



Sociedad Española
de Reumatología -
Colegio Mexicano
de Reumatología

Reumatología Clínica

www.reumatologiaclinica.org



Original

Asociación entre títulos de anticuerpos antinucleares y conectivopatías sistémicas en una Unidad de Reumatología



Raúl Menor Almagro^{a,*}, Juan Francisco Rodríguez Gutiérrez^b, María Auxiliadora Martín-Martínez^c,
María José Rodríguez Valls^a, Concepción Aranda Valera^a y José Luís de la Iglesia Salgado^a

^a Sección de Reumatología, Hospital General de Jerez, Jerez de la Frontera, España

^b Servicio de Hematología, Hospital General de Jerez, Jerez de la Frontera, España

^c Unidad de Investigación, Sociedad Española de Reumatología, Madrid, España

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 12 de junio de 2015

Aceptado el 30 de marzo de 2016

On-line el 22 de mayo de 2016

Palabras clave:

Anticuerpos antinucleares

Inmunofluorescencia indirecta

Títulos de dilución

Conectivopatías

R E S U M E N

Objetivo: Determinar los niveles en los títulos de anticuerpos antinucleares (ANA) observados por inmunofluorescencia indirecta en sustrato de célula HEP-2, y su asociación con el diagnóstico de enfermedad del tejido conectivo sistémica en las pruebas solicitadas por una Unidad de Reumatología.

Método: Se seleccionaron muestras de pacientes que acudían por primera vez a consulta de reumatología, sin prueba de ANA previa, durante el periodo comprendido entre enero de 2010 y diciembre de 2012. Se registró el título de dilución, patrón y especificidad antigénica. En enero de 2015 se valoraron los diagnósticos de los pacientes y se clasificaron en conectivopatías sistémicas (lupus eritematoso sistémico, síndrome de Sjögren, esclerosis sistémica, conectivopatía indiferenciada, síndrome antifosfolípido, enfermedad mixta del tejido conectivo y miopatía inflamatoria) o no conectivopatía sistémica.

Resultado: De un total de 1.282 pruebas solicitadas por la Unidad de Reumatología en sujetos sin estudio previo 293 resultaron positivas, predominando las mujeres (81,9%). Con conectivopatía sistémica se registraron 105 pacientes y 188 sin conectivopatía. En diluciones 1/640 el valor predictivo positivo en las conectivopatías fue de 73,3% frente al 26,6% de las no conectivopatías, y para valores $\geq 1/1.280$, 85% frente al 15% respectivamente. Al realizar el análisis multivariante se observó una asociación positiva entre las diluciones 1/320 OR 3,069 (IC 95%: 1,237-7,614; $p=0,016$), 1/640 OR 12,570 (IC 95%: 3,659-43,187; $p=0,000$) y $\geq 1/1.280$ OR 42,136 (IC 95%: 8,604-206,345; $p=0,000$).

Conclusión: Estos resultados muestran asociación de títulos de dilución $\geq 1/320$ para la primera prueba de ANA realizada en una Unidad de Reumatología con pacientes con conectivopatía sistémica. El VPP en estos pacientes resultó superior a estudios previos desarrollados por otras especialidades médicas. Esto puede indicar la importancia de una solicitud de la prueba de forma dirigida.

© 2016 Elsevier España, S.L.U. y

Sociedad Española de Reumatología y Colegio Mexicano de Reumatología. Todos los derechos reservados.

Association between antinuclear antibody titers and connective tissue diseases in a Rheumatology Department

A B S T R A C T

Objective: To determine the dilution titles at antinuclear antibodies (ANA) by indirect immunofluorescence observed in cell substrate HEP-2 and its association with the diagnosis of systemic connective tissue disease in ANA test requested by a Rheumatology Unit.

Method: Samples of patients attended for the first time in the rheumatology unit, without prior ANA test, between January 2010 and December 2012 were selected. The dilution titers, immunofluorescence patterns and antigen specificity were recorded. In January 2015 the diagnosis of the patients were evaluated and classified in systemic disease connective tissue (systemic lupus erythematosus, Sjögren's syndrome, systemic sclerosis, undifferentiated connective, antiphospholipid syndrome, mixed connective tissue and inflammatory myopathy) or not systemic disease connective tissue.

Keywords:

Antinuclear antibodies

Indirect immunofluorescence

Dilution titres

Systemic connective

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: menoralmagro@hotmail.com (R. Menor Almagro).

Result: A total of 1282 ANA tests requested by the Rheumatology Unit in subjects without previous study, 293 were positive, predominance of women (81.9%). Patients with systemic connective tissue disease were recorded 105, and 188 without systemic connective tissue disease. For 1/640 dilutions the positive predictive value in the connective was 73.3% compared to 26.6% of non-connective, and for values $\geq 1/1,280$ 85% versus 15% respectively. When performing the multivariate analysis we observed a positive association between 1/320 dilution OR 3.069 (95% CI: 1.237-7.614; $P = .016$), 1/640 OR 12.570 (95% CI: 3.659-43.187; $P = .000$) and $\geq 1/1,280$ OR 42.136 (95% CI: 8.604-206.345; $P = .000$).

