

# Padrões de Imunofluorescência do Fator Antinuclear (FAN) em Células HEp-2 de Soros Reagentes para Anti-SSA/Ro

## *Antinuclear Antibodies (ANA) Immunofluorescent Pattern's in HEp-2 Cells on Samples Positive for Anti-SSA/Ro*

Priscila Schmidt Lora<sup>(1)</sup>, Claudia Cilene Fernandes Correia Laurino<sup>(2)</sup>, Adriana Estigarribia de Freitas<sup>(3)</sup>, João Carlos T. Brenol<sup>(4)</sup>, Odirlei Montecielo<sup>(5)</sup>, Ricardo Machado Xavier<sup>(6)</sup>

### RESUMO

**Objetivo:** avaliar os padrões de imunofluorescência do fator antinuclear (FAN) em soros reagentes para anticorpos anti-SSA/Ro e sua associação clínica. **Método:** foi realizado um estudo transversal retrospectivo, no qual foram revisadas as solicitações de anticorpos antiantígenos nucleares extraíveis (anti-ENA) encaminhadas ao SPC/HCPA no período de dois anos. Das solicitações com resultado positivo para anti-ENA identificou-se qual ou quais auto-anticorpos estavam envolvidos (anti-SSA/Ro, anti-SSB/La, anti-RNP, anti-Sm, anti-Scl-70), bem como os padrões de imunofluorescência do FAN e os quadros clínicos dos pacientes anti-SSA/Ro positivo. As técnicas usadas para detecção e identificação foram FAN por imunofluorescência indireta (IFI) em células HEp-2 e anti-ENA por hemaglutinação. **Resultados:** das 392 solicitações analisadas 90 eram anti-ENA positivo. Houve um predomínio do sexo feminino (94%) (86/91) e a idade média foi de 42 anos. O anti-SSA/Ro foi o mais frequente (67,8%) (61/90), sendo que todas as amostras anti-SSA/Ro positivas eram positivas para o FAN. O padrão de imunofluorescência nuclear pontilhado fino foi o predominante (68,9%) (42/61) nos pacientes com anti-SSA/Ro positivo, e o quadro clínico mais encontrado foi de lúpus eritematoso sistêmico, em 50,8% (31/61) dos pacientes. **Conclusão:** o teste de FAN por IFI utilizando células HEp-2 é um bom método de triagem para detecção de auto-anticorpos anti-SSA/Ro, apresentando maior associação com o padrão nuclear pontilhado fino. Diferente do que tem sido descrito na literatura, não encontramos nenhuma amostra de pacientes com anti-SSA/Ro que tenham apresentado FAN falso-negativo na IFI. Pelo menos na nossa experiência, esses dados questionam o custo-efetividade da solicitação de rotina desse exame em pacientes FAN negativo pelo teste de IFI.

**Palavras-chave:** auto-anticorpo, fator antinuclear, anticorpos anti-SSA/Ro, anti-ENA.

### ABSTRACT

**Objective:** to evaluate the pattern at immunofluorescence of the antinuclear antibodies (ANA) detected by the indirect immunofluorescence (IIF) technique in positive samples for anti-SSA/Ro autoantibody and the clinical associations. **Methods:** a retrospective transversal study was performed in a period of two years where the all the solicitations of testing for the presence of anti-extractable nuclear antigen (anti-ENA) antibodies delivered to the SPC/HCPA were analyzed. We selected the positive samples and identified which autoantibodies were involved (anti-SSA/RO, anti-SSB/La, anti-RNP, anti-Sm and anti-Scl70) as well as the immunofluorescence patterns by ANA testing and the clinical associations found in the patients presenting anti-SSA/Ro positive serum. IIF was used for ANA using HEp-2 cells and hemagglutination for anti-ENA antibodies detection. **Results:** 90 out of the 392 solicitations analyzed were anti-ENA positive, with a predominance of women (86/91 – 94%) and the mean age was 42 years old. The most frequent autoantibody was anti-SSA/Ro (61/90 – 67.8%) and all samples that were anti-SSA/Ro positive were also ANA positive. Speckled nuclear immunofluorescence was the most frequent ANA pattern (42/61 – 68.9%) among the anti-SSA/Ro positive samples and systemic lupus erythematosus was the most common clinical diagnosis (31/61 – 50.8%). **Conclusion:** ANA testing by IIF using HEp-2 cells proved to be a good screening test for the detection of anti-SSA/Ro antibodies, that showed a strong positive association to the speckled nuclear IIF pattern. As opposed to what has been described in the literature, there was no ANA negative among the anti-SSA/Ro positive samples. At least in our experience, these data question the cost-effectiveness of performing routine screening for anti-SSA/Ro antibodies in ANA negative samples by IIF testing.

