



# REVISTA BRASILEIRA DE REUMATOLOGIA

www.reumatologia.com.br



Artigo original

## IV Consenso Brasileiro para pesquisa de autoanticorpos em células HEp-2

Paulo Luiz Carvalho Francescantonio<sup>a</sup>, Wilson de Melo Cruvinel<sup>a</sup>, Alessandra Dellavance<sup>b</sup>, Luis Eduardo Coelho Andrade<sup>b,c</sup>, Ben Hur Taliberti<sup>d</sup>, Carlos Alberto von Mühlen<sup>e</sup>, Carlos David Araújo Bichara<sup>f</sup>, Cleonice Bueno<sup>g</sup>, Cristóvão Luis Pitangueira Mangueira<sup>h,i</sup>, Darlene Gonçalves Carvalho<sup>j</sup>, Eloísa S.D. de O. Bonfá<sup>k</sup>, Fabiano de Almeida Brito<sup>j,l</sup>, Flávia Ikeda e Araújo<sup>m</sup>, Jozelia Rêgo<sup>n</sup>, Kaline Medeiros Costa Pereira<sup>b</sup>, Lisiane Maria Enriconi dos Anjos<sup>o,p</sup>, Maria de Fatima Bissoli<sup>q</sup>, Mittermayer Barreto Santiago<sup>r</sup>, Natalya Zaidan Maluf<sup>s</sup>, Rossana Rassi Alvarenga<sup>a</sup>, Suzane Pretti Figueiredo Neves<sup>l</sup>, Valeria Valim<sup>a</sup>, Wilton Silva dos Santos<sup>t,u</sup>

<sup>a</sup>Pontifícia Universidade Católica de Goiás (PUC Goiás), Goiânia, GO, Brasil

<sup>b</sup>Fleury Medicina e Saúde, São Paulo, SP, Brasil

<sup>c</sup>Disciplina de Reumatologia, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), São Paulo, SP, Brasil

<sup>d</sup>Serviço de Reumatologia, Hospital das Clínicas, Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Uberlândia, MG, Brasil

<sup>e</sup>Centro de Diagnósticos Médicos e Rheuma Clínica de Doenças Reumáticas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brasil

<sup>f</sup>Amaral Costa Medicina Diagnóstica, Belém, PA, Brasil

<sup>g</sup>Laboratórios de Investigação Médica, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo (FM-USP), São Paulo, SP, Brasil

<sup>h</sup>Laboratório Central, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo (FM-USP), São Paulo, SP, Brasil

<sup>i</sup>Departamento de Patologia Clínica, Hospital Israelita Albert Einstein, São Paulo, SP, Brasil

<sup>j</sup>Instituto Hermes Pardini, Belo Horizonte, MG, Brasil

<sup>k</sup>Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP, Brasil

<sup>l</sup>Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, Brasil

<sup>m</sup>Universidade Católica de Brasília (UCB), Brasília, DF, Brasil

<sup>n</sup>Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Goiás (UFG), Goiânia, GO, Brasil

<sup>o</sup>Universidade do Sul de Santa Catarina (UNISUL), Florianópolis, SC, Brasil

<sup>p</sup>Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALE), Florianópolis, SC, Brasil

<sup>q</sup>Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Vitória, ES, Brasil

<sup>r</sup>Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública (EBMSP), Salvador, BA, Brasil

<sup>s</sup>Grupo DASA, São Paulo, SP, Brasil

<sup>t</sup>Escola Superior de Ciências da Saúde do Distrito Federal, Brasília, DF, Brasil

<sup>u</sup>Laboratório Sabin, Brasília, DF, Brasil

\* Autor para correspondência.

E-mail: melocruvinel@gmail.com (W.M. Cruvinel).

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

<http://dx.doi.org/10.1016/j.rbr.2013.10.001>

## INFORMAÇÕES

Histórico do artigo:

Recebido em 4 de setembro de 2013

Aceito em 13 de outubro de 2013

Palavras-chave:

Autoanticorpos

Células HEp-2

Anticorpos antinúcleo

Imunofluorescência indireta

Consenso de FAN-HEp-2

## RESUMO

**Objetivo:** O IV Consenso Brasileiro para Pesquisa de Autoanticorpos em Células HEp-2 (FAN) realizado em Vitória (ES), no dia 18 de setembro de 2012, objetivou discutir estratégias e recomendações relacionadas ao procedimento técnico, à padronização e à interpretação dos resultados da pesquisa de autoanticorpos em células HEp-2.

**Métodos:** Participaram do evento 23 pesquisadores e especialistas de Universidades e laboratórios brasileiros. Foram abordados diferentes tópicos, discutidos amplamente a fim de se estabelecer recomendações específicas.

