

Universidad de San Carlos de Guatemala  
Dirección General de Investigación  
Programa Universitario de Investigación Interdisciplinaria en Salud

INFORME FINAL  
**DETERMINACIÓN DE LA DILUCIÓN ÓPTIMA DE ANTICUERPOS  
ANTINUCLEARES POR INMUNOFLUORESCENCIA PARA EL DIAGNÓSTICO  
DE ENFERMEDADES REUMATOLÓGICAS AUTOINMUNES**

Equipo de Investigación  
**Lic. Kevin Alexander Ortiz Barrientos**  
Licda: Egly Maribel Álvarez Cho  
Dr. Maynor Alberto Herrera Méndez  
Dr. Ricardo Arreola Zabala

**Ciudad de Guatemala, 12 de marzo del 2018**

UNIDAD AVALADORA: DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN DE LA FACULTAD DE  
CIENCIAS MEDICAS DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

Directora: Dra. Carmen de Tercero  
Unidad de Reumatología, Hospital Roosevelt

M. Sc. Gerardo Arroyo Catalán  
Director General de Investigación  
Ing.Agr. MARN Julio Rufino Salazar  
Coordinador General de Programas  
Dra. Hilda Valencia  
Lic. Kevin Alexander Ortiz Barrientos  
Licda: Egly Maribel Álvarez Cho  
Dr. Maynor Alberto Herrera Méndez  
Dr. Ricardo Arreola Zabala

Partida Presupuestaria  
4.8.63.1.03  
Año de ejecución: 2017

## Índice

	Páginas
Resumen	1-2
Introducción	3
Marco teórico y estado del arte	4-8
Materiales y métodos	9-21
Resultados	22-30
Análisis y discusión de resultados	31-36
Conclusiones	37
Referencias	38-43
Apéndice	44-48
Actividades de gestión y vinculación	49

## Figuras

	Páginas
Figura 1. Patrón sugestivo de Golgi	25
Figura 2. Patrón few nuclear dots (FND)	25
Figura 3. Preparación de las muestras y sus diluciones	44
Figura 4. Preparación de las muestras y sus diluciones	44
Figura 5. Microscopio de inmunofluorescencia y observación de láminas	45
Figura 6. Patrón moteado denso fino (DFS)	45
Figura 7. Patrón multiple nuclear dots (MND)	46
Figura 8. Patrón anillos y bastones	46
Figura 9. Sueros de grupo ERA prospectivo y retrospectivo	47
Figura 10. Sueros de grupo sano (donadores de sangre)	47
Figura 11. Consentimientos informados y fichas de recolección de información	48

## Tablas

	Páginas
Tabla 1. Operacionalización de variables	19-21
Tabla 2. Datos sociodemográficos y diagnósticos de los grupos estudiados	22
Tabla 3. Resultados reportados por cada observador según el grupo estudiado	24
Tabla 4. Frecuencia de anticuerpos antinucleares en distintas diluciones	26
Tabla 5. Presencia de ANA según dilución y rango de edad de grupo sano	26
Tabla 6. Presencia de ANA según dilución y rango de edad de grupo ERA	27
Tabla 7. Presencia de ANA según dilución y rango de edad de todas las persona.	28
Tabla 8. . Pruebas de precisión diagnóstica a distintas diluciones	29

# **DETERMINACIÓN DE LA DILUCIÓN ÓPTIMA DE ANTICUERPOS ANTINUCLEARES POR INMUNOFLUORESCENCIA PARA EL DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDADES REUMATOLÓGICAS AUTOINMUNES**

## Resumen

Los anticuerpos antinucleares (ANA) son inmunoglobulinas dirigidas contra antígenos celulares. Estos anticuerpos se encuentran presentes en muchas enfermedades reumatológicas autoinmunes (ERA), sin embargo estos anticuerpos también pueden presentarse en personas sanas. El presente estudio se desarrolló con el objetivo de establecer la dilución óptima para la detección de anticuerpos antinucleares mediante inmunofluorescencia (Fana) para poder establecer un diagnóstico de una ERA. Para llevar esto a cabo se muestreó 268 personas que poseen sospecha de presentar una ERA y 814 donadores de sangre. Se realizó un Fana del suero obtenido de los pacientes con diluciones de 1/80, 1/160, 1/320, 1/640, 1/1280. Al finalizar el estudio se evaluó los expedientes de las personas con sospecha de ERA para recopilar el diagnóstico al cual se había llegado por parte del médico reumatólogo. Con esta información se calculó la sensibilidad, especificidad, razones de verosimilitud y curvas ROC utilizando el paquete estadístico EPIDAT para cada una de las diluciones. El grupo sano presentó un 13.3 %, 8.2 % y 3.9 % de positividad para los fana en las diluciones 1/80, 1/160 y 1/320 respectivamente, el porcentaje de positividad aumentaba a medida que incrementaba la edad. Se encontró que la dilución 1/80 presentó la mejor sensibilidad (90.3 %), RV- (0.14) y área bajo la curva (AUC) (0.8673), la dilución 1/1280 presentó la mejor especificidad (96.3 %), y la dilución 1/640 presento la mejor RV + (9.68). La dilución 1/80 presentó una buena sensibilidad y especificidad (83.1 %) y el mejor poder discriminatorio según el AUC.

Palabras clave: inmunoglobulina, inmunología, reumatología, autoinmunidad, laboratorio.

## Abstract

Antinuclear antibodies (ANA) are immunoglobulins with specificity for cellular antigens. These antibodies are present in many autoimmune rheumatologic diseases (ARD) and can also be present in healthy people. The objective of this study was to establish the optimal dilution for the detection of antinuclear antibodies by immunofluorescence (Fana) in the diagnosis of ARD. The study included 268 patients with the suspicion of ARD and 814 blood donors. Serum samples were collected and dilutions of 1/80, 1/160, 1/320, 1/640 and 1/1280 were used for the Fana. Clinical diagnosis established by a rheumatologist was collected from the medical charts at the end of the study. Sensitivity, specificity, likelihood ratios (LR) and receiver operator characteristics (AUC) were calculated with statistical software EPIDAT. In healthy people ANA were present in 13.3 %, 8.2 % and 3.9 % at dilutions 1/80, 1/160 and 1/320 respectively. Dilution 1/80 presented the best sensitivity (90.3 %), LR- (0.14) and AUC (0.8673), dilution 1/1280 presented the best specificity (96.3 %) and dilution 1/640 the best LR+ (9.68). The best discriminatory performance was achieved by the dilution 1/80 with a good sensitivity and specificity (83.1 %).

## Introducción

Los anticuerpos antinucleares (ANA) son inmunoglobulinas generalmente del isotipo IgG cuyo determinante antigénico son principalmente antígenos localizados en el interior del núcleo de las células. La detección de estos anticuerpos es utilizada como prueba de tamizaje para el diagnóstico de enfermedades reumatológicas autoinmunes (ERA). La presencia de estos anticuerpos es tan importante para algunas enfermedades autoinmunes, que la sola presencia de estos es considerada como criterio diagnóstico (Manns et al., 2010; Petri et al., 2012; Shiboski et al., 2012; Van Den Hoogen et al., 2013).

Estos autoanticuerpos pueden ser detectados mediante diferentes metodologías (inmunofluorescencia, Elisa, aglutinación, etc.), siendo considerada la inmunofluorescencia con células Hep-2 como el estándar de oro según la Asociación Americana de Reumatología (ACR, por sus siglas en inglés) y la Unión Europea contra las Enfermedades Reumáticas (Eular, por sus siglas en inglés). Las últimas recomendaciones de Eular/ACR establecen que la dilución adecuada para el diagnóstico de ERA es de 1:160, sin embargo esta dilución debe de establecerse en cada laboratorio, principalmente debido a diferencias metodológicas (método de fijación de células HEp-2, lámpara del microscopio de fluorescencia, tipo y el título del conjugado utilizado, capacitación del personal, entre otros)(Agmon-Levin et al., 2014).

Mucha investigación se ha llevado a cabo en cuanto a la frecuencia de ANA en distintas poblaciones sanas. Los resultados de estas investigaciones han sido bastante consistentes cuando se toma en cuenta las condiciones adecuadas para la realización de los Fana. Actualmente se desconoce la frecuencia de ANA en la población sana guatemalteca así como la dilución adecuada para la investigación de los ANA mediante inmunofluorescencia. El establecer esta dilución permitiría mejorar la utilidad de la prueba, reduciría los costos del laboratorio y brindaría una mejor orientación sobre la condición del paciente. El presente estudio se desarrolló con el propósito de establecer la dilución que presente el mejor rendimiento para la realización de los Fana bajo las condiciones de trabajo que se tienen en el Laboratorio de Inmunología del Hospital Roosevelt.

## Marco teórico y estado del arte

### Enfermedades Autoinmunes

La autoinmunidad se define como un trastorno del sistema de defensa del organismo, en el cual se producen auto-anticuerpos contra componentes propios, debido a la incapacidad de este para reconocerlos, y considerándolos extraños induce una respuesta para destruirlos (Rose, 2015).

Los primeros conceptos de autoinmunidad surgen a finales del siglo XIX. En 1896 Lord Lister planteó en la Asociación Médica Británica la controversia sobre si la inflamación es una respuesta anormal o un mecanismo de defensa. Un año después Paul Ehrlich genera la fundamentación teórica de las cadenas laterales, lo cual da la base para explicar el “horror autotóxico”. En 1906 Clemens Freiherr von Pirquet al analizar la enfermedad del suero planteó la siguiente frase: “La concepción del anticuerpo es que protege contra la enfermedad, pero también son responsables de generar enfermedad, lo que parece absurdo” (Iglesias et al., 2009).

El concepto propuesto por Ehrlich permaneció vigente hasta 1957 cuando Witebsky y Noel Rose describen a la tiroglobulina como un autoantígeno a través de una serie de estudios llevados a cabo. De esta propuesta se desarrollan los cuatro postulados de Witebsky, los cuales proporcionaban una base racional para declarar a una enfermedad humana ser de etiología autoinmune. Estos postulados eran:

1. Demostrar la presencia de anticuerpos circulantes activos a temperatura corporal.
2. Reconocer el antígeno específico (para el anticuerpo).
3. Producir anticuerpos contra el mismo antígeno en experimentos con animales.
4. Reproducir en modelos animales el daño tisular observado en seres humanos.

La más reciente revisión de estos postulados propuesta por Noel Rose, discípulo de Witebsky, considera tres tipos de evidencia:

1. Evidencia directa de la transferencia de anticuerpos y/o linfocitos T patogénicos.
2. Evidencia indirecta basada en la reproducción de la enfermedad autoinmune en modelos animales.
3. Evidencia circunstancial de características clínicas (Rose, 2015).

### Historia de los ANA

Los anticuerpos antinucleares fueron evidenciados por primera vez en 1949 en sueros de pacientes con lupus eritematoso sistémico (LES). Esta investigación demostró que cuando el suero de pacientes con LES era incubado con leucocitos, se producían alteraciones nucleares junto con fagocitosis de remanentes nucleares por los polimorfonucleares. Al año siguiente se demostró que el fenómeno de las células LE era ocasionado por un factor sérico que reaccionaba contra material nuclear. Este factor fue subsecuentemente llamado “Factor antinuclear” (Hargraves, Richmond, y Morton, 1949).

