

## ANTICUERPOS ANTINUCLEARES, IMAGENES Y CARACTERISTICAS OBTENIDAS POR INMUNOFLORESCENCIA. IMPORTANCIA DE LOS ISOTIPOS IgA, IgM E IgG

MIRIAM ARCAVI<sup>1</sup>, JORGE DADONE<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Inmunología Clínica, Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Hospital de Clínicas José de San Martín, Universidad de Buenos Aires, <sup>2</sup>Laboratorio de Reumatología, Centro de Educación Médica e Investigaciones Clínicas, CEMIC, Buenos Aires

**Resumen** La técnica de elección para el *screening* de anticuerpos antinucleares (ANA) es la inmunofluorescencia indirecta que utiliza como sustrato una línea de células epiteliales de carcinoma de laringe humano (IFI-HEp2), y como antisuero, anti-IgG o anti-Ig totales. Los ANA-IgG son los más importantes para el diagnóstico y monitoreo de las enfermedades del tejido conectivo (ETC), mientras los ANA-IgM son de menor relevancia clínica en estos pacientes. Sin embargo, poco se sabe de los ANA-IgA ya que estos Ac han sido menos investigados. El objetivo de este trabajo fue estudiar la prevalencia de los diferentes isotipos de inmunoglobulinas de anticuerpos antinucleares en los pacientes con ETC y evaluar la conveniencia de utilizar conjugados monovalentes o polivalentes. Se procesaron 100 sueros de pacientes con diversas ETC empleando IFI-HEp2, en los cuales se detectó 38% de ANA-IgA (títulos  $\geq 1:80$ ) y 12% de ANA-IgM (títulos  $\leq 1:160$ ). En 29 casos se detectó IgA en ausencia de IgM, en 3 casos IgM en ausencia de IgA. En todos los casos los ANA-IgG estuvieron presentes. En 6 sueros se observó un cambio de imagen con conjugado anti-IgA y en 3 con conjugado anti-IgM. Debido a la alta prevalencia de ANA-IgA detectada por IFI-HEp2, se destaca la conveniencia de utilizar conjugado anti-Ig totales en lugar de anti-IgG, mientras se desconozca la relevancia de los ANA-IgA en el diagnóstico, pronóstico y seguimiento de las enfermedades reumáticas sistémicas.

**Palabras clave:** anticuerpos antinucleares, conjugado anti-IgA, IFI-HEp2, enfermedades del tejido conectivo

**Abstract** *Antinuclear antibodies, patterns and characteristics obtained by immunofluorescence. The importance of the IgA, IgM and IgG isotypes.* The indirect immunofluorescence with epithelial cell line from human laryngeal carcinoma as substrate (IIF-HEp2) and anti-IgG or anti-total Ig as antisera, is the technique currently used for the detection of antinuclear antibodies. The most important antibodies for the diagnosis and follow-up of connective tissue diseases (CTD) are the IgG-ANA, while the IgM-ANA have no clinical relevance. However the IgA-ANA have not been thoroughly investigated so far. The aim of this work was to study the prevalence of different ANA isotypes of Ig antibodies in CTD patients and to evaluate the convenience of the use of monovalent or polyvalent conjugate. We examined the sera of 100 patients with different CTD by IIF-HEp2 and detected a prevalence of 38% IgA-ANA (titles  $\geq 1:80$ ) and 12% IgM-ANA (titles  $\leq 1:160$ ). In twenty nine cases we detected IgA-ANA in absence of IgM-ANA, and in 3 cases IgM-ANA in absence of IgA-ANA. In all the cases IgG-ANA were present. In 6 sera a change in the immunofluorescence pattern was observed while using anti-IgA conjugate, whereas in 3 the change was observed with the use of anti-IgM conjugate. Because of the high prevalence of ANA-IgA detected by IIF-HEp2, we emphasize the convenience of employing anti-total Ig in spite of anti-IgG conjugated until the role of ANA-IgA is elucidated in CTD patients, in order to establish its relevance in the diagnosis, prognosis and follow-up of systemic rheumatic diseases.

