

**UNIVERSIDAD DE CANTABRIA**

PROGRAMA DE DOCTORADO EN MEDICINA Y CIENCIAS DE LA SALUD



TESIS DOCTORAL

Estudio de nuevos métodos de determinación de autoanticuerpos en la predicción de enfermedades del tejido conectivo y análisis de la asociación de los parámetros de autoinmunidad con los principales factores sociodemográficos.

Doctorando:

**Daniel Martínez Revuelta**

Directores:

**José Luís Hernández Hernández**

**Víctor Manuel Martínez Taboada**

Escuela de Doctorado de la Universidad de Cantabria

Santander 2024



D. José Luís Hernández Hernández, Profesor Titular de Medicina del Departamento de Medicina y Psiquiatría de la Universidad de Cantabria, y D. Víctor Manuel Martínez Taboada, Catedrático de Medicina del Departamento de Medicina y Psiquiatría de la Facultad de Medicina de la Universidad de Cantabria.

CERTIFICAN:

Que el trabajo 'Estudio de nuevos métodos de determinación de autoanticuerpos en la predicción de enfermedades del tejido conectivo y análisis de la asociación de los parámetros de autoinmunidad con los principales factores sociodemográficos' que presenta D. Daniel Martínez Revuelta, ha sido realizada bajo nuestra dirección y reúne los requisitos de originalidad necesarios para poder ser presentado como Tesis Doctoral, al objeto de que pueda optar al grado de Doctor en Medicina por la Universidad de Cantabria.

D. José Luis Hernández Hernández

D. Víctor Manuel Martínez Taboada



*A mi familia*



## **AGRADECIMIENTOS**

---

Quiero agradecer a mis directores de tesis, el Dr. José Luís Hernández Hernández y el Dr. Víctor Manuel Martínez Taboada la posibilidad de realizar esta tesis doctoral bajo su dirección, la confianza que depositaron en mí desde el principio y el apoyo que he recibido en su proceso.

Agradecerle todo a mi familia, verdadero eje vertebrador en esta aventura desde que empecé enfermería en Burgos, medicina en Puebla (México) y Reus, hasta la residencia en Santander y finalmente el doctorado. Por los que están y por los que estuvieron y no pudieron llegar a verlo, esto también es vuestro. A mi abuela Manuela, a mis padres María José y Antonio Manuel, a mi hermana Lucía y a mi tía María del Carmen. Y desde luego a mis abuelos que ya no están: Ana María, Manuel y Gerardo.

A mi mujer Patricia, que lo empezamos como novios y lo terminamos casados. Tú fuiste el mayor regalo de la residencia y ahora de vida. Contigo todo es posible, tú eres mi mayor ejemplo en todo. Gracias por estar siempre.

Expresar también mi agradecimiento al Dr. Marcos López Hoyos y al Dr. Juan Irure por toda la ayuda que me han ofrecido durante el desarrollo del doctorado, sin vosotros tampoco hubiese sido posible. Por último, al Dr. Javier Bustamante Odriozola, compañero de residencia y amigo, ejemplo de superación y motivación constante, un referente en lo humano y profesional.

Y en definitiva a todos aquellos que han aportado su granito de arena en esta tesis.

Muchas gracias a todos.



# INDICE

---

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	17
1.1 Antecedentes históricos .....	21
1.2 Anticuerpos .....	22
1.3 Errores de la inmunidad: autoinmunidad .....	23
1.4 Enfermedades autoinmunes sistémicas y órgano específicas .....	23
1.5 Anticuerpos antinucleares (ANA) .....	24
1.6 Presente de las pruebas de detección de autoanticuerpos .....	26
1.6.1 Metodología en el laboratorio de autoinmunidad .....	26
1.6.2 Ensayos de inmunofluorescencia indirecta (IFI) sobre células HEp-2.....	29
1.6.3 Nuevos ensayos en fase sólida (EFS).....	32
1.7 Cambio en el paradigma de solicitud de pruebas ANA .....	34
1.8 Anticuerpos antinucleares y parámetros sociodemográficos.....	38
1.8.1 Un poco de historia sobre la perspectiva comunitaria en la salud .....	38
1.8.2 Determinantes de Salud.....	39
<b>2. HIPÓTESIS GENERAL Y OBJETIVOS</b> .....	43
2.1 Hipótesis General .....	45
2.2 Objetivos .....	45
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	47
3.1 Población de estudio y recolección de sueros .....	49
3.2 Inclusión en la Cohorte Camargo .....	50
3.3 Diseño general del estudio.....	51
3.4 Variables del estudio .....	51
3.5 Detección de autoanticuerpos .....	53
3.6 Desarrollo de enfermedades autoinmunes .....	55
3.7 Análisis estadístico .....	55
3.8 Fuente de los datos .....	56
3.9 Fuentes potenciales de sesgo y medidas adoptadas .....	56
<b>4. RESULTADOS</b> .....	57
4.1 Frecuencia de ANA mediante los métodos de inmunofluorescencia indirecta y ensayos en fase sólida.....	59
4.2 Títulos de ANA por IFI en la Cohorte de estudio .....	64
4.3 Resultados positivos para ANA mediante los métodos de inmunofluorescencia indirecta, ANA Screen y CTD Screen.....	65
4.4 Implicaciones clínicas de los resultados de ANA.....	66

4.5 Prevalencia de ANA según los tres ensayos de laboratorio y su asociación con características sociodemográficas.....	72
4.6 Prevalencia de ANA + con IFI, ANA Screen y CTD Screen y su asociación con el estilo de vida, IMC y PRC.....	74
4.7 Prevalencia de ANA + con IFI, ANA Screen y CTD Screen y su asociación con el estado civil .....	75
4.8 Frecuencia de ANA según el estado civil.....	76
4.9 Prevalencia de títulos de ANA por IFI y su asociación con diferentes características sociodemográficas .....	77
4.10 Prevalencia de la carga de anticuerpos y su asociación con características sociodemográficas.....	81
<b>5. DISCUSIÓN .....</b>	<b>83</b>
5.1 Frecuencia de positividad de los ANA .....	86
5.2 Frecuencia de los ANA + estratificado por sexos .....	87
5.3 Frecuencia de ANA + estratificado por edad.....	87
5.4 Rendimiento de las pruebas diagnósticas.....	88
5.5 Características sociodemográficas de la Cohorte .....	89
5.6 Carga de autoanticuerpos: ¿Hacia una nueva metodología de evaluación del riesgo?... 91	
Ventajas de nuestro estudio .....	92
Limitaciones de nuestro estudio .....	92
<b>6. CONCLUSIONES .....</b>	<b>93</b>
<b>7. BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>97</b>
<b>8. ANEXOS .....</b>	<b>111</b>
8.1 ANEXO I: Comparison of ANA testing by indirect immunofluorescent or solid-phase assay in a low pre-test probability population for systemic autoimmune disease: the Camargo Cohort.....	113
8.2 ANEXO II: Prevalence and sociodemographic correlates of antinuclear antibody testing by indirect immunofluorescence or solid-phase assays in a Spanish population: the Camargo Cohort.....	125
8.3 ANEXO III: Consentimiento informado.....	139
8.4 ANEXO IV: Tablas de criterios de clasificación (Criterios ACR / EULAR).....	141

## INDICE DE FIGURAS

---

<b>Figura 1:</b> Patrones en HEp-2.....	25
<b>Figura 2:</b> Rango de medida de diferentes tipos de Inmunoensayos.....	28
<b>Figura 3:</b> Esquema de la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI).....	30
<b>Figura 4:</b> Ejemplo de patrón Homogéneo (AC-1) y Centrómico (AC-3) por IFI.....	30
<b>Figura 5:</b> Algoritmo general de estudio de ANA, ENA y dsDNA.....	31
<b>Figura 6:</b> Esquema de ensayos en fase sólida (EFS).....	33
<b>Figura 7:</b> Esquema de la evolución de la solicitud de ANA.....	35
<b>Figura 8:</b> Número de determinaciones del servicio de inmunología (periodo 2008 – Septiembre 2023).....	36
<b>Figura 9:</b> Número de determinaciones de autoanticuerpos del servicio de inmunología (periodo 2018 – 2022).....	36
<b>Figura 10:</b> Principales determinantes de la salud.....	39
<b>Figura 11:</b> Municipio de Camargo (Cantabria).....	49
<b>Figura 12:</b> Pirámide de población del municipio de Camargo (30 de enero de 2023).....	50
<b>Figura 13:</b> A. Microscopio de fluorescencia Zeiss. B. Ejemplo de tinción mediante inmunofluorescencia.....	53
<b>Figura 14:</b> A. Sistema ANA screen BioPlex 2200. B. Ejemplo de kits BioPlex 2200.....	54
<b>Figura 15:</b> EliA CTD Screen con sistema Phadia 250 de Thermo Fisher.....	55
<b>Figura 16:</b> Porcentaje de resultados positivos, negativos e indeterminados de ANA, utilizando IFI, ANA Screen y CTD Screen.....	59
<b>Figura 17:</b> Porcentaje de ANA + estratificados por sexo, mediante IFI.....	60
<b>Figura 18:</b> Porcentaje de ANA + estratificados por sexo, mediante ANA Screen.....	60
<b>Figura 19:</b> Porcentaje de ANA + estratificados por sexo, mediante CTD Screen.....	61
<b>Figura 20:</b> Porcentaje de ANA + estratificados por edad y sexo, mediante IFI.....	62
<b>Figura 21:</b> Porcentaje de ANA + estratificado por edad y sexo, mediante ANA Screen.....	62
<b>Figura 22:</b> Porcentaje de ANA + estratificados por edad y sexo, utilizando CTD Screen.....	63
<b>Figura 23:</b> Porcentaje de títulos de ANA + mediante IFI estratificados por sexo.....	64
<b>Figura 24:</b> Diagrama de Venn que muestra la confluencia de resultados positivos de ANA entre los sujetos con cualquier resultado positivo obtenido utilizando IFI, ANA Screen o CTD Screen.....	65
<b>Figura 25:</b> Porcentaje de ANA + estratificado por el estado civil, mediante ANA IFI, ANA Screen y CTD Screen.....	76



## INDICE DE TABLAS

---

<b>Tabla 1:</b> Inmunoensayos disponibles comercialmente para pruebas de ANA.....	34
<b>Tabla 2:</b> Factores importantes que contribuyen a la carga total de enfermedad en la Región Europea de la OMS, 2002.....	40
<b>Tabla 3:</b> Resumen de la inclusión a la Cohorte Camargo.....	51
<b>Tabla 4:</b> Principales EAS incluidas en el estudio.....	66
<b>Tabla 5:</b> Resultados de las tres pruebas de detección de ANA en EAS.....	67
<b>Tabla 6:</b> Pacientes que presentaban una EAS al inicio o la desarrollaron según los resultados de las pruebas de ANA realizadas por IFI o EFS (ANA Screen, CTD Screen).....	68
<b>Tabla 7:</b> Índices epidemiológicos de los tres métodos de detección de ANA en pacientes con EAS.....	70
<b>Tabla 8:</b> Prevalencia de los autoanticuerpos específicos detectados por ANA Screen.....	71
<b>Tabla 9:</b> Variables demográficas en los sujetos de estudio, estratificado por sexo.....	72
<b>Tabla 10:</b> Prevalencia de ANA en relación con los tres métodos de cribado y su asociación con las variables sociodemográficas de los sujetos en la Cohorte Camargo.....	73
<b>Tabla 11:</b> Prevalencia estimada de ANA en la Cohorte Camargo en relación al IMC, hábitos tóxicos, actividad física y PCR.....	74
<b>Tabla 12:</b> Prevalencia de ANA en relación con los tres métodos de cribado y su asociación con el estado civil de los sujetos en la Cohorte Camargo.....	75
<b>Tabla 13:</b> Frecuencia de resultados positivos de ANA por IFI estratificado por edad.....	77
<b>Tabla 14:</b> Frecuencia de resultados ANA positivos por IFI estratificado por sexo.....	77
<b>Tabla 15:</b> Frecuencia de resultados ANA positivos por IFI estratificado por el nivel educativo...	78
<b>Tabla 16:</b> Frecuencia de resultados ANA positivos por IFI estratificado por el hábito tabáquico.....	78
<b>Tabla 17:</b> Frecuencia de resultados ANA positivos por IFI estratificado por la ingesta de alcohol.....	79
<b>Tabla 18:</b> Frecuencia de resultados ANA positivos por IFI estratificado por la PCR en cuartiles (mg/dl).....	79
<b>Tabla 19:</b> Frecuencia de resultados ANA positivos por IFI estratificado por la actividad física...	80
<b>Tabla 20:</b> Carga de anticuerpos mediante la prueba de detección ANA Screen según las características sociodemográficas y los hábitos de vida seleccionadas de los sujetos de la Cohorte Camargo.....	81



## ABREVIATURAS

---

AC: anti-cell  
aCL: anticuerpo anticardiolipina  
ACR: american college of rheumatology  
aFL: anticuerpos antifosfolípidos  
ADNdc: ácido desoxirribonucleico de doble cadena  
AL: anticoagulante lúpico  
ALBIA: addressable laser bead immunoassay  
ANA: antinuclear antibody  
Anti-ADNdc: anticuerpos anti-ADN de doble cadena  
Anti- $\beta$ 2GP-I: anti-beta-2 glicoproteína I  
Anti-CCP: anticuerpos antipéptidos cíclicos citrulinados  
Anti-dsDNA: anti-double stranded DNA antibodies  
Anti-Jo1: anticuerpos contra la histidil-tRNA sintetasa  
Anti-P-ribosomal: anticuerpos ribosomales  
AR: artritis reumatoide  
BCR: b-cell receptor  
CBP: colangitis biliar primaria  
CIA: chemiluminescence immunoassay  
CIEF: contraimmunoelectroforesis  
CLIFT: crithidia lucilae  
CLIA: chemiluminescence immunoassay  
CTD: connective tissue disease  
DM: dermatomiositis  
DO: densidad óptica  
DXA: absorciometría de rayos X de energía dual  
E: especificidad  
EA: encefalitis autoinmune  
EAI: enfermedad autoinmune  
EFS: ensayo en fase solida  
EIA: enzyme immunoassay  
EII: enfermedad inflamatoria intestinal  
ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay

EMTC: enfermedad mixta del tejido conectivo  
ENA: extractable nuclear antigens  
EAOE: enfermedades autoinmunes órgano-específicas  
EPI: enfermedad pulmonar intersticial  
ES: esclerosis sistémica  
EAS: enfermedades autoinmunes sistémicas  
EULAR: european league against rheumatism  
FEIA: fluoro-enzyme immunoassay  
FR: factor reumatoide  
GEAI: grupo de enfermedades autoinmunes  
HAI: hepatitis autoinmune  
ICAP: international consensus on ana patterns  
IF: inmunofluorescencia  
IFA: Immunofluorescence assay  
IFI: inmunofluorescencia indirecta  
Igs: inmunoglobulinas  
MI: miopatía inflamatoria  
PM: polimiositis  
PMAT: tecnología multianalito basada en partículas  
LES: lupus eritematoso sistémico  
RIA: radioinmunoanálisis  
S: sensibilidad  
SAF: síndrome antifosfolípido  
SER: sociedad española de reumatología  
SS: síndrome de Sjögren  
VR: razón de verosimilitud

# **1. INTRODUCCIÓN**



Las enfermedades reumáticas<sup>1</sup> engloban al conjunto de procesos patológicos que afectan principalmente al sistema musculoesquelético, al metabolismo del hueso y al tejido conectivo; estas últimas también llamadas conectivopatías, colagenosis o enfermedades autoinmunes sistémicas (EAS).

Las enfermedades autoinmunes (EAI) son un grupo complejo y heterogéneo de entidades clínicas, que resultan de la interacción entre factores genéticos, epigenéticos, inmunológicos y medioambientales.

Cerca del 5% de la población mundial se ve afectada por enfermedades autoinmunes sistémicas (EAS) y órgano-específicas (EAOE)<sup>2</sup>. No obstante, los estudios epidemiológicos son complejos porque requiere muestras poblacionales muy grandes para poder estimar la prevalencia de estas enfermedades en población general. En España, el primer intento lo llevó a cabo la Sociedad Española de Reumatología (SER) con el estudio EPISER 2000, y actualizado posteriormente con el EPISER 2016<sup>3</sup>; pero no ofrecen una prevalencia global sino cifras de prevalencia en enfermedades concretas. En el año 2017, se publica en la Revista Española de Salud Pública, perteneciente al Ministerio de Sanidad, un estudio que estima una prevalencia del 6,39%<sup>4</sup> para las EAI en España.

Los autoanticuerpos son la marca distintiva de la autoinmunidad siendo los anticuerpos antinucleares (ANA) los más característicos de las EAS, junto con los anticuerpos anti-ADN de doble cadena (anti-ADNdc) y anticuerpos contra antígenos extraíbles del núcleo (anti-ENA). Desde el punto de vista clínico, la detección de estos autoanticuerpos es útil para el diagnóstico y pronóstico en las EAS<sup>3</sup>.

Los autoanticuerpos se producen por la ruptura de la tolerancia inmune, bien sea por la eliminación ineficaz de los desechos de los procesos apoptóticos o por la modificación de proteínas propias, que genera nuevos antígenos durante la respuesta inmunológica. La mayoría de estos autoanticuerpos pueden identificarse años antes del inicio de las EAS y no son una simple consecuencia del proceso inflamatorio<sup>3</sup>. Por este motivo es importante su detección durante la evolución hacia la presentación clínica de la enfermedad.

Se ha planteado que existen distintas fases prodrómicas antes del desarrollo de las EAI y, la investigación con modelos predictivos basados en la determinación de autoanticuerpos, apunta a un futuro donde se pueda realizar una prevención primaria que impida o retrase la aparición de la enfermedad<sup>2,5</sup>.

Para su diagnóstico, y a pesar de los años desde su implantación, la inmunofluorescencia indirecta (IFI) utilizando células HEp-2 continúa siendo una de las técnicas más utilizadas en los estudios de autoinmunidad y se considera el test de referencia o «*gold standard*» para el cribado de los ANA<sup>6</sup>.

Los criterios de clasificación de EAS propuesto por el Colegio Americano de Reumatología (ACR) y la Alianza Europea de Asociaciones de Reumatología (EULAR) siguen recomendando que cualquier método nuevo de determinación de ANA debe ser igual o superior al rendimiento diagnóstico de la IFI<sup>6</sup>.

En los últimos años se ha producido un importante avance en el conocimiento de diferentes EAS gracias al desarrollo tecnológico desde la IFI hasta los nuevos ensayos en fase sólida (EFS) «*solid phase assays*» (SPA) mediante ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA),

inmunoensayo de quimioluminiscencia (CIA), ensayos de inmunotransferencia y tecnologías multianalito<sup>7</sup>.

Conviene recordar que cuando se obtiene un resultado positivo para ANA en células HEp-2 se necesitan más estudios para identificar los autoanticuerpos específicos responsable del patrón IFI, como anti-ADNdc o anti-ENA. La presencia de ANA por IFI sin otros autoanticuerpos no es específico porque su prevalencia en población sana es relativamente alta y aumenta con la edad<sup>8,9,10,11</sup>.

Por ello, al solicitar una prueba de ANA debemos tener en cuenta la probabilidad pre-test de la población a estudio, sabiendo que las EAI tienen mayor incidencia en sujetos jóvenes y mujeres de mediana edad, y ésta disminuye en poblaciones de edad avanzada<sup>12</sup>.

Independientemente de estas consideraciones, la solicitud de ANA ha aumentado en los últimos años en poblaciones con probabilidad pre-test muy baja como los ancianos. Es importante conocer este hecho, puesto que la probabilidad post-test de una enfermedad asociada con una prueba en particular se puede estimar en función de la probabilidad pre-test y la razón de verosimilitud (RV)<sup>13,14</sup>. Debido a esta baja probabilidad pre-test, la probabilidad post-test para la positividad de los ANA también es baja.

El método de IFI que utiliza células HEp-2 para la detección de ANA es un proceso laborioso que necesita profesionales cualificados. A pesar de su sensibilidad, la IFI en HEp-2 tiene una alta variabilidad interobservador y una baja especificidad<sup>15</sup>.

La positividad de los ANA también está presente en muchas otras condiciones diferentes a las EAS, como enfermedades infecciosas<sup>16,17</sup>, procesos inflamatorios<sup>18</sup>, procesos neoplásicos, población envejecida<sup>19,20,21</sup>, etc. También aumenta su positividad con el número de enfermedades asociadas y el incremento de solicitudes por parte de los médicos<sup>21</sup>. Sin embargo, el inicio de las EAS continúa siendo más frecuente a edades más tempranas<sup>22,23</sup>.

En ocasiones, la IFI sobre células HEp-2 puede no ser capaz de detectar ciertos autoanticuerpos debido a la baja abundancia del antígeno o por el método de fijación utilizado<sup>24,25,26,27,28,29</sup>. Por este motivo se han buscado alternativas como los ensayos en fase sólida para el cribado de los autoanticuerpos más frecuentes asociados a EAI más prevalentes, y para confirmar su especificidad en el caso de obtener un resultado de cribado positivos con el método de IFI. Estos ensayos incluyen principalmente el ELISA, la CIA, el inmunoensayo enzimático fluorescente (FEIA), así como los ensayos multianalitos más recientes, como el inmunoensayo de partículas direccionable por láser (ALBIA) y la tecnología de multianalito basada en partículas (PMAT)<sup>30</sup>.

Los EFS son menos sensibles pero más específicos para la detección de EAS asociadas a ANA respecto a la IFI<sup>25,31</sup>. Es fundamental conocer los diferentes puntos de corte que utilizan los ensayos para dar un resultado como positivo ya que las diferencias observadas en el rendimiento entre ensayos está relacionado en gran medida con ellos<sup>32,33</sup>. Varios trabajos han analizado el uso de IFI o EFS para detectar ANA según el flujo de trabajo del centro y se ha demostrado que la combinación de resultados de ambos ensayos es más precisa que cualquiera de ellos por separado. Este enfoque podría tener un valor de diagnóstico, ya que los resultados doble positivo o negativo por ambas técnicas tienen un rendimiento diagnóstico mayor<sup>34,35</sup>.

Hay pocos estudios sobre el desempeño de los EFS, solos o en combinación en poblaciones no seleccionadas, y especialmente en cohortes con una baja probabilidad pre-test de EAS, condiciones que se ajustan a la tendencia actual de solicitud de ANA por parte de los médicos.

Por otro lado, en los últimos años ha crecido el interés entre la relación de los ANA con diferentes características sociodemográficas de la población. Algunos informes sugieren una mayor prevalencia de ANA en mujeres y personas mayores, pero se desconoce en gran medida la asociación entre ANA y otros factores sociodemográficos.

### **1.1 Antecedentes históricos**

La primera evidencia de la existencia de anticuerpos antinucleares (ANA) fue la descripción del fenómeno de células LE por el hematólogo Malcolm Hargraves en 1948 en la Clínica Mayo (Minnesota, EEUU)<sup>36,37</sup>.

Tras un periodo de «silencio inmunológico» a principios del siglo XX, se inicia a finales de la década de 1940 un periodo de intensa investigación citológica en el área de la hematopoyesis que coincide con el interés de la Clínica Mayo (EEUU) en desarrollar como procedimiento diagnóstico la biopsia de médula ósea y, en desarrollar una línea de investigación centrada en el lupus eritematoso sistémico (LES).

En 1948, en este ambiente investigador, y tras estudiar preparaciones de médula ósea de pacientes con LES, el hematólogo Malcolm Hargraves et al. describen las «células LE»<sup>36,37</sup>.

Las células LE son leucocitos —normalmente neutrófilos o macrófagos— que han fagocitado desechos nucleares de células muertas opsonizadas por autoanticuerpos y complemento. Este hallazgo originó la hipótesis de que la fisiopatología del LES podía estar relacionado con respuestas autoinmunes e inflamatorias que involucran proteínas nucleares.