**Keywords:** autoantibody, antibodies antinuclear, anti-SSA/Ro autoantibody, ENA.

Serviços de Reumatologia e Serviço de Patologia Clínica (SPC), Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (Fipe). Recebido em 03/10/06. Aprovado, após revisão, em 22/11/06.

1. Farmacêutica bioquímica, Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Faculdade de Medicina /UFRGS.

2. Farmacêutica, Ph.D. em Ciências Aplicadas à Pediatria, Serviço de Reumatologia HCPA/UFRGS.

3. Estudante de Farmácia UFRGS.

4. Professor adjunto, médico reumatologista, Ph.D. em Clínica Médica, Chefe do Serviço de Reumatologia, HCPA/UFRGS.

5. Médico, Residente do Serviço de Reumatologia, HCPA/UFRGS.

6. Professor adjunto, Ph.D. em Imunologia, médico reumatologista, Serviço de Reumatologia, HCPA/UFRGS.

Endereço para correspondência: Dr. Ricardo Machado Xavier, Rua Ramiro Barcelos, 2.350, sala 645, CEP 90035-003, Porto Alegre, RS, Brasil, telefone (51) 2101-8340, e-mail: rmaxavier@hcpa.ufrgs.br.

## INTRODUÇÃO

Nas doenças reumáticas, uma das principais características é a produção de auto-anticorpos, com alta afinidade contra constituintes intracelulares e extracelulares, fazendo com que estes sejam marcadores específicos dessas doenças. No entanto, esses auto-anticorpos somente possuem significado clínico quando estão associados a outras manifestações de doença<sup>(1)</sup>.

A detecção dos auto-anticorpos tem prestado importante contribuição em diferentes aspectos: como marcadores diagnósticos, indicadores de prognóstico e na monitorização da atividade das doenças auto-imunes<sup>(1-3)</sup>.

O desenvolvimento da técnica de imunofluorescência indireta (IFI) permitiu a detecção de diversos auto-anticorpos<sup>(3)</sup>. Hoje, a pesquisa do fator antinuclear (FAN), usando como substrato células HEp-2 é a metodologia de escolha para rastreamento e identificação dos padrões de imunofluorescência à qual os diversos auto-anticorpos se associam. No entanto, o teste de FAN deve ser complementado pela pesquisa e identificação de auto-anticorpos e auto-antígenos específicos, muitos dos quais apresentam grande utilidade clínica<sup>(4)</sup>.

Apesar de FAN positivo ser um dos 11 critérios estabelecidos pelo Colégio Americano de Reumatologia para a classificação de lúpus eritematoso sistêmico (LES)<sup>(5)</sup>, sua presença não necessariamente indica um estado patológico. Tal situação foi demonstrada em um estudo feito em doadores de banco de sangue, em que 22,6% (113/500) dos doadores apresentavam FAN positivo e 20,4% destes com título de 1:80<sup>(6)</sup>.

A pesquisa de antígenos nucleares extraíveis (ENA) é usada para identificação de um grupo de auto-anticorpos específicos que inclui o anti-SSA/Ro, anti-SSB/La, anti-RNP, anti-Sm, anti-Scl-70 e anti-Jo-1. Esses auto-anticorpos podem ser detectados por diversas metodologias, como contra-imunoelektroforese, immunoblot, imunodifusão, Elisa (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) e hemaglutinação<sup>(2)</sup>. Entretanto, podemos encontrar variações nos resultados, pois essas técnicas divergem em sensibilidade e especificidade<sup>(7)</sup>.