**Key words:** antinuclear antibodies, anti-IgA conjugate, HEp2-IIF, connective tissue diseases

La detección e identificación de los anticuerpos antinucleares (ANA) es una herramienta útil en el diagnóstico, pronóstico, tratamiento y seguimiento de los pacientes con enfermedades reumáticas sistémicas<sup>1-3</sup>. Los ANA<sup>4-6</sup> se hallan asociados a diferentes enfermedades

del tejido conectivo (ETC)<sup>7-10</sup> y en algunas ocasiones a enfermedades hepáticas autoinmunes<sup>11,12</sup>. Mundialmente, la técnica de elección en el *screening* inicial para la detección de estos autoanticuerpos es la inmunofluorescencia indirecta (IFI)<sup>13,14</sup> que utiliza como sustrato una línea de células epiteliales de carcinoma de laringe humano (HEp-2)<sup>15,16</sup>. Las discrepancias en los resultados obtenidos por este método se deben a múltiples factores: modo de fijación de los sustratos comerciales utilizados, tipo de microscopio, experiencia del observador, procedimientos de control de calidad y la elección del

Recibido: 12-VIII-2008

Aceptado: 7-IV-2009

**Dirección postal:** Dra Miriam Arcavi, Departamento de Bioquímica Clínica, Area Inmunología Clínica, Hospital de Clínicas José de San Martín, Av. Córdoba 2351, 1120 Buenos Aires, Argentina  
Fax: (54-11) 4552-4934 e-mail: arcavimiriam@hotmail.com

antisuero marcado<sup>17</sup> (anti-IgG o anti-Ig totales). Hay grupos que sostienen la conveniencia de utilizar conjugado anti-IgG para la detección de ANA<sup>18, 19</sup> debido a que este isotipo es el que más se asocia con enfermedad<sup>20</sup>. Nuestro grupo de trabajo ha notificado previamente la detección de ANA-IgA por la técnica de IFI-HEp2 en pacientes que presentan patrón compatible con anticuerpos anti-envoltura nuclear (ANEA)<sup>12</sup>. Utilizando otras técnicas y detectando ANA específicos, se ha observado que los ANA-IgM suelen coexistir con los ANA-IgG, pero generalmente son de importancia secundaria en el adulto<sup>21</sup>, no se ha encontrado correlación patogénica y se ha visto que habitualmente se asocian a la presencia de anticuerpos IgM naturales<sup>18</sup>. Con respecto a los ANA-IgA específicos, algunos autores han detectado anticuerpos anti-DNA<sup>22</sup> y anti-histonas<sup>23</sup>. Para evaluar la conveniencia de utilizar conjugado anti-IgG o anti-IgG totales por la técnica de IFI-HEp2, se plantearon los siguientes objetivos: a) determinar la prevalencia de isotipos de ANA (IgG, IgM e IgA) en individuos con ETC por la técnica de IFI-HEp2, b) observar si los sueros presentan cambios de imagen con la utilización de los diferentes conjugados (anti-IgG, anti-IgA o anti-IgM), c) determinar la distribución de los diferentes patrones de ANA según el isotipo del antisuero utilizado y d) determinar la frecuencia de aparición de los patrones ANA IgG en las diferentes ETC.

## Materiales y métodos

Se seleccionaron 100 sueros ANA positivos por IFI-HEp2 (conjugado: anti Ig totales), provenientes de pacientes que concurren al Hospital de Clínicas para ser atendidos por presentar diversas enfermedades autoinmunes. Se realizó una revisión retrospectiva de sus historias clínicas, obteniéndose la siguiente información: 57 lupus eritematoso sistémico (LES), 25 esclerodermia (ES), 2 polimiositis (PM), 5 síndrome de Sjögren (SS), 3 enfermedad mixta del tejido conectivo (EMTC) y 8 con enfermedades del tejido conectivo no diagnosticadas al momento del estudio (ETCND).

Los sueros fueron conservados a -20 °C hasta el momento de su procesamiento.

