distribuição dos títulos nos indivíduos saudáveis revelou predomínio de baixos títulos (1:80 e 1:160), embora 29,5% dos resultados positivos tenham ocorrido em títulos $\geq 1:320$, considerados moderados a altos (tabela 1). Os padrões de fluorescência mais prevalentes foram o nuclear pontilhado fino, presente em 11 indivíduos (64,7%), e o nuclear pontilhado fino denso, presente em 3 indivíduos (17,6%) (tabela 2).

Definição do título anormal de FAN

O percentil 95 do FAN HEp-2 na população saudável correspondeu à diluição de 1:160.

Considerando-se esta diluição como o título anormal e, portanto, o valor de referência do FAN HEp-2, a frequência de resultados positivos do teste no grupo de indivíduos saudáveis foi reduzida para 6,3%.

Tabela 1 – Porcentagem de resultados positivos de FAN HEp-2 em 126 indivíduos saudáveis, conforme o título

	Título			
	1:80	1:160	1:320	1:640
Número	17	8	5	2
Porcentagem ^a	13,5%	6,3%	4%	1,6%

^aNúmero de resultados positivos considerando-se o respectivo título como o valor de corte do teste, dividido pelo número total de indivíduos saudáveis.

Tabela 2 – Distribuição dos padrões de fluorescência e títulos de FAN HEp-2 nos 17 indivíduos saudáveis com o teste positivo

Padrão	Título				Total
	1:80	1:160	1:320	1:640	
NPF	6	3	2	0	11 (64,7%)
NPFD	1	0	1	1	3 (17,6%)
Nucleolar	2	0	0	0	2 (11,8%)
Centromérico	0	0	0	1	1 (5,9%)
Total	9 (52,9%)	3 (17,6%)	3 (17,6%)	2 (11,9%)	17 (100%)

NPF, nuclear pontilhado fino; NPFD, nuclear pontilhado fino denso.

Sensibilidade e especificidade do FAN HEp-2

A sensibilidade e a especificidade do FAN HEp-2, calculadas para cada diluição compreendida entre 1:80 e 1:5120, estão discriminadas na tabela 3.

Como a prevalência e a importância diagnóstica do FAN nas diferentes DRAI são variáveis, a proporção de resultados positivos do FAN HEp-2 foi determinada para cada doença representada nos grupos 1 e 2 (figs. 1 e 2).

Em comparação com a diluição de 1:80, o emprego da diluição de 1:160 como valor de referência do teste foi acompanhado por uma redução da sensibilidade do FAN HEp-2 de 87,8% para 82,0% e um aumento da especificidade de 67,8% para 73,8%.

A queda da sensibilidade foi decorrente, principalmente, de uma redução da positividade do teste em pacientes com LES e DM/PM. Já nos pacientes com ES, SS e DITC a sensibilidade permaneceu praticamente inalterada.

Tabela 3 – Sensibilidade e especificidade de FAN HEp-2, conforme o título (IC95%)

Título	Sensibilidade	Especificidade
1:80	87,7% (81,1-92,7)	67,8% (58,6-76,1)
1:160	82,0% (74,6-88,0)	73,7% (64,8-81,4)
1:320	74,8% (66,8-81,8)	80,5% (72,2-87,2)
1:640	57,6% (48,9-65,9)	85,6% (77,9-91,4)
1:1280	46,8% (38,3-55,4)	95,8% (90,4-98,6)
1:2560	27,3% (20,1-35,5)	96,6% (91,5-99,1)
1:5120	18,7% (12,6-26,2)	98,3% (94,0-99,8)

Sensibilidade: calculada como o número de pacientes do grupo 1 com resultados positivos dividido pelo número total de pacientes do grupo. Especificidade: calculada como o número de pacientes do grupo 2 com resultados negativos dividido pelo número total de pacientes do grupo.