**Resultados e conclusão:** O IV Consenso integrou à árvore de decisão o padrão citoplasmático em Anéis e Bastões, o padrão nuclear pontilhado Quasi-homogêneo (QH) e o padrão misto CENP-F. Discutiu-se ainda a necessidade de atenção para a classificação do padrão misto relacionado à presença de anticorpos anti-DNA topoisomerase I (Scl-70), compreendendo os componentes nuclear pontilhado fino, nucleolar homogêneo, NOR na placa metafásica e citoplasmático pontilhado fino. Foram sugeridas diretrizes para o controle de qualidade do teste, diluição de triagem e diluição de esgotamento, e foi emitido alerta quanto à necessidade de atenção em relação à heterogeneidade de substratos disponíveis no mercado e a utilização de metodologias automatizadas para detecção de autoanticorpos.

© 2014 Elsevier Editora Ltda. Todos os direitos reservados.

## IV Brazilian Guidelines for autoantibodies on HEp-2 cells

## ABSTRACT

**Objective:** The Fourth Brazilian Consensus for Autoantibodies Screening in HEp-2 Cells (ANA) was held in Vitória, Espírito Santo, and aimed to discuss strategies and recommendations about the technique, standardization, interpretation and quality control of the indirect immunofluorescence reaction on HEp-2 cells.

**Methods:** Twenty three ANA experts from university centers and private laboratories in different areas from Brazil discussed and agreed upon recommendations for the fourth edition of the Brazilian Consensus for Autoantibodies Screening in HEp-2 Cells.

**Results and conclusion:** The 4th ANA Consensus included three novel patterns into the existing algorithm (cytoplasmic Rods and Rings, nuclear Quasi-homogeneous, and CENP-F). Emphasis was given to the need of attention in describing the peculiar mixed pattern elicited by anti-DNA topoisomerase I (Scl-70) autoantibodies, comprising nuclear fine speckled, nucleolar homogeneous pattern, NOR staining in metaphase plates, and cytoplasmic fine speckled patterns. The group also emphasized the need for continuous quality control in indirect immunofluorescence assays, the establishment of screening dilutions, as well as conjugate titration. An alert was made regarding the heterogeneity of commercial kits in defining patterns and the use of solid phase methodologies to determine the presence of autoantibodies.

© 2014 Elsevier Editora Ltda. All rights reserved.

Keywords:

Autoantibodies

HEp-2 cells

Antinuclear antibodies

Indirect immunofluorescence

ANA consensus

## Introdução

A avaliação de autoanticorpos contra antígenos celulares por imunofluorescência indireta (IFI) em células HEp-2 passou ao longo da última década por elaborado processo de padronização nacional. Tais ações tiveram início no ano de 2000, trazendo diversas repercussões no território brasileiro no âmbito da realização e da interpretação do teste,<sup>1-4</sup> estimulando até mesmo iniciativas internacionais similares.<sup>5-8</sup>

Os dois primeiros Consensos foram direcionados ao estabelecimento de ações com vistas a padronizar critérios de lei-

tura e interpretação dos diversos padrões de autoanticorpos em células HEp-2. Foram elaborados algoritmos de classificação, fundamentados no critério morfológico e estabelecendo cinco grupos principais de padrões (nucleares, nucleolares, citoplasmáticos, aparelho mitótico e mistos). Cada algoritmo foi apresentado com guias de orientação, e também foram abordadas as principais relevâncias clínicas dos diferentes achados.<sup>1,2</sup>

O III consenso, realizado no ano de 2007, teve como propósito atualizar as relevâncias clínicas do ensaio, sugerir medidas efetivas para o controle de qualidade e avaliar as dificuldades na implantação das normas de padronização.<sup>3,4</sup>

Discutiu-se também, no III Consenso, a definição de aspectos ainda controversos na definição da positividade do nucléolo, e foi sugerida a incorporação aos algoritmos de dois novos padrões de fluorescência que ficaram reservados, a fim de que mais estudos fossem realizados para obtenção de evidências científicas para o seu reconhecimento - Padrão Citoplasmático em Anéis e Bastões e Padrão Pontilhado Quasi-homogêneo.<sup>3,4</sup> Na perspectiva da educação continuada e da necessidade de se acompanhar a evolução científica, foi realizado o IV Consenso Brasileiro para pesquisa de Autoanticorpos em células HEp-2. O evento reuniu em Vitória - ES 23 estudiosos do assunto, provenientes de diferentes regiões do Brasil, e novamente foram discutidas as dificuldades e os avanços na normatização do teste. O IV Consenso integrou à árvore de decisão o padrão em Anéis e Bastões, o padrão nuclear pontilhado *quasi-homogêneo* (QH) e o padrão misto observado com a presença de anticorpos anti-CENP-F. Discutiu-se ainda a necessidade de atenção para a classificação do padrão nuclear misto associado à presença de anticorpos anti-DNA topoisomerase.<sup>9</sup> Foram sugeridas diretrizes no que se relaciona ao controle de qualidade do teste, à diluição de triagem e à diluição de esgotamento. Por fim, foram emitidas alertas quanto à heterogeneidade de substratos disponíveis no mercado e à utilização de metodologias automatizadas para detecção de autoanticorpos.