Otros estudios demostraron posteriormente que el fenómeno producido era causado por la fracción de las gammaglobulinas de los sueros de pacientes con LES. Esta relación entre las células LE y el factor contenido en la fracción de las gammaglobulinas del suero continuó siendo motivo de intensa investigación (Haserick y Bortz, 1979). En una investigación llevada a cabo por Friou (1957) se aplicó la técnica desarrollada por Weller y Coons (1954) para confirmar que las globulinas contenidas en los sueros de pacientes con LES poseían afinidad por el núcleo de la célula. La afinidad de los sueros de 100 personas, incluidas 28 con LES, fue comprobada contra núcleos de timo de cordero y tejidos de mamíferos. Una anti-globulina humana marcada con un fluorocromo fue agregada a los tejidos, posterior a una incubación con el suero de las personas. Esto evidenció un aumento de la intensidad en la fluorescencia cuando se utilizaron los sueros de pacientes con LES. Los estudios posteriores de Friou permitieron la estandarización de la técnica y su aplicación para el

estudio y diagnóstico de ERA (Friou, 1958a; Friou, 1958b; Firou, 1958c; Friou, 1964; Friou, Finch, y Detrie, 1958; Friou y Teague, 1964)

La utilización de la técnica de inmunofluorescencia para la investigación de anticuerpos antinucleares permitió evidenciar diferentes patrones de tinción en los núcleos de las células utilizadas. Esta situación fue inicialmente descrita por Beck (1961) y un par de meses después confirmada por Lanchmann y Kunkel (1961) y por Fennell, Rodnan, y Vásquez (1962). Los estudios de Beck fueron realizados desde 1961 hasta 1968 culminando con la descripción de los 4 primeros patrones observados en inmunofluorescencia.

Muchos de los sustratos hasta ese momento utilizados poseían la desventaja de ser muy poco sensibles y rápidamente se detectaron discrepancias entre ellos. Esto llevo a la investigación de los ANA en diferentes sustratos, observándose diferencias en la detección de los títulos finales y deficiencias en el discernimiento de los patrones nucleares. Uno de los primeros estudios llevados a cabo fue el de Muna, Verner, y Hammond (1966) en el cual se empezó a utilizar cultivos celulares para la investigación de los ANA. Estudios posteriores en los que se compararon cortes histológicos contra monocapas de cultivos celulares identificaron a estos últimos como los más sensibles para la detección de los ANA. Dentro de las ventajas identificadas en estos estudios cabe mencionar la disponibilidad de estos sustratos debido a la inmortalidad de las líneas celulares, la homogeneidad de las líneas celulares, la facilidad del discernimiento de los patrones de los ANA, su alta sensibilidad y su potencial para la preservación por largo tiempo del sustrato no teñido (Hahon, Eckert, y Stewart, 1975; Lippmann, Eckert, Hahon, y Morgan, 1973).

#### ANA en poblaciones sanas

Uno de los primeros estudios diseñados con el propósito de evaluar la prevalencia de anticuerpos antinucleares en personas sanas fue el llevado a cabo por Tan y colaboradores (1997), el cual reportó los resultados del subcomité de la Unión Internacional de Sociedades de Inmunología. En este estudio sueros de 125 personas sanas provenientes de

15 laboratorios distintos fueron analizados. Para esa época se conocía que cierto porcentaje de personas sanas podían poseer un resultado positivo para anticuerpos antinucleares por inmunofluorescencia pero el dato exacto se desconocía, principalmente debido a que la técnica hasta ese entonces no había sido por completo estandarizada. Para ese entonces una dilución de 1:40 de los sueros era considerada como la apropiada para la realización de los Fana, pero al observar el alto porcentaje de positividad de los sueros de personas sanas (31.7 %) y la baja especificidad de esta dilución (68 %) los llevó a sugerir la utilización de la dilución 1:160 para la realización de los Fana.

Esto se ha observado en varios estudios (de Almeida et al., 2014; Coople et al., 2012; Marin et al. 2009) demostrándose inclusive que este resultado es reproducible en distintos tipos de poblaciones sanas (Marin et al., 2009). A pesar de esta reproducibilidad de resultados en los diferentes estudios se ha encontrado mucha discrepancia cuando las condiciones bajo las cuales los Fana se llevan a cabo son distintas. Esto fue demostrado por (Coople et al., 2012) en un estudio en el que evaluó células HEp-2 de diferentes proveedores comerciales encontrando diferencias principalmente en la dilución final de distintos sueros provenientes de pacientes con ERA. Un estudio posterior a este reportó diferencias en los patrones observados en las células HEp-2 de diferentes proveedores comerciales (Dellavance et al., 2013).

#### Antecedentes de los ANA en Guatemala

Hasta el momento se desconoce la prevalencia de los Fana en personas sanas en Guatemala, sin embargo diferentes estudios han reportado la prevalencia de los ANA en pacientes con diferentes patologías. El estudio de García y colaboradores (2012) reportaron un 65.6 % de positividad de los ANA en pacientes con LES. Este resultado es diferente al reportado por Herrera (2012) en el cual se reportó un 85% de positividad en los ANA para pacientes con LES. A pesar de la evidente diferencia en la frecuencia de ambos estudios en ninguno se reporta la metodología mediante la cual se realizaron los ANA.

Un estudio retrospectivo llevado a cabo por Jovel, Arreola, y Herrera (2012), el cual fue realizado en el Laboratorio de Inmunología del Hospital Roosevelt, reportó a 99 pacientes con un resultado positivo para ANA mediante inmunofluorescencia a los cuales se les evaluó el diagnóstico final que presentaron. En este estudio se resaltó que durante el 2011 se solicitaron al laboratorio 1208 Fana siendo 266 (22 %) positivas. De esas 266 pruebas positivas solamente el 3.74 % presentó un resultado positivo a una dilución de 1:160. Realizar diluciones del suero de los pacientes no es un procedimiento rutinario en el Laboratorio de Inmunología del Hospital Roosevelt, lo cual explicaría el bajo porcentaje de positividad en esta dilución en pacientes con sospecha de EAR.

## Materiales y métodos

Tipo de investigación: Estudio cuantitativo con enfoque descriptivo y explicativo retrospectivo observacional analítico con tres grupos (personas sanas, ERA retrospectivo, ERA prospectivo).

Técnicas e instrumentos:

Equipo:

- Microscopio de inmunofluorescencia
  - Lámpara de Mercurio
  - Filtro excitador de 495 nm
  - Filtro de emisión de 515 nm
- Pipetas automáticas (10-100 uL y 100-1000 uL)
- Centrifuga
- Congelador a -20°C.
- Probeta de 25 0mL

Materiales/insumos

- Puntas de pipetas de 100-1000 uL
- Puntas de pipetas de 10-100 uL
- Eppendorf de 1.5 mL
- Cubreobjetos
- Cámara de incubación
- Tubos sin anticoagulante
- Portaobjetos FITC QC Slide™ (Microesferas con isotiocianato de fluoresceína)

Reactivos

- Láminas impregnadas con células HEp-2000® (Inmmunoconcepts)

- Conjugado (Anticuerpos anti-IgG humana de cabra conjugado con isotiocianato de fluoresceína)
- Polvo salino tamponado con fosfato (0.001 M pH7.2 +/- 0.2)
- Agua desmineralizada
- Glicerol como medio de montaje.

## Procedimiento

### 1. Recolección de muestras

- Se rotuló adecuadamente el tubo del paciente
- Se obtuvo aproximadamente 3 mL de sangre por venopunción aséptica, con tubo vacío estéril.
- Se dejó coagular la sangre a temperatura ambiente (18-24 °C).

### 2. Separación de suero

- Se centrifugó a 2500 rpm por 5 minutos.
- Con pipeta automática se separó un mínimo de 500 uL de suero del paciente y colocarlo en tubo eppendorf estéril.
- Se almacenó muestra a -20°C hasta su análisis.

### 3. Preparación del PBS

- Se midió 1 L de agua desmineralizada.
- Se disolvió el contenido de una bolsa del buffer en el agua desmineralizada agitando vigorosamente.

### 4. Preparación de las diluciones

Para la preparación de las diluciones se utilizó la siguiente formula:

$$FD = \frac{V_{Mx}}{V_T}$$

Donde,

$FD$  = Factor de dilución (Dilución)

$V_{Mx}$  = Volumen de muestra

$V_T$  = Volumen total

El Volumen total corresponde a:

$$V_T = V_{Mx} + V_{Sol}$$

Donde,

$V_{Mx}$  = Volumen de muestra

$V_{sol}$  = Volumen del solvente (PBS)

Preparación de la dilución inicial

Las muestras se iniciaron con una dilución de 1/80 (1 parte de muestra en 79 partes de solvente) utilizando los siguientes volúmenes:

$V_{Mx} = 10$  uL muestra

$V_{sol} = 790$  uL de PBS

- Se descongeló y homogenizó mediante inversión las muestras
- Se vertió en un pocillo el  $V_{sol}$ .
- Agregó el  $V_{Mx}$  y homogenizar la dilución mediante una serie de succiones (3) con pipeta automática.

Preparación de diluciones seriadas

Se realizó una dilución 1/2 a partir de la dilución inicial hasta llegar a una dilución 1/1280.  
Para ello se utilizaron los siguientes volúmenes:

$V_i = 100$  uL dilución inicial

$V_{sol} = 100$  uL PBS

- Se tomó 100 uL de dilución inicial y verter en pocillo.
- Se agregó 100 uL de PBS y homogenizar mediante una serie de succiones (3) con pipeta automática.
- Se tomó 100 uL de la dilución obtenida en paso anterior y verter en pocillo.
- Se agregó 100 uL de PBS y homogenizar mediante una serie de succiones (3) con pipeta automática.
- Se repitió los 2 pasos anteriores 3 veces.

Del procedimiento anterior se obtuvo las siguientes diluciones: 1/80, 1/160, 1/320, 1/640 y 1/1280.

##### 5. Preparación de láminas con sustrato

- Se sacó los portaobjetos de las bolsas
- Se dispuso los suero de control en el siguiente orden:
  - Control negativo pocillo 1
  - Control Positivo pocillo 2
  - Control PBS pocillo 3
- Se invirtió el frasco cuentagotas y se apretó hasta que se vio una gota en la punta.
- Se tocó suavemente el pocillo de control con la gota, evitando que la punta del cuentagotas entrara en contacto directo con la superficie del portaobjetos.
- Se añadió 1 gota (20-25 uL/pocillo) de cada dilución por pocillo.
- Se colocó porta objetos en cámara húmeda (Caja de Petri con una toalla de papel humedecida).
- Se incubó durante 30 +/- 5 minutos a temperatura ambiente (18-24°C).