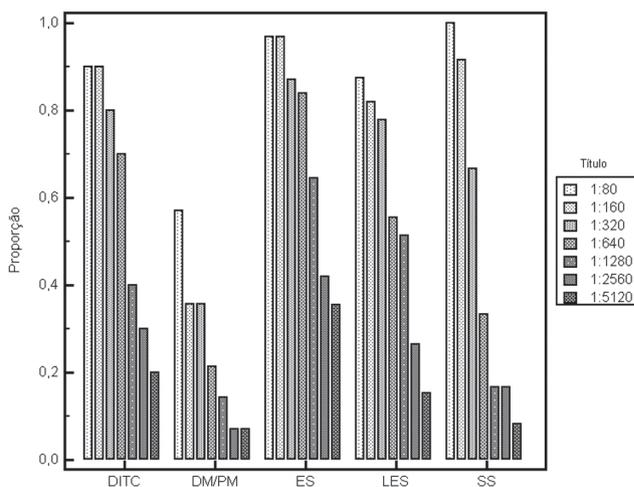


Figura 1 – Proporção de resultados positivos de FAN HEp-2 por doença do grupo 1, conforme o título. Proporção calculada como o número de resultados positivos considerando-se o respectivo título como o valor de corte do teste, dividido pelo número total de pacientes com a doença. DITC, doença indiferenciada do tecido conjuntivo; DM/PM, dermatomiosite/polimiosite; ES, esclerose sistêmica; LES, lúpus eritematoso sistêmico; SS, síndrome de Sjögren.

A sensibilidade do FAN HEP-2 nos pacientes com LES foi de 87,5%, considerando-se a diluição de 1:80 como valor de referência. Uma redução da sensibilidade para 81,9% foi observada quando apenas os resultados do teste em título anormal ($\geq 1:160$) foram definidos como positivos.

Nos pacientes com DM/PM, o uso do valor de referência de 1:160 resultou numa queda da sensibilidade diagnóstica de 57,1% para 42,8%.

Análise da curva ROC

A análise da curva ROC demonstrou que o teste de FAN HEP-2 possui um bom desempenho para discriminar entre as doenças do grupo 1 e as doenças do grupo 2. A área sob a curva foi de 0,835 (IC95% 0,787 a 0,884; $p < 0,0001$), sendo que a diluição de 1:160 foi a que apresentou o melhor compromisso entre sensibilidade e especificidade.

A utilização da população de indivíduos saudáveis para a determinação do índice de falsos positivos do FAN HEP-2 re-

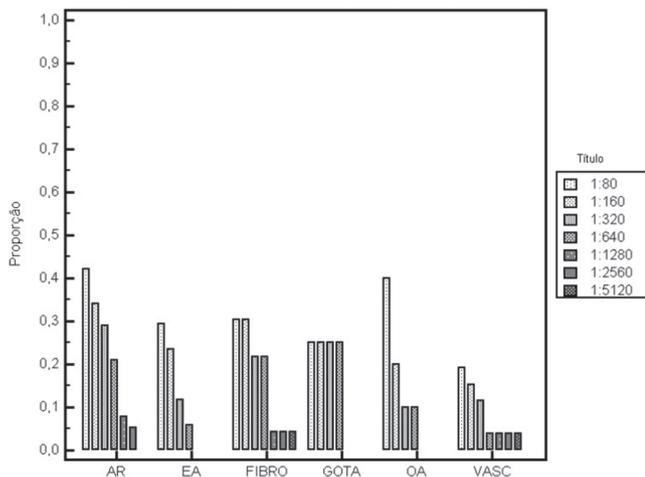


Figura 2 – Proporção de resultados positivos de FAN HEP-2 por doença do grupo 2, conforme o título. Proporção calculada como o número de resultados positivos considerando-se o respectivo título como o valor de corte do teste, dividido pelo número total de pacientes com a doença. AR, artrite reumatoide; EA, espondilite; FIBRO, fibromialgia, AO, osteoartrite; VASC, vasculite.

sultou em melhor desempenho diagnóstico do teste, com uma área sob a curva de 0,916 (IC 95% 0,872 a 0,961; $p < 0,0001$). Também nessa população a diluição de 1:160 foi a que apresentou o melhor compromisso entre sensibilidade e especificidade.