Os resultados do IV Consenso permitiram avançar ainda mais no aperfeiçoamento dos critérios que viabilizam o controle e o aproveitamento satisfatórios das potencialidades desse método de auxílio diagnóstico.

---

## Método de trabalho

Na ocasião do XXIX Congresso Brasileiro de Reumatologia (CBR), participaram do IV Consenso em Vitória (ES), no dia 18 de setembro de 2012, 23 pesquisadores e especialistas de universidades e laboratórios clínicos de diferentes regiões do Brasil. Foram discutidas e aprovadas recomendações relacionadas ao procedimento técnico, à padronização na execução e à interpretação dos resultados do ensaio. Representantes comerciais de diferentes empresas produtoras de insumos participaram do encontro na qualidade de ouvintes, sem direito a comentários, apresentações ou voto. Foram abordados diferentes tópicos referentes à descrição de novos padrões, ao procedimento técnico do ensaio, à diluição e à titulação dos soros, à reprodutibilidade das diferentes marcas de substratos, à utilização de métodos automatizados na identificação de autoanticorpos e à apresentação do laudo. Cada um dos tópicos foi apresentado aos membros da assembleia por relatores e discutido amplamente, a fim de se estabelecer as recomendações. Cada relator se baseou em dados da literatura e na apresentação de estudos próprios.

---

## Recomendações gerais

### I- Padrão citoplasmático em anéis e bastões

O padrão em anéis e bastões foi apresentado na ocasião do III Consenso, embora, naquela ocasião, sem identidade imu-

nológica definida e com evidência científica ainda preliminar. Portanto, não foi incorporado à árvore de decisão naquela ocasião, tendo se recomendado a execução de estudos adicionais. Mediante tais estudos foram reconhecidos como alvos antigênicos a inosina monofosfato deidrogenase 2 (IMPDH2) e a citidina trifosfato sintase 1 (CTPS1).<sup>10</sup> Trata-se de enzimas essenciais na via de biossíntese da citidina trifosfato e da guanosina trifosfato, respectivamente. A CTP está envolvida na biossíntese de ácidos nucleicos (DNA, RNA) e fosfolipídios, com importante função na proliferação celular.<sup>11</sup> A IMPDH2 catalisa a oxidação NAD-dependente da inosina monofosfato em xantossina monofosfato, processo essencial na biossíntese da guanosina monofosfato, portanto atividade também estreitamente relacionada ao mecanismo de proliferação celular.<sup>12</sup> A partir da inibição farmacológica da CTPS1 (6-diazo-5-oxo-L-norleucina e Acivicina) e da IMPDH2 (Ribavirina), evidenciou-se a indução dose-dependente de estruturas em anéis e bastões citoplasmáticos em substratos de células neoplásicas, incluindo-se as células HEp-2.<sup>10</sup>

O estudo de Keppeke e colaboradores (2012) confirmou estreita associação entre o padrão citoplasmático em anéis e bastões e a infecção pelo HCV. Em uma amostra de 597 indivíduos com diversas condições clínicas, os anticorpos associados ao padrão em Anéis e Bastões ocorreram exclusivamente em pacientes com HCV. Entre 342 pacientes com HCV, o autoanticorpo ocorreu em 38% daqueles em tratamento com ribavirina e interferon alfa, mas em nenhum dos demais pacientes, incluindo aqueles recebendo um desses medicamentos isoladamente. Não foi evidenciada associação do padrão com parâmetros demográficos, tempo de diagnóstico, resposta ao tratamento, genótipo do vírus ou carga viral.<sup>13</sup> No estudo de Covini e colaboradores (2012), foi evidenciada em 15 participantes HCV positivos a produção de autoanticorpos contra as estruturas citoplasmáticas após tratamento com Ribavirina/IFN.<sup>14</sup> O IV Consenso integrou à árvore de decisão o padrão em Anéis e Bastões (fig. 1), sendo que o mesmo foi classificado como Padrão Citoplasmático independente, não vinculado a outros padrões citoplasmáticos. Uma informação relevante na caracterização desse padrão foi referente ao fato de que as estruturas em Anéis e Bastões não se expressam em todos os substratos comerciais,<sup>15</sup> informação que levou o IV Consenso a sugerir que seja informado no laudo que o reconhecimento desse padrão é substrato dependente.