Posteriormente, en 1949, demostró que la adición de plasma de enfermos con lupus activo a preparaciones de médula ósea de sujetos sanos inducía el fenómeno LE. Todo esto hizo pensar que se requería de algún componente del plasma de estos enfermos para el desarrollo de este fenómeno<sup>37,38</sup>.

Esta observación fue la base para postular el mecanismo autoinmune de la enfermedad. Un año después, dos laboratorios de investigación confirmaron de forma independiente la naturaleza inducible del fenómeno LE tras la incubación de células de médula ósea de sujetos sanos con plasma de los pacientes con LES. De esta manera se inicia el estudio de los ANA<sup>38</sup>.

En 1957, casi una década después, Halsted Holman y Henry Kunkel del Rockefeller Institute for Medical Research de Nueva York, publican un artículo en la revista Science donde demuestran que el fenómeno LE consiste en autoanticuerpos que se unen a elementos nucleares<sup>39</sup>. Este hallazgo fue crucial para el inicio de los laboratorios de inmunología en el diagnóstico del lupus.

La detección de células LE no se utiliza prácticamente en la actualidad, por ser una técnica difícil de preparar y estandarizar, además de ser menos sensible y específica que los ensayos actuales. Sin embargo, su utilización temprana ayudó a preparar el escenario para la aplicación posterior de técnicas más modernas con líneas celulares optimizadas (HEp-2 y HEp-2000) para la detección de los ANA.

En 1961 Naomi Rothfield et al. observaron que las células LE no se encuentran en la cuarta parte de los pacientes con lupus, lo que demostró su baja sensibilidad<sup>40</sup>.

A la descripción de las células LE siguió la identificación de los anticuerpos anti-ADN en 1957<sup>41</sup>.

Uno año más tarde, en 1958, Friou et al. en la universidad de Yale (EEUU) introducen la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI) con puntos de corte para la detección de ANA<sup>42,43</sup>.

Entre los ANA destacan los anticuerpos anti-ENA, descritos en 1959 por Holman y Robbin, y dirigidos contra antígenos proteicos nucleares extraíbles del núcleo celular mediante soluciones salinas de baja fuerza iónica. El término ENA se refería inicialmente a los antígenos SSA/Ro de 60 kDa, SSB/La, U1-RNP y Sm, este último descubierto por Kunkel y Tan en 1966<sup>44</sup>.

En 1961, Swanson Beck describió mediante IFI tres de los patrones clásicos de los ANA (homogéneo, moteado y nucleolar); introduciendo así la importancia del patrón de los ANA en la práctica clínica<sup>45,46,47</sup>.

En la década de 1970 se desarrollaron otras técnicas como la contraelectroforesis (CIEF), Western blot (o electrotransferencia) y ELISA, que continuaban los estudios iniciales de diagnóstico por IFI de Coons, Kaplan y Weller a principios de la década de 1950<sup>48</sup>, utilizando secciones crioconservadas de tejidos hepático de roedores como sustrato principal durante muchos años<sup>7,44</sup>. Posteriormente se introdujo el uso de células epiteliales humanas de tipo 2 (células HEp-2), derivadas de carcinoma de laringe, que tenían la ventaja frente a las secciones de órganos primarios de disponer de un núcleo grande y presentar entre ellas diferentes fases del ciclo de división celular, lo cual permitía detectar anticuerpos dirigidos frente a ciertos antígenos nucleares específicos del ciclo celular<sup>7,44</sup>.

Por lo tanto, se puede considerar a la mitad de la década de 1970 como la fecha de inicio en la detección de ANA utilizando como sustrato células de la línea celular HEp-2. Este importante cambio metodológico facilitó el estudio de los ANA en el laboratorio, convirtiéndose en un criterio diagnóstico para el LES. A partir de ese momento, el empleo de los ANA como prueba de cribado se ha generalizado en la práctica clínica hasta convertirse en una prueba de primer nivel para el diagnóstico de laboratorio de EAS.

### **1.2 Anticuerpos**

El reconocimiento de los antígenos es la base sobre la que se asienta la respuesta inmunitaria adaptativa, tanto en el caso de los linfocitos B como de los linfocitos T<sup>46</sup>. Las inmunoglobulinas (Igs) son las moléculas específicas de los linfocitos B que reconocen al antígeno. Cada individuo sintetiza una gran variedad de Igs diferentes que le permiten reconocer una variedad prácticamente ilimitada de antígenos.

Las Igs se encuentran en la membrana de los linfocitos B constituyendo su receptor para el antígeno «*B-cell receptor*» (BCR) de estas células. Cuando los linfocitos B reconocen un antígeno, se diferencian a células plasmáticas y secretan al exterior Igs solubles con la misma especificidad antigénica, denominándose entonces anticuerpos. Los anticuerpos están presentes en el suero, en las secreciones mucosas y en los fluidos intersticiales de los tejidos. Son capaces de neutralizar los antígenos y desencadenar diversos mecanismos efectoros, como la activación del complemento y de los fagocitos, lo que permite la eliminación de los patógenos y sus moléculas tóxicas.

Se llama antígeno a cualquier molécula a la que puede unirse de forma específica un anticuerpo. La mayoría de los antígenos frente a los que se desencadena una respuesta inmunitaria mediada por anticuerpos son proteínas. Debido a que las moléculas antigénicas son mucho más grandes

que su región de unión con el anticuerpo, este se une únicamente a pequeñas regiones denominadas epítomos o determinantes antigénicos.

### **1.3 Errores de la inmunidad: autoinmunidad**

La respuesta inmunitaria es generalmente beneficiosa para nuestro organismo, pero a veces reacciona de una forma desproporcionada o aberrante contra antígenos que resultan inofensivos para la mayoría de los individuos. La autoinmunidad se define como una respuesta inmunitaria adaptativa específica contra un antígeno propio o autoantígeno. También incluye la respuesta inmunitaria frente a lo propio producida por un daño colateral durante un ataque específico a lo no propio<sup>46</sup>.

La respuesta adaptativa es capaz de responder a una variedad prácticamente ilimitada de antígenos diferentes, debido al amplio repertorio de receptores para el antígeno que poseen sus linfocitos T y B. Sin embargo, debido a que la generación de dicho repertorio es aleatoria, es inevitable que se generen linfocitos T o B autorreactivos que puedan reconocer autoantígenos. Estas células autorreactivas son eliminadas o controladas por distintos mecanismos que aseguran la tolerancia a lo propio<sup>46,47</sup>. En algunos individuos ciertos linfocitos T o B específicos para un autoantígeno se escapan de estos mecanismos de tolerancia y son capaces de atacar los tejidos donde se localiza este autoantígeno, desencadenando la autoinmunidad. La activación de células del sistema inmunitario innato, como las células dendríticas, puede romper el estado de tolerancia e inducir autoinmunidad mediante un estímulo de linfocitos T autorreactivos.

La autoinmunidad no se produce por un fallo general en los mecanismos generadores de tolerancia, sino por fallos puntuales en dichos mecanismos frente a ciertos autoantígenos. Se desconoce la causa de las enfermedades autoinmunitarias, aunque en la predisposición a la autoinmunidad participan distintos factores ambientales y del huésped, como factores genéticos y epigenéticos, al mismo tiempo que alteraciones de varios sistemas del organismo. Las manifestaciones clínicas dependen de la interacción de esos factores.

Los mecanismos de tolerancia tienen una eficiencia muy elevada, por ello se cree que la autoinmunidad podría reflejar la activación desafortunada de algunas células potencialmente autorreactivas en estado de anergia o ignorancia inmunológica<sup>46,47,49</sup>. Solo algunos autoantígenos inducen autoinmunidad, y suelen ser aquellos para los que es difícil generar tolerancia central o periférica.

El proceso autoinmunitario se genera a lo largo de distintas fases que van desde la predisposición hasta la propagación. Este tipo de enfermedades tienden a ser crónicas y generalmente duran toda la vida. Individualmente la mayoría de EAI son poco frecuentes, pero conjuntamente afectan a más del 5% de la población de los países occidentales, constituyendo uno de los grupos de enfermedades más prevalentes.

### **1.4 Enfermedades autoinmunes sistémicas y órgano-específicas**

Las EAI se clasifican clásicamente en órgano-específicas (EAOE) y no órgano-específicas (o sistémicas), dependiendo de si la respuesta está dirigida principalmente frente a antígenos localizados en un tejido específico o frente a antígenos sistémicos, respectivamente<sup>1,47</sup>.

Esta clasificación es útil clínicamente, pero no tiene en cuenta los mecanismos inmunológicos implicados en su patogenia. Por ello, las enfermedades autoinmunes se pueden clasificar en

función del mecanismo inmunológico que las causa. En la práctica clínica, estos mecanismos son los que se investigan en los laboratorios de rutina clínica, tanto en sangre como en la anatomía patológica de tejidos, para diagnosticar estas enfermedades. En la autoinmunidad, la reacción inmune más frecuente es la de tipo II, que son aquellas medidas por anticuerpos o citotóxicas<sup>46,47</sup>.

### **1.5 Anticuerpos antinucleares (ANA)**

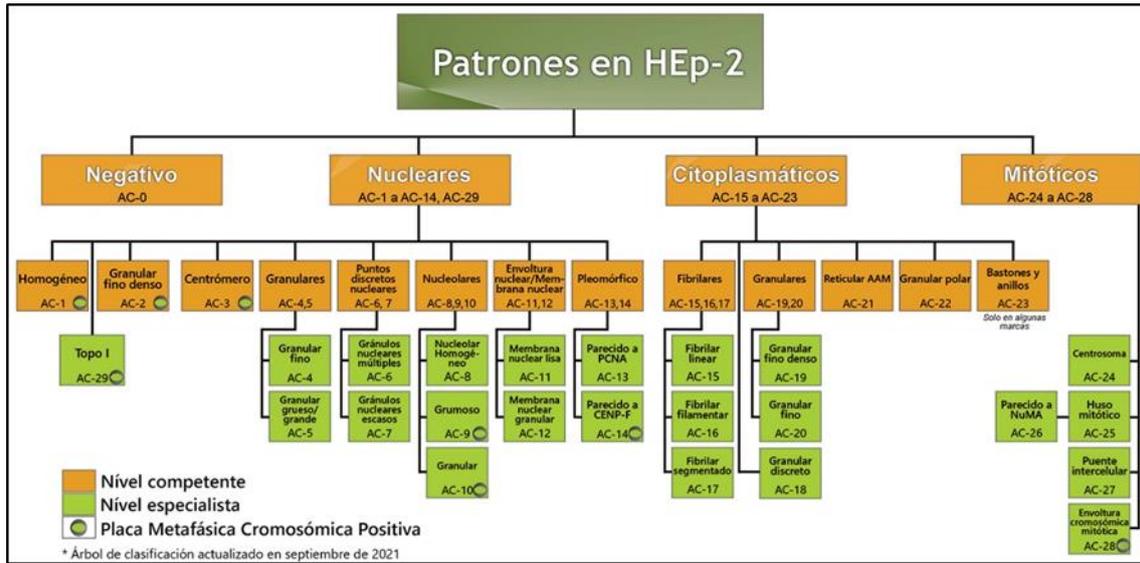
Aunque la comunidad científica generalmente habla de ANA, el concepto se refiere a anticuerpos anticelulares (nucleares, citoplasmáticos y mitóticos)<sup>50</sup>.

Históricamente, solo se denominaban ANA los anticuerpos dirigidos contra antígenos del núcleo celular (antígenos nucleares). De manera similar, el término antígeno extraíble del núcleo (ENA) descrito en 1959 por Holman y Robbins, se utilizó para un grupo de antígenos nucleares extraíbles mediante soluciones salinas. Hoy en día, con la identificación de nuevos autoantígenos dentro de varios compartimentos de la célula, la nomenclatura se ha vuelto imprecisa y confusa. Esta terminología ha sido adoptada incluso en la nomenclatura de los kits comerciales de autoanticuerpos. Hay plataformas en fase sólida con autoanticuerpos que a menudo denominan ANA o ENA a perfiles que contienen antígenos nucleares relativamente insolubles como ADNdc u otras dianas citoplasmáticas como anti-P ribosomal o anti-Jo-1. Por lo tanto, desde hace años ha sido necesaria la estandarización de esta nomenclatura<sup>15,50,51</sup>.

Desde su formación en 2014-2015, el grupo de trabajo '*International Consensus on ANA Patterns*' (ICAP)<sup>50,51</sup> ha realizado esfuerzos para armonizar la nomenclatura del patrón de ANA en células HEp-2. El último Taller-ICAP se realizó en septiembre de 2021<sup>52</sup> como satélite de la reunión del 15º Simposio en Dresde (Alemania) sobre autoanticuerpos; describiendo 29 tipos de patrones diferentes en células HEp-2, agrupados en nucleares, citoplasmáticos y mitóticos. De acuerdo con la estrategia de consenso varios patrones son de reporte obligatorio (nivel competente) mientras que otros requieren un mayor nivel de experiencia para su identificación (nivel experto). Debido a que la prueba de ANA en línea HEp-2 revela reactividad no sólo a antígenos nucleares sino también a antígenos citoplasmáticos y mitóticos, el término anticuerpos anti-células «*anti-cell*» (AC), propuesto por ICAP, es cada vez más utilizado por los investigadores<sup>51</sup>.

Sin embargo, este término se está implementando lentamente en la práctica clínica. La nomenclatura de patrones ANA utilizada por la mayoría de los hospitales incluyen patrones nucleares, como: homogéneo (AC-1), moteado (AC-4, 5), nucleolar (AC-8-10) y centrómero (AC-3), junto con reticular/AMA (AC-21). Sin embargo, los patrones restantes, ya sean nucleares, citoplasmáticos o mitóticos, a veces denominados como patrones infrecuentes, no deben olvidarse. Estos patrones definidos por ICAP ayudan a identificar diferentes enfermedades autoinmunes, incluidas las órgano-específicas y las no órgano-específicas, en ausencia de especificidades asociadas<sup>53</sup>. Se debe tener en cuenta que estamos ante una explosión de autoanticuerpos, con más de 200 en el LES, 60 en el SSc y 25 en el MII<sup>7</sup>.

Figura 1. Patrones en HEp-2



Fuente: *International consensus on ANA patterns (ICAP). Nomenclatura y árbol de clasificación, 2021.*  
 Disponible en: <https://www.anapatterns.org/>

Las recomendaciones del grupo de enfermedades autoinmunes (GEAI) de la Sociedad Española de Inmunología (SEI) en base a las recomendaciones de consenso del ‘*European Autoimmunity Standardization Initiative*’ (EASI) y de la ‘*International Union of Immunologic Societies/World health Organization/Arthritis Foundation/Centers for Disease Control and Prevention*’ (IUIS/WHO/AF/CDC) son las siguientes:

1. La técnica de elección para la determinación de anticuerpos antinucleares (ANA) es la inmunofluorescencia indirecta (IFI) sobre células HEp-2 (o sus variedades)<sup>47,54,55</sup>:

- El resultado se debe informar como negativo o positivo con título y patrón.
- Para la denominación del patrón es recomendable utilizar la nomenclatura consenso de la ICAP<sup>56</sup>.
- La dilución inicial en el cribado de los ANA debe ser como mínimo 1/80, y la dilución máxima no exceder de 1/1280.
- El patrón y el título de ANA deben condicionar la búsqueda eficiente de anticuerpos frente a las especificidades de ANA que más se asocien al patrón detectado. Esto es especialmente importante para patrones específicos con fuerte asociación con enfermedades concretas: nucleolar, citoplasmático, centrómero, patrones asociados a hepatopatías, ya que ambos, patrón y título están directamente asociados a la probabilidad de enfermedad<sup>57,58</sup>.
- En el caso de que el patrón de ANA no sea tan específico de antígenos concretos se puede hacer un cribado con técnicas que utilicen mezclas antigénicas y la posterior caracterización de las especificidades antigénicas individualizadas si el cribado resulta positivo.
- Cuando los ANA tiene un patrón muy específico asociado a un antígeno concreto que no varía con el curso de la enfermedad, no debería repetirse.

2. Si la determinación inicial de ANA se realizara mediante técnicas de enzimoanálisis, éstas deben incluir extractos de células HEp-2 que pueden estar enriquecidos además con mezclas de antígenos. En el caso de resultados positivos, se deberá realizar otra técnica para identificar las especificidades antigénicas de forma individualizada. En estos casos también es conveniente realizar IFI sobre HEp-2, para comprobar que el patrón de ANA concuerda con el resultado obtenido. El empleo alternativo de estos ensayos en fase sólida se presenta como una opción en expansión para la determinación de ANA, pero su equivalencia con las técnicas de ANA-IFI no están estandarizadas<sup>59</sup>.

3. Cuando los ANA son negativos no procede realizar determinaciones de anticuerpos frente a especificidades claramente localizadas en el núcleo. Si se sospecha patología autoinmune asociada a antígenos citoplasmáticos se deben realizar cribados en fase sólida o perfiles de antígenos específicos.

4. Para la determinación de anticuerpos anti ADNc es preferible usar métodos cuantitativos y si el resultado es positivo, comprobar si son anticuerpos de media-alta avidez por otras técnicas como Inmunofluorescencia indirecta sobre *Crithidia lucilae* (CLIFT) o Radioinmunoanálisis (RIA).

5. La determinación de ANA y de sus especificidades, a excepción del ADNc, no se debe repetir hasta que no hayan pasado al menos 3 meses.

6. Es muy importante la comunicación fluida y constante con el clínico peticionario para una adecuada valoración de los resultados y la ampliación del estudio en el contexto del cuadro clínico del paciente.

### **1.6 Presente de las pruebas de detección de autoanticuerpos**

#### **1.6.1 Metodología en el laboratorio de autoinmunidad**

Los inmunoensayos son las técnicas de detección basadas en la reacción antígeno-anticuerpo<sup>46,60</sup>; son de gran importancia para el diagnóstico de enfermedades, estimar el grado de respuesta inmunitaria humoral y la identificación de moléculas de interés médico. Se diferencian unos de otros en la rapidez y sensibilidad: algunos son estrictamente cualitativos mientras que otros permiten cuantificar sustancias.

La reacción Ag-Ac va a depender de las regiones hipervariables del anticuerpo (o CDR; tres en la cadena pesada y tres en la cadena ligera), que constituyen el paratopo o puntos de contacto con el epítopo (o determinante antigénico) del antígeno.

La detección y cuantificación de autoanticuerpos es diferente de la medición de otros parámetros bioquímicos. La respuesta inmune es distinta en cada individuo, pudiendo existir varios enfermos con la misma patología autoinmune y distintos perfiles de autoinmunidad. Además, la respuesta inmune es policlonal y el perfil de autoanticuerpos puede cambiar con el curso de la enfermedad, pues, una vez se modifica la tolerancia, aumenta la predisposición a sintetizar nuevos autoanticuerpos.

Todos los métodos utilizados en el laboratorio de autoinmunidad son métodos de inmunoensayo<sup>60</sup>:

- **IFI** (Inmunofluorescencia indirecta) o IFA (ImmunoFluorescence Assay)
- **EIA** (Enzime ImmunoAssay o inmunoensayos enzimáticos): ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay o ensayo inmunoabsorbente), FEIA (Fluoro-Enzyme ImmunoAssay o inmunoensayo enzimático fluorescente) e inmunoblot
- **CIA** (Chemiluminescence ImmunoAssay o inmunoensayos de quimioluminiscencia) o CLIA (ChemiLuminescence ImmunoAssay)
- **ALBIA** (Addressable laser bead immunoassay o inmunoensayo de partículas direccionable por láser)
- **Técnicas multiplex**

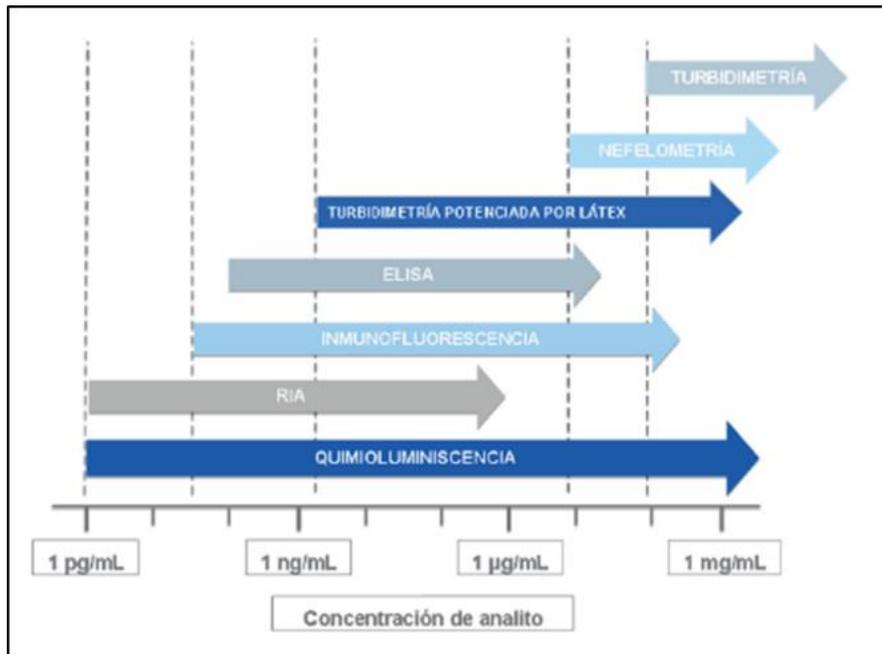
Los laboratorios de autoinmunidad utilizan varios de estos métodos y los facultativos deben saber que pueden existir discrepancias según la técnica utilizada por la diferencia en el rango de medida de los inmunoensayos, por eso, como explicaremos más adelante siempre se debería ofrecer un resultado de autoinmunidad indicando el método utilizado.

Los diferentes métodos de inmunoensayo se diferencian en:

- Soporte al que se une el antígeno: según la técnica utilizada, la matriz donde se realice la reacción Ag-Ac será sólida (precipitación), pegada a un plástico o papel (ELISA, *Western blot*, de flujo lateral) o líquida (nefelometría, citometría).
- Compuesto unido al conjugado: para detectar antígenos en solución se utilizan unas determinadas técnicas (precipitación, ELISA, *Western blot*, RIA), y para detectarlas sobre una célula o tejido se utilizan otras (citometría, inmunofluorescencia, inmunohistoquímica).

La especificidad de un anticuerpo<sup>46</sup> es su capacidad de distinguir entre varios antígenos similares. Algunos anticuerpos son capaces de distinguir y reconocer un antígeno entre 10<sup>8</sup> moléculas similares. Eso hace que sea posible realizar técnicas muy sensibles y específicas sin previa purificación de las muestras a analizar (por ejemplo, suero o células de sangre). El título de un anticuerpo es la dilución de este que es capaz de unir al 50% del antígeno. Según la técnica nos puede interesar un antisuero policlonal (que reconozca diferentes epítopos de un mismo antígeno, como en la precipitación) o un anticuerpo monoclonal (como en el ELISA y la citometría).

**Figura 2:** Rango de medida de diferentes tipos de Inmunoensayos



Fuente: Revista Inmunología. Sociedad Española de Inmunología. 2017. 36(4):18-22

En el caso de la IFI el antígeno está en un portaobjetos; en el ELISA en un pocillo de una microplaca; en el inmunoblot en una membrana de nitrocelulosa; en la FEIA en un CAP de celulosa; en la CIA en una partícula paramagnética y en las técnicas múltiplex en microesferas. Respecto al conjugado, en todos los casos es una anti-inmunoglobulina humana (IgG, IgA, IgM) unida al fluorocromo FITC en la IFI, a una enzima en el EIA (fosfatasa alcalina/ peroxidasa para ELISA e inmunoblot, y  $\beta$ -galactosidasa para el FEIA), a un compuesto quimioluminiscente en la CIA, o a un fluorocromo en las técnicas multiplex<sup>60</sup>.