- Se sacó el portaobjetos de la cámara húmeda.
- Se aclaró con PBS utilizando una pipeta Pasteur o jeringa.
- Se dejó reposar el portaobjetos con PBS durante 10-30 minutos. Una vez utilizada tirar la solución de lavado.
- Se secó el portaobjetos y sumergió 3-5 veces en agua desmineralizada.
- Se pasó un papel secante por el borde del portaobjetos para retirar el agua sobrante.
- Se colocó el portaobjetos en la cámara de incubación.
- Se colocó una gota de conjugado en cada pocillo.
- Se cubrió la cámara y evitar exposición a la luz.
- Se incubó durante 30 +/- 5 minutos a temperatura ambiente (18-24°C).
- Se sacó el portaobjetos de la cámara húmeda.
- Se aclaró con PBS utilizando una pipeta Pasteur o jeringa. Para evitar contaminación cruzada dirija el chorro de PBS a la línea media del portaobjetos, inclinándolo primero hacia los pocillos 1-5 y luego hacia los pocillos 6-10.
- Se dejó reposar el portaobjetos con PBS durante 10-30 minutos. Una vez utilizada tirar la solución de lavado.
- Se secó el portaobjetos y sumergió 3-5 veces en agua desmineralizada.
- Se pasó un papel secante por el borde del portaobjetos para retirar el agua sobrante.
- Se colocó 4-5 gotas de medio de montaje en la línea media de cada portaobjetos.
- Se colocó cubreobjetos con cuidado, evitando que se formen burbujas de aire.

### Control de calidad

Para el control de calidad se observaron los sueros controles positivo, negativo y PBS colocados en el portaobjetos. El control positivo debe de dar una fluorescencia de color verde manzana en los núcleos de las células, con un patrón claramente definido. El control negativo debe de dar una fluorescencia inespecífica de color verde mate en el citoplasma y núcleo, pero sin un patrón discernible de tinción nuclear. El control PBS se emplea para observar la tinción inespecífica del reactivo de anticuerpos y no debe dar fluorescencia

verde. Si los controles no se ven como se ha descrito, la prueba no es válida y debe repetirse.

#### Observación y reporte de resultados

- Previo a observar lámina se debe encendió la fuente de poder y dejar calentar la lámpara de mercurio por al menos 5 minutos.
- Se colocó lámina en microscopio de inmunofluorescencia con la platina hasta abajo y en el objetivo de menor aumento (10X).
- Se abrió la apertura.
- Se elevó platina con aumento macrométrico hasta observar portaobjetos.
- Se cambió a objetivo de mayor aumento (40X).
- Se ajustó el campo de visión con aumento micrométrico.
- Se reportó el resultado describiendo los siguientes parámetros:

Patrón: Se utilizó la nomenclatura propuesta por Agmon-Levin y colaboradores (2014).

Intensidad de fluorescencia: 0-4 conforme a Portaobjetos FITC QC Slide™.

Se observó las siguientes estructuras/organelas celulares con el propósito de determinar el patrón de tinción:

Núcleo

Nucléolos

Citoplasma

Aparato mitótico

Metafasas

Nota: Las muestras fueron observadas por dos personas diferentes. En el caso de diferencias observadas se buscará llegar a un consenso entre ambas. De no ser este posible se buscará una tercera opinión.

Diseño estadístico:

Se trabajó con tres grupos de pacientes, el primer grupo corresponderá a personas sanas, el segundo grupo, pacientes con sospecha de ERA (previo al diagnóstico) provenientes del banco de sueros del Laboratorio de Inmunología y el tercero sueros de pacientes con sospecha de ERA (previo al diagnóstico) que asisten a la Unidad de Reumatología del Hospital Roosevelt durante el periodo de enero a junio del 2017. Por cada suero de paciente con ERA y/o persona sana se realizó diluciones para la detección de anticuerpos antinucleares por inmunofluorescencia. Hacia el final de la recolección de muestras se evaluó los expedientes de los pacientes en ambos grupos (2 y 3) con el propósito de registrar la enfermedad autoinmune diagnosticada. Solamente los pacientes con un diagnóstico establecido según criterios diagnósticos para cada enfermedad al momento de la evaluación de los expedientes fueron tomados en cuenta como verdaderos positivos para la realización de la sensibilidad y especificidad de las diluciones.

#### Muestreo y diseño de muestreo

Universo: Pacientes con sospecha de ERA que asisten a la Unidad de Reumatología del Hospital Roosevelt.

Muestra: 271 pacientes que asisten a la Unidad de Reumatología del Hospital Roosevelt con sospecha de alguna enfermedad reumatológica autoinmune.

Para el grupo 1 (personas sanas) se realizó el muestreo continuo hasta llegar a la cantidad establecida en personas que asistan al banco de sangre del Hospital Roosevelt previo a la obtención del consentimiento informado. Por cada paciente del grupo 2 y 3 se incluirán 3 personas sanas pareados según edad (En los rangos 18-30, 31-40, 41-50, 51-65) y sexo.

Para el grupo 2 (retrospectivo) se buscaron 136 pacientes bajo sospecha de alguna ERA y que hayan asistido al Laboratorio de Inmunología durante el período de junio a diciembre del 2016 y se seleccionaran para ser incluidos en el estudio utilizando

muestreo aleatorio simple. Luego de la obtención del consentimiento informado de los pacientes y su inclusión en el estudio se buscará dentro del banco de sueros de la unidad de reumatología el suero obtenido durante su primera visita.

Para el grupo 3 (prospectivo) se incluyeron pacientes nuevos que asistan a la Unidad de Reumatología del Hospital Roosevelt durante el período de enero a junio del 2017 y fueron incluidos en el estudio utilizando un muestreo continuo hasta completar la cantidad establecido para este grupo. El consentimiento informado se obtendrá previo a la toma de la muestra de sangre.

Calculo de la muestra:

La muestra fue calculada utilizando el paquete estadístico Epidat 3.1. Utilizando la fórmula para pruebas diagnósticas con grupos emparejados.

Los parámetros ingresados en la fórmula fueron los siguientes:

- Se estima una prevalencia del 50%.
- Sensibilidad esperada: 82 % (74.6-88.0)
- Especificidad esperada: 73.7 % (64.8-81.4)
- Nivel de confianza: 95%
- Potencia: 80%

Como resultado se obtuvo un número de 271 enfermos y 813 personas sanas para un total de 1084 personas incluidas en el estudio.

Criterios de inclusión

Los pacientes seleccionados para los grupos 2 y 3 deberán estar bajo la sospecha de las siguientes enfermedades autoinmunes:

- Síndrome de sjögren
- Lupus eritematoso sistémico
- Esclerosis sistémica
- Enfermedad mixta del tejido conectivo
- Artritis reumatoide
- Vasculitis

Para el grupo 1 se define persona sana como: Donadores de sangre que no posean ningún resultado anómalo en las pruebas de laboratorio realizadas rutinariamente por los bancos de sangre y que estén dispuestos a participar en el estudio (Marin et al., 2009).

#### Criterios de exclusión

Personas con enfermedades infecciosas

Personas con procesos neoplásicos

Personas que estén bajo algún tratamiento inmunosupresor

#### Consideraciones éticas del estudio

El proceso del consentimiento informado buscó informar a los pacientes sobre la relevancia social del estudio, el cual al permitir conocer la dilución adecuada para la realización de los Fana permite reducir los costos para las personas por ser necesaria la realización de pruebas adicionales que confirmen el diagnóstico de una enfermedad reumatológica autoinmune. Esta reducción de costos es un beneficio que influirá directamente en las personas que poseen sospecha clínica de padecer estas enfermedades.

El presente estudio fue sometido al comité de ética del Hospital Roosevelt, por lo que en el apéndice 2 se incluye el formato del consentimiento informado solicitado por

dicho comité. El proceso del consentimiento informado se realizó para cada uno de los grupos a estudiar de la siguiente forma:

Grupo 1: Se abordó al paciente al momento en que este se encontraba en la cola de espera para la donación de sangre sin importar su etnia o lugar de procedencia, momento en el cual se le leyó (explicará) de manera clara y concisa la información contenida en el documento del consentimiento informado (Ver anexo 1). Este documento presenta información sobre los objetivos del estudio, los aspectos de confidencialidad de la información brindada y el suero obtenido del paciente y los beneficios que este representa para el paciente y para la comunidad. En ese momento se resolvió cualquier duda que el paciente posea y de aceptar este participar en el estudio se le solicitará que firme el documento y se le hará entrega de una copia del mismo. Posterior a esto se llenara la ficha de recolección de datos con la información provista por el paciente (ver anexo 2). Se le entregó un tubo de química al paciente el cual se llenará al momento de obtener las muestras para los análisis en el banco de sangre. Posterior a esto se trasladó las muestras al Laboratorio de Inmunología para su procesamiento y almacenamiento hasta su análisis. (remitido a la unidad)

Grupo 2: Los pacientes del grupo retrospectivo (todos pacientes de la Unidad de Reumatología) serán obtenidos de la base de datos del Laboratorio de Inmunología. El paciente será abordado al asistir a su cita para el proceso de obtención del consentimiento informado. En ese momento se le leyó de manera clara y concisa la información contenida en el documento del consentimiento informado (Ver anexo 1). Este documento presenta información sobre los objetivos del estudio, los aspectos de confidencialidad de la información brindada y el suero obtenido del paciente, y los beneficios que este representa para el paciente y para la comunidad. En ese momento se resolvió cualquier duda que el paciente posea y de lograr la aceptación de este para participar en el estudio se le solicitará que firme el documento y se le hará entrega de una copia del mismo. Posterior a esto se llenara la ficha de recolección de datos con la información provista por el paciente (ver anexo 2). Los sueros al momento de la primer visita de estos pacientes fueron buscados en el banco de sueros del Laboratorio de

Inmunología y fueron incluidos en el estudio. (como ya cuentan con historial seguirán con citas de rutina)

Grupo 3: Los pacientes del grupo prospectivo fueron abordados en la Unidad de Reumatología al momento en que estos llegan a realizarse sus pruebas de laboratorio. En ese momento se le leerá de manera clara y concisa la información contenida en el documento del consentimiento informado (Ver anexo 1). Este documento presenta información sobre los objetivos del estudio, los aspectos de confidencialidad de la información brindada y el suero obtenido del paciente, y los beneficios que este representa para el paciente y para la comunidad. En ese momento se resolvió cualquier duda que el paciente posea y de lograr la aceptación de este para participar en el estudio se le solicitó que firme el documento y se le hizo entrega de una copia del mismo. Posterior a esto se llenó la ficha de recolección de datos con la información provista por el paciente (ver anexo 2). Una porción del suero obtenido para las pruebas de laboratorio será separada y almacenada para ser incluida en el estudio. (como ya cuentan con historial seguirán con citas de rutina)

Operacionalización de las variables o unidades de análisis:

Tabla 1

*Operacionalización de variables o unidades de análisis*

Objetivo específico	Variable	Definición teórica de la variable	Definición operativa	Técnica	Instrumento	Escala de medición
	Sexo	Conjunto de todos los seres humanos que habitan el planeta. indicando la	Dato obtenido del documento de identificación personal	Cualitativa	Nominal	Femenino o Masculino

		diferencia entre identidad femenino de masculino				
	Edad	Tiempo transcurrido a partir del nacimiento de un individuo.	Número de años en la vida de un individuo	Cuantitativa	Discreta	Años
	Fana en diluciones 1:80, 1:160, 1:320, 1:640 y 1:1280	Suero diluido 1:80, 1:160, 1:320, 1:640 o 1:1280 con presencia de ANA dirigidos contra células HEp-2000	Muestra con patrón distinguible y con una intensidad en la fluorescencia mayor a 2.	Cualitativa	Nominal	Positivo o Negativo
	Enfermedad reumatológica autoinmune	Personas que cumplan con criterios diagnósticos para las siguientes enfermedades: Síndrome de Sjögren. Lupus Eritematoso Sistémico. Esclerosis Sistémica.	Se evaluarán los expedientes de los pacientes incluidos en el estudio y se les clasificará de acuerdo a la enfermedad reumatológica	Cualitativa	Nominal	Síndrome de Sjögren. Lupus Eritematoso Sistémico. Esclerosis Sistémica. Enfermedad Mixta del Tejido Conectivo. Artritis Reumatoide .