### II- Padrão pontilhado quasi-homogêneo (QH)

O IV Consenso integrou à árvore de decisão dos padrões nucleares o padrão nuclear pontilhado *quasi-homogêneo* (QH). Trata-se de um padrão enquadrado na guia de interpretação como opcional (fig. 1) e que se caracteriza por fluorescência nuclear pontilhada extremamente fina, aproximando-se da textura homogênea, com placa metafásica corada da mesma forma. É um padrão distinto dos padrões nuclear homogêneo e nuclear pontilhado fino denso, em que não se verifica uma especificidade antigênica única, mas sim uma miscelânea de alvos antigênicos reconhecidos. França e colaboradores demonstraram que o padrão pontilhado fino *quasi-homogêneo* apresenta perfil de autoanticorpos intermediário entre aquele do padrão pontilhado fino denso e o padrão homogêneo. Igualmente, o perfil clínico associado ao padrão

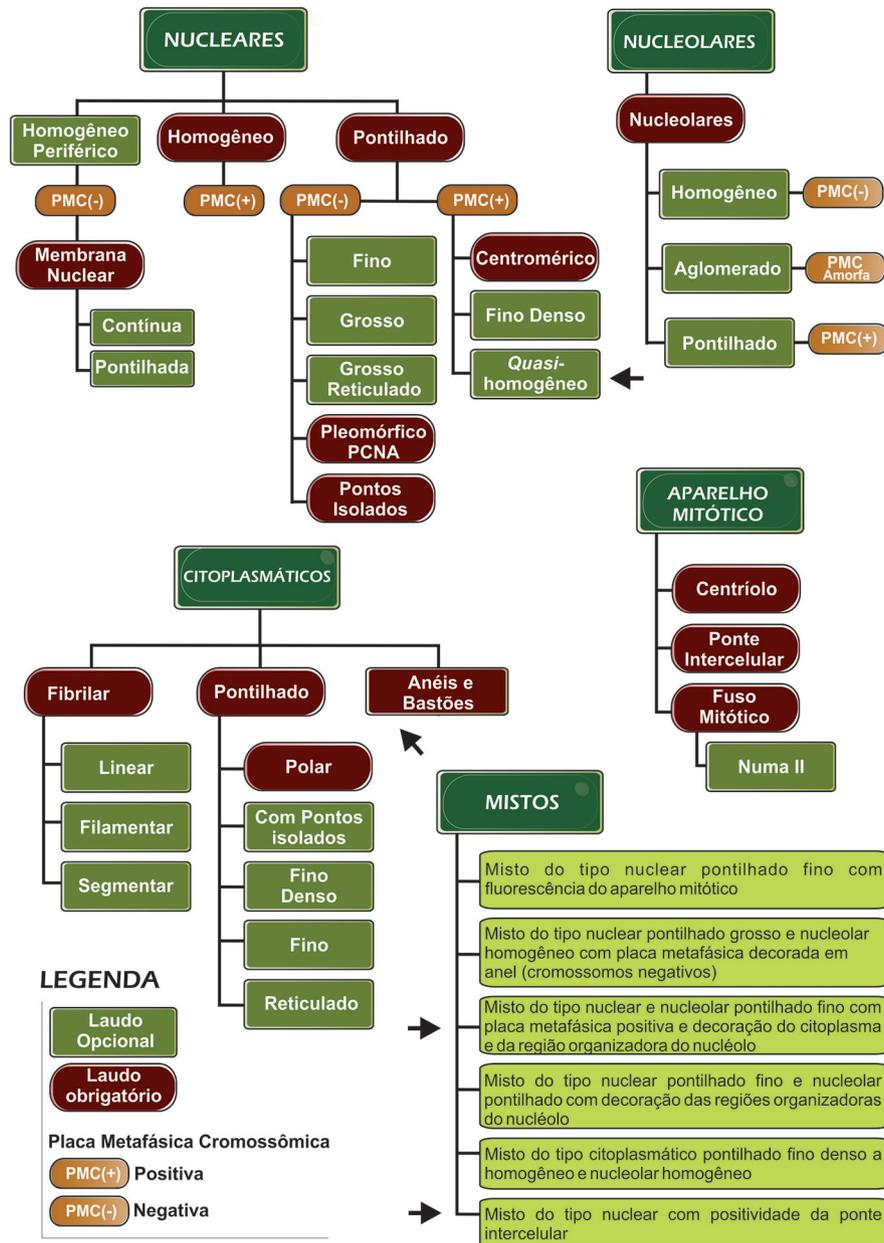


Figura 1 – Árvore de classificação dos padrões nucleares, nucleolares, citoplasmáticos, do aparelho mitótico e mistos. As setas indicam as inclusões dos novos padrões reconhecidos.

pontilhado fino *quasi-homogêneo* situa-se de forma intermediária entre o padrão pontilhado fino denso e o padrão homogêneo.<sup>16</sup> Portanto, a identificação desse padrão sugere a continuidade da investigação do diagnóstico clínico, porque pode estar relacionado a doenças reumáticas autoimunes sistêmicas.<sup>17</sup>

### III- Padrão misto do tipo CENP-F

O IV Consenso integrou à árvore de decisão dos padrões mistos o padrão CENP-F, caracterizado por fluorescência pontilhada fina de intensidade variável na matriz nuclear nas células em interfase e nucléolos geralmente negativos. Observa-se ainda neste padrão uma delicada decoração rendilha-

da dos cinetócoros, predominantemente visível na prófase e na metáfase. O aparelho mitótico apresenta ainda marcação pontual na região central da ponte intercelular nas células em telófase. Finalmente, as figuras em prófase exibem delicada coloração do envelope nuclear.<sup>18</sup>