A todos los sueros se les realizó detección de ANA por la técnica de IFI-HEp2 (*Kallestad, WA, USA*), utilizando como conjugado marcado con isotiocianato de fluoresceína (FICT) (*Biocientífica, Buenos Aires, Argentina*), suero de cabra anti-Ig totales en dilución 1:160 en azul de Evans (AE) 1:300 000. Se utilizaron controles negativos (*pool* de sueros) y controles comerciales positivos, contrastados contra controles del CDC (*IFI, Buenos Aires, Argentina*). El test de IFI-HEp2 puede presentar resultados ANA positivos a bajos títulos en personas sanas<sup>24</sup>, personas que cursan una variedad de enfermedades infecciosas inflamatorias y neoplásicas, en personas de edad avanzada y en pacientes con enfermedades autoinmunes que no sean del tejido conectivo. Habitualmente se hace referencia a títulos anormales de autoanticuerpos, pero no hay un valor de *cut-off* que pueda distinguir en forma absoluta individuos normales de individuos con enfermedad autoinmune; en general, los altos títulos son más frecuentes en pacientes jóvenes. Si bien el valor de corte para esta técnica en solución de *buffer* fosfato (PBS) es 1:40, se resolvió considerar ANA positivos a aquellos sueros que presen-

taran títulos  $\geq 1:80$ <sup>19</sup>, para independizarnos de los bajos títulos que en la mayoría de los casos responden a la presencia de anticuerpos IgM naturales sin significación clínica.

Todos los sueros de los pacientes ANA positivos fueron llevados a dilución final 1:80 con PBS para detectar los diferentes isotipos: IgG, IgA e IgM.

Para detectar ANA-IgG, se utilizó conjugado anti-IgG-FITC (*Biocientífica, Buenos Aires, Argentina*) en dilución 1:100 en AE 1:300 000.

Para detectar ANA-IgA y ANA-IgM, los sueros fueron previamente diluidos 1:10 con absorbente anti-IgG (*The Binding Site, Birmingham, London*), para eliminar la IgG sérica y así evitar los falsos negativos por la presencia de ANA-IgG específica y los falsos positivos por la presencia de factores reumatoideos<sup>25-28</sup>. Se utilizaron conjugados anti-IgA-FITC (*Biocientífica, Buenos Aires, Argentina*) y anti-IgM-FITC (*Biocientífica, Buenos Aires, Argentina*) en dilución 1:100 en AE 1:300.000.

Para realizar la técnica de *immunoblotting*-IgA (IB-IgA) se utilizó como fuente de antígeno un extracto de células HeLa (*Facultad de Medicina, Universidad de San Pablo, Brasil*) obtenidas por congelamiento y descongelamiento rápido (10 ciclos). Las proteínas presentes fueron separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE al 12%) y posteriormente electrotransferidas a una membrana de nitrocelulosa (*Sigma*). La misma fue cortada en tiras que fueron bloqueadas con leche descremada (*Gibco Laboratories, Grand Island, NY*) al 10% en PBS. Las muestras fueron previamente diluidas 1:10 con absorbente anti-IgG humano (*The Binding Site, Birmingham London*) y llevadas a dilución final 1:60 con una solución compuesta por: 1% de leche descremada, 10% de suero bovino adulto y 0.05 de *Tween-20* en PBS). Se utilizó anti-IgG humana conjugada con fosfatasa alcalina (*Sigma, Saint Louis, Missouri, USA*) diluida 1/500 en el mismo diluyente de sueros. Las tiras fueron reveladas con 5-bromo-4-cloro-3-indol-fosfato/nitroblue tetrazolium (BCIP/NBT) (*Vector Laboratories, California, USA*). Se utilizaron como controles un *pool* de sueros negativos y un *pool* de sueros positivos (Ac anti-Ro/SSA, anti-La/SSB, anti-RNP, anti-Sm y anti-ribosomal P).

## Resultados

Se realizó detección de ANA por IFI-HEp2 a 100 sueros de pacientes con diversas ETC.

Todos los sueros procesados presentaron ANA-IgG, de éstos, el 38% presentó ANA-IgA y el 12% ANA-IgM. Los títulos de ANA-IgG fueron  $\geq 1:160$  y los de ANA-IgM  $\leq 1:160$ . Con respecto a los ANA-IgA, se detectó un solo suero con título 1:80 y los restantes fueron positivos  $\geq 1:160$  llegando en algunos casos a valores de 1:1280.