Conclusion: These results show association titles dilution $\geq 1/320$ in ANA's first test requested by a Rheumatology Unit with patients with systemic connective tissue disease. The VPP in these patients was higher than previous studies requested by other medical specialties. This may indicate the importance of application of the test in a targeted way.

© 2016 Elsevier España, S.L.U. and Sociedad Española de Reumatología y Colegio Mexicano de Reumatología. All rights reserved.

Introducción

Los anticuerpos antinucleares (ANA) son inmunoglobulinas dirigidas contra componentes autólogos del núcleo y citoplasma celular¹. La prueba de ANA resulta de gran importancia en el diagnóstico de enfermedades autoinmunes sistémicas y órgano-específicas, y ofrece información sobre el curso clínico y las complicaciones de la enfermedad, pudiendo presentarse desde años antes de la aparición de los síntomas².

La técnica estándar oro para la detección de ANA es la inmunofluorescencia indirecta (IFI)^{3,4}. Su utilidad se ha incrementado progresivamente desde que en 1957 se usaron anticuerpos marcados con fluorocromo, para demostrar que el suero de pacientes con lupus eritematoso sistémico (LES) contenía anticuerpos que producían fluorescencia nuclear homogénea en tejidos humanos⁵. Actualmente se utilizan como sustrato células HEP-2 (línea celular epitelial humana obtenida de carcinoma de laringe), que presenta ventajas frente a los sustratos utilizados tradicionalmente (como hígado y riñón de roedores) al expresar antígenos presentes en todas las fases del ciclo celular⁶.

Se han detectado aproximadamente 100 autoanticuerpos diferentes, describiéndose más de 35 patrones por inmunofluorescencia, algunos de los cuales son antígenos específicos. Los patrones más comunes son el homogéneo, moteado fino, moteado grueso, nucleolar, citoplasmático y centromérico. Como patrones menos comunes existen pleomórfico, múltiples puntos nucleares (MND), centrosoma, NuMA y membrana nuclear, aunque con frecuencia en el suero de determinados pacientes podemos encontrar diferentes autoanticuerpos que resultan en patrón mixto¹. El título de la concentración de ANA se obtiene tras diluciones sucesivas, con regulador de fosfato, de suero del paciente fijado al sustrato células HEP-2, al que se le añade un anticuerpo policlonal contra inmunoglobulinas humanas marcado con fluoresceína⁷. Aunque cada laboratorio debe establecer su propio punto de corte, se recomienda realizar la prueba de cribado con una dilución $> 1/160$ ^{8,9}.

Una de las grandes limitaciones de la IFI es su falta de especificidad, con un valor predictivo positivo (VPP) bajo. En la población general la prueba de ANA resulta positiva hasta un 25-30% según distintos estudios, la mayoría a títulos bajos, aunque un 5% pueden presentar títulos $> 1/160$ ^{10,11}. Esta prueba se encuentra positiva con mayor frecuencia en personas mayores de 65 años (con predominio en mujeres) y en pacientes con infecciones, síndromes neurológicos paraneoplásicos, enfermedades hepáticas, síndrome de fatiga crónica y neoplasias^{1,12}. El valor predictivo negativo de la prueba sí es elevado en determinadas conectivopatías, entre las que encontramos principalmente el LES, síndrome de Sjögren, esclerosis sistémica y miopatía inflamatoria. Actualmente es una técnica de uso común en los laboratorios de inmunología, que permite predecir, diagnosticar y determinar la actividad de muchas enfermedades^{2,8-10}.

Por este motivo, se propone un estudio con el objetivo de determinar los niveles en los títulos de ANA observados por IFI en la primera muestra solicitada a un paciente por la Unidad de Reumatología de nuestro hospital, y estudiar su asociación con el diagnóstico de enfermedad del tejido conectivo sistémica, los distintos patrones observados y las especificidades antigénicas.

Material y método

Diseño

Estudio prospectivo de muestras sanguíneas de pacientes remitidas a un hospital de segundo nivel para determinar la asociación entre los títulos de ANA y el desarrollo de enfermedad sistémica del tejido conectivo.

Sujetos y muestras

Se seleccionaron las muestras recibidas en el Departamento de Inmunología del Servicio de Hematología del Hospital de Jerez y solicitadas desde la Unidad de Reumatología entre enero del 2010 y diciembre del 2012, pertenecientes a sujetos sin diagnóstico clínico a los que no se hubiera realizado con anterioridad la prueba de ANA. Nuestro hospital es un centro de segundo nivel con 550 camas y una Sección de Reumatología que atiende a una población de 450.000 personas, con una media de valoración en consultas externas de 1.550 pacientes al mes, actividad desarrollada por seis reumatólogos.