Trata-se de um padrão complexo, ocasionado por anticorpos contra uma proteína de 350 kDa, conhecida como CENP-F ou mitosina. Esta proteína tem função importante na organização do sistema de microtúbulos citoplasmáticos, metilação de histona H3, regulação de alguns fatores de transcrição e progressão do ciclo celular para mitose.<sup>19,20</sup> Rattner e colaboradores identificaram o padrão no soro de um paciente com câncer de pulmão<sup>18</sup> e posteriormente em câncer de mama.<sup>21,22</sup> Cassiano e colaboradores relataram positividade para o pa-

drão em diferentes doenças neoplásicas, doenças hepáticas crônicas, rejeição crônica de aloenxerto renal e doença de Crohn.<sup>23</sup> Foi relatada a presença do padrão CENP-F em um paciente com carcinoma colorretal.<sup>24</sup> Como um todo, a literatura aponta para a suspeita de doença neoplásica em pacientes com este padrão.

#### IV- Padrão misto do tipo anti-DNA topoisomerase

O IV Consenso chamou a atenção para o padrão composto relacionado à presença de anticorpos anti-DNA topoisomerase I (Scl-70). A descrição clássica na literatura do padrão associado a anticorpos anti-DNA topoisomerase I restringe-se ao núcleo e ao nucléolo, não havendo especificidade neste achado. Recentemente, foi demonstrado que os anticorpos anti-DNA topoisomerase I ocasionam um padrão extremamente específico, caracterizado pela decoração de cinco domínios celulares, a saber, núcleo, nucléolos, citoplasma, região organizada do nucléolo e cromossomos da placa cromossômica.<sup>9</sup>

#### V- Titulação do conjugado e controle de qualidade do ensaio

O IV Consenso ressaltou novamente a necessidade de rigoroso controle de qualidade do ensaio com o objetivo de restringir reações falso-positivas em indivíduos não autoimunes, mas com solicitação para o teste e com o propósito de se minimizar as diferenças entre os resultados entre diferentes laboratórios. Recomendou-se a necessidade permanente de titulação do conjugado para equiparação dos sistemas dos laboratórios brasileiros e a utilização de controles negativos e positivos limítrofes. Essa orientação, previamente estabelecida e detalhada no III Consenso,<sup>4</sup> ressalta a necessidade de os Laboratórios Brasileiros garantirem a qualidade do teste. Para tal, salienta-se a necessidade de treinamento específico e qualificação do corpo técnico, além de se considerar a heterogeneidade dos kits comerciais e dos equipamentos ópticos entre os diferentes serviços. Reforçou-se a necessidade da realização da titulação do conjugado para cada novo lote de kit comercial, a partir da utilização dos soros de referência comerciais ou provenientes de outros serviços.<sup>4</sup>

Considerando-se que a pesquisa de autoanticorpos em células HEp-2 depende tecnicamente de múltiplos fatores (potência da lâmpada do microscópio variando de 20, 50 ou 100 W; concentração e relação proteína/fluoresceína do conjugado; soros controles de reatividade mínima em diluição de 1/80; capacitação e subjetividade inerente ao observador), verifica-se que a titulação do conjugado é um parâmetro fundamental e passível de ajuste, a fim de assegurar o reconhecimento do título nominal dos soros controles. Esta medida é considerada primordial para se alcançar objetividade e exatidão ao método.<sup>4</sup>

#### VI- Diluição de triagem e titulação dos soros

O IV Consenso recomendou aos laboratórios brasileiros a diluição de triagem em 1/80. Tal recomendação se fundamenta no fato de que alguns pacientes autoimunes podem apresentar títulos de 1/80, embora a maior parte deles apresente títulos de autoanticorpos em células HEp-2 de moderado (1/160

e 1/320) a elevado ( $\geq 1/640$ ), ao passo que indivíduos hígidos tendem a apresentar títulos baixos (1/40 e 1/80).<sup>17,25</sup> Outro aspecto que reforçou a necessidade dessa recomendação foi o fato de que o exame continua a ser solicitado por uma variedade de especialistas que atendem pacientes distintos, em serviços onde as doenças reumáticas autoimunes são menos prevalentes. O IV Consenso reforça que o exame deve ser solicitado na presença de suspeita clínica convincente de doença autoimune, evitando que a solicitação do mesmo em contexto clínico inadequado (baixa probabilidade pré-teste) promova confusão ao raciocínio clínico.<sup>4</sup>

Outra orientação foi quanto ao esgotamento do soro até 1/640, podendo as amostras positivas ser liberadas como maior ou igual a 640, pois tem sido demonstrado que até este título há ganho substancial em termos de valor preditivo positivo para diagnóstico de doenças reumáticas autoimunes.<sup>17,26</sup> Em algumas circunstâncias pode ser desejável a continuidade da diluição para discriminação de um ou mais de um padrão concomitante.