O auto-antígeno SSA/Ro é uma ribonucleoproteína, composta de uma porção polipeptídica e outra de quatro pequenas moléculas de RNA. A junção dessas duas porções forma o complexo SSA/Ro RNAs, conhecido com hY RNAs, sendo a porção antigênica desse complexo molecular a parte polipeptídica<sup>(8)</sup>.

A maior importância clínica do anti-SSA/Ro está relacionada à sua associação com o lúpus neonatal, o bloqueio

congenito cardiovascular, em crianças nascidas de mães com esse auto-anticorpo, e lúpus eritematoso cutâneo subagudo<sup>(9-11)</sup>. Esse auto-anticorpo é um dos critérios de diagnóstico dos pacientes com síndrome de Sjögren, sendo encontrado em 50-90% dos pacientes, geralmente também associado com outro complexo antigênico, o SSB/La. No LES é encontrado em cerca de 20-80% dos casos<sup>(3)</sup>.

Mesmo o FAN por IFI, que utiliza células HEp-2 como substrato, possuindo uma alta sensibilidade para a detecção de auto-anticorpos anti-ENA, incluindo anti-SSA/Ro, podemos encontrar pacientes com anti-SSA/Ro positivo, características de doença auto-imune e FAN negativo, conforme demonstrou Hoffman *et al*<sup>(12)</sup>.

Esse trabalho pretende avaliar de forma retrospectiva a correlação dos soros anti-SSA/Ro positivo com os padrões de imunofluorescência do FAN, bem como os dados clínicos desses pacientes.

## PACIENTES E MÉTODOS

### CASUÍSTICA

Neste trabalho foi realizado um estudo transversal retrospectivo. Foram revisadas todas as solicitações de pesquisa de anti-ENA encaminhadas ao Serviço de Patologia Clínica (SPC) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), no período de janeiro de 2004 a março de 2006. Em seguida, foram selecionadas as solicitações com resultados de anti-ENA positivo, e destas se pesquisou nos prontuários qual ou quais auto-anticorpos estavam envolvidos, anti-SSA/Ro, anti-SSB/La, anti-RNP, anti-Sm e anti-Scl 70, bem como sua associação com os padrões de IFI do FAN e os dados demográficos e quadros clínicos dos pacientes anti-SSA/Ro positivo. Os diagnósticos das doenças auto-imunes foram estabelecidos conforme os critérios do Colégio Americano de Reumatologia (*American College of Rheumatology*)<sup>(13-17)</sup>.

### IFI

A IFI para células HEp-2 (Wama Diagnóstica, Brasil) foi realizada de acordo com o protocolo proposto pelo fabricante. As células foram incubadas com os soros diluídos nas seguintes titulações 1:80, 1:160, 1:320, 1:640, 1:1280 em tampão salina fosfato pH 7,2 (PBS) por 30 minutos em câmara úmida à temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram lavadas duas vezes por 10 minutos em PBS e incubadas por 30 minutos com anticorpos secundários anti-IgG humana conjugada com isotiocianato de fluoresceína

(FITC) em câmara escura à temperatura ambiente. Após a incubação, as lâminas foram lavadas em PBS e montadas com glicerina tamponada e lamínula. A leitura foi feita em microscópio de fluorescência, modelo Olympus BX 50 sob aumento de 500 vezes<sup>(3)</sup>.

#### ENA POR HEMAGLUTINAÇÃO

O teste do ENA foi realizado de acordo com o protocolo proposto pelo fabricante (Virgo/Hemagem, EUA). As hemácias foram previamente sensibilizadas com os antígenos RNP, Sm, SSA/Ro, SSB/La e Scl-70; e incubadas com soros diluídos 1:50 (50µl) em solução salina por 90 minutos à temperatura ambiente. Após a incubação, foi feita a interpretação dos resultados. Para os soros que apresentaram reação positiva nessa primeira etapa de rastreamento, foi feita a identificação dos auto-anticorpos específicos, individualmente, para os diferentes ENA.