Como os títulos do FAN HEP-2 são um parâmetro importante para a interpretação dos resultados do teste, tendo em vista que os títulos elevados são mais frequentes em pacientes com DRAI, RV específicas para os diferentes títulos do FAN HEP-2 foram calculadas (tabela 4).

Discussão

O emprego da IFI HEP-2 como método de escolha para a pesquisa de FAN, a otimização dos kits comerciais para a detecção dos vários autoanticorpos de importância clínica e a evolução tecnológica dos microscópios resultaram em aumento significativo da sensibilidade do exame. Esses fatores, associados à utilização do teste por muitos médicos, com o objetivo de descartar o diagnóstico de DRAI em pacientes com sinais e sintomas inespecíficos, tiveram como consequência a redução da especificidade do FAN HEP-2, com a identificação de resultados positivos em uma proporção significativa de indivíduos sem evidência clínica de DRAI.^{2,3,5}

Vários estudos investigaram a frequência e a distribuição dos títulos e padrões de fluorescência do FAN HEP-2 em indivíduos saudáveis e na população geral.^{8,13,27-30} É importante salientar que foram utilizadas nestes estudos diferentes definições para classificar um indivíduo como saudável ou normal, bem como diferentes critérios de recrutamento.

A despeito dessas divergências conceituais, a frequência de FAN HEP-2 positivo na população saudável foi de 13,5%, similar à descrita por estudos realizados na população brasileira e em outras populações, utilizando diferentes critérios de seleção e definição de indivíduos saudáveis.^{8,13,27,28,29}

No estudo de Tan e cols. a frequência de resultados positivos do FAN HEP-2 em 125 indivíduos saudáveis, recrutados por quinze centros internacionais de referência na pesquisa de autoanticorpos, foi de 31,7% no título de 1:40, 13,3% no título de 1:80, 5% no título de 1:160 e 3,3% no título de 1:320.⁸

Por sua vez, Mariz e cols. consideraram como saudáveis apenas indivíduos sem evidência pregressa ou atual de DRAI,

Tabela 4 – Razões de verossimilhança positiva e negativa de diferentes títulos de FAN HEP-2, considerando-se como “não doentes” os pacientes do grupo 2 e a população saudável (IC95%)

Título	GRUPO 2		SAUDÁVEIS	
	RV+	RV-	RV+	RV-
1:80	2,73 (2,4-3,1)	0,18 (0,1-0,3)	6,5 (15,9-7,1)	0,14 (0,08-0,3)
1:160	3,12 (2,7-3,6)	0,24 (0,2-0,4)	20,67 (19,0-22,5)	0,19 (0,07-0,5)
1:320	3,84 (3,4-4,4)	0,31 (0,2-0,5)	18,85 (17,0-20,9)	0,26 (0,1-0,6)
1:640	3,99 (3,4-4,7)	0,5 (0,3-0,8)	36,26 (31,4-41,9)	0,43 (0,1-1,7)
1:1280	11,04 (9,2-13,2)	0,56 (0,2-1,3)		
1:2560	8,06 (6,1-10,6)	0,75 (0,3-2,0)		
1:5120	11,04 (7,8-15,6)	0,83 (0,2-3,3)		

RV+: número de resultados positivos nos pacientes do grupo 1 dividido pelo número de resultados falso-positivos nos pacientes do grupo 2 ou nos indivíduos saudáveis.