Si observamos el porcentaje de distribución de los diferentes isotipos, el 59% presentó sólo anticuerpos anti-IgG, el 29% IgG e IgA, el 3% IgG e IgM y el 9% IgG, IgA e IgM. En 3 casos se detectó IgM en ausencia de IgA, en 29 casos IgA (Fig. 1) en ausencia de IgM y en ningún caso se detectó IgA o IgM en ausencia de IgG (Tabla 1).

Al comparar las imágenes obtenidas con los diferentes isotipos de conjugados con respecto al patrón observado con conjugado anti-Ig totales, se obtuvieron los siguientes resultados: 1) con anti-IgG, no se observaron diferencias. Se pudieron detectar las siguientes imágenes: aparato mitótico nuclear (NuMA), centríolo, *nuclear*

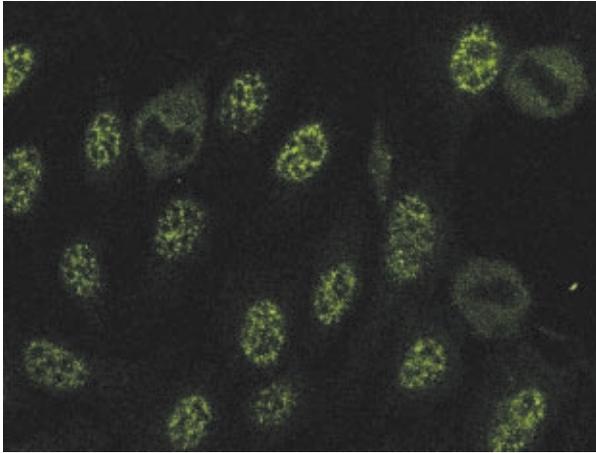


Fig. 1.— Suero de paciente con ANA-IgA por la técnica de IFI-HEp2. Resultado: moteado 1:320. Se utilizó un microscopio láser confocal (*Olympus Fluoview FV300 BS61, Melville, EEUU*). La imagen de la foto fue adquirida con el programa *Fluoview FV 300* (versión 3.3).

*dots*, antígeno nuclear de células proliferantes (PCNA) y CENP-F; 2) con anti-IgA, el 15.8% (6/38) de los sueros presentó un cambio de patrón: a) se detectaron 2 sueros con patrón nucleolar que no se habían evidenciado previamente, b) en otros 2 sueros no se detectó el patrón nucleolar, c) en lugar de la imagen mixta homogénea y moteada, en 1 caso sólo se detectó el patrón homogéneo, y d) en 1 suero con imagen mixta de centrómero y centríolo positivos, sólo se detectó el patrón centromérico; 3) con anti-IgM, el 25% (3/12) de los sueros presentó un cambio de patrón donde sólo se evidenció la imagen moteada (Tabla 2).

Cuando observamos la distribución de los diferentes patrones de ANA según el isotipo de antisuero utilizado, observamos que con anti-IgG y anti-IgA aparece una mayor frecuencia de patrones moteados, homogéneos y

TABLA 1.— Prevalencia de isotipos de ANA en pacientes con ETC

| %  | ANA-IgG                | ANA-IgA                | ANA-IgM               |
|----|------------------------|------------------------|-----------------------|
| 59 | P ≥ 1:160 <sup>a</sup> | N                      | N                     |
| 29 | P ≥ 1:160 <sup>a</sup> | P ≥ 1:80 <sup>b</sup>  | N                     |
| 3  | P ≥ 1:160 <sup>a</sup> | N                      | P ≥ 1:80 <sup>c</sup> |
| 9  | P ≥ 1:160 <sup>a</sup> | P ≥ 1:160 <sup>a</sup> | P ≥ 1:80 <sup>c</sup> |

P: positivo; N: negativo; <sup>a</sup>: 1:160-1:1280; <sup>b</sup>: 1:80- 1:1280; <sup>c</sup>: 1:80-1:160

nucleolares puros o mixtos. Al utilizar conjugado anti-IgM predominan el patrón homogéneo, el mixto (homogéneo y moteado) y el moteado.