#### ESTATÍSTICA

Utilizamos a estatística descritiva para apresentação dos dados demográficos e proporções de testes positivos em uma planilha Excel (Microsoft, versão 2003).

## RESULTADOS

Foram analisados 392 soros de pacientes com solicitações para anti-ENA no período de janeiro de 2004 a março de 2006. Encontramos nessa amostra 90 pacientes com anti-ENA positivo e 302 negativo.

Os pacientes com resultado de anti-ENA positivo apresentaram uma faixa etária de 10 a 84 anos, com média de 42 e desvio-padrão de 18,6 anos, havendo um evidente predomínio do sexo feminino de 94% (86/90).

Na Tabela 1, mostramos a relação entre os testes de anti-ENA positivo e o FAN. Encontramos associação entre anti-ENA positivo e FAN positivo em 97,7% (88/90). Todos os pacientes com anti-SSA/Ro positivo apresentaram FAN positivo. Somente dois pacientes apresentaram anti-ENA positivo e FAN negativo. O quadro clínico de um desses pacientes era paniculite, nódulos subcutâneos e alopecia (paciente anti-RNP positivo), e o do outro era LES em remissão (paciente anti-RNP e anti-Sm positivos) em tratamento com glicocorticóide.

Os padrões de imunofluorescência do FAN e as frequências dos auto-anticorpos ENA específicos estão dispostos na Tabela 2. O auto-anticorpo anti-SSA/Ro apresentou a maior frequência do grupo, com 67,7% (61/90), sendo 31 soros exclusivos para anti-SSA/Ro e 30 com associação

com outros auto-anticorpos. Nessas 30 associações, foram encontrados os seguintes anticorpos concomitantemente ao anticorpo anti-SSA/Ro: anti-SSB/La (26,6%); anti-RNP (26,6%); anti-SSB/La e anti-RNP (6,6%); anti-RNP e anti-Sm (16,6%); anti-SSB/La e anti-Sm (10%); anti-SSB/La, anti-RNP e anti-Sm (6,6%); e anti-SSB/La, anti-RNP, anti-Sm e anti-Scl-70 (6,6%). O segundo auto-anticorpo mais freqüente foi anti-RNP, representando 48,8% da amostra, seguido por anti-SSB/La (17,7%), anti-Sm (16,6%) e anti-Scl-70 (1,1%).

Os padrões de imunofluorescência do FAN apresentados pelas amostras anti-SSA/Ro positivo foram: nuclear pontilhado fino, nuclear pontilhado grosso, nuclear homogêneo e nuclear pontilhado pontos isolados (< 10 pontos). E, em oito soros anti-SSA/Ro positivo, observamos a presença de mais de um padrão, estes foram identificados como padrão misto. O padrão de imunofluorescência mais freqüente para anti-SSA/Ro positivo foi nuclear pontilhado fino (42/61).

Os quadros clínicos dos pacientes anti-SSA/Ro positivo estão demonstrados na Tabela 3; LES foi o quadro clínico mais encontrado em 33 dos 61 pacientes. Somente três pacientes não apresentavam características de doença auto-imune, nestes, os quadros clínicos associados eram neoplasia de mama, neoplasia de útero e quadro inflamatório.