RV-: número de resultados falso-negativos nos pacientes do grupo 1 dividido pelo número de resultados negativos nos pacientes do grupo 2 ou nos indivíduos saudáveis.

infecção crônica e neoplasia, com sorologia negativa para HIV, hepatites B e C, e que não estivessem em uso regular de medicamentos glicocorticoides, imunossupressores, antimicrobianos ou anti-inflamatórios. De 918 indivíduos analisados, 13,3% apresentaram resultados positivos na diluição de 1:80, 7% na diluição de 1:160, 6% na diluição de 1:320, 4,4% na diluição de 1:640 e 2,1% nas diluições \geq 1:1280.¹³

Estudando uma amostra populacional etnicamente heterogênea de 4.754 indivíduos norte-americanos civis não institucionalizados com idade a partir de 12 anos, e sem empregar qualquer critério específico de recrutamento ou de exclusão, Satoh e cols. encontraram uma frequência de FAN HEP-2 de 13,8% na diluição de triagem de 1:80.²⁷

Fernandez e cols. investigaram 500 doadores de sangue brasileiros e encontraram as seguintes frequências de resultados positivos de FAN HEP-2: 22,6% na diluição de 1:40, 8% na diluição de 1:80, 3,4% na diluição de 1:160 e 1,4% nas diluições \geq 1:320.²⁸

De forma oposta aos resultados descritos acima, nenhum dos 100 indivíduos saudáveis doadores de sangue de etnia predominantemente caucasiana do estudo de Copple e cols. apresentou FAN HEP-2 positivo, na diluição de triagem de 1:40.³⁰

Tais discrepâncias na prevalência do FAN podem ser resultado tanto de fatores genético-ambientais e sociodemográficos quanto técnicos. Diferenças entre microscópios e reagentes comerciais, bem como a heterogeneidade na qualificação dos observadores, conferem elevada variabilidade interlaboratorial nos resultados da IFI HEP-2.^{31,32}

Ao contrário de outros estudos que demonstraram maior frequência de FAN HEP-2 positivo em indivíduos do gênero feminino e nos mais idosos, não encontramos diferenças na frequência de FAN HEP-2 nos indivíduos saudáveis, segundo o gênero ou a idade, dispensando, assim, a necessidade do uso de diluições de triagem específicas de acordo com essas variáveis.²⁶⁻²⁸

É possível que nossos achados possam ser explicados pelo pequeno número de indivíduos com FAN positivo, em cada gênero e extrato etário, limitando, portanto, o poder estatístico para a detecção de diferenças significativas entre os grupos, como também pela ausência de representantes septuagenários ou octogenários. Todavia, Mariz e cols. também não encontraram diferenças significativas na prevalência de FAN de acordo com o gênero ou a idade.¹³

Uma pequena proporção de indivíduos saudáveis (18 voluntários, 14,3%) foi constituída por profissionais da área de saúde, como médicos, técnicos de laboratório e técnicos de enfermagem. A despeito de alguns estudos sugerirem que esse perfil ocupacional constitui fator de risco para a presença de anticorpos anti-dsDNA ou de FAN HEP-2 em títulos altos, em especial para aqueles que manipulam amostras de sangue de pacientes com LES, apenas dois indivíduos desse subgrupo apresentaram o teste positivo, o que torna improvável que o recrutamento desse perfil de voluntários saudáveis tenha resultado em algum tipo de bias.^{8,29,33}

A distribuição dos padrões de fluorescência e dos títulos do FAN HEP-2 foi similar à descrita por Mariz e cols.¹³ A única exceção foi a ocorrência do padrão de fluorescência nuclear pontilhado centromérico em um indivíduo saudável, o qual, naquele estudo, foi observado exclusivamente em pacientes com DRAI.