En los sueros de los pacientes con LES, PM, SS, EMTc y ETCND predominó la imagen moteada y en los sueros de los pacientes con ES se detectó con mayor frecuencia el patrón nucleolar puro o mixto (Tabla 3).

Se realizó IB-IgA a 8 de los 38 sueros que presentaban ANA-IgA por IFI-HEp2 y ANA-IgG por las técnicas de IFI-HEp2, IB, LIA y/o ELISA. En 5 sueros se detectaron Ac marcadores de enfermedad, como: anti-Sm en sueros 1, 2, 4 y 5; anti-ribosomal P en sueros 2 y 4 y anti-Scl-70 en suero 3 (Fig. 2). En las muestras restantes se visualizaron diferentes bandas como: RNP, Ro/SSA, La/SSB y otras no identificadas (sueros 7 y 8).

## Discusión

La presencia de autoanticuerpos por sí misma no supone enfermedad. Niveles bajos de autoanticuerpos, especialmente de baja afinidad y de clase IgM, son un hecho normal en la respuesta inmune. Cuando se produce enfermedad, estos autoanticuerpos aumentan su concentración y cambian su clase y afinidad<sup>29</sup>. Cuando analiza-

TABLA 2.— Distribución de los diferentes patrones en IFI-HEp2 según el isotipo del antisuero utilizado

| Patrón (IFI HEp-2)                          | Conjugado anti-IgTotales o anti-IgG | Conjugado anti-IgA | Conjugado anti-IgM |
|---|-------------------------------------|--------------------|--------------------|
| Moteada                                     | 36                                  | 16 <sup>a</sup>    | 2                  |
| Homogénea                                   | 19                                  | 10 <sup>b</sup>    | 4 <sup>g</sup>     |
| Nucleolar (Nu) pura y mixtas                | 18                                  | 7 <sup>c, d</sup>  | 1                  |
| Homogénea y moteada                         | 8                                   | 3 <sup>e</sup>     | 3                  |
| PCNA; NuMA; centríolo; nuclear dots; CENP-F | 8                                   | 0                  | 0                  |
| Envoltura nuclear                           | 1                                   | 1                  | 1 <sup>h</sup>     |
| Centrómero; centrómero y centríolo          | 5                                   | 1 <sup>f</sup>     | 1 <sup>i</sup>     |
| Citoplasma                                  | 5                                   | 1                  | 0                  |

Moteado y Nu: 1, <sup>b</sup>Homogénea y Nu: 1, <sup>c</sup>Homogéneo: 1, <sup>d</sup>Citoplasmático: 1, <sup>e</sup>Homogéneo: 1, <sup>f</sup>Centrómero: 1, <sup>g</sup>Moteado: 1, <sup>h</sup>Moteado: 1, <sup>i</sup>Moteado: 1.

mos la frecuencia de aparición de los diferentes isotipos de ANA detectados por IFI-HEp2, se observa que todas las muestras séricas estudiadas presentaron ANA-IgG a título  $\geq$  1:160. De ellas, un 12% presentó ANA-IgM, generalmente en títulos cercanos al valor de corte y los ANA-IgA presentaron una prevalencia del 38% en títulos  $\geq$  1:80 y  $\leq$  a 1:1280 (Tabla 1). Imágenes como NuMA, PCNA, centrómero, y centriolo fueron exclusivamente a expensas de IgG. En algunos sueros se observaron cambios de imágenes al utilizar conjugado anti-IgA o anti-IgM (Tabla 2). Los patrones prevalentes de ANA-IgG observados en las ETC estudiadas fueron los esperados para esas enfermedades (Tabla 3).