TABELA 1  
COMPARAÇÃO DOS EXAMES ANTI-ENA E FAN POR IFI  
EM CÉLULAS HEP-2

	Anti-ENA + Anti-SSA/Ro +	Anti-ENA + Anti-SSA/Ro -
FAN +	61	27
FAN -	0	2

FAN = fator antinuclear

IFI = imunofluorescência indireta

anti-ENA = auto-anticorpos contra antígenos nucleares extraíveis

anti-SSA/Ro = auto-anticorpo

+ = reagente

- = não-reagente

## DISCUSSÃO

Usualmente, o teste anti-ENA é solicitado para identificação de auto-anticorpos específicos, após o paciente com quadro clínico de doença auto-imune sistêmica ter apresentado um teste de FAN positivo. Muitos trabalhos têm relatado uma sensibilidade inferior a 100% das células HEP-2 na detecção de anticorpos anti-SSA/Ro<sup>(18-22)</sup>. Bos-suyt *et al*<sup>(20)</sup> sugere que esse fato possa acontecer por uma possível perda desse auto-antígeno durante o processo de fixação dessas células, usado na produção dos kits de FAN com células HEP-2.

TABELA 2  
PADRÕES DE IMUNOFLUORESCÊNCIA DO FAN EM CÉLULAS HEP-2 E FREQUÊNCIAS DOS AUTO-ANTICORPOS ANTI-ENA

Padrões de imunofluorescência do FAN	Anti-ENA (n=90)				
	Anti-SSA/Ro (n= 61)*	Anti-RNP (n=44)*	Anti-SSB/La (n=16)*	Anti-Sm (n=15)*	Anti-Scl-70 (n=1)*
Nuclear pontilhado fino	42	22	12	6	0
Nuclear pontilhado grosso	6	6	1	4	0
Nuclear homogêneo	4	3	2	0	0
Nuclear pontilhado pontos isolados (< 10 pontos)	1	3	0	1	0
Nucleolar	0	1	0	0	0
<b>Mistos</b>					
Nuclear pontilhado fino e citoplasmático pontilhado	4	4	0	1	0
Nuclear centromático e citoplasmático pontilhado	2	2	0	1	0
Nuclear homogêneo e citoplasmático pontilhado	1	1	1	1	1
Nuclear pontilhado pontos isolados (< 10 pontos) e citoplasmático pontilhado	1	0	0	0	0

FAN = fator antinuclear

anti-ENA = auto-anticorpos contra antígenos nucleares extraíveis

anti-SSA/Ro = auto-anticorpo

\* = os padrões de FAN estão apresentados conforme os auto-anticorpos anti-ENA. Em virtude das amostras apresentarem concomitantes auto-anticorpos, a soma dos auto-anticorpos não é o total dos pacientes anti-ENA positivos.

TABELA 3  
QUADROS CLÍNICOS DOS PACIENTES ANTI-SSA/RO POSITIVOS

Quadros clínicos	n = 61	Idade em anos*
LES	34	(14-84)
Síndrome de Sjögren	5	(26-77)
LES + síndrome de Sjögren	3	(48-54)
Artrite reumatóide	3	(53-67)
Lúpus eritematoso cutâneo subagudo	2	(37-50)
Anemia hemolítica auto-imune + síndrome de Raynaud	1	80
Artralgia + fibromialgia	1	48
Artrite reumatóide juvenil	1	12
Celulite do tronco + septicemia por <i>Staphylococcus aureus</i>	1	52
Doença indiferenciada do tecido conjuntivo	1	35
Esclerodermia linear	1	10
Esclerose sistêmica progressiva	1	47
Hipertireoidismo + artralgia	1	57
Neoplasia maligna de mama	1	77
Neoplasia maligna de útero	1	34
Poliartralgia	1	60
Púrpura trombocitopênica idiopática	1	24
Síndrome antifosfolípide	1	43
Síndrome de Sjögren + artrite reumatóide	1	58
Total	61	(10-84)

anti-SSA/Ro = auto-anticorpo

LES = lúpus eritematoso sistêmico

\* = os intervalos das idades de cada patologia estão apresentados entre parênteses, em anos.

No período de dois anos, identificamos 90 pacientes com anticorpos anti-ENA positivos testados no Serviço de Patologia Clínica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, maioria de mulheres (94%), com idade média de 42 anos (desvio-padrão de 18 anos), em concordância com os achados prévios<sup>(23,24)</sup>.