#### VII- Reprodutibilidade dos diversos padrões

O IV Consenso alertou para a reprodutibilidade dos diversos padrões entre diferentes marcas comerciais. Existe uma margem de variação entre os diferentes substratos comerciais disponíveis no mercado brasileiro, e esta variabilidade pode afetar de forma diversa a definição dos diferentes padrões. As variações podem ser relacionadas aos lotes, sendo inerentes ao processo de manufatura dos kits.

Em um estudo recente, Dellavance e colaboradores (2013) analisaram 17 padrões de reconhecida relevância diagnóstica em oito substratos. O processamento das reações e leitura foi feito de forma cega e independente por três centros diagnósticos. De modo geral, evidenciou-se boa reprodutibilidade dos 17 padrões testados.<sup>27</sup> Contudo, alguns padrões apresentaram significativa variabilidade de reconhecimento em alguns substratos comerciais, como o padrão CENP-F, o citoplasmático pontilhado fino (associado a anti-Jo-1) e o padrão nuclear pontilhado pleomórfico do tipo PCNA. Tais padrões foram reconhecidos apenas em dois dos oito substratos testados.<sup>27</sup> Esse estudo mostrou que a maior parte dos padrões foi adequadamente reconhecida na maioria dos substratos antigênicos analisados. Possivelmente um dos aspectos que subsidiou esta alta taxa de reprodutibilidade foi o fato de que as amostras utilizadas no estudo eram imunológica e morfológicamente bem caracterizadas. Não podemos extrapolar esses achados para o caso de amostras com padrões de fluorescência menos bem caracterizados.

Considerando-se que pacientes autoimunes nem sempre apresentam soros monoespecíficos, o IV Consenso alertou para a necessidade da utilização de um painel de amostras-controle para validação dos lotes e marcas de células HEp-2 utilizadas nos laboratórios, medida que assegurará maior confiabilidade e segurança na utilização dos resultados pelos clínicos. Recomenda-se, ainda, a utilização de mais de uma marca de substrato para casos específicos e que, para cada novo lote ou marca de lâmina, sejam testados os soros de referência, representativos das diferentes regiões celulares e dos diversos padrões.

### VIII- Métodos automatizados na triagem de autoanticorpos

O IV Consenso não recomenda a utilização de ensaios automatizados (EIA e Quimioluminescência) na triagem de autoanticorpos. Há considerável oferta de kits para triagem de autoanticorpos baseados em imunoenaios de fase sólida e com distintas formulações antigênicas. Em que pese ao considerável progresso da indústria na melhoria desses insumos, o desempenho diagnóstico dos mesmos ainda não sobrepõe o tradicional ensaio de imunofluorescência indireta com células HEP-2. Falsos-negativos no FAN ELISA, por exemplo, podem criar sérios problemas diagnósticos com repercussões insuspeitas.<sup>28,29</sup> Ademais, este último permite a análise preliminar dos prováveis autoanticorpos presentes em dado soro mediante interpretação criteriosa do padrão de imunofluorescência, ao passo que os imunoenaios de fase sólida fornecem tão somente um resultado numérico.

### IX- Detecção de autoanticorpos específicos

O IV Consenso alerta para a escolha dos métodos de identificação de autoanticorpos específicos, como anticorpos anti-DNA nativo e anticorpos contra antígenos nucleares extraíveis. Chama a atenção para a necessidade de cuidado com a excessiva sensibilidade dos métodos imunoenzimáticos, haja vista que a padronização da pesquisa de autoanticorpos específicos, bem como suas correlações clínicas, foram originalmente descritas com base no método de imunodifusão dupla e sua congênere contraímunoelctroforese. Os métodos automatizados são mais sensíveis, e seu valor preditivo positivo em geral é menor, sendo portando adequados para triagem em serviços gerais, mas não em laboratórios especializados. Já a imunodifusão dupla é um método que assegura excelente correlação clínica, sendo relevante como teste confirmatório quando se utilizam em uma primeira fase métodos automatizados ou como método de escolha para laboratórios de apoio à Reumatologia. O uso de métodos mais sensíveis tende a produzir resultados positivos em contextos clínicos distintos daqueles em que os autoanticorpos são esperados, o que pode prejudicar o processo diagnóstico. Em última instância, teme-se que o uso generalizado de métodos ultrasensíveis comprometa a reputação desses autoanticorpos como biomarcadores específicos.

Caso sejam utilizados imunoenaios de fase sólida, foi recomendado que os resultados sejam confirmados por métodos específicos (imunodifusão dupla, contraímunoelctroforese, imunofluorescência em *Crithidia luciliae*, *immunoblotting* etc.) para assegurar alta especificidade ao resultado final. Essa recomendação é essencial na definição do diagnóstico e menos relevante no acompanhamento do paciente. Portanto, a escolha do método de identificação deve ser implantada com cautela, com base no perfil dos pacientes atendidos no serviço.