Hay opiniones divididas sobre la especificidad requerida del conjugado; hay quienes sugieren la ventaja de

utilizar conjugado anti-IgG<sup>19</sup> y quienes aceptan tanto la utilización de conjugados monovalentes como polivalentes<sup>30</sup>. La falta de criterio unánime en cuanto a la utilización del conjugado adecuado ha llevado a variaciones en los títulos informados por diferentes laboratorios. El conjugado polivalente puede detectar un porcentaje más elevado de anticuerpos sin significación clínica<sup>18</sup>. Los ANA-IgG son los Acs más importantes en términos de diagnóstico y monitoreo de LES y enfermedades relacionadas y siempre deben ser investigados, mientras que los ANA-IgM serían de importancia secundaria en el adulto<sup>21</sup>. Por este motivo, en la detección de Ac dirigidos contra antígenos nucleares extraíbles (ENA), sólo se utiliza conjugado anti-IgG independientemente de la técnica utilizada: *immunoblotting* (IB), enzimoimmunoensayo (EIA) o inmunoensayo lineal (LIA). Si nos basamos en estos datos, estaría indicada la utilización de conjugado anti-IgG por la técnica de inmunofluorescencia indirecta. Otros autores han encontrado anticuerpos de isotipo IgA con especificidad anti-Ro/SSA y anti-La/SSB, por las técnicas de EIA o IB, en pacientes con Sjögren y en pacientes lúpicos<sup>31</sup>. También han detectado en pacientes lúpicos anti-DNA de isotipo IgA por la técnica de IFI que utiliza *Crithidia lucilliae* como sustrato<sup>32</sup>.

En este trabajo no encontramos diferencias entre la utilización de conjugado anti-IgG totales o anti-IgG pero detectamos una alta prevalencia de ANA-IgA y en algunos casos los títulos obtenidos fueron sorprendentemente elevados. Estos resultados nos llevaron a plantearnos si la presencia de ANA-IgA estaba asociada a Ac IgA específicos (Ro/SSA, La/SSB, Sm, RNP, Jo1, Scl-70 y ribosomal-P). Por este motivo se realizó IB-IgA a 8 pacientes que presentaban ANA-IgA por IFI-HEp2 a altos títulos además de diferentes Ac específicos de clase IgG por las técnicas de IB, LIA y/o ELISA. Se detectaron bandas en todas las muestras seleccionadas y en 5 casos se visualizaron Ac marcadores de enfermedad como: anti-Sm y anti-ribosomal P (LES) y anti-Scl-70 (ES) (Fig. 2).

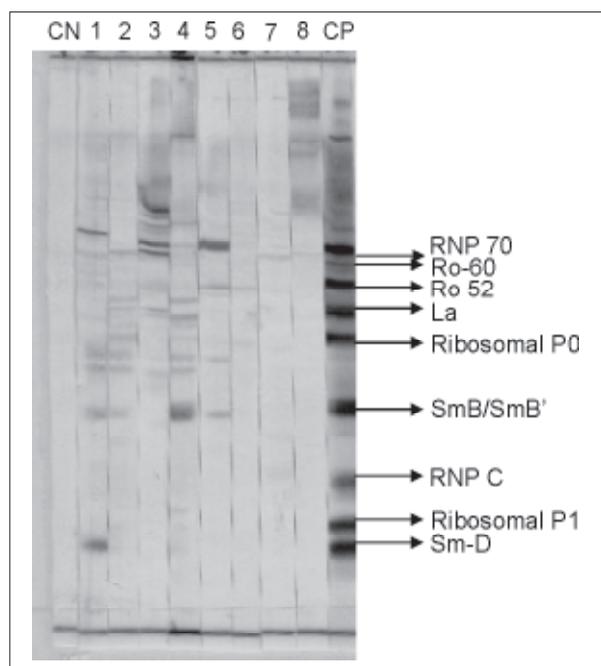


Fig. 2.- Sueros de pacientes con ANA-IgA por la técnica de IB. CN: control negativo, CP: control positivo

TABLA 3.- Distribución de los patrones obtenidos con conjugado anti-IgG por IFI-HEp2 en las diferentes ETC

| Patrón (IFI-HEp2)<br>n: 100  | LES<br>n: 57 | ES<br>n: 25 | PM<br>n: 2 | SS<br>n: 5 | EMTC<br>n: 3 | ETCND<br>n: 8 |
|--|--------------|-------------|------------|------------|--------------|---------------|
| Moteada  | 19           | 4           | 2          | 5          | 3            | 3             |
| Homogénea  | 15           | 4           | -          | -          | -            | -             |
| Homogénea y moteada  | 7            | 1           | -          | -          | -            | -             |
| Nucleolar (Nu) pura y mixtas                                       | 7            | 11          | -          | -          | -            | -             |
| PCNA   | 4            | -           | -          | -          | -            | -             |
| NuMA; centriolo; CENP-F; envoltura nuclear;<br><i>nuclear dots</i> | -            | -           | -          | -          | -            | 5             |
| Centrómero; centrómero y centriolo                                 | -            | 5           | -          | -          | -            | -             |
| Citoplasma   | 5            | -           | -          | -          | -            | -             |