Estudios de laboratorio

Se recogió la primera muestra y se registraron los resultados positivos y negativos de la prueba. Las muestras fueron analizadas por IFI mediante sustrato de la línea celular HEP-2 (Euroimmun, Alemania), y se registró su nivel de titulación y patrón. Para aquellos pacientes con ANA a títulos mayores a 1/40 se realizaron diluciones a 1/80, 1/160, 1/320, 1/640 y 1/1.280. Cuando la muestra presentó mitosis positivas en las células Hep2, se realizó la prueba de cribado para la presencia de anticuerpos frente a dsDNA, mediante IFI en *Crithidia luciliae* (Euroimmun, Alemania). Si esta era positiva, se cuantificaba la titulación por quimioluminiscencia (Menarini, Italia). Por otra parte, en todos los casos positivos para el ANA se les aplicó el test ENAs por inmunoblot, mediante el kit comercial EUROLINE ANA Profile 5 (IgG) (Euroimmun, Alemania). Este kit proporciona un ensayo cualitativo in vitro para autoanticuerpos humanos de la clase IgG frente a 18 antígenos diferentes: RNP-70, RNP-A, RNP-C, Ro-52, Ro-60, La/SSB, Scl-70, Sm, complejo U1-Nrnp, nucleosoma, Jo-1, Pm-Scl, CENP B, PCNA, dsDNA de doble cadena, histonas, P-proteína ribosomal y Mi-2 en suero o plasma (sensibilidad y especificidad de los principales antígenos mostrados en la

Tabla 1
Sensibilidad y especificidad de los principales anticuerpos determinados mediante inmunoblot con el kit Euroline ANA de Euroimmun

| Anticuerpo | Sensibilidad % | Especificidad % |
|-------------------|----------------|-----------------|
| Anti-RNP | 100 | 98 |
| Anti-Sm | 93 | 99 |
| Anti-SSA | 90 | 99 |
| Anti-Ro52 | 97 | 92 |
| Anti-La | 68 | 100 |
| Anti-Scl70 | 99 | 99 |
| Anti-Jo1 | 77 | 100 |
| Anti-centromérico | 91 | 99 |
| Anti-ribosomal P | 95 | 98 |
| Anti-dsDNA | 89,3 | 98,2 |

tabla 1). Las pruebas inmunológicas fueron analizadas por un solo inmunólogo entrenado en IFI y pruebas de enzimoimmunoensayo.

Variables y definiciones operativas

Se recogieron variables sociodemográficas (edad y sexo), de diagnóstico, título de dilución, patrón por IFI y especificidades antigénicas de estos pacientes con resultado de su primera prueba positivo.

El diagnóstico clínico de los pacientes se revisó en febrero del 2015, con un mínimo de dos años desde la determinación analítica. Para ello se utilizó el programa informático de historias clínicas Diraya, implantado en el Sistema Andaluz de Salud. Se clasificaron los pacientes en dos grupos en función de si habían desarrollado enfermedad sistémica del tejido conectivo o no. La clasificación de enfermedades del tejido conectivo se basó en el abordaje clásico de la *American College of Rheumatology* adaptado a la actualidad, y que se usa en gran parte de los manuales de nuestra especialidad¹³. Se consideraron conectivopatías sistémicas: LES, síndrome de Sjögren, esclerosis sistémica, conectivopatía indiferenciada, síndrome antifosfolípido, enfermedad mixta del tejido conectivo y miopatía inflamatoria. Esta información fue registrada de forma retrospectiva por cuatro reumatólogos de la Unidad de Reumatología del Hospital de Jerez, utilizando las mismas definiciones y entrenados en la recogida de datos de las historias clínicas.

Análisis estadístico

Se realizó un análisis descriptivo de las variables cualitativas expresándose en frecuencias absolutas y relativas, y de las variables cuantitativas con distribución normal mediante media y desviación estándar, mientras que aquellas que no siguieron una distribución normal se expresaron en medianas y rango intercuartílico (RI: p25-p75). La edad se analizó como variable cuantitativa y cualitativa estableciendo como punto de corte 65 años. Para la valoración de la distribución normal se desarrolló el test de Kolmogorov-Smirnov.

Se realizó un análisis estratificado, según presentara diagnóstico clínico de conectivopatía sistémica o no, utilizando la prueba de chi cuadrado para la comparación entre variables cualitativas de los grupos como los tipos de patrones por IFI y los distintos anticuerpos en tablas de 2 × 2. La media de edad entre los grupos se calculó mediante la t de Student.

Para analizar la asociación entre los títulos de ANA y el desarrollo de conectivopatía sistémica se construyó un modelo de regresión logística para calcular la odds ratio (OR), junto con el intervalo de confianza al 95% (IC 95%) ajustado por potenciales factores de confusión. La variable dependiente fue conectivopatía (sí/no) y las variables independientes se seleccionaron según criterio clínico y criterio estadístico a partir de aquellas con un valor de $p < 0,20$ en el análisis bivariante. El modelo final se ajustó por todas las potenciales variables confusoras, explorándose la multicolinealidad entre

ellas. La precisión del modelo fue analizada mediante el área bajo la curva ROC.

Todos los test fueron desarrollados por el programa estadístico SPSS versión 16, asumiendo una significación estadística de $p < 0,05$.