A continuación, se explican brevemente las diferentes técnicas antes de centrarnos en las utilizadas para la presente tesis doctoral:

El inmunoensayo enzimático denominado **ELISA** es la técnica más utilizada en la actualidad para cuantificar antígenos solubles en la mayor parte de los fluidos corporales o medios de cultivo en el laboratorio. Es un inmunoensayo en medio líquido, donde uno de los componentes (Ag o AC) está absorbido sobre un plástico. Se debe tener disponibles anticuerpos monoclonales para el antígeno que se quiere cuantificar (o antígenos purificados si lo que se quiere cuantificar son anticuerpos). En autoinmunidad se utilizan varios tipos (indirecto, sándwich o de captura y competitivo). La enzima del conjugado cataliza una reacción en la que el sustrato se convierte en un producto coloreado soluble, cuya densidad óptica (DO) se mide en el espectrofotómetro del analizador. Actualmente, todos los analizadores automáticos realizan la técnica y calculan los resultados<sup>60</sup>.

Las técnicas de inmunofluorescencia son inmunoensayos en los que el anticuerpo está acoplado por su porción Fc a una sustancia fluorescente o fluorocromo. Estas técnicas se van a utilizar normalmente sobre células en suspensión o fijadas a portaobjetos. Hablamos de inmunofluorescencia directa o indirecta en función de si entre dicho anticuerpo fluorescente y el antígeno hay (indirecta) o no (directa) otro anticuerpo sin marcar<sup>60</sup>.

La **IFI** es una técnica sencilla en la que, durante la primera incubación, el suero diluido del paciente se incuba en los portaobjetos. Posteriormente hay un lavado para eliminar lo que no se ha unido, incubación con el conjugado, último lavado y visualización al microscopio de fluorescencia. Es conveniente incluir controles para verificar que la técnica ha transcurrido correctamente<sup>60</sup>.

En el caso del **FEIA**, la enzima del conjugado cataliza una reacción, generándose un producto fluorescente que se cuantifica en el fluorímetro del analizador<sup>60</sup>.

En el **inmunoblot** el producto de la reacción es insoluble y precipita en la membrana de nitrocelulosa<sup>60</sup>.

En la **CIA**, el conjugado lleva unido un compuesto quimioluminiscente que, al reaccionar con los activadores, produce emisión de luz que se cuantifica en el luminómetro del equipo<sup>61</sup>.

Respecto a las **técnicas multiplex**, las microesferas llevan diferentes proporciones de dos fluorocromos que determinan el tipo de partícula. El tercer fluorocromo va unido al conjugado y mediante dos láseres se detecta el tipo de partícula y se cuantifica<sup>60</sup>.

### **1.6.2 Ensayos de inmunofluorescencia indirecta (IFI) sobre células HEp-2**

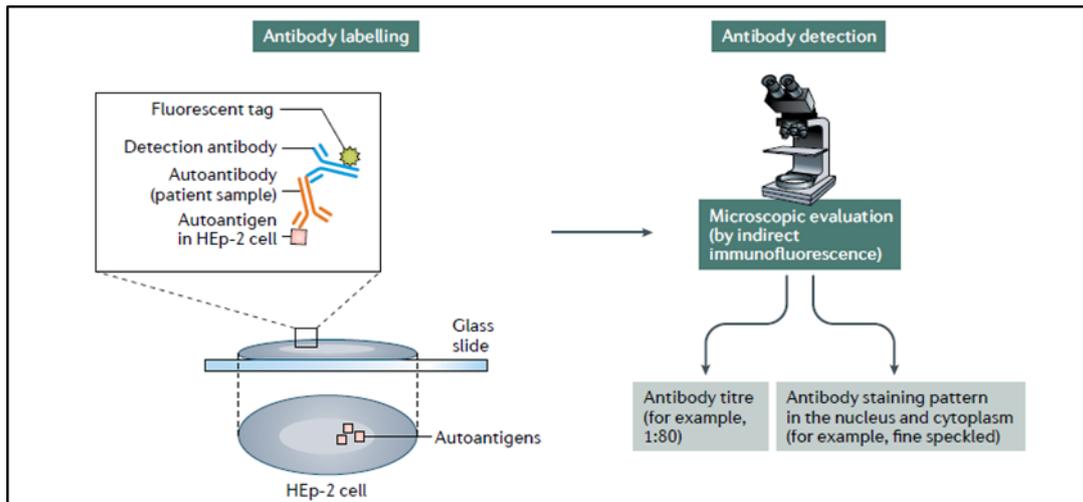
La IFI sobre células HEp-2 es el método de elección recomendado por el Colegio Americano de Reumatología (ACR) y la Alianza Europea de Asociaciones de Reumatología (EULAR) para el cribado de los ANA.

Los ensayos por IFI se introdujeron hace más de 50 años y continúa siendo la técnica convencional más utilizada para detectar los ANA. Detecta gran cantidad de autoanticuerpos que se unen a los antígenos nucleares.

Las células HEp-2 (células epiteliales procedentes de un laringioma humano) representan un sustrato ideal para la identificación de ANA ya que son células aisladas en monocapa, con grandes núcleos y nucléolos, así como todos los estadios del ciclo celular<sup>62</sup>. Presenta la ventaja de tener más de 150 antígenos en su conformación nativa. El ICAP tiene descrito 30 patrones de fluorescencia que se pueden visualizar en estas células<sup>50,51</sup>.

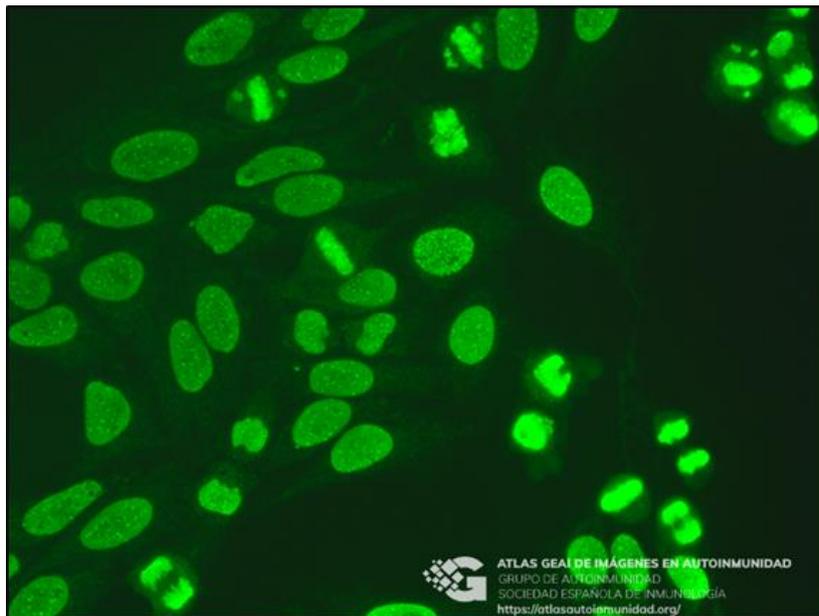
Para su realización, se requiere en primer lugar suero del paciente que se diluye a título 1/80 o superior y, posteriormente se superpone sobre la preparación de las células HEp-2 permitiendo de esta forma que los anticuerpos del paciente se unan con los antígenos diana presentes en estas células. Después se realiza un lavado con una solución tamponada (o *buffer*) y se aplica una solución con IgG antihumana acoplada a un fluorocromo que se une al complejo antígeno-anticuerpo presente en la muestra. Finalmente, tras un segundo lavado que retire los anticuerpos fluorescentes que no se unieron, se puede observar el resultado mediante un microscopio equipado con una fuente de luz ultravioleta.

**Figura 3:** Esquema de la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI)



Fuente: Imagen tomada de ref. 59

**Figura 4:** Ejemplo de patrón Homogéneo (AC-1) y Centrómero (AC-3) por IFI



Fuente: Atlas GEAL de imágenes en autoinmunidad. Grupo español de autoinmunidad. Sociedad española de inmunología. <https://atlasautoinmunidad.org/>

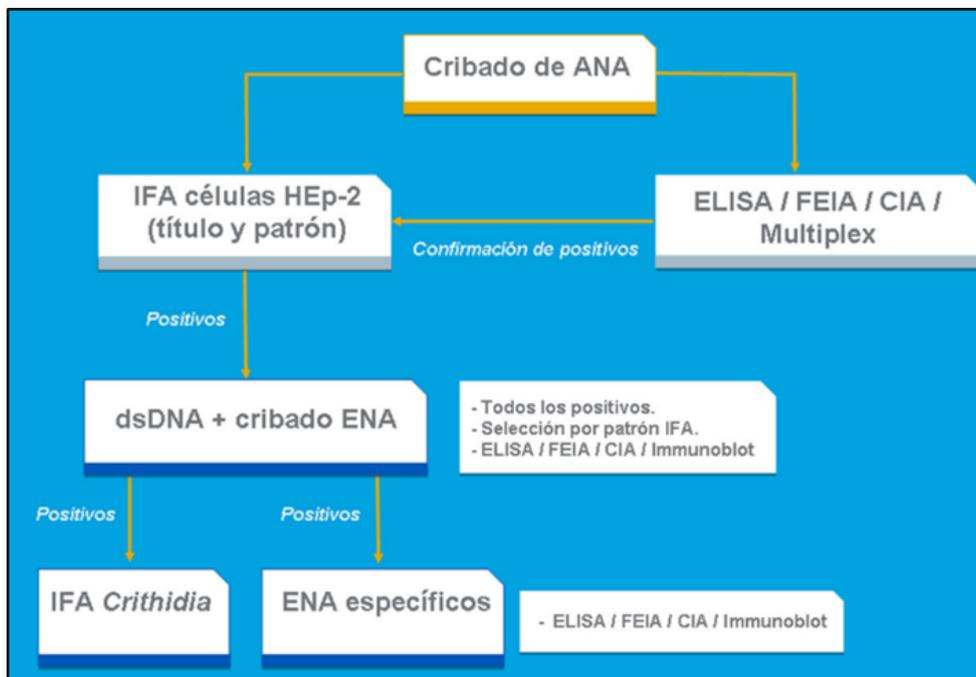
Estas células permiten detectar anticuerpos contra antígenos que dependen del ciclo celular. Sin embargo, es importante tener en cuenta que la detección de ANA mediante IFI está directamente relacionada con la experiencia del observador y tras ser positivo, el resultado debe comunicarse a los clínicos de forma estandarizada, incluido el título y el patrón de inmunofluorescencia, junto con nomenclatura AC, y las posibles asociaciones de anticuerpos,

agregando valor a los hallazgos de laboratorio y ayudando con las decisiones clínicas<sup>56</sup>. Los estándares internacionales<sup>50</sup> recomiendan una segunda prueba que aumente su especificidad, por medio de ELISA, RIA, electroinmunotransferencia, Western blot o tecnología multianálisis con el fin de determinar la especificidad antigénica a la cual están dirigidos los anticuerpos que en algunos laboratorios ya están automatizadas y dependen menos del operador<sup>63</sup>. Si la sospecha clínica es alta, se puede solicitar su determinación, aun siendo el test de ANA negativo, en caso de especificidades Jo-1, ribosomal y SSA/Ro (especialmente si se ha realizado por IFI). De la misma manera, si se utilizan otros métodos alternativos, se debe tener en cuenta la posibilidad de obtener falsos negativos y positivos<sup>50</sup>. En caso de elevada sospecha clínica, aunque el método alternativo sea negativo, se deberá realizar la IFI. El informe de resultados debe indicar siempre el método utilizado.

Una de las novedades de esta clasificación en los últimos años es la inclusión del patrón granular fino denso (*dense fine speckled*) como un patrón con entidad propia cuya especificidad se denomina DFS70. Las conclusiones de la bibliografía más reciente afirman que su identificación al microscopio es compleja —confirmación por métodos alternativos— y que su presencia aislada es muy baja en las EAI del tejido conectivo<sup>64</sup>; por lo que su positividad es útil para descartar razonablemente una EAS.

En el último Congreso de la SEI (Zaragoza, 2017) se realizó una encuesta a 71 facultativos presentes en la reunión sobre el método de cribado que utilizaban para determinar los ANA. El 69% utilizaba la IFI, el 18,31% diferentes métodos en función del médico solicitante, el 7,04% método múltiple y el 5,63% empleaba ELISA / FEIA o CIA.

**Figura 5:** Algoritmo general de estudio de ANA, ENA y dsDNA



Fuente: Imagen tomada de ref. 60.

Por lo tanto, la IFI ofrece muchas ventajas: Es un método sensible, económico, tiene gran variedad de autoantígenos naturales (>100), algunos autoanticuerpos pueden identificarse como positivos sin test de confirmación (ej: anti-centrómero), fácil de reproducir, de realizar y accesible para muchos laboratorios.

Pero también presenta algunas desventajas: estandarización, subjetividad, necesidad de personal especializado, variabilidad interobservador, baja especificidad y baja sensibilidad para ciertos autoanticuerpos importantes como Jo-1, P-ribosomal, SS-A/Ro60 y Ro52 (TRIM21) debido a la baja abundancia del antígeno o por el método de fijación<sup>15</sup>, debido al hecho de que los ANA pueden estar presentes en pacientes con EAS, pero también en pacientes con enfermedades infecciosas, procesos inflamatorios y en individuos sanos con el aumento de la edad<sup>8,9</sup>. Se debe tener en cuenta que el inicio de las EAI suele ocurrir en sujetos jóvenes y no en edades avanzadas.

Respecto a la estandarización<sup>50</sup>, los principales factores que influyen son: las diluciones de cribado (recomendado 1/160 o percentil 95 de la población), el petionario (especialidad hospitalaria o desde Atención Primaria), el fabricante de los portaobjetos (cultivo celular y fijación), el tipo de conjugado (recomendado anti-IgG) y el microscopio.

### 1.6.3 Nuevos ensayos en fase sólida (EFS)

En la última década, se han desarrollado nuevos ensayos para intentar reemplazar la IFI, debido al aumento de la solicitud de este tipo de pruebas y a la centralización de ciertos servicios de laboratorio.

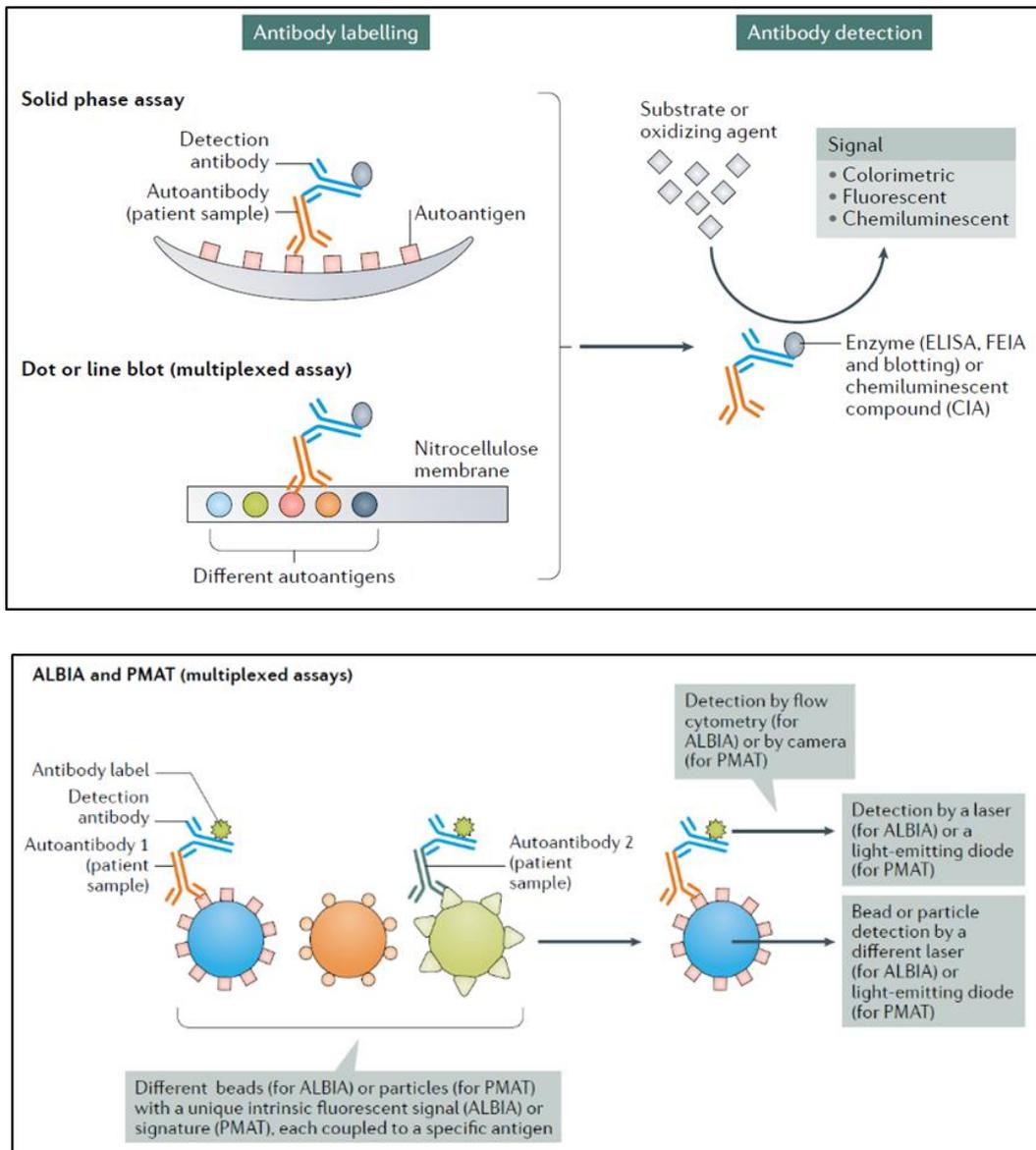
El método de elección para el cribado de los ANA continúa siendo la IFI, pero siempre que haya síntomas sugestivos de EAS, independientemente de que el resultado sea positivo o negativo, se deben realizar EFS para determinar la especificidad de los autoanticuerpos.

En los últimos años han surgido diferentes EFS incluido el ELISA, el inmunoensayo ligado a enzimas fluorométrico (FEIA), el inmunoensayo de quimioluminiscencia (CIA), o el inmunoensayo de partículas direccionable por láser (ALBIA). Estos ensayos cada vez están más presentes en los laboratorios de inmunología para detectar ANA asociados a EAS, y para confirmar la especificidad de los autoanticuerpos en los casos positivos mediante IFI<sup>65</sup>.

Para el cribado mediante EFS se utiliza una mezcla de autoantígenos relevantes: purificados o recombinantes y específicos contra autoanticuerpos que pueden estar presente en las muestras de suero. Se recubre la placa en el caso de ELISA y FEIA, o una perla en el caso de CIA. Sin embargo, cuando se realiza un ensayo de confirmación, la fase sólida está recubierta con un solo autoantígeno específico.

Si los autoanticuerpos están presentes en un suero del paciente, en el caso de ELISA, éstos se unen a su autoantígeno correspondiente mediante una detección del anticuerpo ligado a una enzima que genera una reacción colorimétrica. En el caso de la FEIA es una reacción fluorescente, o un sustrato quimioluminiscente en el caso de la CIA. En las líneas de inmunotransferencia (*line blots*), tienen una membrana de nitrocelulosa recubierta de diferentes autoantígenos contra autoanticuerpos que pueden ser detectados usando un anticuerpo de detección ligado a una enzima que genera una reacción colorimétrica, como en el caso de ELISA (**Figura 6**).

**Figura 6:** Esquema de ensayos en fase sólida (EFS)



Fuente: Imagen tomada de ref. 59

El punto de corte para un resultado positivo de la prueba se basa en la reactividad de las muestras control y su comparación con otro ensayo de referencia aprobado que utilice las características del operador y receptor.

Estos sistemas tienen la ventaja de ser semiautomáticos, más específicos en la detección de especificidades de ANA asociadas a EAS<sup>31,66</sup>, tener tiempos de respuesta más rápidos que la IFI, mejorar el flujo de trabajo del laboratorio sin depender de la especialización del inmunólogo y la capacidad de utilizarlo para la detección a gran escala.

Por el contrario, tienen limitaciones importantes como: resultados discordantes de sensibilidad/especificidad comparado con IFI para el cribado de ANA, diferentes composiciones antigénicas según el ensayo (número y origen: purificados, recombinantes, sintéticos), menos antígenos en comparación con las células Hep-2 (**Tabla 1**) y no proveen información de patrones.

Es fundamental tener en cuenta cómo se eligen los puntos de corte de los ensayos para considerar un resultado como positivo, ya que las diferencias observadas en el rendimiento entre ensayos están relacionadas en gran medida con éstos.

**Tabla 1: Inmunoensayos disponibles comercialmente para pruebas de ANA**

Antigen	Automated screening assays				Multiplex assays				Line immunoassays/dot blots						
	EliA CTD Thermo Scientific	EIA Symphony Scientific	QUANTA Flash ENAT INOVA Diagnostics	QUANTA Flash CTD Screens Plus INOVA Diagnostics	Alegria ANA Detect Orgentec	Bio-Plex 2200 ALBIA Bio-Rad	ANA ArboNA Multi-Lyte Zeus	Anti-Nuclear Antibodies (ANA)	FIDIS Connective 10 Therdiag	ANA Profile Euroimmun	ImmunoStraps ANA Advanced DMCO Diagnostics	ANA12 IgG BlasDot D-Tek	ANA-12 Pro (BLOT) AESKU Diagnostics	recomLine ANA/ENA IgG MKGROGEN Diagnostics	ANA Lia MAX HUMAN Diagnostics
U1-RNP	X	X	X	X		X	X			X		X	X		
U1-RNP Sm		X	X	X	X				X			X			
U1-RNP 68 kDa					X					X					X
U1-RNP A					X					X					X
U1-RNP C					X					X					X
SS-A/Ro60	X	X	X	X	X	X <sup>(1)</sup>	X		X	X		X	X	X	X
Ro52/TRIM21	X	X	X	X	X	X <sup>(1)</sup>			X	X		X	X	X	X
SS-B/La	X	X	X	X	X	X	X		X	X		X	X	X	X
Centromere	X	X	X <sup>(2)</sup>	X <sup>(2)</sup>	X	X	X		X	X		X <sup>(2)</sup>	X	X	X
Scl-70/topo 1	X	X	X	X	X	X	X		X	X		X	X	X	X
Jo-1	X	X	X	X	X	X	X		X	X		X	X	X	X
Fibrillarin/URNP X				X											
RNA Pol III				X											
Ribosomal P				X		X			X	X		X	X		X
PM Scl				X					X						X
PM Scl-75										X					X
PM Scl-100					X					X					X
PCNA	X			X						X		X		X	X
Mi-2	X			X						X		X		X	X
Sm	X			X	X	X	X		X	X		X	X	X	X
dsDNA	X			X	X	X		X	X	X		X	X	X	X
Nucleosome					X				X	X		X	X	X	X
Histone					X		X		X	X		X	X	X	X
Ku				X					X	X		X	X	X	X
SRP4										X					X
AMA-M2									X	X					X

Note: some companies offer several line immunoassays for ANA detection. Most comprehensive assays from different companies are shown.  
 AMA: Anti-mitochondrial antibodies; PCNA: Proliferating cell nuclear antigen; SRP: signal recognition particle.  
 NOTE: RNP and RNP:Sm contain the subunits RNP-A, RNP-C and RNP-68 kDa.  
<sup>(1)</sup>Reported outside the United States as Ro60 and Ro52 and as SS-A in the United States.  
<sup>(2)</sup>Contains CENP-A and CENP-B.

Fuente: Tomada de ref. 15

**1.7 Cambio en el paradigma de solicitud de pruebas ANA**

La irrupción de nuevas técnicas en fase sólida para la detección de los autoanticuerpos en los laboratorios de inmunología ha abierto el campo a su automatización. A pesar de la posición de la ACR y la EULAR, están surgiendo diferentes preguntas sobre si debemos seguir considerando la IFI el *gold standard* o debe ser reemplazado por los EFS<sup>7</sup>. ¿Deberíamos seguir realizando diagnósticos basados en algoritmos clásicos a pesar de estar en la época de las nuevas plataformas de diagnóstico autoinmune?