Los resultados encontrados en este trabajo y en publicaciones anteriores de nuestro grupo<sup>12</sup>, indican la importancia de profundizar el estudio de los ANA-IgA para evaluar si la presencia de estos autoanticuerpos en los diferentes estadios clínicos de las ETC, podría ser de utilidad en el diagnóstico, seguimiento y/o pronóstico de estas enfermedades reumatológicas. Teniendo en cuenta que la IFI-HEp2 es la técnica recomendada para el *screening* inicial de ANA-IgG o ANA-Ig totales, debemos detectar ANA-IgA inicialmente por esta técnica. Cuando quede demostrada la importancia de la presencia de ANA-IgA por IFI-HEp2 en pacientes con ETC, tendremos que plantearnos la búsqueda de ANA-IgA específicos por otras metodologías. Sin embargo, podemos concluir que mientras no tengamos mayor información del rol que juegan los ANA-IgA en el contexto de las enfermedades autoinmunes sistémicas, se considera conveniente utilizar el conjugado anti-Ig totales para la detección de ANA por IFI-HEp2.

## Bibliografía

1. von Mühlen CA, Tan EM. Autoantibodies in the diagnosis of systemic rheumatic diseases. *Seminars in Arthritis Rheumatism* 1995; 24: 323-58.
2. Fritzler MJ. Clinical relevance of autoantibodies in systemic rheumatic diseases. *Mol Biol Rep* 1996; 23: 133-45.
3. Zuber M. Antinuclear antibodies in rheumatology. *Z Rheumatol* 1994; 53: 327-34.
4. Goulvestre C. Antinuclear antibodies. *Presse Med* 2006; 35: 287-95.
5. Tan EM. Autoantibodies to nuclear antigens (ANA): Their immunobiology and medicine. *Adv Immunol* 1982; 33: 167-240.
6. Notman, DD, Kurata N, Tan EM. Profiles of antinuclear antibodies in systemic rheumatic diseases. *Ann Intern Med* 1975; 83:464-9.
7. Wiik AS. Antinuclear autoantibodies: clinical utility for diagnosis, prognosis, monitoring, and planning of treatment strategy in systemic immunoinflammatory diseases. *Scand J Rheumatol* 2005; 34: 260-8
8. Pahor A, Krajnc I, Gorenjak M, Holc I. The clinical significance of antinuclear antibodies in connective tissue disease. *Wien Klin Wochenschr* 1988; 110: 338-41
9. Sepúlveda C. Anticuerpos antinucleares en las enfermedades del tejido conectivo. *Immunol Clin* 1987; 3: 14-23.
10. Kurien BT, Scofield RH. Autoantibody determination in the diagnosis of systemic lupus erythematosus. *Scand J Immunol* 2006; 64: 227-35.
11. Zachou K, Rigopoulou E, Dalekos GN. Autoantibodies and autoantigens in autoimmune hepatitis: important tools in clinical practice and to study pathogenesis of the disease. *J Autoimmune Dis* 2004; 1:2.
12. Arcavi M, Orfus G. Prevalencia de anticuerpos anti envoltura nuclear y sus isotipos en sueros positivos para anticuerpos antinucleares. *Medicina(Buenos Aires)* 2006; 66: 327-31.
13. Tan EM. Relationship of nuclear staining patterns with precipitating antibodies in systemic lupus erythematosus. *J Lab Clin Med* 1967; 70: 800-12.
14. López-Longo FJ, Rodríguez Mahon M, Grau R, Carreño L. Autoanticuerpos en las enfermedades reumáticas. Clasificación y técnicas de detección. *Rev Esp Reumatol* 1966; 23: 343-9.
15. Slomon D, Kavanaugh AJ, Schur PH. Evidence-based guidelines for the use of immunologic test: antinuclear antibody testing. *Arth Rheum* 2002; 47: 434-44.