### X- O laudo

O IV Consenso manteve a apresentação do resultado de forma descritiva, mas sugeriu que o laudo seja apresentado na parte superior do resultado, facilitando a apresentação para o Reumatologista (fig. 2). Recomendou-se que o laudo continue contemplando a reatividade (fluorescente/não fluorescente



**Figura 2 – Exemplo de laudo descritivo conforme as recomendações do IV consenso, apresentando-se como primeira informação a definição do padrão.**

ou reagente/não reagente) nos diferentes compartimentos celulares (núcleo, nucléolo, citoplasma, aparelho mitótico), isolados ou em associação (para o caso dos padrões mistos).

### Agradecimentos

À Fundação Aroeira e aos patrocinadores do evento, Albert Einstein Medicina Diagnóstica, Alka Tecnologia, Amaral Costa Laboratório, Conselho Federal de Biomedicina, Conselho Regional de Biomedicina - 3ª Região, DASA, Euroimmun Brasil, Grupo Fleury, Hemagen, Hermes Pardini, Medivax, Olympus, Padrão Laboratório Clínico, Pontifícia Universidade Católica de Goiás - PUC-Goiás, Sociedade Brasileira de Patologia Clínica e Medicina Laboratorial, Sociedade Brasileira de Reumatologia, Thermo Scientific, Wama Diagnóstica, Werfen Group - Werfen Medical.

### Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

### REFERÊNCIAS

1. Dellavance A, Gabriel Júnior A, Cintra AFU, Ximenes AC, Nuccitelli B, von Mühlen CA et al. I Consenso Nacional para Padronização dos Laudos de FAN HEP-2. *J Bras Patot Med Lab.* 2002;38(3):201-16.
2. Dellavance A, Gabriel Junior A, Cintra AFU, Ximenes AC, Nuccitelli B, Taliberti BH et al. II Consenso Brasileiro de Fator Antinuclear em Células HEP-2. *Rev Bras Reumatol.* 2003;43(3):129-40.
3. Dellavance A, Gabriel Júnior A, Nuccitelli B, Taliberti BH, von Mühlen CA, Bichara CDA et al. 3º Consenso Brasileiro para pesquisa de autoanticorpos em células HEP-2 ( FAN ). Recomendações para padronização do ensaio de pesquisa de autoanticorpos em células HEP-2, controle de qualidade e associações clínicas. *Rev Bras Reumatol.* 2009;49(2):89-109.
4. Franciscantonio PLC, Andrade LEC, Cruvinel W de M, Araújo FI, Dellavance A, Gabriel Júnior A et al. III Consenso Brasileiro para Pesquisa de Autoanticorpos em Células HEP-2: perspectiva histórica, controle de qualidade e associações clínicas. *J Bras Patot Med Lab.* 2009;45(3):185-99.