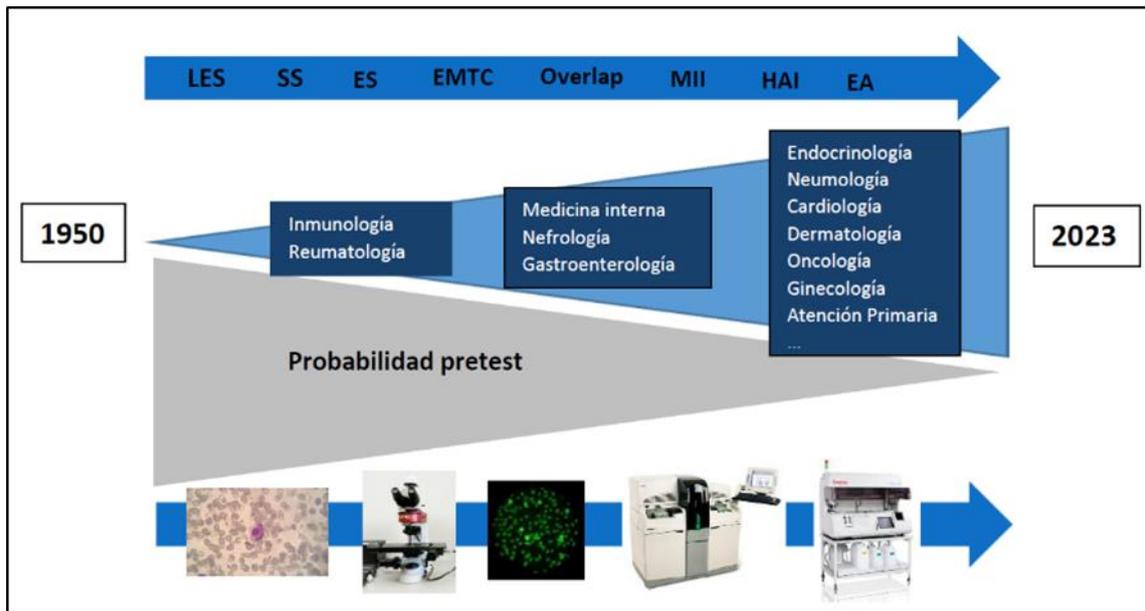
Para intentar responder esta pregunta debemos entender cómo ha evolucionado tanto la solicitud de ANA cómo la población diana a estudio en los últimos años:

La descripción de los ANA en la década de los años cincuenta supuso una revolución en el ámbito de la inmunología y la reumatología. En esa época, los pacientes con EAI eran diagnosticados en fases avanzadas de su enfermedad por la falta de estandarización de los criterios diagnósticos y de las pruebas complementarias. Por ello, la solicitud de ANA por parte de inmunólogos y reumatólogos estaba dirigida a población muy seleccionada con una probabilidad pre-test muy alta para obtener un resultado positivo. En los últimos años, ha aumentado su solicitud debido al incremento del conocimiento en inmunología, a la descripción de nuevos autoanticuerpos, y la descripción de nuevas enfermedades inmunomediadas como el síndrome de Sjögren (SS), la enfermedad mixta del tejido conjuntivo (EMTC), la artritis reumatoide (AR), el síndrome antifosfolípido (SAF), la esclerosis sistémica (ES), las miopatías inflamatorias (MI); así como otras afecciones específicas: las glomerulonefritis, las vasculitis, las encefalitis, las hepatitis

autoinmune, la colangitis biliar primaria (CBP), la enfermedad inflamatoria intestinal (EII) y la enfermedad pulmonar intersticial (EPI), donde los fenómenos autoinmunes y los ANA también juegan un papel relevante<sup>7</sup>.

Actualmente se ha generalizado tanto que incluso los médicos de familia pueden solicitar la determinación desde Atención Primaria como parte de la cartera de servicios. Todo esto ha producido un cambio en la selección de población diana con una disminución en la probabilidad pre-test de la prueba<sup>7,15</sup> (**Figura 7**).

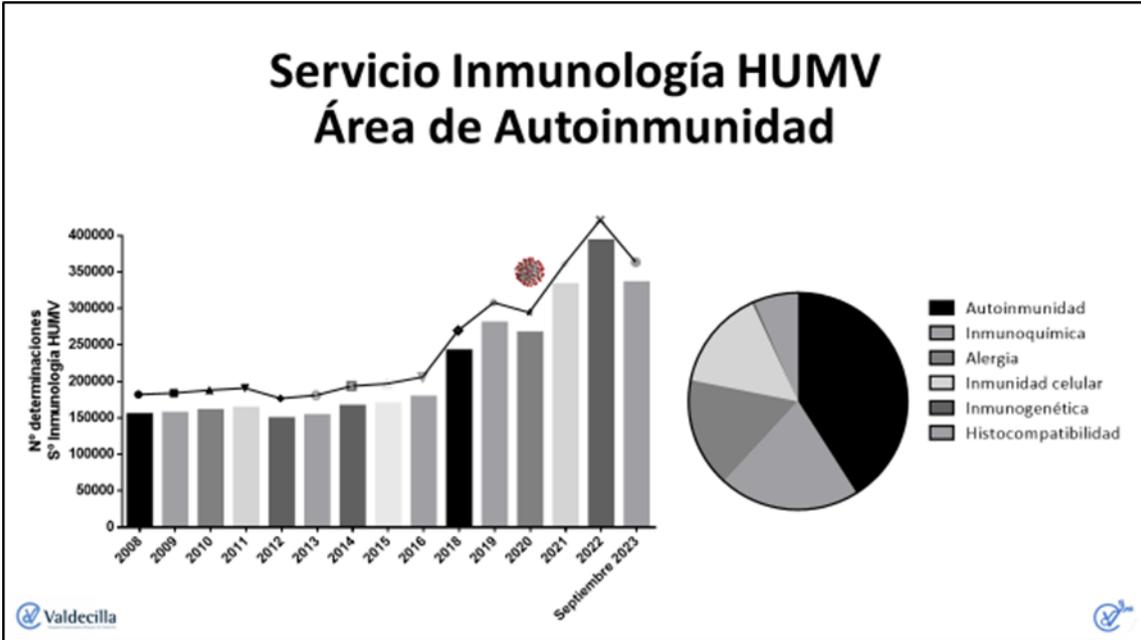
**Figura 7:** Esquema de la evolución de la solicitud de ANA



*Fuente: Imagen tomada de ref. 7*

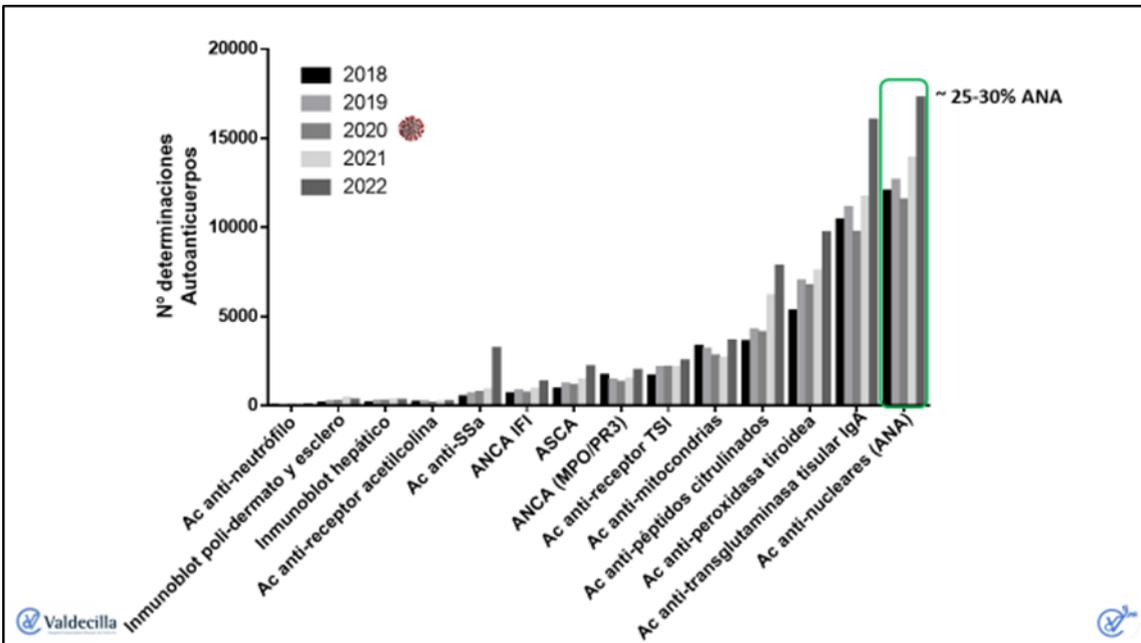
Este incremento en el conocimiento de las diferentes EAI se ha producido también gracias a un importante desarrollo tecnológico, desde las células LE en los años cuarenta hasta la IFI, ELISA, quimioluminiscencia, *immunoblot* y el desarrollo en los últimos años de la tecnología multianálisis. En este sentido, Cantabria no ha sido ajena a esta tendencia global de desarrollo y aumento de peticiones, y también en nuestro laboratorio de inmunología se ha visto incrementada la solicitud de estas pruebas (**Figura 8 y 9**):

**Figura 8:** Número de determinaciones del servicio de inmunología (periodo 2008 – Septiembre 2023)



Fuente: Elaboración propia. Servicio de Inmunología del HUMV.

**Figura 9:** Número de determinaciones de autoanticuerpos del servicio de inmunología (periodo 2018 – 2022)



Fuente: Elaboración propia. Servicio de Inmunología del HUMV.

Respecto al cambio de la población diana: ¿Cómo influye la probabilidad pre-test y post-test en la solicitud de ANA y cómo ha cambiado con el paso de los años?

Como hemos mencionado anteriormente, en estos momentos tenemos un contexto sanitario en que la solicitud de ANA se produce habitualmente en una población poco seleccionada con una probabilidad pre-test y post-test muy baja. Además, la IFI sobre células Hep-2 ha sido reemplazada, en muchos laboratorios, desde el desarrollo de métodos automatizados basados en EIA, CIA y técnicas multianálisis. Debido a una significativa prevalencia de *falsos negativos* en estas nuevas plataformas ha surgido una creciente preocupación por la instauración y el rendimiento de estos nuevos ensayos de cribado<sup>15</sup>.

Estas preguntas sobre qué plataforma debe utilizarse y cómo mejorar la falta de estandarización de los nuevos métodos de detección llevó al Colegio Americano de Reumatología (ACR) a formar un grupo de trabajo que finalmente recomendó el uso de la IFI sobre células HEp-2 para el cribado de los ANA. Esta recomendación se basó en la evidencia de que el sustrato de células HEp-2 presenta más de 100 antígenos naturales, mientras que la mayoría de métodos de detección están mucho más limitados en el objetivo de autoanticuerpos.

En 1997, Tan y cols. sugirieron que la prueba debe realizarse y comunicarse en dos diluciones, 1:40 y 1:160, con el fin de preservar la adecuada sensibilidad y especificidad, pero estudios más recientes recomiendan utilizar la dilución 1:160 para clasificar los ANA mediante IFI en positivo o negativo<sup>15</sup> que es la que hemos utilizado en el laboratorio de inmunología de nuestro hospital.

Para aplicaciones de diagnóstico es importante diferenciar entre sensibilidad y especificidad clínica o analítica. Está ampliamente documentado que ciertos autoanticuerpos pueden preceder al diagnóstico o a la expresión clínica de una enfermedad durante muchos años y, por lo tanto, resultados inicialmente falsos positivos, con el tiempo, podrían convertirse en verdaderos positivos<sup>67,68</sup>. Por lo tanto, el término «falso positivo» para los autoanticuerpos debe usarse con cautela.

El laboratorio de inmunología debe mencionar el método utilizado y su punto de corte. Un método de cribado requiere un alto grado de sensibilidad para que el número de pacientes que se pierden sea lo más bajo posible. A diferencia de las pruebas de confirmación que necesitan una especificidad alta. En general, un punto de corte bajo aumenta la sensibilidad a expensas de disminuir especificidad y viceversa. La interpretación de los resultados de la prueba ANA depende de la probabilidad previa pre-test de tener la enfermedad. En un entorno de alto índice de sospecha, incluso títulos bajos de ANA por IFI pueden interpretarse como significativos<sup>69</sup>.

Tradicionalmente, se ha utilizado un único punto de corte para la interpretación de una prueba de laboratorio y todos los valores por encima o por debajo del valor de corte reciben la misma interpretación —positivo o negativo—, respectivamente. En cambio, para muchas EAS, la probabilidad de enfermedad aumenta con el aumento de la concentración de autoanticuerpos, y esta información falta cuando se utiliza un solo punto de corte<sup>70</sup>.

Algunos autores consideran que dentro de los datos que deberían ofrecerse está la razón de verosimilitud (RV) por ser una herramienta de gran utilidad para la toma de decisiones clínicas.

¿Cuál es la probabilidad de que un paciente tenga una enfermedad cuándo la prueba de laboratorio es positiva o que no la tenga cuando es negativa?<sup>15,71</sup>. Los médicos tienen dificultades para estimar la probabilidad post-test de padecer una enfermedad basado en la sensibilidad y la especificidad, pero la RV de una prueba diagnóstica es una alternativa para

transmitir estos datos al describir la posibilidad de tener la enfermedad en oposición a no tenerla, teniendo un resultado del test positivo y, la probabilidad de no tenerla en oposición a tenerla, teniendo un resultado negativo<sup>72</sup>. Por lo tanto, el uso de la RV constituye una herramienta de gran utilidad para la toma de decisiones clínicas frente a la solicitud de algún test diagnóstico, porque son valores inherentes a este e independientes de la prevalencia de enfermedad, a diferencia de los valores predictivos. Proporciona una estimación de si habrá un cambio significativo de la probabilidad, desde pre-test a pos-test, de padecer una enfermedad en función del resultado de la prueba, simplificado habitualmente a través del uso del nomograma de Fagan. El conocimiento de la RV mejora la interpretación clínica de un resultado en particular en comparación con el conocimiento relacionado con un solo valor de corte.

## **1.8 Anticuerpos antinucleares y parámetros sociodemográficos**

Un aspecto menos estudiado y que ha despertado gran interés en los últimos años es la potencial relación entre la prevalencia de ANA y determinadas características sociodemográficas poblacionales. Desde hace décadas se conoce la relación entre la mayor prevalencia de ANA en mujeres y en personas mayores<sup>73,74</sup>; en cambio, se desconoce la asociación que pueda haber entre los ANA y otros factores sociodemográficos de una población.

### **1.8.1 Un poco de historia sobre la perspectiva comunitaria en la salud**

La salud no es un asunto individual. El impacto de lo social en la salud se acepta desde finales del siglo XIX, cuando en 1848, Rudolf Virchow publicó su informe sobre la epidemia de tifus en la Alta Silesia, en el que afirmó que las condiciones de vida influyen en la diseminación de la enfermedad: «No puede haber la menor duda de que tal diseminación epidémica fue posible bajo las terribles condiciones de vida que habían sido creadas por la pobreza y la falta de cultura» (extracto del informe de Virchow, reproducido en la revista *Medicina Social* en 2008). Desde entonces, ha habido varios informes donde se ha hecho hincapié en la necesidad de una perspectiva comunitaria de salud, desde el informe epidemiológico Black (1980), después de la Segunda Guerra Mundial, hasta la Conferencia Internacional en Atención Primaria de Salud (Alma-Ata, 1978), donde se propuso la Atención Primaria como vehículo para mejorar la salud de las poblaciones. Posteriormente, la Organización Mundial de la Salud (OMS) avanzó en la consideración del abordaje de los determinantes para la promoción de la salud en la Carta de Ottawa (1986) y en las sucesivas reuniones internacionales<sup>75</sup>.

La publicación de Marmot de *Los Determinantes Sociales de la Salud: Los Hechos Probados* (publicado por primera vez en 1998) marcó el rumbo de la acción para difundir resultados científicos para la elaboración de políticas sanitarias que cristalizó en el año 2005 con la creación por parte de la OMS de la Comisión sobre Determinantes Sociales de la Salud (CDSS) donde se sintetizó el marco conceptual de los determinantes sociales donde se corrobora que las condiciones de vida determinan la manera en que las personas enferman y mueren.

Tener en cuenta la perspectiva comunitaria en salud implica, pues, la consideración de los determinantes sociales de la salud, es decir, «las condiciones en que las personas nacen, crecen, viven, trabajan y envejecen», como determinantes tanto de salud como de enfermedad y muerte<sup>75,76</sup>. El impacto en la salud del «lugar de residencia, el nivel educativo, las relaciones sociales, el tipo de trabajo, el nivel de ingresos, el acceso a los servicios, las políticas económicas, culturales y medioambientales o las leyes del mercado» (*Guía metodológica para el abordaje de*

la salud desde una perspectiva comunitaria, 2016) es mayor que el peso del propio sistema sanitario y de los determinantes genéticos y los estilos de vida individuales.

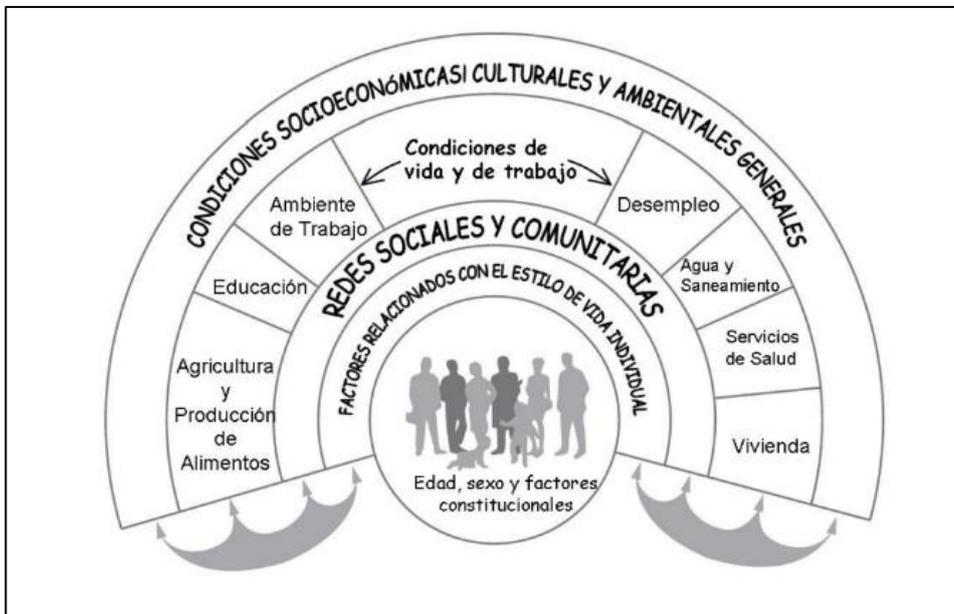
Considerar la perspectiva comunitaria en Atención Primaria y en especialidades hospitalarias implica tener en cuenta el ámbito comunitario, es decir, el marco conceptual de los determinantes sociales de la salud y el contexto en el que se manifiestan los determinantes intermedios de la salud. Estos determinantes intermedios son los factores biológicos y conductuales (herencia, nutrición, actividad física, consumo de tabaco y alcohol, etc.), que también están influidos por las condiciones socioeconómicas, los factores psicosociales (relaciones sociales, presencia o ausencia de apoyo social, acontecimientos estresantes, estilos de afrontamiento), las condiciones de vida (ingresos, vivienda, alimentación, entorno, escuela, trabajo, etc.) y los propios servicios de salud<sup>75</sup>.

Como resumen, la salud comunitaria es la expresión colectiva de la salud de los individuos y grupos en una comunidad definida, determinada por la interacción de características individuales y familiares, por el entorno social, cultural y físico, así como por los servicios de salud y por la influencia de factores sociales, políticos y de globalización (Gofin y Gofin, 2012).

### 1.8.2 Determinantes de Salud

Los determinantes de la salud general de la población pueden conceptualizarse como estratos de influencia similares a un arco iris<sup>76</sup> (Figura 10):

Figura 10: Principales determinantes de la salud



Fuente: Imagen tomada de ref. 76

En el centro de la figura, los individuos tienen una edad, un sexo y unas características constitucionales que influyen en su salud y que no son modificables. En cambio, en torno a ellos hay influencias que, en teoría, pueden ser modificadas por medio de la acción política. En primer

lugar, están los factores relacionados con la conducta personal, como el hábito de fumar y la actividad física. En segundo lugar, los individuos interactúan con las personas de su entorno y con la comunidad inmediata y se ven influidos por ellas, lo cual se representa en el segundo estrato. Seguidamente, la capacidad de una persona para mantener su salud (en el tercer estrato) se ve influida por las condiciones de vida y de trabajo, la alimentación y el acceso a bienes y servicios esenciales. Por último, como mediadores de la salud de la población, las influencias económicas, culturales y medioambientales actúan sobre el conjunto de la sociedad. Este modelo que describe los determinantes de la salud hace hincapié en las interacciones: los estilos de vida individuales se integran en unas normas y redes sociales, así como en unas condiciones de vida y de trabajo que a su vez guardan relación con el entorno socioeconómico y cultural general.

Para establecer prioridades y proponer intervenciones y estrategias adecuadas, se debe evaluar la importancia de la contribución de distintos factores de riesgo a la carga total de enfermedad. La OMS ha realizado este tipo de evaluación del riesgo (2002). En la **Tabla 2** se indican los 10 principales factores que contribuyen a la carga total de enfermedad en Europa, según la OMS<sup>76</sup>. Todos ellos pueden considerarse factores de riesgo individuales relacionados con la conducta y proporcionan sólo una base parcial, puesto que los determinantes de la salud más generales que aparecen en la columna derecha de la tabla no se han cuantificado en el análisis de la OMS.

**Tabla 2:** Factores importantes que contribuyen a la carga total de enfermedad en la Región Europea de la OMS, 2002

Individuales	Generales
<p>Diez factores de riesgo conductuales en Europa, según la OMS:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Tabaco</li> <li>2. Hipertensión</li> <li>3. Consumo excesivo de alcohol</li> <li>4. Hipercolesterolemia</li> <li>5. Sobrepeso</li> <li>6. Consumo insuficiente de frutas y verduras</li> <li>7. Inactividad física</li> <li>8. Abuso de drogas</li> <li>9. Prácticas sexuales de riesgo</li> <li>10. Deficiencia de hierro</li> </ol>	<p>Riesgos más generales para la salud que no han sido considerados en análisis cuantitativos concretos:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Políticas de comercio internacional</li> <li>2. Desigualdades en renta</li> <li>3. Pobreza</li> <li>4. Riesgos para la salud relacionados con el trabajo</li> <li>5. Falta de cohesión social</li> </ol>

Fuente: Imagen tomada de ref. 76

En general, hay muy poca información sobre la relación entre los ANA y parámetros sociodemográficos-determinantes de salud, y una ausencia total de esta relación en población española. Revisando la bibliografía hemos encontrado algunos estudios realizados en Estados Unidos, dónde en el año 2012, el *National Health and Nutrition Examination Survey* (NHANES), perteneciente al Centro Nacional de Estadísticas de Salud, realizó un estudio observacional con cinco años de seguimiento para estudiar esta relación. Se marcaron el objetivo de definir la

prevalencia de ANA, así como caracterizar los factores asociados con su producción, y ver si podían proporcionar información sobre la etiología de las enfermedades autoinmunes, cuya frecuencia sospechaban que se encontraba en aumento, pero de difícil caracterización y estudio poblacional. Dentro de los factores que estudiaron (el tabaquismo, el consumo de alcohol, la etnia/raza, el nivel educativo, los ingresos familiares y la obesidad<sup>74,77</sup>) observaron una mayor prevalencia de positivos para ANA en sujetos afroamericanos respecto a sujetos blancos americanos, así como una menor prevalencia de positivos para ANA en sujetos con sobrepeso y obesidad. No encontraron significación estadística en el resto de parámetros estudiados. En el año 2022, Dinse et al. actualizaron los resultados de anteriores estudios, también basados en los datos obtenidos de la población por la NHANES durante tres periodos de seguimiento (1988-1991, 1999-2004 y 2011-2012) con resultados muy similares, a excepción de la asociación entre ANA positivos y el sobrepeso-obesidad con una relación directa en el tercer periodo de seguimiento. Los hallazgos generales sugirieron que la prevalencia de ANA aumentó sustancialmente, pero hacen falta estudios adicionales para complementar la investigación, particularmente de los grupos sociodemográficos antes mencionados, con el fin de determinar las causas de estos aumentos de ANA e intentar desarrollar posibles medidas preventivas. Recientemente, también se han relacionado con el incremento de los ANA, factores genéticos y diversas exposiciones ambientales, infecciones y consumo de medicamentos<sup>78</sup>; con resultados por el momento poco concluyentes pero que orienta a pensar en la implicación del medio ambiente y los cambios del estilo de vida en la producción de ANA.