Resultados

El Departamento de Inmunología recibió un total de 9.478 muestras en este periodo, de las cuales un 25,5% (2.426) fueron solicitadas por la Unidad de Reumatología, con un 39,7% (965) de resultados positivos que correspondían a 576 pacientes (85% mujeres).

Las muestras pertenecientes a pacientes que acudían por primera vez a valoración en consulta de reumatología y que no tenían prueba de ANA previa resultaron un total de 1.282. De ellas, 293 (22,8%) presentaron un resultado positivo, con predominio de mujeres (81,9%) y con una media de edad de $47,02 \pm 16,7$ años, 247 (84,8%) menores de 65 años.

En la distribución por patologías de estas primeras muestras positivas de nuestros pacientes, 105 (35,9%) se clasificaron en el grupo de conectivopatías sistémicas y 188 (64,1%) fueron pacientes sin estas enfermedades. Dentro del grupo de conectivopatías sistémicas los principales diagnósticos resultaron: LES en 38 pacientes con VPP de 12,9%, seguido del síndrome de Sjögren en 29 (VPP 9,8%), esclerosis sistémica en 17 (VPP 5,8%), y conectivopatía indiferenciada en 14 (VPP 4,7%). Dentro del grupo de pacientes sin conectivopatías sistémicas las principales patologías que encontramos fueron: 26 pacientes con artritis reumatoide (2 asociada a síndrome de Sjögren), 14 espondiloartropatías (10 artropatías psoriásicas), 13 fibromialgias, 10 artrosis, 9 lupus discoides y 5 microcristalinas. En el momento de revisión de los diagnósticos, 10 pacientes se encontraban en estudio y 30 pacientes no tenían ninguna enfermedad reumática.

Los principales patrones observados en sujetos sin este grupo de conectivopatías fueron el homogéneo (44,6%), seguido del moteado fino (34,6%), y en pacientes con conectivopatías sistémicas, el moteado fino (44,7%) y el homogéneo (28,5%). No se observó ningún sujeto con patrón moteado grueso ni PCNA. Las principales especificidades antigénicas fueron anti-Ro52, anti-Ro60, anti-dsDNA y anti-La, sin positividad para topoisomerasa, anti-Jo1, ni antimúsculo liso (tabla 2).

En el análisis del VPP de las distintas patologías según su nivel de titulación se observó un valor más elevado en pacientes con diagnóstico de enfermedades sistémicas del tejido conectivo. Así, para titulaciones 1/640 el grupo de las conectivopatías presentó un VPP de 73,3%, frente al 26,6% de las no conectivopatías, y para $\geq 1/1.280$ un VPP de 85% y 15% respectivamente, diferencias que se mantuvieron al desglosar los sujetos por edades (tabla 3).

Al realizar el análisis multivariante se observó una asociación positiva entre las enfermedades sistémicas del tejido conectivo y las diluciones 1/320 OR 3,069 (IC 95%: 1,237-7,614; $p = 0,016$); 1/640 OR 12,570 (IC 95%: 3,659-43,187; $p = 0,000$), y $\geq 1/1.280$ OR 42,136 (IC 95%: 8,604-206,345; $p = 0,000$) (tabla 4). La evaluación discriminativa de la prueba diagnóstica mediante el área bajo la curva ROC presentó un valor de 0,749.

Discusión

Los hallazgos obtenidos en este trabajo muestran asociación entre la presencia de patologías reumatológicas clasificadas dentro del grupo de las conectivopatías sistémicas y los niveles más altos de titulaciones de la prueba de ANA positiva ya desde su primer análisis, en comparación con el grupo de pacientes sin este tipo de enfermedad.

Tabla 2
Características demográficas e inmunológicas de los pacientes incluidos en el estudio