16. Lyons R, Narain S, Nichols C, Satoh M, Reeves WH. Effective use of autoantibody test in the diagnosis of systemic autoimmune disease. *Ann N Y Acad Sci* 2005; 1050: 217-28.
17. Craft J, Hardin JA. Antinuclear Antibodies. Textbook of Rheumatology. 4<sup>th</sup> ed. Vol: 1. W.B. Saunders, 1993; 164-87.
18. Kavanaugh A, Tomar R, Reveille J, Solomon DH, Homburger HA. Guidelines for clinical use of the anti-nuclear antibody test and test for specific autoantibodies to nuclear antigens. *Arch Pathol Lab Med* 2000; 124: 71-81.
19. Tozzoli R, Bizzaro N, Tonutti E, et al. Guidelines for the laboratory use of autoantibody test in the diagnosis and monitoring of autoimmune rheumatic diseases. *Am J Clin Path* 2002; 117: 316-24.
20. Garde JB, López Longo FJ, Herranz Hermosa JM. Autoanticuerpos en las enfermedades autoinmunes del tejido conectivo. *Actas Dermosifiliogr* 1999; 90: 1-7.
21. Bootsma H, Spronk PE, Ter Borg EJ, Hummel EJ, de Boer G, Limburg PC, Kallenberg CG. The predictive value of fluctuations in IgM and IgG class anti-dsDNA antibodies for relapses in systemic lupus erythematosus. A prospective long-term observation. *Ann Rheum Dis* 1997; 56: 661-6.
22. Miltenburg AM, Roos A, Slegtenhorst L, Daha MR, Breedveld FC. IgA anti-dsDNA antibodies in systemic lupus erythematosus: occurrence, incidence and association with clinical and laboratory variables of disease activity. *J Rheumatol* 1993; 20: 53-8.
23. Gompertz NR, Isenberg DA, Turner BM. Correlation between clinical features of systemic lupus erythematosus and levels of antihistone antibodies of the IgG, IgA, and IgM isotypes. *Ann Rheum Dis* 1990; 49: 524-7.
24. Tan EM, Feltkamp TEW, Smolen JS, et al. Range of antinuclear antibodies in "healthy" individuals. *Arthritis Rheum* 1997; 40: 1601-11.
25. Arcavi M, Orfus G, Griemberg G. Diagnosis of toxoplasmosis by joint detection of immunoglobulin A and immunoglobulin M. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 1450-3.
26. Joassin L, Reginster M. Elimination of nonspecific cytomegalovirus immunoglobulin M activities in the enzyme-linked immunosorbent assay by using anti-human immunoglobulin G. *J Clin Microbiol* 1986; 23: 576-81.
27. Martin V, Arcavi M, Santillan G, et al. Detection of human Toxoplasma-specific immunoglobulins A, M, and G with a recombinant *Toxoplasma gondii* rop2 protein. *Clin Diagn Lab Immunol* 1998; 5: 627-31.
28. Arcavi M, Troielli P, Pizzimenti C, Griemberg G. Importancia de los anticuerpos IgA específicos en el diagnóstico de toxoplasmosis activa asociada con polimiositis/dermatomiositis. *Medicina (Buenos Aires)* 2005; 65: 183-4.
29. Pérez Carreño L, Rodríguez M. M. Mecanismo inmunopatogénico de los autoanticuerpos. *Rev Esp Reumatol* 1996; 23: 357-61.
30. Bradwell AR, Hughes RG, Harden EL Atlas of HEp-2 patterns. 2nd ed. Birmingham, UK: The Binding Site, 2003, p 20-1.
31. Pourmand N, Wahren-Herlenius M, Gunnarsson I, et al. Ro/SSA and La/SSB specific IgA autoantibodies in serum of patients with Sjögren's syndrome and systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 1999; 58: 623-9.
32. Gripenberg M, Helve T. Anti-DNA antibodies of IgA class in patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatol Int* 1986; 6:53-5.