## **2. HIPÓTESIS GENERAL Y OBJETIVOS**



### **2.1 Hipótesis General**

La hipótesis principal del trabajo es si los nuevos ensayos automatizados y de fase sólida (ANA Screen por BioPlex de Bio-Rad y CDT Screen por ImmunoCAP 250 de ThermoFisher), pueden sustituir a la técnica convencional de IFI en la detección de autoanticuerpos para el diagnóstico de enfermedades autoinmunes.

Por otra parte, se podría considerar que la producción de autoanticuerpos no depende únicamente de la inmunidad innata o adaptativa, sino que diferentes factores sociodemográficos y de estilo de vida, también influyen en el desarrollo del proceso autoinmune.

### **2.2 Objetivos**

1. Comparar el rendimiento diagnóstico de la IFI sobre células HEp-2 y de los nuevos métodos automatizados con tecnología ALBIA (ANA Screen por Bioplex - Bio-Rad) y FEIA (CTD InmunoCAP 250 - ThermoFisher) en las muestras basales de los sujetos de la Cohorte de Camargo, una población de baja probabilidad pre-test para desarrollar enfermedades autoinmunes.
2. Analizar la posible influencia de los principales factores sociodemográficos y de estilo de vida en el desarrollo de autoanticuerpos.



### **3. MATERIAL Y MÉTODOS**

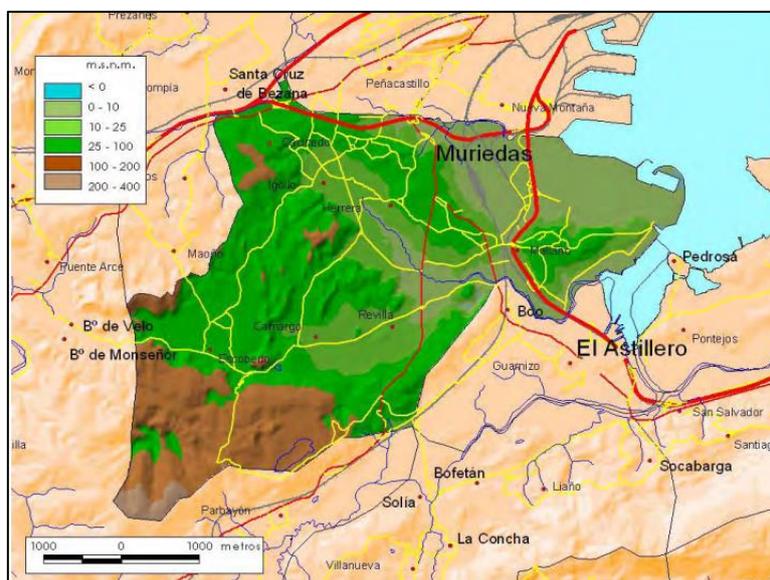


### 3.1 Población de estudio y recolección de sueros

Los participantes fueron reclutados en el marco de la Cohorte Camargo, un estudio prospectivo de base comunitaria realizado entre febrero de 2006 y febrero de 2011 en el centro de salud José Barros en el municipio de Camargo (Cantabria, España) con un seguimiento prospectivo que continua en la actualidad. Los detalles del diseño y características de la Cohorte Camargo han sido publicados anteriormente<sup>79,80,81,82,83</sup>. Fue diseñada para evaluar la prevalencia e incidencia de enfermedades del metabolismo óseo, factores de riesgo para osteoporosis y fracturas por fragilidad en mujeres posmenopáusicas y varones mayores de 49 años.

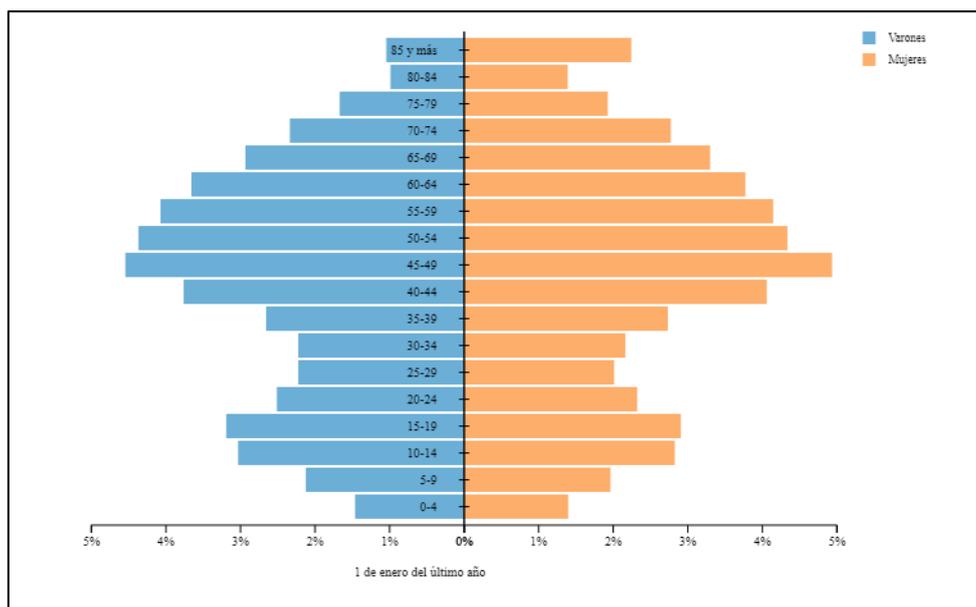
Los sujetos incluidos en la Cohorte pertenecen a la población general del valle de Camargo, en la Comunidad Autónoma de Cantabria. El municipio de Camargo pertenece al cinturón de la bahía de Santander, cuenta con 7 núcleos poblacionales y más de 30.000 habitantes (**Figura 11**).

**Figura 11:** Municipio de Camargo (Cantabria)



Fuente: Instituto Cántabro de Estadística. Fichas Municipales: Camargo, 2011. Disponible en: <http://www.icane.es>

Su pirámide de población muestra un predominio de los individuos entre los 40 y los 60 años (**Figura 12**) y la distribución por sexo, edad y nivel socioeconómico de las personas del valle de Camargo es comparable a la de la población de Cantabria<sup>80</sup>.

**Figura 12:** Pirámide de población del municipio de Camargo (30 de enero de 2023)

Fuente: Instituto Cántabro de Estadística. Fichas Municipales: Camargo, 2023. Disponible en: <http://www.icane.es>

### **3.2 Inclusión en la Cohorte Camargo**

Según el Protocolo del Estudio de la Cohorte Camargo, a medida que acudían a la consulta médica de Atención Primaria, independientemente del motivo, los sujetos que cumplían los criterios de inclusión, eran informados del propósito del estudio e invitados a participar en él. Todos aquellos que accedieron firmaron un consentimiento informado (**Anexo I**).

En la visita inicial, los sujetos eran entrevistados por su médico de familia y se recogían datos en relación con los factores de riesgo de osteoporosis y de fracturas. Para ello se utilizó un cuestionario estructurado informatizado que incluía la edad, raza, edad de menarquia, edad de menopausia, tipo de menopausia, antecedentes personales de fractura en edad adulta (>40 años), historia familiar de fracturas, consumo de tabaco, de productos lácteos, de café y alcohol, ejercicio físico, número de caídas en el último año, enfermedades crónicas (HTA, DL, diabetes mellitus, urolitiasis, hipertiroidismo, hiperparatiroidismo, etc.) y el consumo presente o pasado de fármacos con efectos sobre el hueso. Asimismo, se hizo una evaluación antropométrica: medición del peso, la talla y el perímetro abdominal.

En el contexto de esta evaluación basal, a los participantes se les realizó un estudio radiológico simple de columna torácica (CT) y lumbar (CL), en el Servicio de Radiología del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, en Santander, mediante el procedimiento radiográfico convencional, centrado en las vértebras T7 y L2, respectivamente. Adicionalmente, se obtuvo, en todos los participantes, una muestra de sangre venosa en ayunas para un estudio de laboratorio general y especial del metabolismo óseo, una medición de la DMO en la columna lumbar y en la cadera (cuello femoral y cadera total), mediante DXA, y un estudio ultrasonográfico del calcáneo (**Tabla 3**).

**Tabla 3:** Resumen de la inclusión en la Cohorte Camargo

2997 sujetos, mujeres postmenopáusicas y varones > 50 años		
Estudio analítico (general y específico dirigidos al metabolismo óseo)	Densitometría ósea (DXA)	Radiología simple de columna torácica y columna lumbar
Cuestionario sobre metabolismo óseo y enfermedades generales, consumo de medicación y factores de riesgo de osteoporosis y fracturas		Ultrasonográfico del calcáneo

### **3.3 Diseño general del estudio**

Estudio descriptivo analítico anidado en una cohorte de base poblacional, que incluye mujeres postmenopáusicas y varones mayores de 50 años<sup>81</sup>.

Se han analizado las 2997 muestras de suero de todos los sujetos incluidos en la Cohorte Camargo. Específicamente se ha analizado la primera muestra de suero disponible de cada sujeto cuando se incluyó en la cohorte para valorar la presencia de autoanticuerpos.

Esta muestra fue seleccionada para analizar un rango de edad donde la positividad para autoanticuerpos asociada con la edad tiene una baja probabilidad pre-test, acorde a la tendencia actual de solicitud en la práctica clínica.

El estudio se llevó a cabo de acuerdo con los criterios establecidos por la Declaración de Helsinki y fue aprobado por el Comité de Ética Regional (Código Interno CEIm: 2020.309). Todos los pacientes dieron su consentimiento informado por escrito.

### **3.4 Variables del estudio**

Las siguientes variables fueron analizadas para el presente trabajo de investigación:

#### **Datos de filiación y variables antropométricas**

- Sexo (varón, mujer)
- Edad (en años)
- Peso (en Kg), medido con una báscula con una precisión de 100 gr., con el sujeto descalzo.
- Talla (en cm). Se midió con un estadiómetro (precisión 1 cm), estando el sujeto descalzo y con los talones juntos.
- Índice de masa corporal (IMC), que se calculó dividiendo el peso en kilos (kg), entre la altura en metros al cuadrado (m<sup>2</sup>), considerándose obesidad si el IMC era  $\geq 30$  kg/m<sup>2</sup>.
- Perímetro abdominal (en cm), se ha medido utilizando una cinta métrica flexible y milimetrada, con el paciente en bipedestación y sin ropa, en la región abdominal. Se localizaba el borde superior de las crestas ilíacas y por encima de dicho punto se rodeaba la cintura de forma paralela al suelo, con la cinta ajustada, pero sin comprimir, al final de una espiración normal.

- Consumo de tabaco: las personas se dividieron en fumadoras (fumador en el momento del estudio o hasta menos de 2 años antes), no fumadoras y exfumadores (más de 2 años sin fumar), registrando asimismo el número de cigarrillos/día y los años de consumo.
- Consumo de alcohol: las personas se dividieron en bebedoras (consumo de más de 20 gr diarios de alcohol), no bebedoras y ex-bebedoras, registrando asimismo el consumo de etanol en gramos/día y los años de consumo.
- Actividad física: variable semicuantitativa definida en tres niveles: Intensa (definida por >3 horas semanales de ejercicio o practicar algún tipo de deporte), moderada (definida por <3 horas semanales de ejercicio o realizar las actividades básicas de la vida diaria, pasear, salir de compras, sin llegar a hacer ejercicio vigoroso) y sedentarismo (salir en contadas ocasiones del domicilio o vida cama-sillón)<sup>84</sup>.

### **Variabes clínicas**

Se incluyeron en este grupo las siguientes variables clínicas:

- La tensión arterial sistólica y diastólica fueron medidas en mmHg utilizando un esfigmomanómetro digital de brazo sobre la arteria braquial derecha tras 5 minutos con el sujeto sentado.
- Los diagnósticos de HTA, DM2, cardiopatía isquémica, accidente cerebrovascular e insuficiencia renal crónica (IRC) fueron obtenidos de la historia clínica de Atención Primaria del sujeto.
- El síndrome metabólico fue definido de acuerdo con los criterios del NCEP ATP III (National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III)<sup>86</sup>. De esta forma, los participantes fueron clasificados con este síndrome con cualquier combinación de 3 ítems de los siguientes, con los siguientes valores de referencia:
  - Obesidad abdominal (perímetro abdominal >102 cm en varones y >88 cm en mujeres)
  - Nivel plasmático de triglicéridos  $\geq 150$  mg/dL o niveles de HDL-c <40 mg/dL en varones y HDL-colesterol <50 mg/dL en mujeres
  - Presión arterial  $\geq 130/85$  mmHg
  - Glucemia basal plasmática  $\geq 100$  mg/dL.
    - Si se recibía tratamiento específico para un criterio, dicho criterio se consideraba cumplido.

### **Parámetros de laboratorio**

- Las muestras sanguíneas se obtuvieron de la vena cubital, tras un ayuno de 12 horas, y los valores de parámetros bioquímicos fueron aportados por un aparato ADVIA-2400 Chemistry System® (Siemens Healthcare Diagnostics, Tarrytown, NY, EE. UU.)
  - Se analizaron los niveles de los parámetros siguientes: glucemia basal, creatinina, colesterol total, colesterol-HDL, colesterol-LDL, triglicéridos, ácido úrico, proteína C reactiva (PCR), calcio, fósforo, expresados en mg/dL; Fosfatasa alcalina en UI/L, albúmina, en g/dL; T4 libre en ng/dL; TSH plasmática (medida en mUI/L), y el filtrado

glomerular (FG) —estimado según la fórmula MDRD-4 (*Modification of Diet in Renal Disease-4*)—, en ml/min/1.73 m<sup>2</sup>.

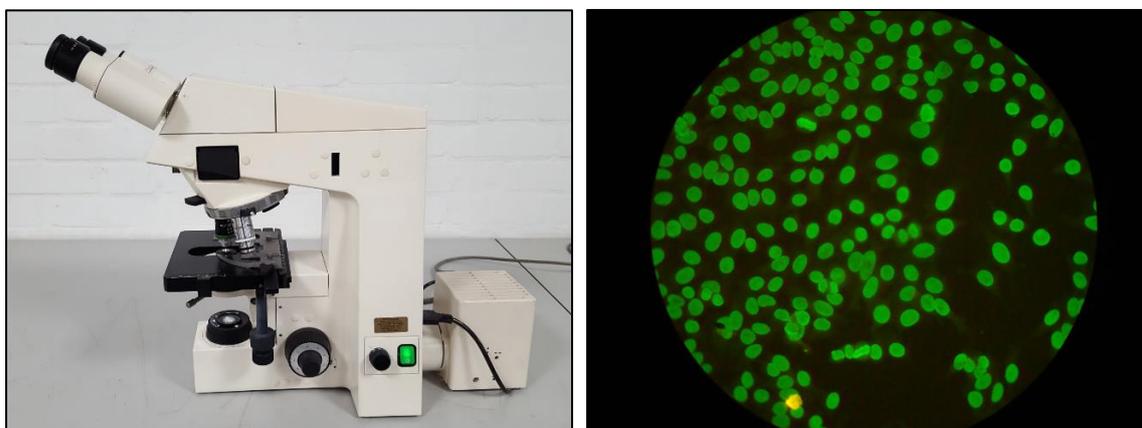
- Se ha considerado como un perfil lipídico aterogénico unos niveles plasmáticos de colesterol total  $\geq 200$  mg/dL, colesterol LDL (LDLc)  $\geq 130$  mg/dL, colesterol HDL (HDLc)  $< 40$  mg/dL en varones y  $< 50$  mg/dL en mujeres y/o triglicéridos (TG)  $\geq 150$  mg/dL<sup>85</sup>.

### **3.5 Detección de autoanticuerpos**

El cribado de ANA se hizo con las muestras de suero de cada sujeto obtenidas al inicio del estudio. Específicamente, los autoanticuerpos se determinaron mediante tres métodos diferentes incluyendo IFI sobre células HEp-2 (Biosystems, Barcelona, España), y dos métodos de fase sólida: ANA Screen (Bio-Rad, Hércules [CA], EE.UU.) y CTD Screen (ThermoFisher, Freiburg, Alemania).

- **Ensayo IFI sobre células HEp-2:** Los sueros se diluyeron a 1:160 con una solución salina tamponada con fosfato (PBS), que se consideró la dilución de cribado. Utilizamos un microscopio de fluorescencia Zeiss con iluminación de luz incidente de mercurio y filtros para activación/emisión de isotiocianato de fluoresceína (FITC). Los portaobjetos con células HEp-2 fijadas sirvieron como fuente de antígenos nucleares (Biosystems, Barcelona, España). Utilizamos como anticuerpo secundario un conjugado FITC Anti-Conejo IgG (Biosystems, Barcelona, España). Las incubaciones, lavados y montaje de portaobjetos del microscopio se realizaron siguiendo las instrucciones del fabricante. Las diapositivas fueron inspeccionadas bajo el microscopio de fluorescencia a 400 aumentos. Se consideraron los patrones nuclear, citoplasmático y mitótico de Hep-2. La nomenclatura utilizada para describir los ANA positivos mediante IFI en células HEp-2 se estableció de acuerdo con el Consenso Internacional sobre Patrones ANA (ICAP)<sup>51,88</sup>.

**Figura 13:** A. Microscopio de fluorescencia Zeiss. B. Ejemplo de tinción mediante inmunofluorescencia



Fuente: A. Elaboración propia. B. Atlas GEAI de imágenes en autoinmunidad. Grupo español de autoinmunidad. Sociedad española de inmunología. <https://atlasautoinmunidad.org/>

- **Ensayo ANA Screen Bio-Rad:** Utilizamos el sistema ANA Screen BioPlex 2200 (Bio-Rad, Hércules [CA], EE.UU.) basado en la tecnología ALBIA para detectar 13 tipos de autoanticuerpos simultáneamente, mediante la detección cuantitativa de ADNdc y semicuantitativa de cromatina, centrómero B, Scl-70, RNP (RNP-A, RNP-68), Sm, RNP/Sm, Ro (SSA-52, SSA-60), SSB/La, Jo-1 y proteína P ribosomal, siguiendo las instrucciones del fabricante. Se analizó con este mismo ensayo pero con otro kit los anti-CCP. El autoanticuerpo anti-ADNdc se clasificó como negativo si los niveles eran  $\leq 4$  UI/mL, indeterminado si eran entre 5-9 UI/mL, y positivo si eran  $\geq 10$  UI/mL, según lo recomendado por el fabricante. Para los demás autoanticuerpos los resultados fueron expresado como un *antibody index* (AI). Un AI de 1.0 fue el punto de corte establecido por el estudio del fabricante que correspondía aproximadamente con el percentil 99 de valores obtenidos para una población sin enfermedad. Los resultados  $\geq 1.0$  se informaron como positivos (rango, 0.2 – 8.0 AI). El resultado de la prueba se consideró positivo para ANA si uno o más de las pruebas de anticuerpos en el panel fueron positivos.

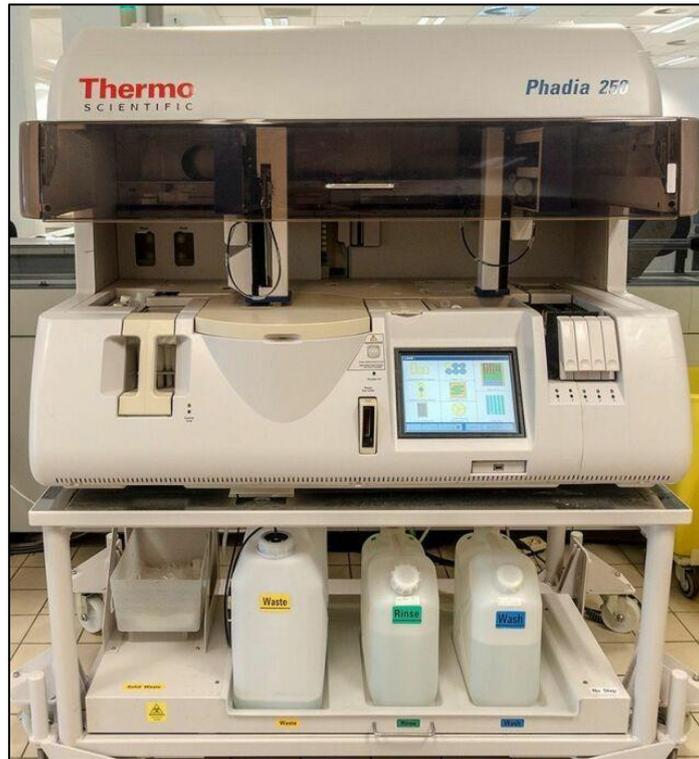
**Figura 14:** A. Sistema ANA Screen BioPlex 2200. B. Ejemplo de kits BioPlex 2200



Fuente: A. Elaboración propia. B. <https://www.bio-rad.com/>

- **Ensayo EliA™ CTD Screen Thermo Fisher:** EliA™ CTD Screen (Thermo Fisher, Friburgo, Alemania) basado en la tecnología FEIA sobre el sistema Phadia 250 (Thermo Fisher Scientific) para detectar 14 autoanticuerpos, como centrómero B (CENP-B), ADNdc, Jo-1, Mi-2, antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA), polimiositis (PM-Scl), ribosomal-P, ARN Pol III, Scl-70, Sm, SSA/Ro (Ro52 y Ro60), SSB/La, U1-RNP (RNP-70, A y C), y fibrilarina, siguiendo las indicaciones del fabricante. Los resultados obtenidos se interpretaron como positivos, indeterminados, o negativo de acuerdo con los puntos de corte especificados por el fabricante (Positivo  $>1.0$ , indeterminado 0.7–1.0, negativo  $<0.7$ ). El resultado de la prueba se consideró positivo para ANA si uno o más de las pruebas de anticuerpos en el panel fueron positivos.

**Figura 15:** *EliA™ CTD Screen con sistema Phadia 250 de Thermo Fisher*



Fuente: Elaboración propia.

### **3.5 Desarrollo de enfermedades autoinmunes.**

Las historias clínicas de todos los sujetos incluidos en el estudio fueron revisadas de forma independiente por dos investigadores, ciegos para el resultado de ANA, para determinar si habían desarrollado alguna enfermedad autoinmune, incluyendo EAS, EAOE o AR, desde su inclusión en la Cohorte Camargo hasta marzo de 2022. Para el diagnóstico de dichas enfermedades se emplearon los criterios validados (**ver Anexo**).

### **3.6 Análisis estadístico**

La distribución de las variables continuas se evaluó mediante la prueba de Kolmogorov–Smirnov o de Shapiro-Wilk. Los resultados fueron expresados como media  $\pm$  desviación estándar para variables continuas y porcentajes para datos categóricos. Las comparaciones para datos categóricos se realizaron mediante la prueba de Chi<sup>2</sup> o test de Fisher y para variables continuas paramétricas y no paramétricas mediante la prueba t de Student o prueba U de Mann-Whitney, respectivamente. Un valor de  $p < 0,05$  se consideró significativo en todos los cálculos. El análisis estadístico se realizó utilizando SPSS 28.0 (IBM Corp., Armonk, NY, EE.UU.) y Graph Pad Prism 6.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego [CA], EE.UU.).