| | No conectivopatías sistémicas | | Conectivopatías sistémicas | | p |
|-------------------------|-------------------------------|-------|----------------------------|-------|-------|
| | n | VPP % | n | VPP % | |
| <i>Pacientes</i> | 188 | 64,10 | 105 | 35,80 | |
| <i>Edad media, años</i> | 46,5 (DE ± 18,2) | | 47,9 (DE ± 13,8) | | 0,455 |
| < 65 | 154 | 62,30 | 93 | 37,60 | |
| ≥ 65 | 32 | 72,70 | 12 | 27,20 | |
| <i>Sexo</i> | | | | | |
| Mujeres | 146 | 60,80 | 94 | 39,10 | 0,011 |
| Hombres | 42 | 79,20 | 11 | 20,70 | |
| <i>Patrón IFI</i> | | | | | |
| Homogéneo | 84 | 73,6 | 30 | 26,4 | 0,007 |
| Moteado fino | 65 | 58,0 | 47 | 42 | 0,85 |
| Citoplasmático | 9 | 75,0 | 3 | 25 | 0,424 |
| Nucleolar | 18 | 69,2 | 8 | 30,8 | 0,572 |
| Centromérico | 6 | 37,5 | 10 | 62,5 | 0,022 |
| Nuclear dots | 3 | 50,0 | 3 | 50 | 0,465 |
| Membrana nuclear | 1 | 25,0 | 3 | 75 | 0,1 |
| Mixto | 1 | 50,0 | 1 | 50 | 0,675 |
| Ciclo celular | 1 | 100 | 0 | 0 | 0,454 |
| <i>Anticuerpos</i> | | | | | |
| Anti-Ro52 | 4 | 10 | 40 | 90 | 0 |
| Anti-Ro60 | 1 | 2,8 | 34 | 23,7 | 0 |
| Anti-La | 0 | 0 | 14 | 100 | 0 |
| Anti-Dna | 3 | 17,6 | 14 | 82,4 | 0 |
| Anti-Sm B | 0 | 0 | 5 | 100 | 0,002 |
| Anti-Sm D | 0 | 0 | 3 | 100 | 0,19 |
| Anti-RNP 70 | 0 | 0 | 6 | 100 | 0,001 |
| Anti-RNPA | 0 | 0 | 6 | 100 | 0,001 |
| Anti-RNPC | 0 | 0 | 6 | 100 | 0,001 |
| Anti-ribosomal P | 0 | 0 | 1 | 100 | 0,456 |
| Anti-centromérico | 4 | 50 | 8 | 50 | 0,022 |
| Anti-histonas | 1 | 50 | 2 | 50 | 0,259 |
| Anti-AMA | 1 | 33,3 | 3 | 66,6 | 0,098 |
| Anti-Mi-2 | 0 | 0 | 1 | 100 | 0,18 |

DE: desviación estándar; IFI: inmunofluorescencia indirecta; VPP: valor predictivo positivo.

La utilidad de esta prueba en las enfermedades del tejido conectivo y población sana ha sido ampliamente estudiada, estableciéndose en recientes trabajos guías para su uso^{14,15}. Sin embargo, son escasos los estudios desarrollados exclusivamente con pacientes valorados en una Unidad de Reumatología y que nunca antes habían sido analizados para esta prueba inmunológica¹⁶. Así, en nuestra cohorte presentamos los datos clínicos e inmunológicos asociados a la prueba de ANA positiva de las primeras muestras

solicitadas por un Servicio de Reumatología de un hospital de especialidades en Andalucía.

Entre los diagnósticos observados encontramos un numeroso grupo de sujetos, 158 (56,6%), sin conectivopatías sistémicas que presentaron esta primera prueba de ANA positiva, y dentro de este hasta 30 sujetos sin enfermedad reumatológica. Distintos trabajos realizados en poblaciones diferentes a la de nuestro estudio muestran una considerable proporción de pruebas positivas en sujetos

Tabla 3
Número de pacientes y valor predictivo positivo en los títulos de dilución de las principales enfermedades observadas en el estudio

| Dilución por IFI | Conectivopatías sistémicas | | | | | | No conectivopatías sistémicas | | | | | | Total n | |
|------------------|----------------------------|-------|------------------|-------|-----------------------|-------|-------------------------------|-------|-----------|-------|--------------------------|-------|------------|-------|
| | > 65 años | | < 65 años | | Total conectivopatías | | > 65 años | | < 65 años | | Total no conectivopatías | | | |
| | n | VPP % | n | VPP % | n | VPP % | n | VPP % | n | VPP % | n | VPP % | | |
| 1/80 | 3 | 4 | 8 | 10,8 | 11 | 14,8 | 13 | 17,5 | 50 | 67,5 | 63 | 85,1 | 74 | |
| 1/160 | 1 | 0,97 | 25 | 24,2 | 26 | 25,2 | 15 | 14,5 | 62 | 60,1 | 77 | 74,7 | 103 | |
| 1/320 | 4 | 6,2 | 25 | 39 | 29 | 45,3 | 3 | 4,6 | 32 | 50 | 35 | 54,6 | 64 | |
| 1/640 | 4 | 13,3 | 18 | 60 | 22 | 73,3 | 1 | 3,3 | 7 | 23,3 | 8 | 26,6 | 30 | |
| ≥ 1/1.280 | 0 | 0 | 17 | 85 | 17 | 85 | 0 | 0 | 3 | 15 | 3 | 15 | 20 | |
| | LES | | Síndrome Sjögren | | Esclerosis sistémica | | Conectivopatía indiferenciada | | AR | | Fibromialgia | | Artrosis | |
| | n | VPP % | n | VPP % | n | VPP % | n | VPP % | n | VPP % | n | VPP % | n | VPP % |
| 1/80 | 3 | 4 | 0 | 0 | 2 | 2,7 | 4 | 5,4 | 9 | 12,1 | 4 | 5,4 | 5 | 6,7 |
| 1/160 | 9 | 8,7 | 8 | 7,7 | 4 | 3,8 | 3 | 2,9 | 11 | 10,6 | 4 | 3,8 | 4 | 3,8 |
| 1/320 | 12 | 18,7 | 10 | 15,6 | 2 | 3,1 | 4 | 6,2 | 3 | 4,6 | 5 | 7,8 | 1 | 1,5 |
| 1/640 | 8 | 26,6 | 6 | 20 | 7 | 23,3 | 0 | 0 | 1 | 3,3 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| ≥ 1/1.280 | 6 | 30 | 5 | 25 | 2 | 10 | 3 | 15 | 2 | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 |

AR: artritis reumatoide; IFI: inmunofluorescencia indirecta; LES: lupus eritematoso sistémico; VPP: valor predictivo positivo.