Nessa amostra, o anticorpo anti-SSA/Ro foi o de maior prevalência, tendo sido identificado em 67,7% (61/90) dos pacientes anti-ENA reagente, dados semelhantes aos relatados por Sanchez-Guerrero *J et al*<sup>(19)</sup>, que encontraram anti-SSA/Ro positivo em 40% de sua amostra, e por Pollock and Toh<sup>(21)</sup>, que encontraram em sua amostra 65% de anti-SSA/Ro nos anti-ENA positivos.

Observamos que, dos 61 pacientes positivos para anti-SSA/Ro, 30 possuíam associação com outros auto-anticorpos. A coexistência em uma mesma doença auto-imune de diversos auto-anticorpos contra distintos constituintes de um mesmo complexo molecular já foi estudada anteriormente por Tan<sup>(25)</sup>, sugerindo que esse fato pode ser explicado pela formação de complexos supramoleculares como SSA/SSB e Sm/RNP.

Nossos resultados mostram que 97% dos pacientes anti-ENA reagentes eram também reagentes para FAN. Todos os pacientes positivos para o auto-anticorpo anti-SSA/Ro foram positivos também para o teste FAN com células HEp-2, mostrando 100% de sensibilidade desse teste para a detecção de anti-SSA/Ro. Sendo assim, concordamos com Kavanaugh *et al*<sup>(7)</sup>, sugerindo que, aos pacientes com FAN negativo, não há indicação de outro teste. Contudo, encontramos dois pacientes com FAN negativo e anti-ENA positivo. Um desses pacientes apresentava anti-RNP positivo e tinha evidências de doença auto-imune, e o outro apresentava anti-RNP e anti-Sm positivos com um diagnóstico de LES em remissão com uso de glicocorticóides. Encontramos na literatura um caso em que um paciente com LES apresentava anti-RNP positivo e FAN negativo<sup>(12)</sup>.

No entanto, no passado, quando o substrato utilizado para o FAN era tecido de animal (fígado e rim de ratos), podia-se verificar FAN negativo em pacientes anti-SSA/Ro positivo devido à diminuída expressão desse antígeno quando comparado às células HEp-2<sup>(13)</sup>. Porém Hoffman *et al*<sup>(12)</sup> realizaram um estudo com 494 amostras, no qual foram utilizados dois substratos para FAN por IFI, células HEp-2 e células HEp-2 geneticamente modificadas, com superexpressão do auto-antígeno SSA/Ro (*HEp-2000*<sup>®</sup> *Immunoconcepts*, EUA), encontrando três pacientes com anti-SSA/Ro positivo que só apresentaram positividade

para FAN por IFI quando o substrato utilizado era células HEp-2 geneticamente modificadas<sup>(19)</sup>.

Apesar de a sensibilidade do FAN para LES ser de 95-100%<sup>(7,25)</sup>, podem-se encontrar pacientes com esse diagnóstico sem um teste de FAN positivo. Ainda não se sabe se esses pacientes formariam um subgrupo de LES ou se isso seria um resultado falso-negativo de FAN<sup>(26)</sup>.

O padrão de imunofluorescência do FAN predominante dos pacientes anti-ENA positivos foi o nuclear pontilhado fino, tanto naqueles com anti-SSA/Ro positivos (68,9%) (42/61) quanto nos outros auto-anticorpos. A correlação encontrada entre anticorpos anti-SSA/Ro e o padrão nuclear pontilhado fino já foi demonstrada por outros autores<sup>(3,19,27)</sup> e não deve ser usada como único parâmetro, pois esse padrão também foi o mais prevalente nas amostras sem a presença desse anticorpo, o que pode ser explicado talvez pela coexistência do anticorpo anti-SSB/La, que também costuma apresentar esse padrão de imunofluorescência.

Os quadros clínicos mais encontrados nos pacientes anti-SSA/Ro positivos foram o LES e a síndrome de Sjögren, condizendo com o que se esperava encontrar, pois essas patologias estão fortemente relacionadas com a presença desse auto-anticorpo<sup>(22,27,28)</sup>.