### **3.7 Fuente de los datos**

Los datos de las variables demográficas, antropométricas, clínicas, y de laboratorio provienen del estudio de la Cohorte Camargo.

Para este trabajo se han revisado todos los antecedentes médico-quirúrgicos, datos de laboratorio y episodios de consulta registrados en los dos sistemas informáticos del Servicio Cántabro de Salud (Altamira, para la historia hospitalaria y AP Cantabria para la historia clínica de atención primaria) de los sujetos del estudio (n=2997).

Durante la fase de evaluación el doctorando permaneció ciego a todo dato clínico relacionado con los participantes.

El registro y la codificación se han realizado en una Hoja de Recogida de Datos específica para cada paciente, con una adecuada preservación de su anonimato.

Toda duda relacionada con los datos de recogida, análisis o clasificación de algún paciente fue consultada con un experto reumatólogo (profesor Martínez Taboada).

### **3.8 Fuentes potenciales de sesgo y medidas adoptadas**

Se ha considerado que hay dos tipos de sesgos que pueden afectar a la validez interna del estudio: un sesgo de confusión y un sesgo de clasificación o diagnóstico.

#### **Sesgo de confusión**

Es sabido que ciertas características basales de los pacientes pueden ejercer un papel confusor o modificador de efecto. Con objeto de neutralizar el efecto de variables confusoras se elaboraron modelos multivariantes, contemplando en el estudio las variables de ajuste necesarias.

#### **Sesgo de clasificación**

Si bien el análisis de laboratorio es un método objetivo, la interpretación de la inmunofluorescencia indirecta es subjetiva y, por tanto, sujeta a error. Dado que el resultado positivo y dilución derivan de una interpretación de imágenes bajo microscopio de fluorescencia, cabe esperar un sesgo y se ha hecho necesario, por tanto, adoptar una estrategia específica para minimizar en lo posible este efecto.

Las siguientes actuaciones que se han llevado a cabo han pretendido mejorar la validez y la fiabilidad de las medidas:

- **Formación específica:** En una fase previa el investigador principal recibió un entrenamiento dirigido a la evaluación de conectivopatías mediante los diferentes criterios diagnósticos tanto analíticos con marcadores y autoanticuerpos específicos de cada entidad como clínicos, todos ellos de la clasificación EULAR / ACR vigentes en el momento de dicha revisión. En dicho entrenamiento fueron analizadas conjuntamente con un reumatólogo y un investigador acreditado de la Cohorte Camargo alrededor de 20 pacientes afectados con alguna de las patologías a estudio. Así mismo durante el proceso de análisis de autoanticuerpos y clasificación de conectivopatías cualquier duda fue consultada y aclarada con el Profesor Martínez Taboada como tutor y reumatólogo experto.
- **Elección de variables estandarizadas:** Tanto los criterios EULAR como ACR son metodologías validadas (**ver Anexo IV**).

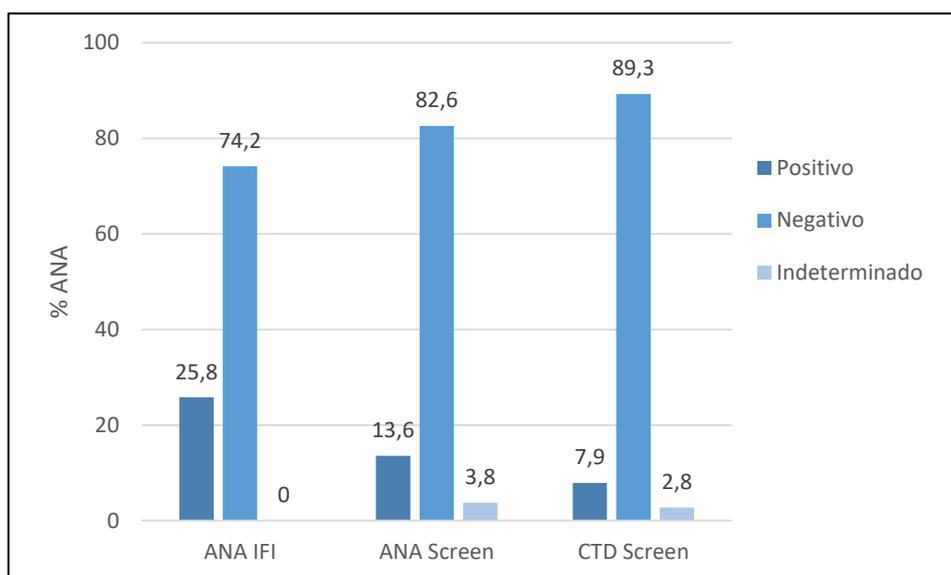
## **4. RESULTADOS**



#### **4.1 Frecuencia de ANA mediante los métodos de inmunofluorescencia indirecta y ensayos en fase sólida**

La frecuencia de resultados positivos para ANA en la Cohorte Camargo mediante los tres métodos utilizados, la inmunofluorescencia indirecta (IFI) y los dos ensayos en fase sólida (EFS): ANA Screen mediante tecnología ALBIA y CTD Screen mediante tecnología FEIA, se muestran en la **Figura 16**.

**Figura 16:** Porcentaje de resultados positivos, negativos e indeterminados de ANA, utilizando IFI, ANA Screen y CTD Screen

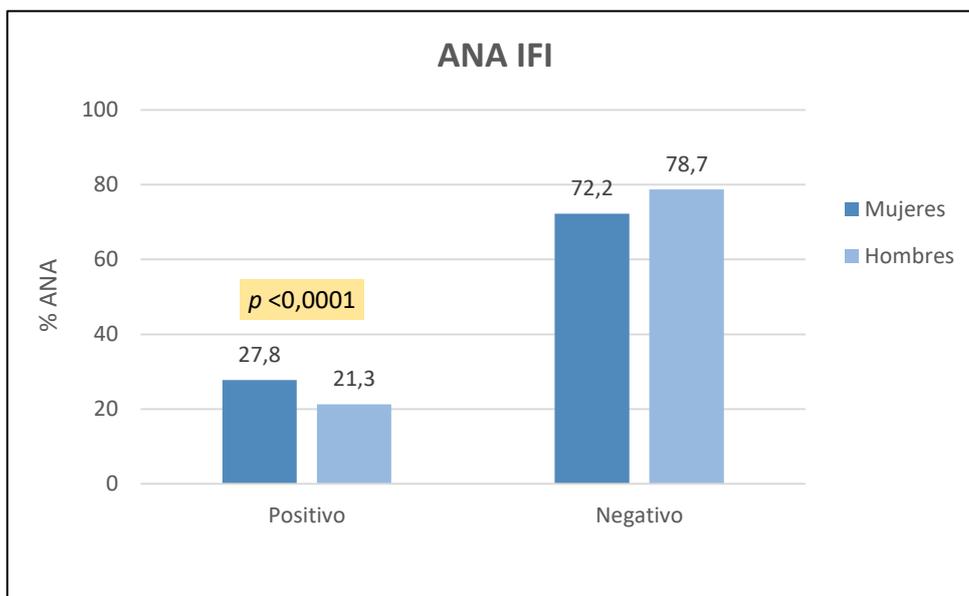


La figura muestra la frecuencia más alta de resultado positivo para los ANA mediante el ensayo por IFI con un 25,8%, en comparación con el ANA Screen con un 13,6% ( $p < 0,0001$ ) y el CTD Screen con el 7,9% ( $p < 0,0001$ ). Con ambas técnicas de EFS, la diferencia también fue significativa ( $p < 0,0001$ ).

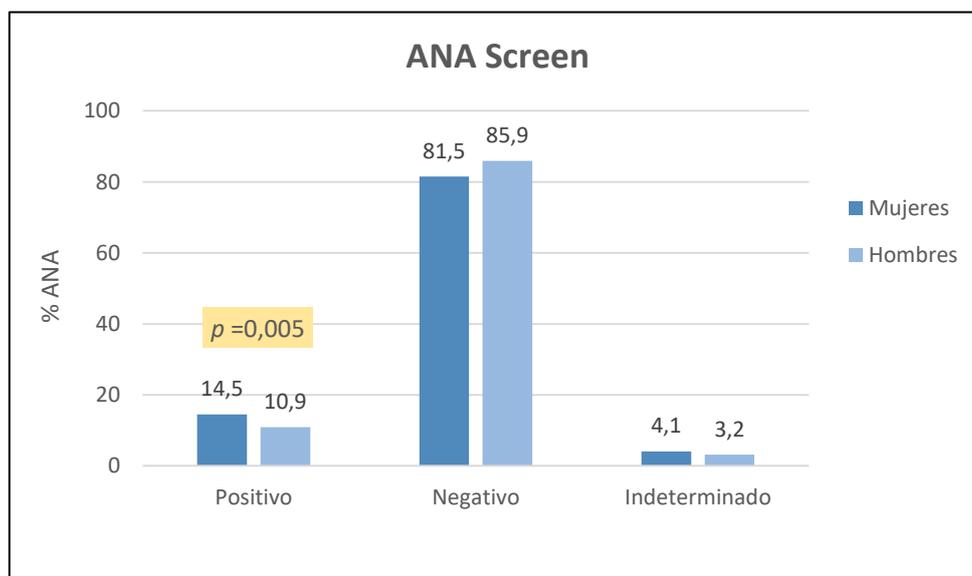
## RESULTADOS

Cuando la población a estudio se estratificó por el sexo se halló una frecuencia significativamente más alta de resultados positivos para ANA en las mujeres, independientemente de la técnica utilizada, como se muestra en las **Figuras 17, 18 y 19**.

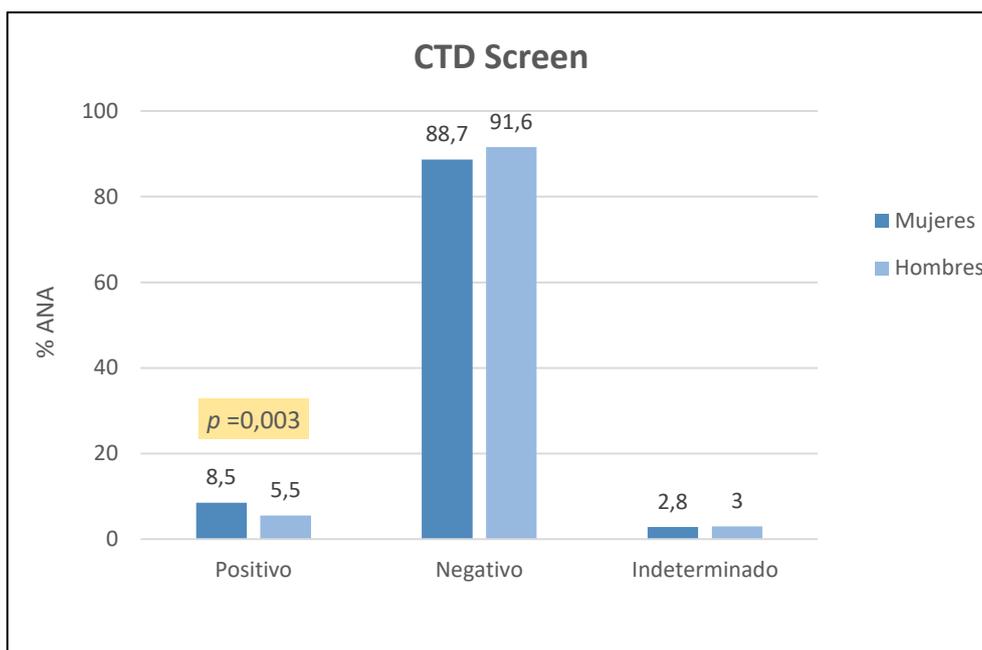
**Figura 17:** Porcentaje de ANA + estratificados por sexo, mediante IFI



**Figura 18:** Porcentaje de ANA + estratificados por sexo, mediante ANA Screen



**Figura 19:** Porcentaje de ANA + estratificados por sexo, mediante CTD Screen



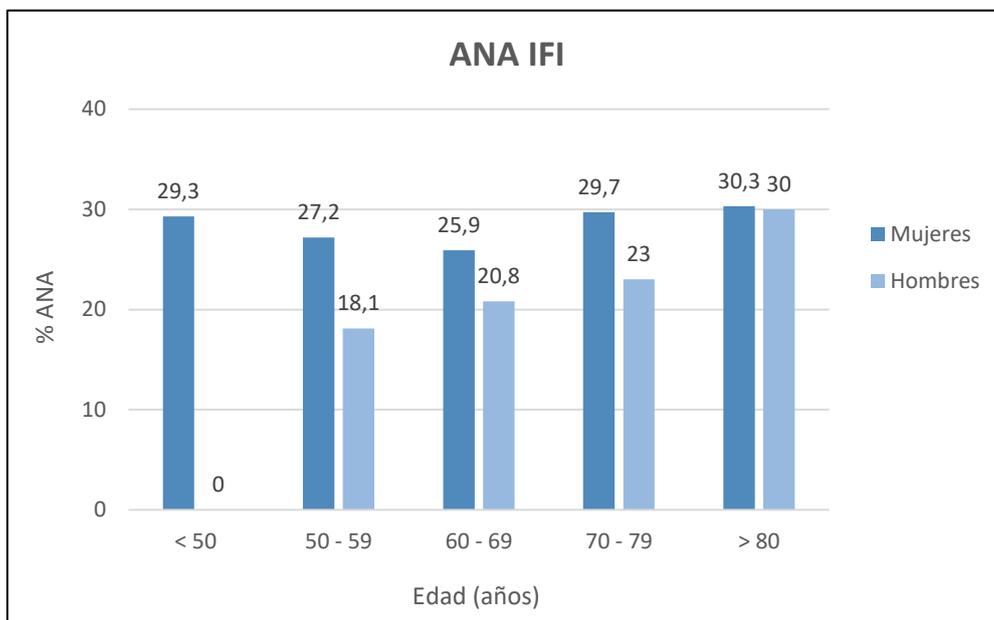
La **Figura 17** muestra una mayor frecuencia de resultados positivos para ANA mediante IFI en el grupo de mujeres (27,8%), con respecto a los varones (21,3%), siendo el resultado significativo ( $p < 0,0001$ ).

En las **Figuras 18** y **19**, con ambos EFS (ANA Screen y CTD Screen) donde encontramos una frecuencia de positivos en mujeres del 14,5% y 8,5%, y de hombres del 10,9% y 5,5%, también significativos con  $p = 0,005$  y  $p = 0,003$ , respectivamente.

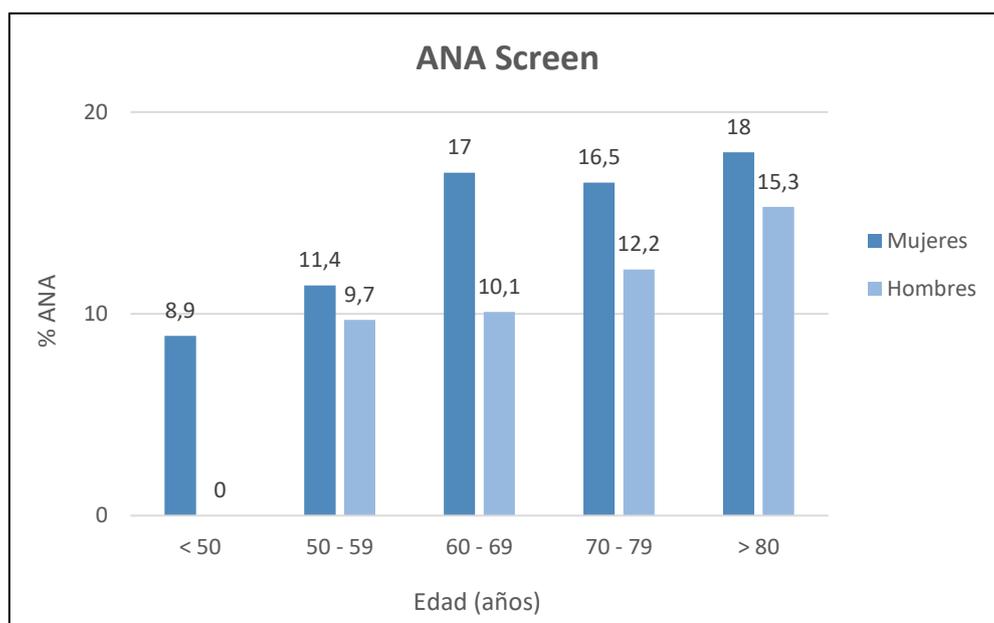
## RESULTADOS

Cuando además del *sexo* se tuvo en cuenta la *edad*, la prevalencia de ANA fue aumentando en ambos sexos a medida que lo hacía la edad. Este incremento fue más marcado cuando se usaron ambos EFS (ANA Screen y CTD Screen) (**Figuras 20, 21 y 22**)

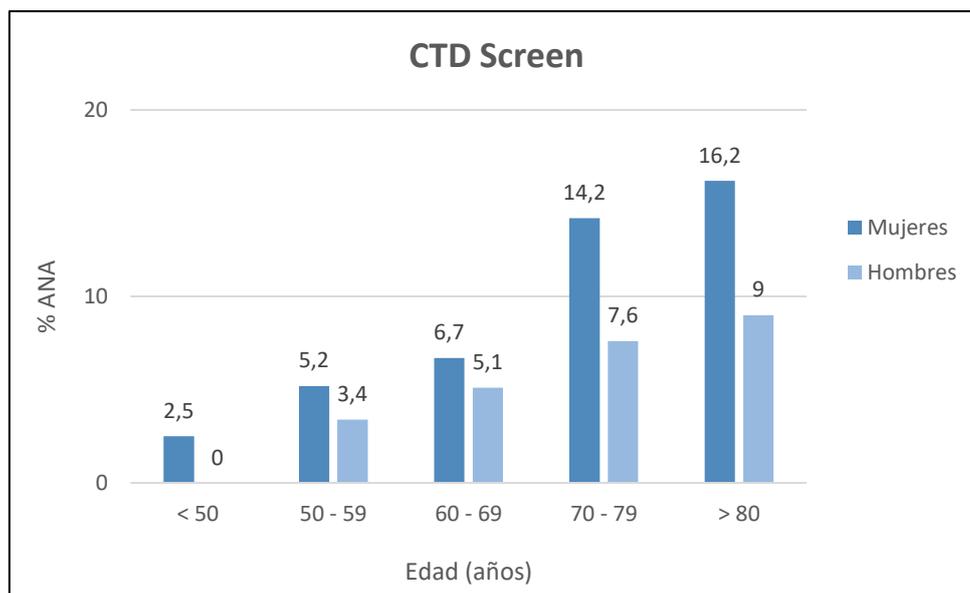
**Figura 20:** Porcentaje de ANA + estratificados por edad y sexo, mediante IFI



**Figura 21:** Porcentaje de ANA + estratificado por edad y sexo, mediante ANA Screen



**Figura 22:** Porcentaje de ANA + estratificados por edad y sexo, utilizando CTD Screen



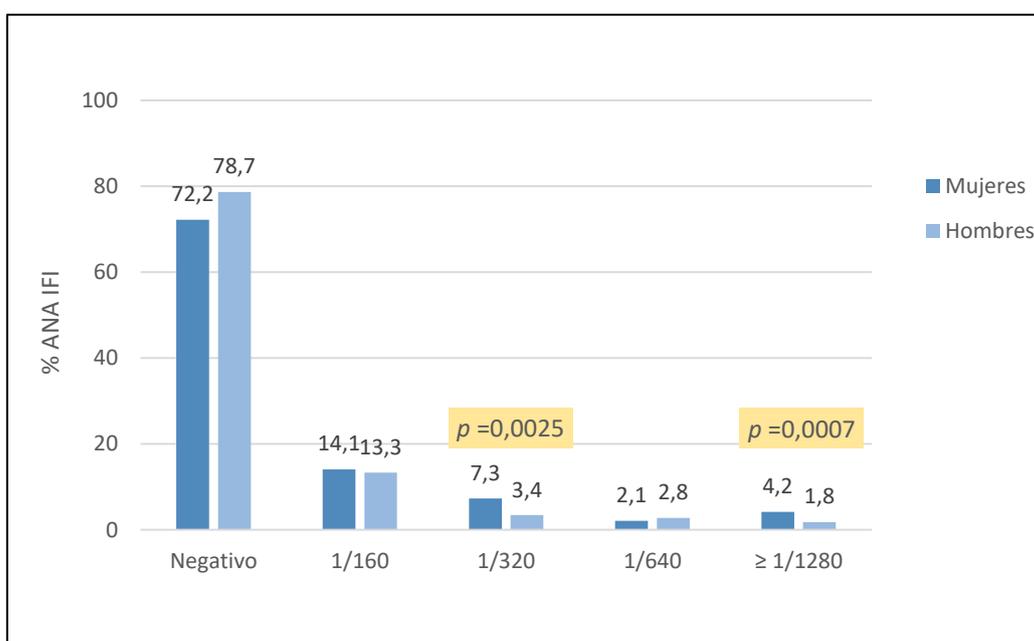
La **Figura 20** muestra un mayor porcentaje de resultados positivos de ANA, determinados por IFI, en las mujeres que en los varones, principalmente con el aumento de la edad. Se puede observar un mayor porcentaje, tanto en mujeres como en hombres mayores de 80 años, con un 30,3% y 30%, respectivamente. Seguidos del rango de edad entre 70-79 años, con un 29,7% y 23%, respectivamente.

En las **Figuras 21 y 22**, se observa que con las técnicas EFS, el porcentaje de positividad de los ANA aumenta con la edad en ambos sexos., con porcentajes más altos en el grupo de las mujeres. Con las técnicas ANA Screen y CTD screen los resultados siguen también este mismo patrón etario y de sexo, aunque los porcentajes de positividad son más bajos que con la IFI.

## 4.2 Títulos de ANA por IFI en la Cohorte de estudio

Como se ha mostrado previamente, la mayoría de sujetos de ambos sexos mostraron un resultado negativo de ANA. En aquellos en los que se observó una positividad mediante IFI, los ANA se detectaron principalmente a títulos bajos (1/160 y 1/320) (**Figura 23**)

**Figura 23:** Porcentaje de títulos de ANA + mediante IFI estratificados por sexo

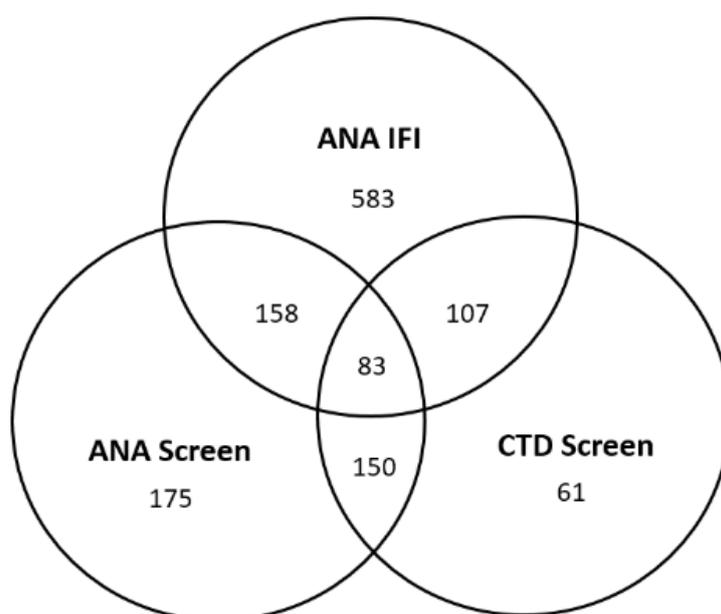


Sólo el 5,72% de los participantes presentaron ANA+ a títulos altos: 1/640 o 1/1280. Cuando se estratificó por sexo, las mujeres tuvieron mayor porcentaje de ANA a títulos de 1/320 respecto a los varones (7,3% frente 3,4%; p=0,0025); y el porcentaje de títulos altos > 1/1280) fue también superior en las mujeres (4,2% vs. 1,8%; p=0,0007).