Tabla 4
Análisis multivariante de los títulos de dilución por IFI según pacientes con conectivopatía sistémica y el grupo sin esta patología, ajustado por potenciales variables confusoras

| Variables | OR crudo | OR ajustado | p |
|---------------------------|-----------------------|------------------------|-------|
| Edad | 1,005 (0,991-1,020) | 0,998 (0,979-1,018) | 0,872 |
| Sexo (ref. hombres) | 2,458 (1,205-5,013) | 4,124 (1,555-10,932) | 0,004 |
| Título ANA (ref. 1/80) | | | |
| Título ANA 1/160 | 1,96 (0,90-4,28) | 1,460 (0,621-3,443) | 0,386 |
| Título ANA 1/320 | 4,68 (2,09-10,48) | 3,069 (1,237-7,614) | 0,016 |
| Título ANA 1/640 | 16,00 (5,70-44,88) | 12,570 (3,659-43,187) | 0,000 |
| Título ANA \geq 1/1.280 | 32,97 (8,26-131,58) | 42,136 (8,604-206,345) | 0,000 |
| Patrón moteado fino | 1,533 (0,941-2,498) | 0,936 (0,460-1,907) | 0,856 |
| Patrón nucleolar | 0,779 (0,327-1,858) | 1,121 (0,386-3,260) | 0,834 |
| Patrón centromérico | 3,193 (1,126-9,052) | 0,657 (0,141-3,068) | 0,594 |
| Anti-Ro52 | 28,750 (9,897-83,520) | 27,380 (8,250-90,869) | 0,000 |

ANA: anticuerpos antinucleares; IFI: inmunofluorescencia indirecta; OR: odds ratio.

sanos^{8,17,18}. Esto podría justificarse por dos motivos principales: el elevado número de este tipo de patologías que acuden a las consultas de reumatología en España, donde las conectivopatías solo representan el 19% de las revisiones en consulta¹⁹, y el inicio insidioso de patologías reumatológicas que pueden en su comienzo simular patologías del tejido conectivo, con la conocida positividad de la prueba en enfermedades como artropatía psoriásica, artritis reumatoide y fibromialgia^{2,20-22}. Dentro de los pacientes a los que realizamos la prueba de ANA atendidos por primera vez en reumatología, un destacable número de ellos, 989 (77,1%), presentaron un resultado negativo. Este dato puede resultar llamativo en una serie de pruebas solicitadas por especialistas en reumatología. Sin embargo, en una revisión de la literatura, nuestras cifras (positividad para el 28,1% de las muestras) son incluso discretamente superiores a estudios realizados por Unidades de Reumatología de hospitales secundarios y terciarios, que presentan datos de prueba de ANA positiva cercanos al 15 y 20% respectivamente, y aún mayor si los comparamos con otras especialidades médicas²³.

Respecto a los títulos de diluciones para la prueba de ANA que presentan enfermedades reumatológicas no clasificadas como conectivopatías sistémicas, y los observados en sujetos sanos, son más bajos que en aquellos pacientes con enfermedad sistémica del tejido conectivo^{8,18,24}. En los distintos estudios realizados sobre la utilidad de la prueba de ANA en la población general, diluciones $> 1/160$ establecieron el valor a partir del cual existe mayor frecuencia en la asociación con estas conectivopatías de afectación multiorgánica^{2,25,26}. En el análisis de nuestros resultados se muestra asociación entre diluciones $> 1/320$ y la patología conectiva sistémica de nuestras consultas, valores que aumentan de forma marcada con mayores diluciones (1/640 y $> 1/1.280$). De esta forma se establece para nuestra serie una mayor probabilidad de presentar conectivopatía sistémica en aquellos pacientes con diluciones más altas ya desde su primera visita. Y estos valores mantienen la diferencia con la artritis reumatoide, enfermedad de naturaleza autoinmune que presenta mayor número de pacientes entre sus muestras positivas para títulos $< 1/160$.

En una comparación de este nivel de titulaciones para la prueba de ANA en nuestra Unidad de Reumatología con estudios previos desarrollados por otras especialidades médicas se muestra un VPP en las conectivopatías notablemente superior, tanto en las diluciones más bajas ($> 1/80 = 36\%$ vs. 10%), como para diluciones altas ($> 1/1.280 = 85\%$ vs. 38,9%). Y estas diferencias se hacen aún más importantes en el subestudio para LES, donde el VPP es del 12,9% en una dilución $> 1/80$ y del 30% para $> 1/1.280$ (vs. 2,2% y 5,6%, respectivamente, en estudio desarrollado por otras especialidades)²⁵.