É importante ressaltar que em nosso trabalho foi utilizada hemaglutinação para a detecção de anticorpos anti-ENA, podendo assim diferir na sensibilidade e especificidade de outros métodos (Elisa, contra-imunoelektroforese, imunodifusão etc.), como já foi relatado por inúmeros autores<sup>(26,29-33)</sup>. Novas pesquisas sobre essas diferentes metodologias que não só comparem técnicas de detecção dos auto-anticorpos, mas que também analisem os pacientes quanto aos seus dados clínicos e acompanhem o curso das doenças nos pacientes, são necessárias para uma melhor utilização das tecnologias disponíveis hoje<sup>(34)</sup>.

O teste de FAN em células HEp-2 por IFI mostrou ser um bom método de rastreamento para a detecção de auto-anticorpos anti-SSA/Ro, apresentando maior associação com o padrão nuclear pontilhado fino e com os quadros clínicos de LES e síndrome de Sjögren.

## AGRADECIMENTOS

Agradecemos aos funcionários do Serviço de Reumatologia e do Serviço de Patologia Clínica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, especialmente às bioquímicas Marta Bergman Senger, Maria Clara Medina Correa e Dra. Carolina Sichinger Moura de Souza.

*Declaramos a inexistência de conflitos de interesse.*

## REFERÊNCIAS

1. Tan EM: Autoantibodies in Pathology and Cell Biology. *Cell* 67: 841-2, 1991.
2. Phan TG, Wong RC, Adelstein S: Autoantibodies to extractable nuclear antigens: making detection and interpretation more meaningful. *Clin Diagn Lab Immunol* 9: 1-7, 2002.
3. von Muhlen CA, Tan EM: Autoantibodies in the diagnosis of systemic rheumatic diseases. *Semin Arthritis Rheum* 24: 323-58, 1995.
4. Kelley WN: Textbook of rheumatology. 5. ed. Philadelphia: Editora WB Saunders, 1997.
5. Hochberg MC: Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 40: 1725, 1997.
6. Fernandez SA, Lobo AZ, Oliveira ZN, Fukumori LM, AM Pr, Rivitti EA: Prevalence of antinuclear autoantibodies in the serum of normal blood donors. *Rev Hosp Clin Fac Med São Paulo* 58: 315-9, 2003.
7. Kavanaugh A, Tomar R, Reveille J, Solomon DH, Homburger HA: Guidelines for clinical use of the antinuclear antibody test and tests for specific autoantibodies to nuclear antigens. American College of Pathologists. *Arch Pathol Lab Med* 124: 71-81, 2000.
8. Macrae IJ, Doudna JA: Ro's role in RNA reconnaissance. *Cell* 20: 495-6, 2005.
9. Chen X, Wolin SL: The Ro 60 kDa autoantigen: insights into cellular function and role in autoimmunity. *J Mol Med* 82: 232-9, 2004.
10. Jaeggi ET, Fouron JC, Silverman ED, Ryan G, Smallhorn J, Hornberger LK: Transplacental fetal treatment improves the outcome of prenatally diagnosed complete atrioventricular block without structural heart disease. *Circulation* 110: 1542-8, 2004.
11. Srivastava M, Rencic A, Diglio G, et al: Drug-induced, Ro/SSA-positive cutaneous lupus erythematosus. *Arch Dermatol* 139: 45-9, 2003.
12. Hoffman IEA, Peene I, Veys EM, De Keyser F: Detection of specific antinuclear reactivities in patients with negative antinuclear antibody immunofluorescence screening tests. *Clinical Chemistry* 48: 2171-6, 2002.
13. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, et al: The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 31: 315-24, 1988.
14. Bohan A, Peter JB: Polymyositis and dermatomyositis (first of two parts). *N Engl J Med* 292: 344-7, 1975.
15. Bohan A, Peter JB: Polymyositis and dermatomyositis (second of two parts). *N Engl J Med* 292: 403-7, 1975.