Seguindo a determinação do ACR e do SLICC, e adotando as diretrizes do CLSI para a definição de intervalos de referência no laboratório clínico, o presente estudo estabeleceu a diluição de 1:160 como o título anormal ou o valor de referência do FAN HEP-2.^{6,25} Empregando-se essa diluição como valor de referência do teste, a frequência de FAN em títulos anormais nos pacientes com LES foi de 81,9%. Frequências ainda mais baixas de FAN HEP-2 em títulos anormais, como 76,0%, podem ser observadas nos pacientes com LES estabelecido.²⁶

Além de não sacrificar a sensibilidade diagnóstica do exame, a utilização da diluição de 1:160 para a triagem inicial de autoanticorpos produziu uma redução de 53,0% no número de resultados positivos de FAN HEP-2 na população saudável. Podemos enumerar como prováveis benefícios do aumento da especificidade do teste a diminuição do número de diagnósticos incorretos e de prescrições terapêuticas potencialmente deletérias para o paciente, bem como a redução da solicitação de exames complementares adicionais e de encaminhamentos desnecessários para o reumatologista.

Não só a diluição de triagem do teste, como também a forma como os pacientes são recrutados, pode influenciar a frequência de FAN positivo.^{26,34} Fizemos uma avaliação transversal de pacientes com LES estabelecido, compreendendo um grupo heterogêneo em relação à atividade e à duração da doença, à composição étnica e ao uso de corticosteroides e imunossupressores. Nesse sentido, é importante salientar que todos os pacientes com LES e FAN HEP-2 positivo apenas na diluição de 1:80 estavam com a doença em remissão.

Pelo estudo da curva ROC, o valor de corte ótimo do FAN HEP-2 para ambos os grupos de comparação avaliados (grupo 2 e indivíduos saudáveis) foi definido como a diluição de 1:160. Beck e cols. analisaram pela curva ROC os resultados de FAN HEP-2 de 47 pacientes com diagnóstico de LES e 27 portadores de outras doenças autoimunes, e também verificaram a diluição de 1:160 como o valor de corte ótimo do teste.³⁵ Contudo, naquele estudo a utilização da diluição de 1:160 como valor de corte foi associada à redução significativa da sensibilidade diagnóstica do FAN HEP-2 para o LES.³⁵ Por outro lado, no estudo de Tan e cols. somente a diluição de 1:160 foi capaz de discriminar adequadamente entre indivíduos normais e pacientes com ES, LES e SS, com sensibilidades de 87,0%, 95,0% e 74,0%, respectivamente, e especificidade de 95%.

Existe grande variabilidade na literatura quanto à diluição de triagem a ser utilizada no teste do FAN HEP-2, com alguns autores sugerindo a diluição de 1:40 e outros sugerindo as diluições 1:80 e 1:160.⁸⁻¹² Entretanto, todos recomendam que somente títulos \geq 1:160 devam ser considerados positivos ou relevantes do ponto de vista diagnóstico, devido ao seu maior valor preditivo positivo para DRAI e para a presença de autoanticorpos específicos. Os títulos \leq 1:80 são considerados indeterminados, pois geralmente não possuem importância diagnóstica e não estão associados à presença de autoanticorpos específicos (anti-dsDNA e anti-ENA).⁸⁻¹²

Por se tratar de um exame destinado ao rastreamento de autoanticorpos, resultados positivos do FAN HEP-2 devem ser complementados pela solicitação dos autoanticorpos específicos. Há uma associação bem definida entre os títulos de FAN HEP-2 e a probabilidade da presença de autoanticorpos

específicos.^{11,12} Nesse sentido, González e cols. sugeriram o título de 1:160 como a diluição de triagem ideal do FAN HEP-2, visto que o mesmo possui maior valor preditivo positivo para a presença de anticorpos anti-dsDNA e anti-ENA quando comparado com as diluições mais baixas, e sem comprometer a sensibilidade do teste para o diagnóstico do LES.¹²

Na população saudável o valor de corte de 1:80 foi associado com RV+ > 5, que classifica um teste diagnóstico como muito útil. Entretanto, somente a partir da diluição de 1:160 foi obtida RV positiva > 10, considerada capaz de modificar significativamente a probabilidade pós-teste de doença.³⁶ Na população de indivíduos com outras doenças reumáticas, somente a diluição de 1:1280 foi associada a uma RV positiva > 5. Em ambas as populações, títulos abaixo de 1:160 apresentaram RV negativa < 0,2, considerada muito útil para excluir o diagnóstico de DRAI.