5. Pham BN, Albarede S, Guyard A, Burg E, Maisonneuve P. Impact of external quality assessment on antinuclear antibody detection performance. *Lupus*. 2005 Jan;14(2):113-9.
6. Sack U, Conrad K, Csernok E, Frank I, Hiepe F, Krieger T, et al. Autoantibody detection using indirect immunofluorescence on HEp-2 cells. *Ann N Y Acad Sci*. 2009 Sep;1173:166-73.
7. Wiik AS, Høier-Madsen M, Forslid J, Charles P, Meyrowitsch J. Antinuclear antibodies: a contemporary nomenclature using HEp-2 cells. *J Autoimmun*. 2010 Nov;35(3):276-90.
8. Carballo, Orlando Gabriel Ingénito, Fernanda Beatriz Ginaca AA, Carabajal P, Costa MA, Balbaryski J. Primer Consenso Argentino para la Estandarización de la Determinación de Anticuerpos Anti-Nucleares por Inmunofluorescencia Indirecta – HEp-2 First Argentine Consensus for Standardization. *Acta Bioquím Clín Latinoam*. 2012;46(1):3-13.
9. Dellavance A, Gallindo C, Soares MG, da Silva NP, Mortara RA, Andrade LEC. Redefining the Scl-70 indirect immunofluorescence pattern: autoantibodies to DNA topoisomerase I yield a specific compound immunofluorescence pattern. *Rheumatology (Oxford, England)* [Internet]. 2009 Jun [cited 2012 Oct 15];48(6):632-7. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2681287&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
10. Carcamo WC, Satoh M, Kasahara H, Terada N, Hamazaki T, Chan JYF, et al. Induction of cytoplasmic rods and rings structures by inhibition of the CTP and GTP synthetic pathway in mammalian cells. *PLoS one*. 2011 Jan;6(12):e29690.
11. Kursula P, Flodin S, Ehn M, Hammarström M, Schüler H, Nordlund P, et al. Structure of the synthetase domain of human CTP synthetase, a target for anticancer therapy. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*. 2006 Jul 1;62(Pt 7):613-7.
12. Carr SF, Papp E, Wu JC, Natsumeda Y. Characterization of human type I and type II IMP dehydrogenases. *J Biol Chem*. 1993 Dec 25;268(36):27286-90.
13. Keppeke GD, Nunes E, Ferraz MLG, Silva EAB, Granato C, Chan EKL, et al. Longitudinal study of a human drug-induced model of autoantibody to cytoplasmic rods/rings following HCV therapy with ribavirin and interferon- $\alpha$ . *PLoS one*. 2012 Jan;7(9):e45392.
14. Covini G, Carcamo WC, Bredi E, von Mühlen CA, Colombo M, Chan EKL. Cytoplasmic rods and rings autoantibodies developed during pegylated interferon and ribavirin therapy in patients with chronic hepatitis C. *Antivir Ther*. 2012 Jan;17(5):805-11.
15. Stinton LM, Myers RP, Coffin CS, Fritzler MJ. Clinical associations and potential novel antigenic targets of autoantibodies directed against rods and rings in chronic hepatitis C infection. *BMC gastroenterology*. *BMC Gastroenterology*; 2013 Mar 19;13(1):50.
16. Franca NR, Dellavance, Alessandra Rodrigues SH, Perazzio SF, Silva NP, Andrade LEC. Quasi-homogeneous ANA-HEp-2 pattern reflects an autoantibody profile intermediate to the homogeneous and dense fine speckled nuclear patterns. *Arthritis Rheum*. 2011;63 Suppl(10):2307.
17. Mariz HA, Sato EI, Barbosa SH, Rodrigues SH, Dellavance A, Andrade LEC. Pattern on the antinuclear antibody-HEp-2 test is a critical parameter for discriminating antinuclear antibody-positive healthy individuals and patients with autoimmune rheumatic diseases. *Arthritis Rheum*. 2011 Jan;63(1):191-200.
18. Rattner JB, Rao A, Fritzler MJ, Valencia DW, Yen TJ. CENP-F is a .ca 400 kDa kinetochore protein that exhibits a cell-cycle dependent localization. *Cell Motil Cytoskeleton*. 1993 Jan;26(3):214-26.
19. Du J, Li Y, Zhu X. Involvement of CENP-F in histone methylation. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2010;42(3):173-6.
20. Moynihan KL, Pooley R, Miller PM, Kaverina I, Bader DM. Murine CENP-F regulates centrosomal microtubule nucleation and interacts with Hook2 at the centrosome. *Mol Biol Cell*. 2009;20:4790-803.
21. Rattner JB, Rees J, Whitehead CM, Casiano CA, Tan EM, Humbel RL, et al. High frequency of neoplasia in patients with autoantibodies to centromere protein CENP-F. *Clin Invest Med*. 1997 Oct;20(5):308-19.
22. O'Brien SL, Fagan A, Fox EJP, Millikan RC, Culhane AC, Brennan DJ, et al. CENP-F expression is associated with poor prognosis and chromosomal instability in patients with primary breast cancer. *Int J Cancer*. 2007 Apr 1;120(7):1434-43.
23. Casiano CA, Humbel RL, Peebles C, Covini G, Tan EM. Autoimmunity to the cell cycle-dependent centromere protein p330d/CENP-F in disorders associated with cell proliferation. *J Autoimmun*. 1995 Aug;8(4):575-86.
24. Bonaci-Nikolic B, Andrejevic S, Bukilica M, Urosevic I, Nikolic M. Autoantibodies to mitotic apparatus: association with other autoantibodies and their clinical significance. *J Clin Immunol*. 2006 Sep;26(5):438-46.
25. Tan EM, Feltkamp TE, Smolen JS, Butcher B, Dawkins R, Fritzler MJ, et al. Range of antinuclear antibodies in "healthy" individuals. *Arthritis Rheum*. 1997 Sep;40(9):1601-11.
26. Satoh M, Chan EKL, Ho LA, Rose KM, Parks CG, Cohn RD, et al. Prevalence and sociodemographic correlates of antinuclear antibodies in the United States. *Arthritis Rheum*. 2013;64(7):2319-27.
27. Dellavance A, Cruvinel W de M, Francescantonio PLC, Mangueira CLP, Drugowick IC, Rodrigues SH, et al. Variability in the recognition of distinctive immunofluorescence patterns in different brands of HEp-2 cell slides. *J Bras Patol Med Lab*. 2013;49(3):182-90.
28. Kroshinsky D, Stone JH, Bloch DB, Sepehr A. Case records of the Massachusetts General Hospital. Case 5-2009. A 47-year-old woman with a rash and numbness and pain in the legs. *N Engl J Med*. 2009 Mar 12;360(7):711-20.
29. Nordal EB, Songstad NT, Berntson L, Moen T, Straume B, Rygg M. Biomarkers of chronic uveitis in juvenile idiopathic arthritis: predictive value of antihistone antibodies and antinuclear antibodies. *J Rheumatol*. 2009 Aug;36(8):1737-43.