16. Fox RI, Robinson CA, Curd JG, Kozin F, Howell FV: Sjogren's syndrome. Proposed criteria for classification. *Arthritis Rheum* 29: 577-85, 1986.
17. Masi AT, Rodnan GP, Medsger TA Jr, et al: Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). *Arthritis Rheum* 23: 581-90, 1980.
18. Kozin F, Fowler M, Koethe SM: A comparison of the sensitivities and specificities of different substrates for the fluorescent antinuclear antibody test. *Am J Clin Pathol* 74: 785-90, 1980.
19. Sanchez-Guerrero J, Lew RA, Fossel AH, Schur PH: Utility of anti-Sm, anti-RNP, anti-Ro/SS-A, and anti-La/SS-B (extractable nuclear antigens) detected by enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 39: 1055-61, 1996.
20. Bossuyt X, Frans J, Hendrickx A, Godefridis G, Westhovens R, Marien G: Detection of anti-SSA antibodies by indirect immunofluorescence. *Clin Chem* 50: 2361-9, 2004.
21. Pollock W, Toh BH: Routine immunofluorescence detection of Ro/SS-A autoantibody using HEp-2 cells transfected with human 60 kDa Ro/SS-A. *J Clin Pathol* 52: 684-7, 1999.
22. Peene I, Van Ael W, Vandebossche M, Vervaeke T, Veys E, De Keyser F: Sensitivity of the HEp-2000 substrate for the detection of anti-SSA/Ro60 antibodies. *Clin Rheumatol* 19: 291-5, 2000.
23. Kang I, Siperstein R, Quan T, Breitenstein ML: Utility of age, gender, ANA titer and pattern as predictors of anti-ENA and -dsDNA antibodies. *Clin Rheumatol* 23: 509-15, 2004.
24. Craig WY, Ledue TB, Johnson AM, Ritchie RF: The distribution of antinuclear antibody titers in "normal" children and adults. *J Rheumatol* 26: 914-9, 1999.
25. Tan EM: Autoantibodies and Autoimmunity: A Three-Decade Perspective. *An NY Acad Sci* 815: 1-14, 1997.
26. Egner W: The use of laboratory tests in the diagnosis of SLE. *J Clin Pathol* 53: 424-32, 2000.
27. Peene I, Meheus L, Veys EM, De Keyser F: Detection and identification of antinuclear antibodies (ANA) in a large and consecutive cohort of serum samples referred for ANA testing. *Ann Rheum Dis* 60: 1131-6, 2001.
28. Peene I, Meheus L, De Keyser S, Humbel R, Veys EM, De Keyser F: Anti-Ro52 reactivity is an independent and additional serum marker in connective tissue disease. *Ann Rheum Dis* 61: 929-33, 2002.
29. James K, Carpenter AB, Cook L, Marchand R, Nakamura RM: Development of the antinuclear and anticytoplasmic antibody consensus panel by the Association of Medical Laboratory Immunologists. *Clin Diagn Lab Immunol* 7: 436-43, 2000.
30. Lock RJ, Unsworth DJ: Antibodies to extractable nuclear antigens. Has technological drift affected clinical interpretation? *J Clin Pathol* 54: 187-90, 2001.
31. Llorente MJ, Jimenez J, Gonzalez C, et al: Biochemistry Commission for Immunological Diseases of the Spanish Society of Clinical Chemistry. Effectiveness of different methods for anti-Sm antibody identification. A multicentre study. *Clin Chem Lab Med* 43: 748-52, 2005.
32. Orton SM, Peace-Brewer A, Schmitz JL, Freeman K, Miller WC, Folds JD: Practical evaluation of methods for detection and specificity of autoantibodies to extractable nuclear antigens. *Clin Diagn Lab Immunol* 11: 297-301, 2004.
33. Welin Henriksson E, Hansson H, Karlsson-Parra A, Pettersson I: Autoantibody profiles in canine ANA-positive sera investigated by immunoblot and Elisa. *Vet Immunol Immunopathol* 61: 157-70, 1998.
34. Damoiseaux JG, Tervaert JW: From ANA to ENA: how to proceed? *Autoimmun Rev* 5: 10-7, 2006.