Nosso estudo possui algumas limitações. Nós avaliamos apenas pacientes com diagnóstico estabelecido de DRAI. Contudo, exceto no LES, o perfil imunológico da maioria dos pacientes com ES, DITC, DM/PM e SS tende a ser estável ao longo do tempo.³⁷⁻³⁹

Os resultados de nosso trabalho foram obtidos com a lâmina de apenas um fabricante. Ainda que a frequência de resultados positivos na população saudável tenha sido similar à de estudos que utilizaram lâminas de outros fabricantes ou *in house*, existem diferenças qualitativas importantes entre as lâminas HEP-2 comerciais.^{8,13,27-29}

Resultado da falta de padronização no que diz respeito às condições de cultura celular, tipo de fixador utilizado (acetona, álcool/acetona), características do conjugado (polivalente ou IgG específico, razão fluoresceína/proteína) etc. tais diferenças produzem inconsistências importantes na reprodução do título e do padrão de fluorescência quando se analisa a mesma amostra de soro em lâminas de fabricantes diferentes (mesmo utilizando-se um único microscópio e observador).⁴⁰

Por fim, outros fatores de ordem técnica, como o microscópio, a potência da lâmpada e a experiência do observador, também contribuem para a grande variabilidade interlaboratorial do exame de FAN HEP-2.^{31,32} Logo, nossas conclusões não podem ser extrapoladas para outros laboratórios, sendo aconselhável que cada laboratório estabeleça o título anormal de FAN analisando indivíduos saudáveis provenientes da população local e utilizando seus próprios instrumentos.

Concluindo, a diluição de 1:160 foi definida como o título anormal de FAN HEP-2 e o valor de corte ótimo do teste. Sendo assim, é importante ressaltar que, em situações em que o FAN for solicitado fora de contexto clínico, com o principal objetivo de excluir a presença de DRAI em pacientes com sinais e sintomas clínicos inespecíficos, como tem ocorrido no cenário atual da prática médica, e devido à alta frequência de resultados positivos em indivíduos saudáveis, o valor de referência de 1:160 traria como benefício uma redução importante da frequência de resultados “falso-positivos” sem perda significativa da sensibilidade diagnóstica.

Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

REFERÊNCIAS

- Solomon DH, Kavanaugh AJ, Schur PH. Evidence-based guidelines for the use of immunologic tests: antinuclear antibody testing. *Arthritis Rheum* 2002;47:434-444.
- Kavanaugh A, Tomar R, Reveille J, Solomon DH, Homburger HA: Guidelines for clinical use of the antinuclear antibody test and tests for specific autoantibodies to nuclear antigens. *American College of Pathologists. Arch Pathol Lab Med* 2000;124: 71-81.
- Dellavance A, Júnior AG, Nuccitelli B, Taliberti BH, von Muhlen CA, Bichara CDA, et al. 3º Consenso Brasileiro para pesquisa de autoanticorpos em células HEP-2 (FAN). Recomendações para padronização do ensaio de pesquisa de autoanticorpos em células HEP-2, controle de qualidade e associações clínicas. *Rev Bras Reumatol* 2009;49:89-98.
- Meroni PL, Schur PH. ANA screening: an old test with new recommendations. *Ann Rheum Dis* 2010;69(8):1420-2.
- Dellavance A, Leser PG, Andrade LEC. Análise crítica do teste de anticorpos antinúcleo (FAN) na prática clínica. *Rev Bras Reumatol* 2007;47:265-275.
- Hochberg MC, for the Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee of the American College of Rheumatology. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus [letter]. *Arthritis Rheum* 1997;40:1725.
- Petri M, Orbai AM, Alarcón GS, Gordon C, Merrill JT, Fortin PR, et al. Derivation and validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics classification criteria for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2012;64:2677-86.
- Tan EM, Feltkamp TE, Smolen JS, Butcher B, Dawkins R, Fritzler MJ et al. Range of antinuclear antibodies in "healthy" individuals. *Arthritis Rheum* 1997;40:1601-11.
- Tozzoli R, Bizzaro N, Tonutti E, Villalta D, Bassetti D, Manoni F et al. Italian Society of Laboratory Medicine Study Group on the Diagnosis of Autoimmune Diseases. Guidelines for the laboratory use of autoantibody tests in the diagnosis and monitoring of autoimmune rheumatic diseases. *Am J Clin Pathol* 2002;117:316-24.
- Sack U, Conrad K, Csernok E, Frank I, Hiepe F, Krieger T et al. Autoantibody detection using indirect immunofluorescence on HEP-2 cells. *Ann NY Acad Sci* 2009; 1173:166-73.
- Bonaguri C, Melegari A, Ballabio A, Parmeggiani M, Russo A, Battistelli L et al. Italian multicentre study for application of a diagnostic algorithm in autoantibody testing for autoimmune rheumatic disease: Conclusive results. *Autoimmun Rev* 2011;11:1-5.
- González DA, León AC, Varela AR, García MG, Rahola Mde S, Pérez Mdel C et al. Autoantibody detection with indirect immunofluorescence on HEP-2 cells: starting serum dilutions for systemic rheumatic diseases. *Immunol Lett* 2011;140:30-5.
- Mariz HA, Sato EI, Barbosa SH, Rodrigues SH, Dellavance A, Andrade LE. Pattern on the antinuclear antibody-HEP-2 test is a critical parameter for discriminating antinuclear antibody-positive healthy individuals and patients with autoimmune rheumatic diseases. *Arthritis Rheum* 2011;63:191-200.
- Vitali C, Bombardieri S, Jonsson R, Moutsopoulos HM, Alexander EL, Carsons SE et al. Classification criteria for Sjogren's syndrome: a revised version of the European criteria proposed by the American-European Consensus Group. *Ann Rheum Dis* 2002;61:554-558.
- Subcommittee for Scleroderma Criteria of the American Rheumatism Association Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee. Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). *Arthritis Rheum* 1980;23:581-590.