		Enfermedad Mixta del Tejido Conectivo. Artritis Reumatoide. Vasculitis.	ca autoinmune de acuerdo a criterios diagnósticos .			Vasculitis.
--	--	---	---	--	--	-------------

Procesamiento de datos y plan de análisis:

Se utilizó estadística descriptiva en los grupos de interés. Las variables cualitativas se expresaron como frecuencias y porcentajes con sus respectivos intervalos de confianza (IC) para los grupos de interés en cada una de las diluciones trabajadas; la edad será valorada en media con su desviación estándar. Para el análisis de las variables categóricas se utilizará estadística inferencial mediante Ji cuadrado ( $X^2$ ) o la prueba F exacta de Fisher para diferencias entre grupos para cada dilución; para la variable edad se utilizará ANOVA para diferencias entre los grupos. Se considerará estadísticamente significativo un  $p < .05$ . La sensibilidades y especificidades con sus IC del 95% fueron calculadas tomando el porcentaje de positivos de los pacientes del grupo 2 y 3 a los que se llegó a un diagnóstico establecido de ERA según criterios diagnósticos y el porcentaje de los negativos del grupo 1, 2 y 3. La utilidad diagnóstica fue evaluada utilizando curvas ROC para cada dilución y para todas las diluciones comparando los pacientes con diagnóstico de ERA del grupo 2 y 3 y las personas sanas del grupo 1, 2 y 3. Los análisis estadísticos fueron realizados en el software EPIDAT y MEGASTAT.

## Resultados

Se recolectaron 1082 muestras, de las cuales 268 eran pacientes con solicitud realizada por médico reumatólogo por presentar sospecha clínica de una ERA. Estos pacientes presentaban una edad promedio de 35.09 años y eran en su mayoría mujeres (ver tabla 2). En el grupo con sospecha de ERA se llegó al diagnóstico de 72 pacientes (26.86 %). La ERA que se presentó con mayor frecuencia fue LES seguido por AR. 13 pacientes presentaron otras ERA (7 síndrome antifosfolípido, 5 dermatomiositis y 1 polimiositis), sin embargo estos diagnósticos no fueron incluidos como enfermos en el cálculo para evaluar la prueba diagnóstica.

Se observó diferencias significativas en la edad y el sexo de los pacientes del grupo con sospecha de ERA y el grupo sano, en donde la edad del grupo sano era menor y presentaba una mayor frecuencia de mujeres. La mayor parte de este grupo habitaba en el departamento de Guatemala (87.34 %) y presentaban el 5.22 % reportó no presentar ningún grado de escolaridad, el 29.41 % completó la primaria, 20 % completo la secundaria, 33 % completo el diversificado y 12.15 % reportó estar en la universidad o haber completado una carrera universitaria. 17 personas en este grupo reportaron poseer un familiar con una ERA.

Tabla 2

*Datos sociodemográficos y diagnósticos de los grupos estudiados*

	Grupo ERA (n = 268)	Grupo sano (n = 814)
Edad <sup>a*</sup>	35.09 (15.73)	31.63 (8.68)
Sexo <sup>*</sup>		
Femenino <sup>b</sup>	235 (87.68)	776 (95.33)
Masculino <sup>b</sup>	33(12.32)	38 (4.67)
Procedencia		
Guatemala		711
Otro		113
departamento		
Diagnóstico		

LES	36
AR	23
SS	2
SSc	9
EMTC	1
Psoriasis	1
Otros	13

---

*Nota:* ERA: enfermedad reumatológica autoinmune. LES: lupus eritematoso sistémico. AR: artritis reumatoide. SS: síndrome de sjögren. SSc: esclerosis sistémica. EMTC: enfermedad mixta del tejido conectivo.

<sup>a</sup> n= 256, media (desviación estándar)

<sup>b</sup> frecuencia (porcentaje)

\* p<0.001

Las muestras fueron observadas por dos especialistas entrenados en la observación de anticuerpos antinucleares. En la tabla 3 se presentan los resultados reportados por cada observador para una dilución 1/80. De las 1082 muestras analizadas ambos observadores reportaron como positivas 233 muestras y como negativas 730 muestras. En 119 muestras se reportaron resultados diferentes por los observadores, la concordancia entre ambos observadores fue analizada con el coeficiente de kappa de Cohen el cual tuvo un valor de 0.7212 con un IC 95 % de 0.6744-0.7680 y un valor  $p < 0.001$ . Si se toma en cuenta los intervalos de confianza esto sugiere una concordancia que va de moderada a buena (López, Galparsoro, & Fernández, 1999). También se observó diferencias en los patrones reportados por ambos observadores. El patrón que se reportó con mayor frecuencia en ambos grupos fue el moteado. En el grupo sano segundo patrón que se reportó con mayor frecuencia fue el citoplasmático mientras que en el grupo con sospecha de ERA el segundo en frecuencia fue el patrón homogéneo.

Tabla 3

*Resultados reportados por cada observador según el grupo estudiado*

	Grupo ERA (n = 268)		Grupo sano (n = 814)	
	Observador 1	Observador 2	Observador 1	Observador 2
Positivo	117	133	169	145
Negativo	151	118	645	669
Patrones				
Moteado	65	80	61	57
Homogéneo	34	41	14	20
Centromérico	14	12	4	4
Nucleolar	10	6	25	19
Sugestivo de anti-Ro	14	15	1	2
Periférico		1		4
Mixto	1	5		
Citoplasmático	10	8	61	39
NuMa-1			1	0
MND			2	0
FND	1	1		
Golgi	1	1		
DFS-70	1	3		
GW bodies	0	1		

*Nota:* Los resultados reportados en esta tabla corresponden a una dilución 1/80. El valor kappa entre ambos observadores es de 0.7212 con intervalos de confianza al 95% de 0.6744-0.7680 y valor  $p < 0.001$

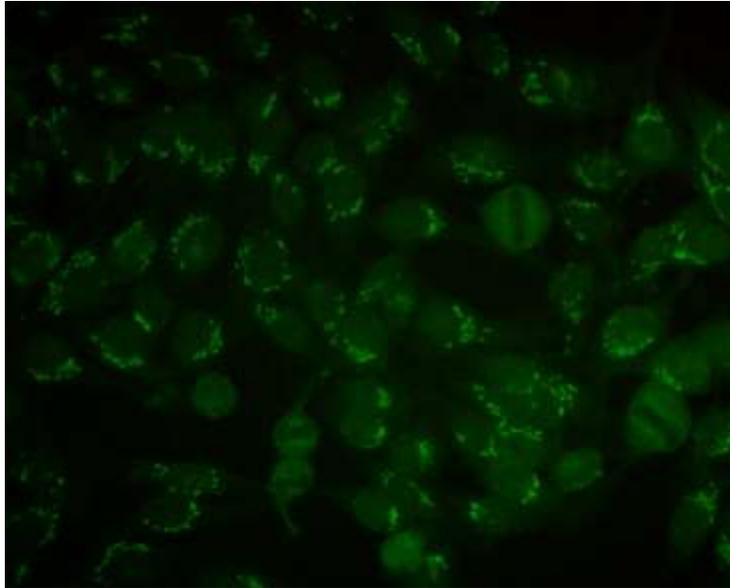


Figura 1. Patrón sugestivo de Golgi

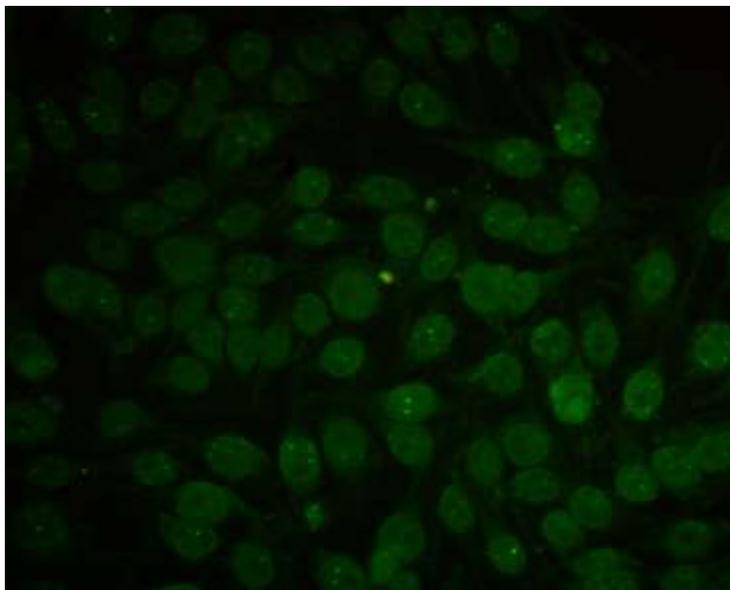


Figura 2. Patrón few nuclear dots (FND)

La presencia de anticuerpos antinucleares en las distintas diluciones trabajadas puede observarse en la tabla 4, en donde se presentan los resultados por grupo. Los datos presentados reportados en la tabla corresponden a los resultados reportados por ambos observadores como positivos. El grupo con sospecha de ERA fue el que presentó la mayor frecuencia de positividad y el mayor porcentaje a todas las diluciones. También se puede

observar que a medida que aumenta la dilución también disminuye la frecuencia de positividad de los FANA. El porcentaje de toda la población a estudio es de 21.72 %, 16.08 %, 10.72 %, 7.94 %, 5.73% para las diluciones 1/80, 1/160, 1/320, 1/640 y 1/1280, respectivamente.

Tabla 4  
*Frecuencia de anticuerpos antinucleares en distintas diluciones*

Dilución	Grupo ERA (n = 268) <sup>a</sup>	Grupo sano ( n = 814) <sup>a</sup>
1/80	126 (47.01)	109 (13.39)
1/160	107 (39.92)	67 (8.23)
1/320	84 (31.34)	32 (3.93)
1/640	68 (25.37)	18 (2.21)
1/1280	54 (20.14)	8 (0.98)

*Nota:* ERA: enfermedad reumatológica autoinmune. Los datos presentados en esta tabla corresponden a los resultados reportados por ambos observadores como positivos.

<sup>a</sup> frecuencia (porcentaje)

En la tabla 5 se puede observar que en el grupo de sanos a medida que la edad aumenta también lo hace la proporción de personas que presentan ANA. Esto se presenta en las diluciones 1/80, 1/160, 1/320 y 1/640.