### **4.3 Resultados positivos para ANA mediante los métodos de inmunofluorescencia indirecta, ANA Screen y CTD Screen**

Debido a la diferente sensibilidad de cada método de laboratorio para la detección de ANA, es relevante saber si la presencia de estos autoanticuerpos fue detectada por 1, 2 o los 3 métodos analizados en cada uno de los sujetos. El resultado se muestra en la **Figura 24**:

*Figura 24: Diagrama de Venn que muestra la confluencia de resultados positivos de ANA entre los sujetos con cualquier resultado positivo obtenido utilizando IFI, ANA Screen o CTD Screen*



El diagrama de Venn muestra los resultados de ANA+ utilizando los tres métodos por separado y en combinación. Se obtuvieron 583 resultados positivos con ANA IFI, 175 con ANA Screen y 61 con CTD Screen.

Los sujetos con resultados positivos para ANA mediante 2 técnicas diferentes: IFI y EFS (ANA Screen y CTD Screen) fueron 415. Además, se detectaron 83 individuos positivos para ANA utilizando los tres métodos por separado: IFI, ANA Screen y CTD Screen.

Esta triple positividad para la detección de ANA estaba significativamente asociada a la presencia de diferentes especificidades detectadas por ANA Screen. En concreto, la triple positividad para la detección de ANA se asoció significativamente con la presencia de anti-DNAc ( $p < 0,0001$ ), SSA/Ro60 ( $p < 0,0001$ ), Ro52 ( $p < 0,0001$ ), SSB/La ( $p < 0,0001$ ), RNP ( $p < 0,0001$ ), Scl70 ( $p = 0,009$ ) y anticuerpos CENP-B ( $p < 0,0001$ ). No se observó correlación con anti-Sm ( $p = 0,23$ ), Anticuerpos RNP68 ( $p = 0,82$ ) o P ribosomal ( $p = 0,13$ ).

#### **4.4 Implicaciones clínicas de los resultados de ANA**

Tras la revisión exhaustiva de las historias clínicas de los pacientes de la Cohorte Camargo, hasta marzo del año 2022 y tras un seguimiento de 11 a 16 años desde su inclusión en la Cohorte, observamos que algunos sujetos ya presentaban inicialmente enfermedades autoinmunes sistémicas (n=19), enfermedades autoinmunes órgano-específicas (n=54) y artritis reumatoide (n=26).

Aunque la mayoría de sujetos incluidos en el estudio no desarrollaron ninguna enfermedad autoinmune durante el seguimiento (**Tabla 4**), 107 sujetos sí que desarrollaron algún tipo de proceso autoinmune: EAS (n= 15), EAOE (n=62) y AR (n=30).

Dentro de las EAS, las más prevalentes fueron el síndrome de Sjögren, el lupus eritematoso sistémico y la esclerosis sistémica. Respecto a las órgano-específicas las tres más frecuentes fueron la tiroiditis de Hashimoto, la enfermedad de Graves y el vitíligo.

El resultado total de pacientes con EAS, EAOE y AR —sumando los pacientes con enfermedad ya diagnosticadas en el momento de la inclusión y durante el seguimiento—, fue de 34, 116 y 56, respectivamente, lo que hace un total de 206 pacientes detectados con alguna de las tres formas de enfermedad en el estudio desde su inclusión hasta el final del seguimiento, en 2022.

**Tabla 4:** Principales EAS incluidas en el estudio

<b>Enfermedades</b>			
<b>Enfermedades autoinmunes sistémicas (%)</b>			
	Basal (n=19)	Seguimiento (n=15)	Total (n=34)
<b>Síndrome de Sjögren, n (%)</b>	10 (52.6)	3 (20.0)	13 (38.2)
<b>Lupus eritematoso sistémico, n (%)</b>	7 (36.8)	3 (20.0)	10 (29.4)
<b>Esclerosis sistémica, n (%)</b>	2 (10.6)	3 (20.0)	5 (14.7)
<b>Enfermedad conectiva indeterminada, n (%)</b>	—	4 (26.7)	4 (11.8)
<b>Síndrome de CREST, n (%)</b>	—	2 (13.3)	2 (5.9)
<b>Enfermedades autoinmunes órgano-específicas (%)</b>			
	Basal (n=54)	Seguimiento (n=62)	Total (n=116)
<b>Tiroiditis de Hashimoto, n (%)</b>	24 (44.4)	30 (48.4)	54 (46.6)
<b>Enfermedad de Graves, n (%)</b>	10 (18.5)	10 (16.1)	20 (17.2)
<b>Vitíligo, n (%)</b>	6 (11.1)	3 (4.8)	9 (7.8)
<b>Neurológicas autoinmunes, n (%)</b>	5 (9.3)	5 (8.1)	10 (8.6)
<b>Hematológicas autoinmunes, n (%)</b>	3 (5.6)	2 (3.2)	5 (4.3)
<b>Diabetes Mellitus Tipo 1, n (%)</b>	2 (3.7)	—	2 (1.7)
<b>Púrpura trombocitopénica idiopática, n (%)</b>	2 (3.7)	4 (6.5)	6 (5.2)
<b>Hepatitis autoinmune, n (%)</b>	1 (1.9)	2 (3.2)	3 (2.6)
<b>Mixto, n (%)</b>	1 (1.9)	1 (1.6)	2 (1.7)
<b>Colangitis biliar primaria, n (%)</b>	—	4 (6.5)	4 (3.4)
<b>Enfermedad relacionada con IgG4, n (%)</b>	—	1 (1.6)	1 (0.9)
	Basal	Seguimiento	Total
<b>Artritis reumatoide, n</b>	26	30	56

La frecuencia de pacientes con EAS detectada por cada uno de los métodos (IFI, ANA Screen y CTD Screen) se muestran en la **Tabla 5**.

**Tabla 5:** Resultados de las tres pruebas de detección de ANA en EAS

<b>Enfermedad autoinmune sistémica (n=34)</b>	ANA IFI N (%)	ANA Screen N (%)	CTD Screen N (%)
<b>Síndrome de Sjögren (n=13)</b>	6 (46.2)	7 (53.8)	7 (53.8)
<b>Lupus eritematoso sistémico (n=10)</b>	9 (90)	7 (70)	8 (80)
<b>Esclerosis sistémica (n=5)</b>	4 (80)	5 (100)	4 (80)
<b>Enfermedad conectiva indeterminada (n=4)</b>	4 (100)	3 (75)	2 (50)
<b>Síndrome de CREST (n=2)</b>	2 (100)	2 (100)	2 (100)

Se detectaron 34 sujetos con EAS. Clasificados de mayor a menor prevalencia encontramos el síndrome de Sjögren (n=13), el lupus eritematoso sistémico (n=10), la esclerosis sistémica (n=5), la conectivopatía de tipo indeterminado (n=4) y en último lugar el síndrome de CREST (n=2).

Se puede observar que para el SS el mayor rendimiento diagnóstico lo tuvieron ambos EFS (ANA Screen y CTD Screen) con un 53,8% cada uno. En el caso del LES el mejor rendimiento lo obtuvo la IFI (90%), seguido de CTD Screen (80%); en el caso de la ES el mejor rendimiento lo obtuvo el ANA Screen (100%). En la enfermedad mixta del tejido conectivo, la IFI presentó un rendimiento diagnóstico del 100% con IFI respecto al ANA Screen con un 75% y el CTD Screen con un 50%. Finalmente, en el caso del síndrome de CREST el rendimiento diagnóstico fue del 100% con los tres métodos.

La **Tabla 6** muestra los resultados de ANA obtenidos por cada método en función del grupo al que pertenecen.

La IFI detectó positividad para ANA en el 67,6%, 38,1% y el 37,5% de los sujetos que presentaron al inicio o desarrollaron durante el seguimiento una EAS, EAOE o AR. El mayor porcentaje lo obtuvimos para las EAS.

Respecto a los EFS (tanto ANA Screen como CTD Screen) el número de sujetos en los que se encontraron autoanticuerpos fue similar cuando se consideraron las EAS, pero menor en el caso de las EAOE o AR, en comparación con IFI.

Se puede observar el impacto clínico de los resultados obtenidos en aquellos sujetos con resultado positivo usando dos EFS o la combinación de los tres métodos para la detección de ANA. En nuestro estudio obtuvimos un resultado superior con el uso de dos EFS frente a su combinación con IFI principalmente para EAS, menor diferencia para EAOE e igual para AR.

La triple positividad para ANA se asoció con el diagnóstico de EAS al inicio ( $p < 0,0001$ ) o después del período de seguimiento ( $p < 0,0001$ ), así como con el diagnóstico de EAOE o AR al inicio del estudio ( $p = 0,016$  y  $p = 0,001$ , respectivamente) pero no después del seguimiento ( $p = 0,25$  y  $p = 0,20$ , respectivamente).

**Tabla 6:** Pacientes que presentaban una EAS al inicio o la desarrollaron según los resultados de las pruebas de ANA realizadas por IFI o EFS (ANA Screen, CTD Screen)

	ANA IFI (n=2.997)		ANA screen (n=2.941)		CTD screen (n=2.985)		ANA screen + CTD screen (n=150)	ANA IFI + ANA screen + CTD screen (n=83)	p
	+	-	+	-	+	-			
<b>Enfermedades autoinmunes sistémicas</b>									
Total (n=34)	23 (67.6)	11 (32.4)	22 (64.7)	9 (26.5)	21 (61.8)	13 (38.2)	18 (52.9)	15 (44.1)	—
Basal (n=19)	12 (63.2)	7 (36.8)	12 (63.2)	5 (26.3)	13 (68.4)	6 (31.6)	10 (52.6)	9 (47.4)	<0.0001
Seguimiento (n=15)	11 (73.3)	4 (26.7)	10 (66.7)	4 (26.7)	8 (53.3)	7 (46.7)	8 (53.3)	7 (46.7)	<0.0001
<b>Enfermedades autoinmunes órgano-específicas</b>									
Total (n=116)	43 (38.1)	70 (61.9)	18 (16.4)	80 (72.7)	12 (10.6)	95 (84.1)	10 (8.8)	7 (6.2)	—
Basal (n=54)	18 (33.3)	36 (66.7)	11 (20.8)	35 (66.0)	8 (14.8)	45 (83.3)	6 (11.1)	5 (9.3)	0.016
Seguimiento (n=62)	27 (43.5)	35 (56.5)	8 (13.3)	46 (76.7)	5 (8.1)	52 (83.9)	4 (6.4)	3 (4.8)	0.25
<b>Artritis reumatoide</b>									
Total (n=56)	21 (37.5)	35 (62.5)	15 (27.3)	40 (72.7)	7 (12.5)	47 (83.9)	7 (12.5)	7 (12.5)	—
Basal (n=26)	10 (38.5)	16 (61.5)	7 (26.9)	19 (73.1)	5 (19.2)	21 (80.8)	5 (19.2)	5 (19.2)	<0.0001
Seguimiento (n=30)	11 (36.7)	19 (63.3)	8 (27.6)	21 (72.4)	2 (6.7)	26 (86.7)	2 (6.6)	2 (6.6)	0.20
<b>Sin conectivopatía</b>									
Total (n=2808)	697 (24.8)	2.111 (75.2)	356 (12.9)	2.303 (83.6)	204 (7.3)	2.516 (90.0)	125 (4.4)	62 (2.2)	—

Los resultados se muestran en números y porcentajes (entre paréntesis). No se incluyen pacientes con resultados indeterminados.  
 Abreviaturas: ANA anticuerpos antinucleares, IFI inmunofluorescencia indirecta, CTD enfermedad del tejido conectivo.

La **Tabla 7** muestra el rendimiento de cada método de cribado para ANA.

El ANA Screen, usando ALBIA, presentó una alta sensibilidad para la detección de ANA en pacientes con EAS (70,9%), seguida de IFI (67,7%) y CTD Screen por FEIA (61,8%).

Por el contrario, ambos EFS (ANA Screen y CTD Screen) mostraron una mayor especificidad (86,6% y 92,5%, respectivamente) que IFI (75,2%). Además, estos ensayos presentaron mayor valor predictivo positivo (VPP) (5,8% y 9,3%, respectivamente) y razón de verosimilitud positiva (RV+) (5,30 y 8,24) en comparación con IFI (VPP 3,2% y RV 2,73).

Para triple positividad, la RV+ es 20,9 (IC 95%, 13,3–32,8) y RV- 0,57 (IC 95%, 0,42-0,77). Los números correspondientes para la doble positividad (ANA Screen + CTD Screen) son: RV+, 12.4 (IC 95%, 8,7-17,8) y RV- 0,49 (IC 95%, 0,34-0,70).

**Tabla 7:** Índices epidemiológicos de los tres métodos de detección de ANA en pacientes con EAS

	Sensibilidad (IC 95%)	Especificidad (IC 95%)	VPP (IC 95%)	VPN (IC 95%)	RV + (IC 95%)	RV - (IC 95%)	Youden index
<b>ANA IFI</b>							
Total	67.7 (50.5-84.8)	75.2 (73.6-76.8)	3.2 (1.8-4.6)	99.5 (99.2-99.8)	2.73 (2.14-3.47)	0.43 (0.26-0.70)	0.43 (0.27-0.59)
Basal	63.2 (38.8-87.5)	75.2 (73.5-76.8)	1.7 (0.7-2.7)	99.7 (99.4-99.9)	2.54 (1.79-3.61)	0.49 (0.27-0.88)	0.38 (0.17-0.60)
Seguimiento	73.3 (47.6-99.1)	75.2 (73.6-76.8)	1.6 (0.6-2.5)	99.8 (99.6-100.0)	2.95 (2.16-4.04)	0.35 (0.15-0.82)	0.49 (0.26-0.71)
<b>ANA screen</b>							
Total	70.9 (53.4-88.6)	86.6 (85.3-87.9)	5.8 (3.3-8.3)	99.6 (99.3-99.9)	5.30 (4.15-6.77)	0.34 (0.19-0.58)	0.58 (0.42-0.74)
Basal	70.6 (45.9-95.2)	86.6 (85.3-87.9)	3.3 (1.3-5.2)	99.8 (99.6-99.9)	5.27 (3.82-7.27)	0.34 (0.16-0.71)	0.57 (0.36-0.79)
Seguimiento	71.4 (44.2-98.7)	86.6 (85.3-87.9)	2.7 (0.9-4.5)	99.8 (99.6-100.0)	5.34 (3.78-7.53)	0.33 (0.14-0.76)	0.58 (0.34-0.82)
<b>CTD screen</b>							
Total	61.8 (43.9-79.6)	92.5 (91.5-93.5)	9.3 (5.3-13.4)	99.5 (99.2-99.8)	8.24 (6.13-11.1)	0.41 (0.27-0.63)	0.54 (0.38-0.71)
Basal	68.4 (44.9-91.9)	92.5 (91.5-93.5)	5.9 (2.6-9.4)	99.8 (99.6-99.9)	9.12 (6.54-12.7)	0.34 (0.18-0.66)	0.61 (0.40-0.82)
Seguimiento	53.3 (24.8-81.9)	92.5 (91.5-93.5)	3.8 (0.9-6.6)	99.7 (99.5-99.9)	7.11 (4.35-11.6)	0.50 (0.29-0.87)	0.46 (0.21-0.71)

*Abreviaturas:* ANA anticuerpos antinucleares, IFI inmunofluorescencia indirecta, CTD enfermedad del tejido conectivo, IC intervalo de confianza, VPP valor predictivo positivo, VPN valor predictivo negativo, RV razón de verosimilitud.

La **Tabla 8** muestra la prevalencia de los autoanticuerpos específicos detectados por ANA Screen

**Tabla 8:** Prevalencia de los autoanticuerpos específicos detectados por ANA Screen

ANA Screen (ALBIA)	n (%)
Negativo	2430 (82.6)
Indeterminado	111 (3.8)
Positivo	400 (13.6)
• RNP-A	154 (5.2)
• dsDNA	114 (3.9)
• SSA	51 (1.7)
• SSA/Ro60	36 (1.2)
• Scl-70	30 (1.0)
• Ro52	28 (1.0)
• SSB/La	26 (0.9)
• Cromatina	25 (0.9)
• Sm/RNP	23 (0.8)
• Centrómero B	16 (0.5)
• Sm	9 (0.3)
• RNP-68	7 (0.2)
• Ribosomal P	5 (0.2)
• DFS70	2 (0.1)
• Jo-1	0 (0.0)

Con la técnica de ANA screen de ALBIA se obtuvieron un total de 400 positivos (13,6% de la muestra). Entre los resultados positivos, destaca en primer lugar los Ac anti-RNP-A con 154 casos (5,2%) seguidos de los anti-DNAc con 114 (3,9%) y de los Ac anti-SSA (1,7%). Siguen en orden de frecuencia los anti-SSA/Ro60 con 36 casos (1,2%) y los Ac anti-Scl-70 con 30 (1%). El resto de resultados positivos distan mucho de los comentados previamente. Un 3,8% (n=111) de los ANA fueron indeterminados y 2430 determinaciones (82,6%) fueron negativas.

**4.5 Prevalencia de ANA según los tres ensayos de laboratorio y su asociación con características sociodemográficas**

Las variables sociodemográficas de los sujetos incluidos en el estudio se muestran en la **Tabla 9**.

*Tabla 9: Variables demográficas en los sujetos de estudio, estratificado por sexo*

	<b>Total</b>	<b>Mujeres</b>	<b>Hombres</b>	<b>P</b>
<b>Edad (años), media ± DE</b>	64.7 ± 10.6	64.2 ± 11.2	65.5 ± 9.5	0.001
<b>Sexo, n (%)</b>	2997	1941 (64.8)	1056 (35.2)	< 0.001
<b>Nivel educativo, n (%)</b>				
<i>Ninguno</i>	43 (1.5)	32 (1.7)	11 (1.1)	0.24
<i>Primaria</i>	2148 (73.9)	1419 (75.7)	729 (70.7)	0.02
<i>Secundaria</i>	479 (16.5)	313 (16.7)	166 (16.1)	0.81
<i>Formación Profesional</i>	106 (3.6)	43 (2.3)	63 (6.1)	< 0.001
<i>Universitario</i>	126 (4.3)	66 (3.5)	60 (5.8)	0.004
<b>Ejercicio, n (%)</b>				
<i>Sedentario</i>	155 (5.2)	122 (6.4)	33 (3.1)	< 0.001
<i>Moderado</i>	1237 (41.6)	907 (47.3)	330 (31.4)	< 0.001
<i>Intenso</i>	1578 (73.1)	889 (46.4)	689 (65.5)	< 0.001
<b>Tabaquismo, n (%)</b>	442 (14.7)	243 (12.5)	199 (18.8)	< 0.001
<b>Diabetes mellitus, n (%)</b>	437 (14.6)	227 (11.7)	210 (19.9)	< 0.001
<b>Hipertensión arterial, n (%)</b>	1364 (45.5)	846 (43.6)	517 (49.0)	0.005
<b>Dislipemia, n (%)</b>	917 (30.6)	554 (28.5)	363 (34.4)	0.001
<b>IMC (Kg/m<sup>2</sup>), media ± DE</b>	28.9±4.5	28.7±5.0	29.0 ± 3.5	0.09
<b>Consumo de alcohol, n (%)</b>	741 (24.7)	226 (11.6)	515 (48.8)	< 0.001
<b>PCR (mg/dl), mediana (IQR)</b>	0.47 ± 0.85	0.46 ± 0.74	0.50 ± 1.0	0.09
<b>Abreviaturas: DE</b> desviación estándar, <b>IMC</b> índice de masa corporal, <b>IQR</b> rango intercuartílico, <b>PCR</b> proteína C reactiva				

El porcentaje de mujeres fue significativamente mayor que el de varones. Dentro de las variables estudiadas, las mujeres presentaron un mayor porcentaje de estudios primarios, así como de sedentarismo y de realización de ejercicio físico moderado, respecto a los varones. Los hombres fueron significativamente de mayor edad, presentaron un mayor porcentaje de estudios de formación profesional y universitaria, realizaban más ejercicio físico intenso y tenían más factores de riesgo cardiovascular (tabaquismo, diabetes, hipertensión arterial, dislipemia) y consumían más alcohol.

## RESULTADOS

La prevalencia de ANA + en los sujetos de la Cohorte Camargo, utilizando los tres métodos de detección de ANA, considerando las diferentes características sociodemográficas, se muestra en la **Tabla 10**.

**Tabla 10:** Prevalencia de ANA en relación con los tres métodos de cribado y su asociación con las variables sociodemográficas de los sujetos en la Cohorte Camargo

Variable	ANA IFI + n=2997	<i>p</i>	ANA Screen + n=2941	<i>p</i>	CTD Screen + n=2985	<i>p</i>
<b>Total, n (%)</b>	774 (25.8)	-	400 (13.6)	-	235 (7.9)	-
<b>Edad (años), n (%)</b>		0.10		0.01		0.0001
<50	25 (30.1)		8 (10.0)		3 (3.7)	
50-59	266 (24.7)		119 (11.2)		52 (4.9)	
60-69	217 (24.1)		127 (14.3)		58 (6.5)	
70-79	171 (27.5)		94 (15.5)		78 (12.6)	
≥80	95 (30.0)		52 (16.8)		44 (13.9)	
<b>Sexo, n (%)</b>		0.0001		0.003		0.003
<i>Hombres</i>	226 (21.4)		114 (11.0)		59 (5.6)	
<i>Mujeres</i>	548 (28.2)		286 (15.0)		176 (9.1)	
<b>Nivel educativo, n (%)</b>		0.47		0.51		0.21
<i>Ninguno</i>	12 (27.9)		5 (11.9)		10 (23.3)	
<i>Primaria</i>	558 (26.0)		228 (13.7)		171 (8)	
<i>Secundaria</i>	117 (24.4)		64 (13.6)		29 (6.1)	
<i>Formación Profesional</i>	26 (24.5)		14 (13.6)		6 (5.7)	
<i>Universitario</i>	29 (23.0)		17 (13.5)		9 (7.1)	
<i>n</i> : refleja el número de sujetos dentro de la muestra. %: refleja el porcentaje de sujetos de cada subgrupo. *valor <i>p</i> (excluyendo análisis de sexo) para cada técnica ANA						
<i>Abreviaturas</i> : ANA anticuerpos antinucleares, IFI inmunofluorescencia indirecta						

Respecto a la edad, y como se ha mostrado previamente, la prevalencia de ANA+ aumentaba con la edad, independientemente del método utilizado, aunque este aumento fue más evidente cuando se utilizaron EFS, en primer lugar, ANA Screen y en segundo lugar CTD Screen, con resultados significativos para la detección de autoanticuerpos ( $p=0,01$  y  $p<0,001$ , respectivamente).

Asimismo, independientemente del método empleado para la detección de ANA, el porcentaje de resultados positivos fue mayor en mujeres que en varones: IFI (28,2%;  $p=0,0001$ ), ANA Screen (15%;  $p=0,003$ ) y CTD Screen (9,1%;  $p=0,003$ ).

Cuando se consideró el nivel educativo, no se observaron diferencias en la prevalencia de ANA+. No obstante, utilizando IFI o CTD Screen se observó una mayor frecuencia, aunque no significativa, de resultados positivos para ANA, en el subgrupo de sujetos sin ningún estudio.