La edad también se ha descrito como un factor importante en la positividad de la prueba. En nuestro trabajo, dentro del grupo de las conectivopatías sistémicas encontramos un mayor VPP en sujetos menores de 65 años, ya que la presentación de estas patologías se sitúa con mayor frecuencia en la cuarta y quinta década de la vida.

Sin embargo, en las no conectivopatías, y al clasificar los sujetos en grupos por edad, no encontramos mayor positividad de la prueba para mayores de 65 años, como sería esperable por la conocida mayor prevalencia del test positivo en sujetos sin conectivopatías de edad adulta avanzada^{2,27}. Y es además en sujetos mayores de 65 años sin conectivopatías donde se presentan niveles de diluciones más elevados¹, datos que tampoco se observan en nuestro estudio, donde para este grupo de edad solo 3 pacientes presentaron diluciones 1/320 (VPP 4,6%) y uno 1/640 (VPP 3,3%), sin observarse ninguna muestra con una dilución mayor.

Aunque trabajos previos han asociado mayor significación clínica en patrones homogéneos, centromérico y citoplasmático, en nuestros pacientes con conectivopatías el patrón más numeroso fue el moteado fino, resultando el VPP de sujetos con patrón homogéneo y citoplasmático sensiblemente menor que en el grupo sin conectivopatías²⁰. Sí existió un predominio del patrón centromérico con un VPP de 62,5%, que se correspondió con 7 esclerosis sistémicas, un LES y 2 conectivopatías indiferenciadas. Además, al contrario que en trabajos recientes publicados que muestran una mayor prevalencia del patrón moteado fino en sujetos sin este tipo de enfermedades, nuestros datos mostraron un mayor número de sujetos con patrón homogéneo en las no conectivopatías sistémicas, con un VPP de 58% frente al 41,9% de las conectivopatías sistémicas^{1,28,29}.

En referencia a los autoanticuerpos, los datos sí se correspondieron con estudios previos^{1,16,23}. La mayor frecuencia se asoció a anti-Ro52, anti-Ro60, anti-dsDNA y anti-La, con muestras positivas en 44, 35, 17 y 15 pacientes respectivamente, y todos ellos de forma predominante se expresaron como patrón moteado fino, y en las conectivopatías sistémicas, con marcada diferencia significativa entre ambos grupos. Debemos destacar que este patrón en la positividad para anti-Ro52 puede venir determinada por su asociación con anti-Ro60 y/o anti-La, ya que su detección aislada suele presentarse con patrón citoplasmático³⁰. Por último, los anticuerpos contra dsDNA se pueden encontrar en ocasiones en pacientes con otras enfermedades autoinmunes, infecciosas e incluso en sujetos clínicamente asintomáticos, si bien el 85% de este último grupo puede desarrollar LES en los cinco años posteriores a la positividad para el dsDNA³¹. En nuestra serie encontramos hasta 3 pacientes con esta prueba positiva (uno con título 1/320 y dos con 1/640), que correspondieron a pacientes aún en estudio que no se habían definido a ninguna patología hasta la fecha, pero que habrá que hacer un seguimiento exhaustivo de su evolución.

En conclusión, todos estos datos muestran el incremento de la frecuencia de ANA en títulos elevados observados por IFI desde la primera muestra en enfermedades con conectivopatías sistémicas respecto a las no conectivopatías, estableciéndose esta asociación para diluciones $> 1/320$. El VPP de nuestros pacientes con afectación sistémica del tejido conectivo es más elevado que estudios previos solicitados por otras especialidades médicas, ya que una

exploración dirigida y el apoyo de otras exploraciones complementarias solicitadas en nuestras consultas conducen a un análisis más focalizado de la prueba. Aunque en estudios previos, tres años desde la positividad de la prueba resultan suficientes para definir la enfermedad hacia patología sistémica del tejido conectivo o no, nuestro trabajo se verá mejorado en un posterior análisis de los diagnósticos en aquellos sujetos que clasificados como libres de conectivopatía sistémica presentan una alta dilución en el título de ANA. Estudios con mayor número de sujetos aumentarán la fiabilidad en el análisis por grupos de edad y patología específica.

Responsabilidades éticas

Protección de personas y animales. Los autores declaran que para esta investigación no se han realizado experimentos en seres humanos ni en animales.

Confidencialidad de los datos. Los autores declaran que han seguido los protocolos de su centro de trabajo sobre la publicación de datos de pacientes.