Tabla 5  
*Presencia de ANA según dilución y rango de edad de grupo sano (n = 814)*

Rango de edad	1/80 ( n = 109)	1/160 (n = 67)	1/320 (n = 32)	1/640 (n = 18)	1/1280 (n = 8)	Total
11-20	5 (8.62)	2(3.45)	1(1.72)	1(1.72)		58
21-30	36(10.75)	21(6.27)	9(2.69)	4(1.19)	1(0.30)	335
31-40	39(15.42)	25(9.88)	13(5.14)	7(2.77)	4(1.58)	253
41-50	26(17.33)	16(10.67)	8(5.33)	5(3.33)	3(2.0)	150
51-60	3(16.67)	3(16.67)	1(5.56)	1(5.56)		18

*Nota:* ANA: anticuerpo antinuclear. Datos en frecuencias (porcentaje)

En el grupo de pacientes con sospecha de ERA no se evidencia el aumento de la proporción de ANA a medida que aumenta la edad de los pacientes. Esto se sostiene para todas las diluciones.

Tabla 6

*Presencia de ANA según dilución y rango de edad de grupo ERA (n = 253)*

Rango de edad	1/80 (n = 123)	1/160 (n = 104)	1/320 (n = 83)	1/640 (n = 66)	1/1280 (n = 52)	Total
11-20	23(36.66)	20(34.48)	16(27.59)	10(17.24)	9(15.52)	58
21-30	26(57.78)	20(44.44)	17(37.78)	17(37.78)	12(26.67)	45
31-40	26(41.94)	22(35.48)	17(27.42)	12(19.35)	8(12.90)	62
41-50	25(59.52)	23(54.76)	21(50.00)	16(38.10)	14(33.33)	42
51-60	15(41.72)	14(48.28)	10(34.48)	9(31.03)	7(24.14)	29
60-70	7(46.67)	5(33.33)	2(13.33)	2(13.33)	2(13.33)	15
70-80	1(50.00)					2

*Nota:* ANA: anticuerpo antinuclear. ERA: enfermedad reumatológica autoinmune Datos en frecuencias (porcentaje). Dos pacientes tenían menos de 11 años de edad. No se encontró el dato de la edad de 15 pacientes.

La presencia de ANA según el rango de edad en toda la población de estudio demuestra un aumento en el porcentaje de presencia de ANA a medida que aumenta la edad. Sin embargo el rango de edad 11-20 años presenta un porcentaje superior a los rangos de edad 21-30 y 31-40.

Tabla 7

*Presencia de ANA según dilución y rango de edad de todas las personas (n = 1067)*

Rango de edad	1/80 (n = 232)	1/160 (n = 171)	1/320 (n = 115)	1/640 (n = 84)	1/1280 (n = 60)	Total
11-20	28(24.14)	22(18.97)	17(14.66)	11(9.48)	9(7.76)	116
21-30	62(16.32)	41(10.79)	26(6.84)	21(5.53)	13(3.42)	380
31-40	65(20.63)	47(14.92)	30(9.52)	19(6.03)	12(3.81)	315
41-50	51(26.56)	39(20.31)	29(15.10)	21(10.94)	17(8.85)	192
51-60	18(38.30)	17(36.17)	11(23.40)	10(21.28)	7(14.89)	47
60-70	7(46.67)	5(33.33)	2(13.33)	2(13.33)	2(13.33)	15
70-80	1(50.00)				0	2

*Nota:* ANA: anticuerpo antinuclear. Datos en frecuencias (porcentaje). Dos pacientes tenían menos de 11 años de edad. No se encontró el dato de la edad de 15 pacientes

Las pruebas de precisión diagnóstica para las diferentes diluciones pueden observarse en la tabla 8. La dilución que presentó la mejor sensibilidad fue la dilución 1/80 con una sensibilidad del 90.28%. Esta dilución también fue la que presentó la menor razón de verosimilitud negativa con un valor de 0.12 y en el análisis de la curva ROC fue la que presentó la mayor área bajo la curva (AUC = 0.8672). Los resultados en esta dilución se logran sin comprometer la especificidad (83.17 %) ni la razón de verosimilitud positiva (5.36).

La dilución que presentó la mayor especificidad fue 1/1280 con un valor de 96.34 %. La dilución que presento la razón de verosimilitud más grande fue la 1/640 con una razón de 9.63. Contrario a lo observado para la dilución 1/80, en esta dilución se observa una importante reducción en la sensibilidad, razón de verosimilitud negativa y área bajo la curva.

Tabla 8.

*Pruebas de precisión diagnóstica a distintas diluciones*

	Sensibilidad <sup>a</sup>	Especificidad <sup>a</sup>	RV+ <sup>b</sup>	RV- <sup>b</sup>	AUC <sup>c</sup>
1/80	90.28 (82.74-97.82)	83.17 (80.81-85.53)	5.36 (4.59-6.27)	0.12 (0.06-0.24)	0.8677 (0.83-0.90)
1/160	77.78 (67.48-88.08)	88.32 (86.29-90.35)	6.66 (5.40-8.21)	0.25 (0.16-0.39)	0.8305 (0.78-0.88)
1/320	63.38 (51.47-75.29)	92.87 (91.23-94.51)	8.89 (6.69-11.81)	0.39 (0.29-0.54)	0.7813 (0.72-0.84)
1/640	48.61 (36.37-60.85)	94.95 (93.55-96.35)	9.63 (6.73-13.77)	0.54 (0.43-0.68)	0.7178 (0.66-0.78)
1/1280	34.72 (23.03-46.41)	96.34 (95.13-97.54)	9.48 (6.06-14.83)	0.68 (0.57-0.80)	0.6553 (0.59-0.71)

Nota: RV+: razón de verosimilitud positiva. RV-: razón de verosimilitud negativa. AUC: área bajo la curva.

<sup>a</sup> = datos en porcentaje (intervalos de confianza al 95 %)

<sup>b</sup> = datos en razones (intervalos de confianza al 95 %)

<sup>c</sup> = área bajo la curva (intervalos de confianza al 95 %)

Matriz de resultados

Objetivo Específico	Resultado Esperado	Resultado obtenido
Determinar la frecuencia de anticuerpos antinucleares en distintas diluciones de sueros de personas sanas guatemaltecas.	Se esperaba obtener los siguientes porcentajes de positividad según la dilución: 1/80 = 12-15 % 1/160 = 5-8 % 1/320 = 3-5 % 1/640 = 1-3% 1/1280 = 1 %	Se obtuvieron los siguientes porcentajes según las diluciones: 1/80 = 13.3 % 1/160 = 8.2 % 1/320 = 3.9 % 1/640 = 2.2 % 1/1280 = 0.9 %

<p>Determinar la frecuencia de anticuerpos antinucleares en distintas diluciones de sueros de pacientes con ERA que asisten a la Unidad de Reumatología del Hospital Roosevelt.</p>	<p>Se esperaba un 50 % de positividad en una dilución 1/80</p>	<p>Se obtuvieron los siguientes porcentajes según las diluciones:</p> <p>1/80 = 47.0 %  1/160 = 39.9 %  1/320 = 31.3 %  1/640 = 25.3 %  1/1280 = 20.1 %</p>
<p>Evaluar la precisión diagnóstica de las diferentes diluciones entre personas sanas y pacientes con ERA.</p>	<p>Se esperaba que la dilución con mayor sensibilidad fuese 1/80 y que la dilución con mayor especificidad fuese 1/1280. Se esperaba que el AUC fuese mayor en la dilución 1/160.</p>	<p>La mayor sensibilidad reportada fue de la dilución 1/80 con un 90.3 % y la mayor especificidad reportada fue de la dilución 1/1280 con un 96.3 %. La dilución que presentó la mayor AUC fue 1/80 con un valor de 0.8672.</p>

#### Impacto esperado

La dilución que presentó la mejor capacidad de discriminación fue 1/80. Establecer esta dilución para la realización de los anticuerpos antinucleares por inmunofluorescencia en el diagnóstico de las ERA en el laboratorio de Inmunología del Hospital Roosevelt permitirá la reducción de los resultados falsos positivos, así como el correcto abordaje de los pacientes por parte del médico tratante. Los costos también se verán reducidos al ya no ser necesaria la realización de pruebas confirmatorias.

## Análisis y discusión de resultados

Las personas con ERA suelen presentar ANA. Se ha demostrado que estos anticuerpos pueden estar presentes hasta 3 años antes del diagnóstico y hasta 2 años antes del inicio de los síntomas (Arbuckle et al., 2003). A pesar ello la presencia de estos anticuerpos no es prueba de que la persona vaya a desarrollar una ERA. En un estudio llevado a cabo en Japón, se evaluó la presencia de ANA en la población general (n = 2181) y a los pacientes que presentaron ANA (n = 566) se les evaluó anticuerpos específicos de ERA. De estos 100 pacientes presentaron positividad a estos anticuerpos específicos y solamente 18 llegaron a desarrollar una ERA. Sin embargo el seguimiento de los pacientes con ANA al final de estudio fue de solamente 60 personas (Hayashi et al., 2008).

El grupo con sospecha de ERA presentó mayor edad que el grupo sano (35 vs 31 años). Varios estudios han realizado análisis sobre el efecto de la edad en la positividad de los ANA. Un estudio llevado a cabo en Serbia evaluó a 10851 personas y encontró que a medida que aumentaba la edad también lo hacía la presencia de ANA (Racoubian, Zubaid, Shareef, & Almawi, 2016). Esta observación fue también realizada en el grupo sano en donde se demostró que a medida que aumenta la edad también lo hace la proporción de ANA en la población, con excepción de la dilución 1/1280 (Tabla 4).

Sin embargo los resultados obtenidos en el grupo sano contrastan con los obtenidos en otras poblaciones en donde no se encontró diferencias significativas entre las edades analizadas y la presencia de ANA. Los resultados obtenidos en el presente estudio para el grupo de pacientes con sospecha de ERA (tabla 7) tampoco demostraron ninguna tendencia con respecto a la edad (Fernandez et al., 2003; Hayashi et al., 2008; Selmi et al., 2016; Tan et al., 1997).

Al analizar todas las personas del estudio se pone en evidencia que la presencia de ANA aumenta a medida que aumenta la edad. Esto es consistente con varios estudios en los cuales se analizó a la población general independientemente de si presentaban o no una ERA (Racoubian et al., 2016; Satoh et al., 2012; Terao et al., 2014). Sin embargo en el

rango de edad 11-20 años se presenta un porcentaje de positividad bastante elevado. Uno de los motivos por los cuales se pudo dar este efecto es debido a que el muestreo del grupo sano solamente incluyó donadores del banco de sangre y por consiguiente estos deben de presentar más de 18 años de edad. Es también importante observar que el grupo de sanos la frecuencia de 11-20 años fue la segunda menor después de 50-60 años. Esto añadido al hecho que en el grupo de pacientes con sospecha de ERA la limitante de edad esta dada por la edad a la cual pueden ser atendidos por la Unidad de Reumatología del Hospital Roosevelt (mayores a 12 años) provoco que el efecto de la presencia de ANA en el grupo ERA influenciara en el porcentaje observado en este rango de edad.

Con respecto al sexo se observaron diferencias significativas entre ambos grupos, siendo la proporción de mujeres mayor en el grupo sano. La relación entre el sexo femenino y la presencia de ANA es consistente en todos los estudios, independientemente de la población estudiada (con ERA, con sospecha de ERA o personas sanas) (Fernandez et al., 2003; Racoubian et al., 2016; Satoh et al., 2012; Selmi et al., 2016; Tan et al., 1997; Terao et al., 2014) Debido a esta observación algunos autores han propuesto que factores hormonales o propios de la mujeres pueden tener un papel importante en la producción de los ANA (Satoh et al., 2012).