16. Bohan A, Peter JB. Polymyositis and dermatomyositis (first of two parts). *N Engl J Med* 1975;292:344-347.
17. Bohan A, Peter JB. Polymyositis and dermatomyositis (second of two parts). *N Engl J Med* 1975;292:403-407.
18. Amigues JM, Cantagrel A, Abbal M & Mazieres B. Comparative study of 4 diagnosis criteria sets for mixed connective tissue disease in patients with anti-RNP antibodies. *Autoimmunity Group of the Hospitals of Toulouse. J Rheumatol* 1996; 23: 2055-2062.
19. Mosca M, Neri R & Bombardieri S. Undifferentiated connective tissue diseases (UCTD): a review of the literature and a proposal for preliminary classification criteria. *Clin Exp Rheumatol* 1999; 17: 615-620.
20. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988;31:315-324.
21. Wolfe F, Smythe HA, Yunus MB, Bennett RM, Bombardier C, Goldenberg DL, et al. The American College of Rheumatology 1990 Criteria for the Classification of Fibromyalgia. Report of the Multicenter Criteria Committee. *Arthritis Rheum* 1990;33:160-72.
22. Dougados M, van der Linden S, Juhlin R, Huitfeldt B, Amor B, Calin A, et al. The European Spondyloarthropathy Study Group preliminary criteria for the classification of spondyloarthropathy. *Arthritis Rheum* 34:1218-1227, 1991.
23. Jennette JC, Falk RJ, Andrassy K, Bacon PA, Churg J, Gross WL, et al. Nomenclature of systemic vasculitides: Proposal of an international consensus conference. *Arthritis Rheum* 1994; 37:187-192.
24. Rudwaleit M, van der Heijde D, Landewé R, Akkoc N, Brandt J, Chou CT, et al. The Assessment of SpondyloArthritis International Society classification criteria for peripheral spondyloarthritis and for spondyloarthritis in general. *Ann Rheum Dis* 2011;70:25-31.
25. Defining, Establishing, and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory; Approved Guideline—Third Edition. CLSI document C28-A3. Wayne, PA; 2008.
26. Sjöwall C, Sturm M, Dahle C, Bengtsson AA, Jönsen A, Sturfelt G, et al. Abnormal antinuclear antibody titers are less common than generally assumed in established cases of systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 2008;35:1994-2000.
27. Satoh M, Chan EK, Ho LA, Rose KM, Parks CG, Cohn RD, et al. Prevalence and sociodemographic correlates of antinuclear antibodies in the United States. *Arthritis Rheum*. 2012;64:2319-27.
28. Fernandez SA, Lobo AZ, Prado de Oliveira ZN, Fukumori LM, Perigo AM, Rivitti EA. Prevalence of antinuclear autoantibodies in the serum of normal blood donors. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo*. 2003;58:315-9.
29. Marin GG, Cardiel MH, Cornejo H, Viveros ME. Prevalence of antinuclear antibodies in 3 groups of healthy individuals: blood donors, hospital personnel, and relatives of patients with autoimmune diseases. *J Clin Rheumatol*. 2009; 15:325-9.
30. Copple SS, Sawitzke AD, Wilson AM, Tebo AE, Hill HR. Enzyme-linked immunosorbent assay screening then indirect immunofluorescence confirmation of antinuclear antibodies: a statistical analysis. *Am J Clin Pathol* 2011;135:678-84.
31. Nossent H, Rekvig OP. Antinuclear antibody screening in this new millennium: farewell to the microscope? *Scand J Rheumatol* 2001;30:123-126.
32. Pham BN, Albareda S, Guyard A, Burg E, Maisonneuve P. Impact of external quality assessment on antinuclear antibody detection performance. *Lupus* 2005;14:113-9.
33. Zarmbinski MA, Messner RP, Mandel JS. Anti-dsDNA antibodies in laboratory workers handling blood from patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol*. 1992;19:1380-4.
34. Ippolito A, Wallace DJ, Gladman D, Fortin PR, Urowitz M, Werth V, et al. Autoantibodies in systemic lupus erythematosus: comparison of historical and current assessment of seropositivity. *Lupus* 2011;20:250-5.
35. Beck ST, Silva JCN, Schimit S, Fleck J, Santos RS. Taxa de probabilidade como guia de interpretação do FAN-HEp-2 na pesquisa de autoanticorpos no lúpus eritematoso sistêmico. *J Bras Patol Med Lab* 2009;45:275-283.
36. American College of Rheumatology Ad Hoc Committee on Immunologic Testing Guidelines. Guidelines for immunologic laboratory testing in the rheumatic diseases: an introduction. *Arthritis Care Res* 2002;47:429-33.
37. Love LA, Leff RL, Fraser DD, Targoff IN, Dalakas M, Plotz PH, et al. A new approach to the classification of idiopathic inflammatory myopathy: myositis-specific autoantibodies define useful homogeneous patient groups. *Medicine (Baltimore)* 1991; 70:360-74.
38. Mosca M, Tani C, Neri C, Baldini C, Bombardieri S. Undifferentiated connective tissue diseases (UCTD). *Autoimmun Rev* 2006;6:1-4.
39. Ramos-Casals M, Solans R, Rosas J, Camps MT, Gil A, Del Pino-Montes J, et al. GEMESS Study Group. Primary Sjögren syndrome in Spain: clinical and immunologic expression in 1010 patients. *Medicine (Baltimore)* 2008;87:210-9.
40. Copple SS, Giles SR, Jaskowski TD, Gardiner AE, Wilson AM, Hill HR. Screening for IgG antinuclear autoantibodies by HEp-2 indirect fluorescent antibody assays and the need for standardization. *Am J Clin Pathol*. 2012;137:825-30.