Derecho a la privacidad y consentimiento informado. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

- Cabiedes J, Núñez-Álvarez CA. Anticuerpos antinucleares. *Reumatol Clin.* 2010;6:224–30.
- O'Sullivan M, McLean-Tooke A, Loh RK. Antinuclear antibody test. *Aust Fam Physician.* 2013;42:718–21.
- Agmon-Levin N1, Damoiseaux J, Kallenberg C, Sack U, Witte T, Herold M, et al. International recommendations for the assessment of autoantibodies to cellular antigens referred to as anti-nuclear antibodies. *Ann Rheum Dis.* 2014;73:17–23.
- Krause C, Ens K, Fechner K, Voigt J, Fraune J, Rohwäder E, et al. EUROPattern Suite technology for computer-aided immunofluorescence microscopy in auto-antibody diagnostics. *Lupus.* 2015;24:516–29.
- Holborow EJ, Weir DM, Johnson GD. Aserum factor in lupus erythematosus with affinity for tissue nuclei. *Br Med J.* 1957;2:732–4.
- Op de Beeck K, Vermeersch P, Verschueren P, Westhovens R, Mariën G, Blockmans D, et al. Detection of antinuclear antibodies by indirect immunofluorescence and by solid phase assay. *Autoimmun Rev.* 2011;10:801–8.
- Campos-González ID, Viveros ME, Cardiel MH. Utilidad clínica de las pruebas inmunológicas especializadas en reumatología en un hospital de segundo nivel de atención en México. *Reumatol Clin.* 2007;3:110–6.
- 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.
- Keren DF. Antinuclear antibody testing. *Clin Lab Med.* 2002;22:447–74.
- Volkman ER, Taylor M, Ben-Artzi A. Using the antinuclear antibody test to diagnose rheumatic diseases: When does a positive test warrant further investigation? *South Med J.* 2012;105:100–4.
- Meroni PL, Schur PH. ANA screening: An old test with new recommendations. *Ann Rheum Dis.* 2010;69:1420–2.
- Wanchu A. Antinuclear antibodies: Clinical applications. *J Postgrad Med.* 2000;46:144–8.
- Manual SER de las enfermedades reumáticas. 6.ª ed. España: Elsevier SL; 2014.
- Solomon DH, Kavanaugh AJ, Schur PH. Evidence based guidelines for the use of immunologic tests: Antinuclear antibody testing. *Arthritis Rheum.* 2002;47:434–44.
- Benito-García E, Schur PH, Lahita R. Guidelines for immunologic laboratory testing in rheumatic diseases: Anti-Sm and anti-RNP antibodies test. *Arthritis Rheum.* 2004;51:1030–44.
- Fitch-Rogalsky C, Steber W, Mahler M, Lupton T, Martin L, Barr SG, et al. Clinical and serological features of patients referred through a rheumatology triage system because of positive antinuclear antibodies. *PLoS One.* 2014;9:e93812.
- Rosas I, Gómez EI, Núñez Álvarez 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.
- 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.
- Rodríguez Gómez M, Gómez-Reino J, Galdo Fernández F, González-Gay M, Hernández Rodríguez I, Ibáñez Ruán JJ, Grupo Gallego de Estudio Epidemiológico de Enfermedades Reumáticas. Actividad asistencial en las consultas externas de las unidades de reumatología de Galicia. *Reumatol Clin.* 2006;2:239–46.
- 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;50:261–5.
- Kötter I, Neuscheler D, Günaydin I, Wernet D, Klein R. Is there a predisposition for the development of autoimmune diseases in patients with fibromyalgia? Retrospective analysis with long term follow-up. *Rheumatol Int.* 2007;27:1031–9.
- 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;146:31–2.
- Avery TY, van de Cruys M, Austen J, Stals F, Damoiseaux JG. Anti-nuclear antibodies in daily clinical practice: Prevalence in primary, secondary, and tertiary care. *J Immunol Res.* 2014;2014:401739.
- Giannouli E, Chatzidimitriou D, Gerou S, Gavriilaki E, Settas L, Diza E. Frequency and specificity of antibodies against nuclear and cytoplasmic antigens in healthy individuals by classic and new methods. *Clin Rheumatol.* 2013;32:1541–6.
- Abeles AM, Abeles M. The clinical utility of a positive antinuclear antibody test result. *Am J Med.* 2013;126:342–8.
- Satoh M, Vázquez-del Mercado M, Chan EK. Clinical interpretation of antinuclear antibody tests in systemic rheumatic diseases. *Mod Rheumatol.* 2009;19:219–28.
- Ocaña Medina C, García Hernández F, del Castillo Palma MJ, Wichmann I, Respalda N, Sánchez Román J. Frecuencia de anticuerpos antinucleares en ancianos sanos. *Rev Esp Reumatol.* 2004;31:368–71.
- Mahler M, Fritzler MJ. The clinical significance of the dense fine speckled immunofluorescence pattern on HEp-2 cells for the diagnosis of systemic autoimmune diseases. *Clin Dev Immunol.* 2012;2012:494356.
- 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.
- Keech CL, Gordon TP, McClustey J. Cytoplasmic accumulation of the 52 kDa Ro/SSA-A nuclear autoantigen in transfected cell lines. *J Autoimmun.* 1995;8:699–712.
- Haugbro K, Nossent JC, Winkler T, Figenschau Y, Rekvig OP. Anti-dsDNA antibodies and disease classification in antinuclear antibody positive patients: The role of analytical diversity. *Ann Rheum Dis.* 2004;63:386–94.