Se llegó al diagnóstico de una ERA en el 26.8 % de los pacientes del grupo con sospecha de una ERA. La mayor parte de los estudios reportan prevalencias menores (9.1 % a 21.0 %) en el diagnóstico de enfermedades del tejido conectivo (ETC) (Abeles & Abeles, 2013; Fitch-Rogalsky et al., 2014; Minz et al., 2012; Selmi et al., 2016; Yang, Ren, Liu, Lin, & Liang, 2016). Diversos factores pueden ser atribuidos al elevado porcentaje de diagnósticos reportado en el presente estudio. Quizá el factor más importante en el presente estudio es uno de los criterios de inclusión de los pacientes en el grupo ERA, el cual establece que para poder ser incluido en el estudio el paciente debía de presentar una prescripción de laboratorio para la realización de Fana realizada por un médico reumatólogo. Esto implica que desde un inicio se tenía la sospecha clínica de una posible ERA, con lo cual se aumenta la probabilidad de una ERA que presentaba este grupo. En un estudio llevado a cabo en 355 pacientes con manifestaciones clínicas que hacían sospechar una ETC y la presencia de

ANA se llegó al diagnóstico de una ETC en el 47.00 % de la población estudiada a los 6 meses de realizado el ANA (Wang et al., 2011). Otro estudio llevado a cabo en una unidad especializada de reumatología en España se encontró que el 28.0 % de las personas con una solicitud de ANA realizada por un reumatólogo poseían el diagnóstico de una enfermedad sistémica del tejido conectivo (LES, SAF, SSc, SS, EMTC y miopatía inflamatoria) (Menor Almagro et al., 2016).

En un estudio en donde se evaluó 15357 pacientes con sospecha de una ETC que fueron ingresados a una base de referencias de reumatología en Canadá se llegó al diagnóstico de una ETC en el 12.10 % de los casos. De los pacientes ingresados en el registro 236 fueron evaluados por un reumatólogo, todos con un Fana positivo, y el 24.00 % de los pacientes fueron diagnosticados con una ERA asociada a ANA, el 38.80 % presentó otra enfermedad reumatológica, y el 11.00 presentó sintomatología para una ERA pero no cumplió criterios diagnósticos (Fitch-Rogalsky et al., 2014). Ambos estudios presentan resultados bastante similares con los reportados en la presente investigación, y como puede observarse los criterios de inclusión de los pacientes también son similares entre los estudios.

Los Fanas fueron reportados por dos observadores independientes los cuales tuvieron un coeficiente de kappa de Cohen de 0.7212 y un porcentaje de concordancia del 89%, lo cual indica que hubo una buena correlación en los resultados reportados por ambos observadores. Estos valores son bastante similares a los reportados en estudios previos (Brito et al., 2014; Copple et al., 2012; Tan et al., 1997).

Al igual que otros estudios realizados en donadores de banco de sangre, en el presente estudio el patrón más frecuentemente observado fue el patrón moteado. Una observación interesante en el presente estudio es la elevada cantidad de patrones citoplasmáticos observados en el grupo de sanos. Este patrón es el segundo en frecuencia en el presente estudio lo cual contrasta con estudios previos en donde este patrón ha sido observado en frecuencias bastante bajas (Brito et al., 2014; Fernandez et al., 2003; Marin, Cardiel, Cornejo, & Viveros, 2009; Tan et al., 1997; Yang et al., 2016).

La positividad de los anticuerpos antinucleares en toda la población a una dilución 1/80 fue de 21.72 %, la cual es bastante similar a la reportada por otros autores cuando no toman en cuenta distinción entre enfermos y sanos (Roberts-Thomson, Nikoloutsopoulos, Cox, Walker, & Gordon, 2003; Selmi et al., 2016). Sin embargo otros autores han reportado que en la población general este porcentaje es tan bajo como el observado en donadores de sangre (Satoh et al., 2012; Terao et al., 2014). Por otro lado el grupo sano presentó un porcentaje de positividad menor (13.39 %) al observado en la población de estudio en todas las diluciones. Pese a ello este resultado reportado es bastante similar al reportado por otros autores para donadores de sangre (Brito et al., 2014; Fernandez et al., 2003; Marin et al., 2009; Tan et al., 1997) y al reportado por Satoh et al. (2012) y Terao et al. (2014) en la población general.

La recomendación técnica de ACR/EULAR (Agmon-Levin et al., 2014) establece que la dilución adecuada para la realización de los Fana es 1/160, esto fundamentado en que en la mayor parte de los estudios a esta dilución se presenta el percentil 95 %. En el presente estudio el grupo sano presentó un 8.23 % de positividad en la dilución 1/160. Este porcentaje tan alto solo fue observado por Hayashi et al. (2008) en un estudio llevado a cabo en Japón en 2181 personas en el cual se obtuvo un 9.5 %. Este porcentaje también puede ser también explicado por el alto porcentaje de personas del sexo femenino en las personas analizadas, el cual es mayor al reportado por estudios previos (Brito et al., 2014; Fernandez et al., 2003; Marin et al., 2009; Satoh et al., 2012; Tan et al., 1997; Terao et al., 2014)

Los resultados obtenidos en las pruebas de precisión diagnóstica observadas en el presente estudio son bastante similares a los reportados por Brito et al. (2014) quién reporto una sensibilidad del 87.7 % para una dilución 1/80 en pacientes con una enfermedad reumatológica asociado a ANA. A pesar de la similitud obtenida en esta dilución a partir de la dilución 1/160 las sensibilidades obtenidas en el presente estudio son menores a las reportadas (82 % vs 77 % para 1/160 y 74.8 % vs 63 % para 1/320). Esta observación se da muy probablemente por diferencias en las enfermedades incluidas para el cálculo de la sensibilidad. En el presente estudio se incluye a la AR como una ERA, la cual en estudios

anteriores ha demostrado presentar una sensibilidad bastante baja en los Fanas (37.8 % en 1/80 y 13.5 en 1/160) (Tan et al., 1996)

También existe una importante diferencia en la especificidad reportada (67.8 %), principalmente por diferencias en los criterios (especificidad calculada como pacientes con una enfermedad reumatológica no asociada a ANA [artritis reumatoide, osteoartritis, hepatitis autoinmune, espondiloartropatía, fibromialgia y gota] con ANA positivo) para realizar el cálculo de la especificidad. Esta diferencia es también observada en el estudio de Tan et al. (1996) en el cual se reporta la especificidad únicamente como el porcentaje de negativos obtenidos en el grupo de sanos del estudio. Como puede observarse el criterio de “enfermo” es muy importante a la hora de realizar el cálculo de la sensibilidad y especificidad. El estudio con la mayor similitud en cuanto al criterio de “enfermo” fue el realizado por Slater, Davis, & Robert, (1996) el cual buscó evaluar la utilidad diagnóstica de los ANA en 256 personas. A pesar de ello el estudio de Slater, Davis, & Robert, (1996) no incluyó un grupo de sanos y por ello se observan diferencias importantes en la sensibilidad reportada entre ambos estudios (sensibilidad de 60 % para 1/40 vs 90 % para 1/80 en el presente estudio y especificidad 87 % para 1/40 vs 83 % para 1/80 en el presente estudio).

A pesar de las diferencias encontradas en la sensibilidad y especificidad de la prueba, un criterio similar en el cálculo de las RV fue utilizado entre el estudio de Brito et al. (2014) y el presente estudio. Sin embargo se observó que las RV solamente fueron similares para una dilución 1/80 (RV + 6.5 vs 5.3 y RV - 0.12 vs 0.14) y que a partir de la dilución 1/160 las RV+ fueron mucho menores a las reportadas por Brito et al. (2014).

El análisis de las curvas ROC en el presente estudio indica que la dilución con el mejor poder discriminatorio es la dilución 1/80, siendo esta dilución la que presenta la mejor sensibilidad (90.28 %) con una especificidad bastante aceptable (83.13 %). Esta dilución fue también la recomendada por Slater, Davis, & Robert, (1996), quien utilizó criterios para la clasificación de “enfermos” similares a los utilizados en el presente estudio. Las recomendaciones de diversos grupos en la realización de los Fana indican que el título

adecuado es 1/160 (Agmon-Levin et al., 2014; Sack et al., 2009; Tozzoli et al., 2002), esta recomendación surge de los estudios de Tan et al. (1996) o el de Kang, Siperstein, Quan, & Breitenstein, (2004). Otros autores también han recomendado esta dilución como la ideal, basados principalmente en el porcentaje de negativos obtenido del grupo de sanos (Brito et al., 2014; Marin et al., 2009). Sin embargo es de mucha importancia conocer que dependiendo de la enfermedad los resultados de la sensibilidad y especificidad pueden variar (Tan et al, 1996).

## Conclusiones

La dilución que presentó el mejor poder discriminatorio entre enfermos y sanos fue la dilución 1/80.

El grupo de sanos presentó ANA en el 13.8 % a una dilución de 1/80, porcentaje de ANA disminuyó a medida que aumentó la dilución.

Se detectó ANA en el 47.0 % de los pacientes con sospecha de un ERA, al igual que en el grupo de sanos el porcentaje disminuyó a medida que aumentó la dilución.

La dilución 1/80 presentó la mayor sensibilidad (90.3 %) y AUC (0.8276); y la mayor especificidad fue presentada por la dilución 1/1280 (96.3 %) .

## Referencias

- Abeles, A. M., & Abeles, M. (2013). The clinical utility of a positive antinuclear antibody test result. *The American Journal of Medicine*, *126*(4), 342–8.
- Agmon-Levin, N., Damoiseaux, J., Kallenberg, C., Sack, U., Witte, T., Herold, M., ... Shoenfeld, Y. (2014). International recommendations for the assessment of autoantibodies to cellular antigens referred to as anti-nuclear antibodies. *Ann Rheum Dis*, *73*(1), 17–23.
- Arbuckle, M. R., McClain, M. T., Rubertone, M. V., Scofield, R. H., Dennis, G. J., James, J. A., & Harley, J. B. (2003). Development of Autoantibodies before the Clinical Onset of Systemic Lupus Erythematosus. *New England Journal of Medicine*, *349*(16), 1526–1533.
- Beck, J. S. (1961). Variations in the morphological patterns of "Autoimmune" nuclear fluorescence. *Lancet*, *1*, 1203-1205.
- Brito, F. D. A., Santos, S. M. E., Ferreira, G. A., Pedrosa, W., Gradisse, J., Costa, L. C., & Neves, S. P. F. (2014). Detection of anti-nuclear antibodies by indirect immunofluorescence on HEp-2 cells: setting the appropriate screening dilution for the diagnosis of autoimmune rheumatic diseases. *Revista Brasileira de Reumatologia (English Edition)*, *54*(1), 13–20
- Copple, S. S., Giles, S. R., Jaskowski, T. D., Gardiner, A. E., Wilson, A. M., & Hill, H. R. (2012). Screening for IgG antinuclear autoantibodies by HEp-2 indirect fluorescent antibody assays and the need for standardization. *American Journal of Clinical Pathology*, *137*(5), 825–830.
- de Almeida, F., Elói, S. M., Ferreira, G. A., Pedrosa, W., Gradisse, J., Costa, L. C., y Figueiredo, S. P. (2014). Detection of antinuclear antibodies by indirect immunofluorescenc on HEp-2 cells: setting the appropriate screening dilution for the diagnosis of autoimmune rheumatic diseases. *Revista Brasileira de Reumatologia*, *54*(1), 13-20.
- Dellavance, A., de Melo, W., Carvalho, P. L., Pitangueira, C. L., Drugowick, I. C., Rodrigues, S. H., & Coelho, L. E. (2013). Variability in the recognition of distinctive immunofluorescence patterns in different brands of HEp-2 cell slides. *Jornal Brasileiro de Patologia de Medicina de Laboratorio*, *49*(3), 182-190.

- Fennell, R. H., Rodnan, G. P., & Vásquez, J. J. (1962). Variability of tissue-localizing properties of serum from patients with different disease state. *Laboratory Investigation*, *11*, 24-31.
- Fernandez, S. A. V., Lobo, A. Z. C., Oliveira, Z. N. P. de, Fukumori, L. M. I., Prigo, A. M., & Rivitti, E. A. (2003). Prevalence of antinuclear autoantibodies in the serum of normal blood donors. *Revista Do Hospital Das Clínicas*, *58*(6), 315–9.
- Fitch-Rogalsky, C., Steber, W., Mahler, M., Lupton, T., Martin, L., Barr, S. G., ... Fritzler, M. J. (2014). Clinical and serological features of patients referred through a rheumatology triage system because of positive antinuclear antibodies. *PLoS ONE*, *9*(4), e93812.
- Friou, G. J. (1957). Clinical application of lupus serum nucleoprotein reaction using fluorescent antibody technique. *Journal of Clinical Investigation*, *36*, 890-897.
- Friou, G. J. (1958)a. Clinical application of a tes for lupus globulin nucleohistona interaction using fluorescent antibody. *Yale Journal of Biology and Medicie*, *31*, 476-481.
- Friou, G. J. (1958)b. Identification of the nuclear component of the interaction of lupus erythematosus globulin and nuclei. *Journal of Immunology*, *31*, 476-481.
- Friou, G. J. (1958)c. The signifcnase of the lupus globulin-nucleoprotein reaction. *Annals of internal Medicine*, *49*, 886-894.
- Friou, G. J. (1964). Immunofluorescence and antinucelar antibodies. *Arthritis and Rheumatism*, *7*, 161-166.
- Friou, G. J., Finch, S. C., & Detrie, K. D. (1958). Interaction of nulei and globulin from lupus erythematosus serum demostrated with fluorescent antibody. *Journal of Immunology*, *80*, 224-229.
- Friou, G. J., & Teague, P. O. (1964). Spontaneous autoimmunity in mice: to nucleoprotein strain A/J. *Science*, *143*(3612), 1333-1334.
- García, C. O., Ajiataz, N. G., Chapas, R. R., Citalan, J. E., Estrada, C. P., Menéndez, D. R., ... Cifuentes, M. E. (2012). Caracterización epidemiológica, clínica y terapéutica de pacientes con lupus eritematoso sistémico. *Revista Guatemalteca de Reumatología*, *2*(1), 17-30.

- Hahon, N., Eckert, H., & Stewart, J. (1975). Evaluation of cellular substrates for antinuclear antibody determinations. *Journal of Clinical Microbiology*, 2(1), 42-45.
- Hargraves, M. M., Richmond, H., y Morton, R. (1949). Presentation of two bone marrow elements: the "tart" cell and "LE" cell. *Proceedings of the Staff Meetings of the Mayo Clinic*, 23, 25-28.
- Haserick, J. R., & Bortz, D. W. (1979). Normal bone marrow inclusion phenomena induced by lupus erythematosus plasma. *Journal of Investigative Dermatology*, 13, 47-49.
- Hayashi, N., Koshiba, M., Nishimura, K., Sugiyama, D., Nakamura, T., Morinobu, S., ... Kumagai, S. (2008). Prevalence of disease-specific antinuclear antibodies in general population: Estimates from annual physical examinations of residents of a small town over a 5-year period. *Modern Rheumatology*, 18(2), 153–160.
- Herrera, M. (2012). Lupus eritematoso sistémico. Reporte de 50 años de investigación en Guatemala. *Revista de Reumatología de Guatemala*, 2(1), 4-16.
- Iglesias, A., Siachoque, H., Pons, B., Restrepo, J. F., Quintana, G., & Gómez, A. (2009). Historia de la autoinmunidad. Primera Parte. La inmunología ¿desde dónde y hacia dónde? *Revista Colombiana de Reumatología*, 16(1), 11-31.
- Jovel, A., Arreola, R., & Herrera, M. (2012). *Anticuerpos antinucleares, anticuerpos extraíbles del núcleo y el diagnóstico final*. Hospital Roosevelt, Unidad de Reumatología.
- Kang, I., Siperstein, R., Quan, T., & Breitenstein, M. Lou. (2004). Utility of age, gender, ANA titer and pattern as predictors of anti-ENA and -dsDNA antibodies. *Clinical Rheumatology*, 23(6), 509–515.
- Lanchmann, P. J., & Kunkel, H. G. (1961). Correlation of antinuclear antibodies an nuclear staining patterns. *Lancet*, 2, 436-437.
- Lippmann, M., Eckert, H. L., Hahon, N., & Morgan, W. K. (1973). Circulating antinuclear and rheumatoid factors in coal miners. *Annals of Internal Medicine*, 79, 807-811.
- López, A., Galparsoro, D. U., & Fernández, P. (1999). Medidas de concordancia : el índice de Kappa. *Cadernos de Atención Primaria*, 6, 169–171.
- Manns, M. P., Czaja, A. J., Gorham, J. D., Krawitt, E. L., Mieli-Vergani, G., Vergani, D., & Vierling, J. M. (2010). Diagnosis and management of autoimmune hepatitis. *Hepatology*, 51(6), 2193–2213

- Marin, G. G., Cardiel, M. H., Cornejo, H., & Viveros, M. E. (2009). Prevalence of Antinuclear Antibodies in 3 Groups of Healthy Individuals. *JCR: Journal of Clinical Rheumatology*, 15(7), 325–329.
- Menor Almagro, R., Rodríguez Gutiérrez, J. F., Martín-Martínez, M. A., Rodríguez Valls, M. J., Aranda Valera, C., & de la Iglesia Salgado, J. L. (2016). Association between antinuclear antibodies titers and connective tissue diseases in a Rheumatology Department. *Reumatología Clínica*, 0(0), in press.  
<http://doi.org/10.1016/j.reuma.2016.03.019>
- Minz, R. W., Kumar, Y., Anand, S., Singh, S., Bamberi, P., Verma, S., & Shegal, S. (2012). Antinuclear antibody positive autoimmune disorders in North India: An appraisal. *Rheumatology International*, 32(9), 2883–2888.
- Muna, N. M., Verner, J. L., & Hammond, D. F. (1966). Fluorescent antibody technic as a routine procedure in the diagnosis of lupus erythematosus using stored tissue culture cells. *American Journal of Clinical Pathology*, 45, 117-121.
- Petri, M., Orbai, A. M., Alarcón, G. S., Gordon, C., Merrill, J. T., Fortin, P. R., ... Magder, L. S. (2012). Derivation and validation of the systemic lupus international collaborating clinics classification criteria for systemic lupus erythematosus. *Arthritis and Rheumatism*, 64(8), 2677–2686. <http://doi.org/10.1002/art.34473>
- Racoubian, E., Zubaid, R. M., Shareef, M. A., & Almawi, W. Y. (2016). Prevalence of antinuclear antibodies in healthy Lebanese subjects, 2008–2015: a cross-sectional study involving 10,814 subjects. *Rheumatology International*, 36(9), 1231–1236.
- Roberts-Thomson, P. J., Nikoloutsopoulos, T., Cox, S., Walker, J. G., & Gordon, T. P. (2003). Antinuclear antibody testing in a regional immunopathology laboratory. *Immunology and Cell Biology*, 81(5), 409–412.
- Rose, N. R. (2015) In the beginning. *The Israel Medicine Association Journal*, 17, 74-79.
- Sack, U., Conrad, K., Csernok, E., Frank, I., Hiepe, F., Krieger, T., ... Mierau, R. (2009). Autoantibody detection using indirect immunofluorescence on HEp-2 cells. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1173, 166–173.
- Satoh, M., Chan, E. K. L., Ho, L. A., Rose, M., Parks, C. G., Cohn, R. D., ... Miller, F. W. (2012). Prevalence and Sociodemographic Correlates of Antinuclear Antibodies In the United States. *Arthritis and Rheumatism*, 64(7), 2319–2327.

- Selmi, C., Ceribelli, A., Generali, E., Scirè, C. A., Alborghetti, F., Colloredo, G., ... Meroni, P. L. (2016). Serum antinuclear and extractable nuclear antigen antibody prevalence and associated morbidity and mortality in the general population over 15years. *Autoimmunity Reviews*, *15*(2), 162–166.
- Shiboski, S. C., Shiboski, C. H., Criswell, L. A., Baer, A. N., Challacombe, S., Lanfranchi, H., ... Daniels, T. E. (2012). American College of rheumatology classification criteria for Sjögren’s syndrome: A data-driven, expert consensus approach in the Sjögren’s International Collaborative Clinical Alliance cohort. *Arthritis Care and Research*, *64*(4), 475–487.
- Slater, C. a, Davis, R. B., & Robert, H. (1996). Antinuclear Antibody Testing: A Study of Clinical Utility. *Archives of Internal Medicine*, *156*, 1421–1425.
- Tan, E. M., Feltkamp, T. E. W., Smolen, J. S., Butcher, B., Dawkins, R., Fritzler, M. J., ... Koziol, J. A. (1997). Range of antinuclear antibodies in “healthy” individuals. *Arthritis and Rheumatism*, *40*(9), 1601–1611
- Terao, C., Ohmura, K., Yamada, R., Kawaguchi, T., Shimizu, M., Tabara, Y., ... Mimori, T. (2014). Association between antinuclear antibodies and the hla class ii locus and heterogeneous characteristics of staining patterns: The nagahama study. *Arthritis and Rheumatology*, *66*(12), 3395–3403.
- Tozzoli, R., Bizzaro, N., Tonutti, E., Villalta, D., Bassetti, D., Manoni, F., ... Rizzotti, P. (2002). Guidelines for the Laboratory Use of Autoantibody Tests in the Diagnosis and Monitoring of Autoimmune Rheumatic Diseases. *American Journal of Clinical Pathology*, *117*, 316–324.
- Van Den Hoogen, F., Khanna, D., Fransen, J., Johnson, S. R., Baron, M., Tyndall, A., ... Pope, J. E. (2013). 2013 classification criteria for systemic sclerosis: An american college of rheumatology/European league against rheumatism collaborative initiative. *Arthritis and Rheumatism*, *65*(11), 2737–2747.
- Wang, K. Y., Yang, Y. H., Chuang, Y. H., Chan, P. J., Yu, H. H., Lee, J. H., ... Chiang, B. L. (2011). The initial manifestations and final diagnosis of patients with high and low titers of antinuclear antibodies after 6 months of follow-up. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, *44*(3), 222–228.

- Wayne, P. A. (2008). *Defining, establishing, and verifying reference intervals in the clinical laboratory. Approved Guideline, 3.* (CLSI document C28-A3). Recuperado de: [http://shop.clsi.org/site/Sample\\_pdf/EP28A3C\\_sample.pdf](http://shop.clsi.org/site/Sample_pdf/EP28A3C_sample.pdf)
- Weller, T. H., & Coons, A. H. (1954). Fluorescent antibody studies with agents of varicella and herpes zoster propagated in vitro. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 86, 789-794.
- Yang, Z., Ren, Y., Liu, D., Lin, F., & Liang, Y. (2016). Prevalence of systemic autoimmune rheumatic diseases and clinical significance of ANA profile: data from a tertiary hospital in Shanghai, China. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica*, 124(9), 805–811.

## Apéndice



Figura 3. Preparación de las muestras y sus diluciones

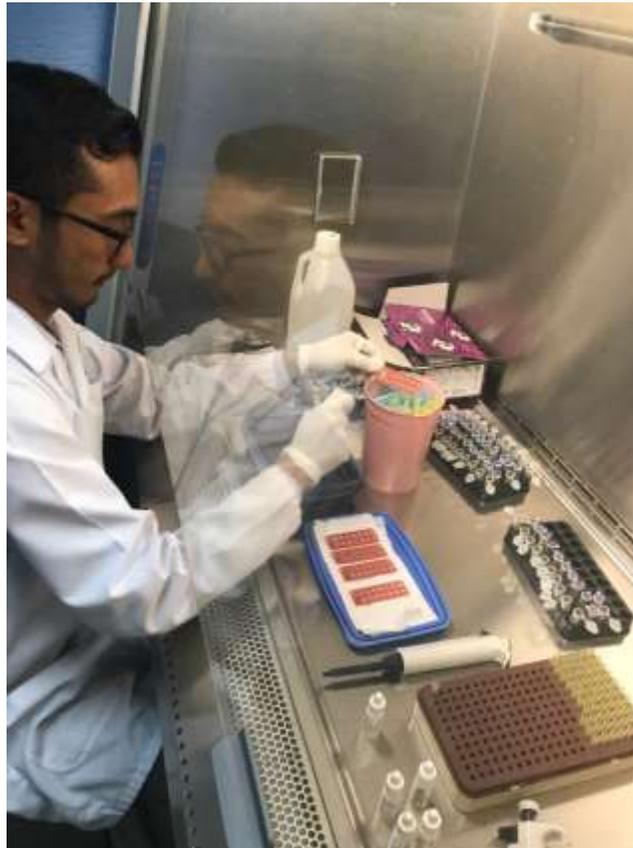


Figura 4. Preparación de las muestras y sus diluciones



Figura 5. Microscopio de inmunofluorescencia y observación de láminas

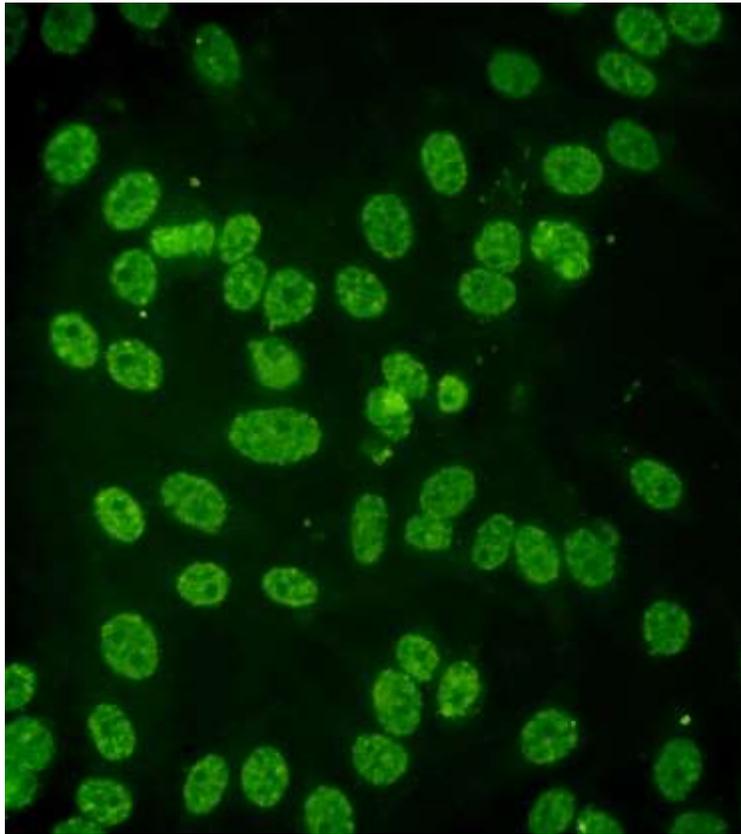


Figura 6. Patrón moteado denso fino (DFS)

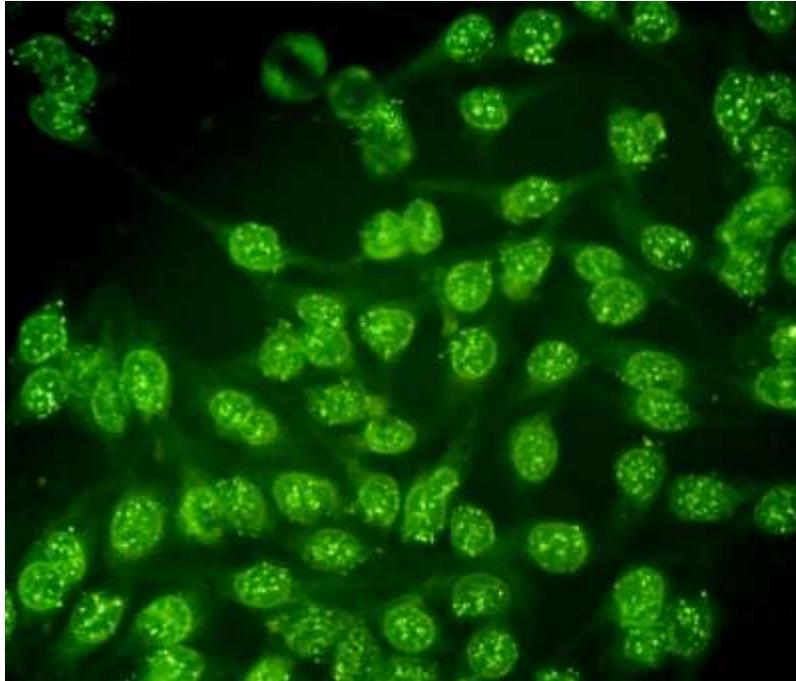


Figura 7. Patrón multiple nuclear dots (MND)

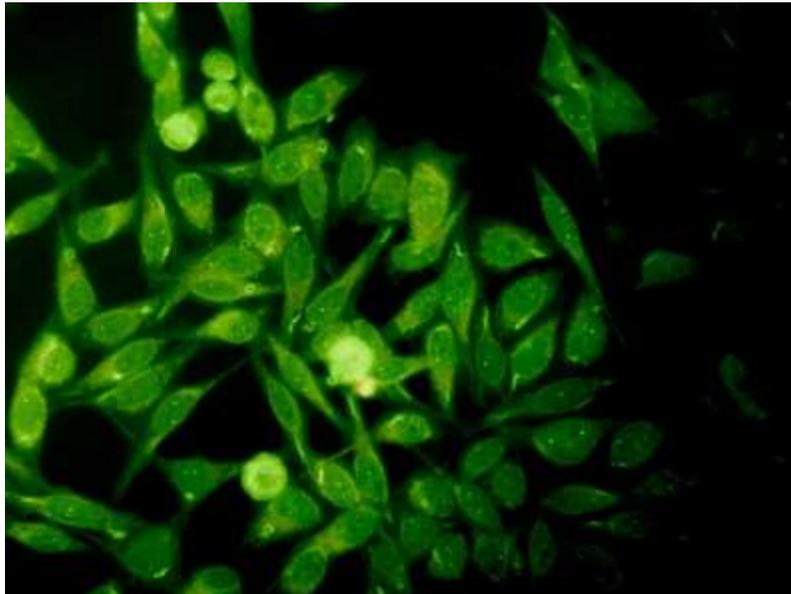


Figura 8. Patrón anillos y bastones

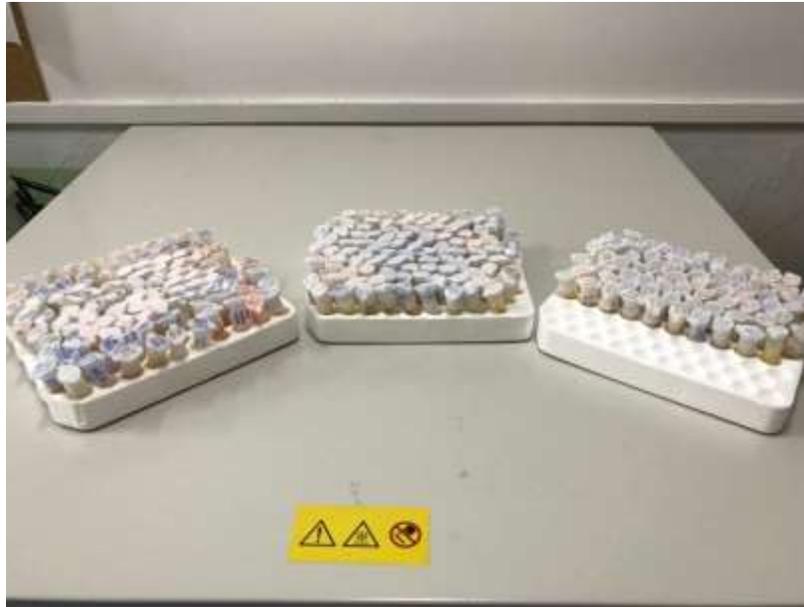


Figura 9. Sueros de grupo ERA prospectivo y retrospectivo



Figura 10. Sueros de grupo sano (donadores de sangre)



Figura 11. Consentimientos informados y fichas de recolección de información

## Actividades de Gestión, vinculación y divulgación

Coordinación con la Clínica de Atención Temprana de la Unidad de Reumatología del Hospital Roosevelt para la evaluación clínica de controles sanos con inmunofluorescencia positiva: las personas que poseen un FANA positivo serán contactadas para asignarles una evaluación llevada a cabo por un médico Reumatólogo y poder dar seguimiento a la presencia de los anticuerpos antinucleares detectados.

### Orden de Pago

Contratados por unidad avaladora	Otros Colaboradores
	Dr. Maynor Herrera
	Dr. Ricardo Arreola
	Licda. Egly Álvarez
	Br. Jordana Catalán

Contratados por la Dirección General de Investigación					
Nombre	Categoría	Registro de Personal	Pago DIGI		Firma
			SI	NO	
Lic. Kevin Alexander Ortiz Barrientos	Coordinador de proyecto	20110315		X	

Ciudad de Guatemala 28 de febrero del 2018

Kevin Alexander Ortiz Barrientos

\_\_\_\_\_

Coordinador del proyecto de investigación

Vo. Bo. Dra. Hilda Elena Valencia Abril

\_\_\_\_\_

Coordinadora Programa Universitario de

Investigación Interdisciplinaria en Salud

Ing. Julio Rufino Salazar

\_\_\_\_\_

Coordinador General de Programas