**4.6 Prevalencia de ANA + con IFI, ANA Screen y CTD Screen y su asociación con el estilo de vida, IMC y PCR**

Se observaron varias diferencias en la prevalencia de ANA según las características seleccionadas en relación a los hábitos de vida (**Tabla 11**)

*Tabla 11: Prevalencia estimada de ANA en la Cohorte Camargo en relación al IMC, hábitos tóxicos, actividad física y PCR*

Variable	ANA IFI + n (%)	p*	ANA screen + n (%)	p*	CTD screen + n (%)	p*
<b>IMC (Kg/m<sup>2</sup>), n (%)</b>		0.98		0.90		0.52
<20	0 (0.0)		0 (0.0)		0 (0.0)	
20-25	146 (26.8)		72 (13.6)		43 (8.1)	
25.01 – 29.99	326 (25.0)		168 (13.1)		77 (5.9)	
≥30	263 (26.0)		137 (13.8)		91 (9.0)	
<b>Tabaquismo, n (%)</b>		0.08		0.93		0.35
Actual	118 (26.7)		54 (12.4)		21 (4.8)	
Ex	154 (22.7)		82 (12.4)		39 (5.8)	
No	502 (26.8)		264 (14.3)		175 (9.4)	
<b>Consumo de alcohol, n (%)</b>		0.11		0.06		0.008
Actual	172 (23.2)		81 (11.1)		35 (4.7)	
Ex	62 (26.5)		34 (14.9)		22 (9.5)	
No	540 (26.7)		285 (14.4)		178 (8.8)	
<b>Actividad física, n (%)</b>		0.03		0.96		0.01
Sedentario	50 (32.3)		29 (19.2)		24 (15.5)	
Moderado	330 (26.7)		160 (13.1)		101 (8.2)	
Intenso	387 (24.5)		207 (13.4)		109 (6.9)	
<b>PCR (mg/dl), n (%)</b>		0.07		0.48		0.01
< 0.10	236 (24.8)		105 (11.2)		51 (5.4)	
0.10-0.49	313 (25.5)		185 (15.3)		109 (8.9)	
0.50-1.0	106 (27.7)		48 (12.9)		30 (7.9)	
> 1.0	70 (30.0)		32 (14.2)		26 (11.2)	

n: refleja el número de sujetos dentro de la muestra. %: refleja el porcentaje de sujetos de cada subgrupo. \*p es la tendencia para cada técnica de ANA  
**Abreviaturas:** ANA anticuerpos antinucleares, IFI inmunofluorescencia indirecta, IMC índice de masa corporal, PCR proteína C reactiva

Si bien no se observaron diferencias significativas en la prevalencia de ANA+ según el IMC, ésta si varió en función de la actividad física y el consumo de alcohol de los sujetos incluidos en el estudio.

En concreto, los resultados positivos de ANA fueron más frecuentes en los participantes con un estilo de vida sedentario, en comparación con los que realizaban una actividad física moderada o intensa. Estos resultados se observaron cuando la detección de ANA se hizo mediante IFI (p=0,03) y CTD Screen (p=0,01). Asimismo, esta tendencia también se observó utilizando ANA Screen, aunque sin alcanzar una diferencia significativa.

En cuanto al consumo de alcohol, independientemente del método utilizado para la detección de ANA, la prevalencia de ANA+ fue mayor en exbebedores y en no consumidores, en

comparación con los sujetos con consumo de alcohol activo. Sin embargo, de los tres métodos utilizados, sólo el cribado con CTD Screen halló diferencias significativas en ambos grupos ( $p=0,008$ ).

Cuando se analizó la prevalencia de ANA+ respecto al hábito tabáquico, se halló una mayor frecuencia de resultados positivos en sujetos no fumadores, independientemente del método de cribado empleado. Sin embargo, las diferencias no alcanzaron la significación estadística.

Finalmente, se observó un aumento significativo en la prevalencia de ANA+ en aquellos sujetos con niveles plasmáticos más altos de PCR, mediante CTD Screen ( $p=0,01$ ). Esta tendencia también se observó utilizando la IFI como método de detección de ANA+.

#### **4.7 Prevalencia de ANA + con IFI, ANA Screen y CTD Screen y su asociación con el estado civil**

La **Tabla 12** muestra la prevalencia de ANA+ obtenido con los tres métodos de cribado en relación al estado civil de los sujetos en la Cohorte Camargo.

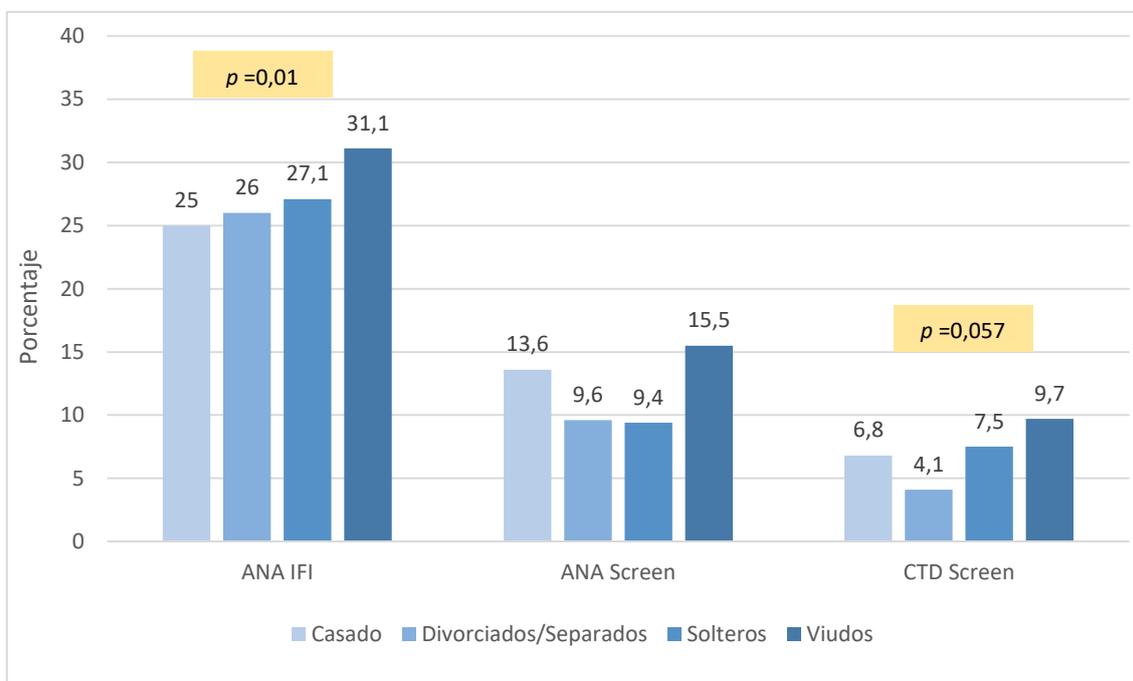
**Tabla 12:** Prevalencia de ANA en relación con los tres métodos de cribado y su asociación con el estado civil de los sujetos en la Cohorte Camargo

	Casados	Divorciados/Separados	Solteros	Viudos
<b>IFI</b> <i>p =0,06</i>	468 (25)	19 (26)	29 (27,1)	125 (31,1)
<b>ANA Screen</b> <i>p= 0,61</i>	253 (13,6)	7 (9,6)	10 (9,4)	60 (15,5)
<b>CTD Screen</b> <i>p =0,53</i>	128 (6,8)	3 (4,1)	8 (7,5)	39 (9,7)
<i>n: refleja el número de sujetos dentro de la muestra. %: refleja el porcentaje de sujetos en cada subgrupo. ANA IFI: p de tendencia =0.06; ANA Screen: p de tendencia =0.61; CTD Screen: p de tendencia =0.53</i>				

En relación con la asociación de ANA+ con el estado civil, si bien no obtuvimos un resultado significativo con ningún método, la tendencia en todos ellos, y especialmente con ANA IFI, fue de un aumento progresivo en la prevalencia de ANA en divorciados, solteros y viudos; siendo el grupo de casados el que tuvo menor prevalencia.

**4.8 Frecuencia de ANA según el estado civil**

**Figura 25:** Porcentaje de ANA + estratificado por el estado civil, mediante ANA IFI, ANA Screen y CTD Screen



La figura muestra un mayor porcentaje de resultados positivos de ANA, determinados por IFI ( $p=0.01$ ), en los sujetos divorciados, solteros y viudos, con un 26%, 27,1% y 31,1%, respectivamente. Siendo el grupo de casados el de menor porcentaje con un 25%. Esta tendencia también la observamos con el método de CTD Screen ( $p=0.057$ ).

#### **4.9 Prevalencia de títulos de ANA por IFI y su asociación con diferentes características sociodemográficas**

La prevalencia de ANA determinados por IFI, considerando los diferentes títulos de anticuerpos observados, mostró diferentes asociaciones con diferentes variables sociodemográficas. En concreto, se consideró ANA+ los títulos  $\geq 1/160$ , y también se tuvo en cuenta el título específico obtenido.

**Tabla 13:** Frecuencia de resultados positivos de ANA por IFI estratificado por edad

	<50 años	50-59 años	60-69 años	70-79 años	$\geq 80$ años
ANA negativo, n (%)	58 (69.9)	808 (75.2)	683 (75.9)	451 (72.5)	222 (70.0)
ANA + 1/160, n (%)	11 (13.3)	149 (13.9)	128 (14.2)	80 (12.9)	45 (14.2)
ANA + >1/160, n (%)	14 (16.9)	118 (11.0)	89 (9.9)	91 (14.6)	50 (15.8)
ANA + 1/320, n (%)	7 (8.4)	67 (6.2)	38 (4.2)	42 (6.8)	27 (8.5)
ANA + 1/640, n (%)	2 (2.4)	19 (1.8)	19 (2.1)	21 (3.4)	9 (2.8)
ANA + 1/1280, n (%)	2 (2.4)	14 (1.3)	19 (2.1)	13 (2.1)	6 (1.9)
ANA + >1/1280, n (%)	3 (3.6)	17 (1.6)	12 (1.3)	15 (2.4)	8 (2.5)

*n*: refleja el número de sujetos dentro de la muestra. %: refleja el porcentaje de sujetos en cada subgrupo. Valor *p* de tendencia= 0.02  
*Abreviaturas*: ANA, anticuerpos antinucleares

Como podemos observar en la **Tabla 13**, cuando se estratificó la población de estudio por *edad*, se obtuvo una alta frecuencia de resultados negativos en todos los grupos etarios, debido a la baja probabilidad pre-test de los sujetos incluidos, variando del 69,9% para los sujetos menores de 50 años hasta el 75,9% para aquellos de 60 a 69 años. Cuando los resultados de ANA se estratificaron en títulos negativos, positivos 1/160 o >1/160 y se analizaron en todos los estratos de edad, la *p* de tendencia fue de + 0,036.

**Tabla 14:** Frecuencia de resultados ANA positivos por IFI estratificado por sexo

	Hombres	Mujeres	<i>p</i>
ANA negativo, n (%)	830 (78.6)	1392 (71.7)	<0.0001
ANA + 1/160, n (%)	141 (13.4)	272 (14.0)	0.66
ANA + >1/160, n (%)	85 (8.0)	277 (14.3)	<0.0001
ANA + 1/320, n (%)	36 (3.4)	145 (7.5)	<0.0001
ANA + 1/640, n (%)	29 (2.7)	41 (2.1)	0.33
ANA + 1/1280, n (%)	14 (1.3)	40 (2.1)	0.19
ANA + >1/1280, n (%)	6 (0.6)	49 (2.5)	0.0002

*n*: refleja el número de sujetos dentro de la muestra. %: refleja el porcentaje de sujetos en cada subgrupo.  
*Abreviaturas*: ANA, anticuerpos antinucleares

## RESULTADOS

Considerando la prevalencia de ANA en función del sexo, se observó una frecuencia significativamente mayor de resultados negativos en los hombres ( $p < 0,0001$ ).

Aunque no se observaron diferencias significativas en la frecuencia de ANA positivos a 1/160, sí se observó un aumento significativo de títulos  $>1/160$  en mujeres ( $p < 0,0001$ ).

Específicamente, las mujeres mostraron un aumento significativo de resultados positivos para ANA a títulos de 1/320 y  $>1/1280$  en comparación con los hombres ( $p < 0,0001$  y  $p = 0,0002$ , respectivamente).

**Tabla 15:** Frecuencia de resultados ANA positivos por IFI estratificado por el nivel educativo

	Ninguno	Primaria	Secundaria	Formación Profesional	Universidad	$p$
ANA negativo, $n$ (%)	31 (72.1)	1590 (74.0)	361 (75.4)	80 (75.5)	97 (77.0)	0.87
ANA + 1/160, $n$ (%)	4 (9.3)	300 (14.0)	59 (12.3)	16 (15.1)	18 (14.3)	0.59
ANA + $>1/160$ , $n$ (%)	8 (18.6)	258 (12.0)	59 (12.3)	10 (9.4)	11 (8.7)	0.22
ANA + 1/320, $n$ (%)	5 (11.6)	129 (6.0)	29 (6.1)	4 (3.8)	7 (5.6)	0.19
ANA + 1/640, $n$ (%)	1 (2.3)	49 (2.3)	12 (2.5)	4 (3.8)	2 (1.6)	0.62
ANA + 1/1280, $n$ (%)	0 (0.0)	44 (2.0)	6 (1.3)	0 (0.0)	0 (0.0)	0.79
ANA + $>1/1280$ , $n$ (%)	2 (4.7)	35 (1.6)	11 (2.3)	2 (1.9)	2 (1.6)	0.38

*n*: refleja el número de sujetos dentro de la muestra. %: refleja el porcentaje de sujetos en cada subgrupo. Valor  $p$  de tendencia= 0.59.  
*Abreviaturas*: ANA anticuerpos antinucleares

Cuando se consideraron los diferentes títulos de ANA según el *nivel educativo* de los participantes (**Tabla 15**) no se observaron diferencias con una  $p$  de tendencia de 0,59. Respecto al *hábito tabáquico* (**Tabla 16**), sin embargo, la  $p$  de tendencia fue de 0,029.

**Tabla 16:** Frecuencia de resultados ANA positivos por IFI estratificado por el hábito tabáquico

	Actual	Ex	No
ANA negativo, $n$ (%)	323 (73.1)	525 (77.3)	1374 (73.2)
ANA + 1/160, $n$ (%)	60 (13.6)	95 (14)	258 (13.8)
ANA + $>1/160$ , $n$ (%)	59 (13.3)	59 (8.7)	244 (13)
ANA + 1/320, $n$ (%)	27 (6.1)	25 (3.7)	129 (6.9)
ANA + 1/640, $n$ (%)	13 (2.9)	16 (2.4)	41 (2.2)
ANA + 1/1280, $n$ (%)	10 (2.3)	9 (1.3)	35 (1.9)
ANA + $>1/1280$ , $n$ (%)	8 (1.8)	9 (1.3)	38 (2)

*n*: refleja el número de sujetos dentro de la muestra. %: refleja el porcentaje de sujetos en cada subgrupo. Valor  $p$  de tendencia =0.029.  
*Abreviaturas*: ANA, anticuerpos antinucleares.

## RESULTADOS

**Tabla 17:** Frecuencia de resultados ANA positivos por IFI estratificado por la ingesta de alcohol

	Actual	Ex	No
ANA negativo, n (%)	569 (76.8)	172 (73.5)	1482 (73.3)
ANA + 1/160, n (%)	98 (13.2)	36 (15.4)	280 (13.8)
ANA + >1/160, n (%)	74 (10.1)	26 (11.1)	260 (12.9)
ANA + 1/320, n (%)	34 (4.6)	12 (5.1)	135 (6.7)
ANA + 1/640, n (%)	24 (3.2)	3 (1.3)	43 (2.1)
ANA + 1/1280, n (%)	9 (1.2)	6 (2.6)	39 (1.9)
ANA + >1/1280, n (%)	7 (0.9)	5 (2.1)	43 (2.1)

*n: refleja el número de sujetos dentro de la muestra. %: refleja el porcentaje de sujetos en cada subgrupo. Valor p de tendencia =0.059.*  
*Abreviaturas: ANA, anticuerpos antinucleares.*

Además, considerando los títulos de ANA y la *ingesta de alcohol* (Tabla 17) o los cuartiles de PCR sérica (Tabla 18), se objetivó una tendencia a presentar títulos de ANA más bajos en los bebedores activos ( $p=0,059$ ) y títulos más altos en los sujetos con niveles de PCR en los cuartiles más altos ( $p=0,058$ ).

**Tabla 18:** Frecuencia de resultados ANA positivos por IFI estratificado por la PCR en cuartiles (mg/dl)

	<0.10	0.10-0.50	0.50-1.0	>1.0
ANA negativo, n (%)	716 (75.1)	915 (74.5)	276 (72.3)	163 (70.0)
ANA + 1/160, n (%)	132 (13.9)	168 (13.7)	49 (12.8)	39 (16.7)
ANA + >1/160, n (%)	105 (11.0)	145 (11.8)	57 (14.9)	31 (13.3)
ANA + 1/320, n (%)	52 (5.5)	76 (6.2)	29 (7.6)	14 (6.0)
ANA + 1/640, n (%)	18 (1.9)	30 (2.4)	13 (3.4)	4 (1.7)
ANA + 1/1280, n (%)	15 (1.6)	18 (1.5)	10 (2.6)	8 (3.4)
ANA + >1/1280, n (%)	18 (1.9)	21 (1.7)	5 (1.3)	5 (2.1)

*n: refleja el número de sujetos dentro de la muestra. %: refleja el porcentaje de sujetos en cada subgrupo. Valor p de tendencia =0.058.*  
*Abreviaturas: ANA anticuerpos antinucleares*

Cuando se consideraron los diferentes títulos de ANA en sujetos según su *actividad física* (Tabla 19), se observaron varias diferencias. Así, aunque no se observaron diferencias en ANA positivo a 1/160, la prevalencia de ANA positivo a títulos >1/160 fue significativamente mayor en sujetos sedentarios en comparación con los que realizaban alguna actividad física ( $p=0,0005$ ). Una vez estratificado los valores fueron significativos 1/320 y >1/1280 con  $p=0,01$  y  $p=0,02$ , respectivamente.

RESULTADOS

**Tabla 19:** Frecuencia de resultados ANA positivos por IFI estratificado por la actividad física

	Sedentario	Moderado	Intenso	<i>p</i>
ANA negativo, <i>n</i> (%)	105 (67.7)	907 (73.3)	1190 (75.4)	0.07
ANA + 1/160, <i>n</i> (%)	17 (11.0)	179 (14.5)	213 (13.5)	0.36
ANA + >1/160, <i>n</i> (%)	33 (21.3)	151 (12.2)	175 (11.1)	0.0005
ANA + 1/320, <i>n</i> (%)	17 (11.0)	70 (5.7)	94 (6.0)	0.01
ANA + 1/640, <i>n</i> (%)	3 (1.9)	32 (2.6)	35 (2.2)	0.93
ANA + 1/1280, <i>n</i> (%)	6 (3.9)	28 (2.3)	19 (1.2)	0.08
ANA + >1/1280, <i>n</i> (%)	7 (4.6)	21 (1.7)	26 (1.6)	0.02

*n*: refleja el número de sujetos dentro de la muestra. %: refleja el porcentaje de sujetos en cada subgrupo. Valor *p* para la tendencia =0.002  
 Los valores *p* representa la diferencia entre sujetos sedentarios y aquellos que realizan alguna actividad física  
 Abreviaturas: ANA anticuerpos antinucleares, valores *p* tendencia=0.002 (tres categorías para ejercicio)

**4.10 Prevalencia de la carga de anticuerpos y su asociación con características sociodemográficas**

La comparación entre la carga de anticuerpos observada en los sujetos de la Cohorte Camargo utilizando ANA Screen, que brinda información sobre 14 especificidades, y las características sociodemográficas y hábitos de vida seleccionadas se muestra en la **Tabla 20**.

*Tabla 20: Carga de anticuerpos mediante la prueba de detección ANA Screen según las características sociodemográficas y los hábitos de vida seleccionadas de los sujetos de la Cohorte Camargo*

	Carga de anticuerpos 0	Carga de anticuerpos 1	Carga de anticuerpos ≥2	p
<b>Total, n (%)</b>	2541 (86.4)	364 (12.4)	36 (1.2)	-
<b>Edad (años), n (%)</b>				0.001
<50	72 (90.0)	6 (7.5)	2 (2.5)	
50-59	939 (88.8)	112 (10.6)	7 (0.7)	
60-69	759 (85.7)	117 (13.2)	10 (1.1)	
70-79	513 (84.5)	83 (13.7)	11 (1.8)	
≥80	258 (83.2)	46 (14.8)	6 (1.9)	
<b>Sexo, n (%)</b>				0.001
Hombres	923 (89.0)	110 (10.6)	4 (0.4)	
Mujeres	1618 (85.0)	254 (13.3)	32 (1.4)	
<b>Nivel educativo, n (%)</b>				0.56
Ninguno	37 (88.1)	4 (9.5)	1 (2.4)	
Primaria	1816 (86.3)	258 (12.3)	30 (1.4)	
Secundaria	408 (86.4)	62 (13.1)	2 (0.4)	
Formación Profesional	89 (86.4)	14 (13.6)	0 (0.0)	
Universidad	109 (86.5)	15 (11.9)	2 (1.6)	
<b>IMC (Kg/m<sup>2</sup>), n (%)</b>				0.68
<20	4 (100)	0 (0.0)	0 (0.0)	
20-25	456 (86.4)	66 (12.5)	6 (1.1)	
25.01-29.99	1111 (86.9)	153 (12.0)	15 (1.2)	
≥30	854 (86.2)	123 (12.4)	14 (1.2)	
<b>Tabaquismo, n (%)</b>				0.62
Actual	382 (15.0)	49 (13.5)	5 (13.9)	
Ex	579 (22.8)	78 (21.4)	4 (11.1)	
No	1580 (62.2)	237 (65.1)	27 (75.0)	
<b>Consumo de alcohol, n (%)</b>				0.08
Actual	646 (25.4)	74 (20.3)	7 (19.4)	
Ex	194 (7.6)	34 (9.3)	0 (0.0)	
No	1701 (66.9)	256 (70.3)	29 (1.0)	
<b>Actividad física, n (%)</b>				0.17
Sedentario	122 (80.8)	26 (17.2)	3 (2.0)	
Moderado	1058 (86.9)	142 (11.7)	18 (1.5)	
Intenso	1339 (86.6)	193 (12.5)	14 (0.9)	
<b>PCR (mg/dl), n (%)</b>				0.11
<0.10	835 (88.8)	96 (10.2)	9 (1.0)	
0.10-0.49	1025 (84.7)	170 (14.0)	15 (1.2)	
0.50-1.0	324 (87.1)	40 (11.8)	8 (2.2)	
>1.0	193 (85.8)	29 (12.9)	3 (1.3)	

*n: refleja el número de sujetos dentro de la muestra. %: refleja el porcentaje de sujetos de cada subgrupo. "p" representa los valores de p para la tendencia, excepto el sexo (para cada categoría de carga de anticuerpos)*  
*Abreviaturas: IMC índice de masa corporal, PCR proteína C reactiva*

De acuerdo al número de autoanticuerpos, los sujetos se clasificaron de la siguiente manera: carga de anticuerpos 0 (sin autoanticuerpos; 86,4%), carga de anticuerpos 1 (un autoanticuerpo; 12,4 %) y carga de anticuerpos  $\geq 2$  (dos o más autoanticuerpos; 1,2 %).

Sólo se obtuvieron resultados estadísticamente significativos para las variables edad y sexo. Cuando se estratificó por *edad* se detectó una frecuencia creciente de cargas de 1 y  $\geq 2$  anticuerpos a medida que aumentaba la edad de los sujetos ( $p=0,001$ ). Cuando se estratificó por *sexo* a los participantes, se observó una frecuencia significativamente mayor de resultados positivos en las mujeres (carga de 1 y  $\geq 2$  anticuerpos).

Observamos una tendencia creciente, aunque no significativa, en la carga de anticuerpos de los sujetos no bebedores en comparación con los bebedores activos. Del resto de características sociodemográficas y de hábitos de vida no se observaron diferencias significativas en términos de carga de anticuerpos.

## **5. DISCUSIÓN**



La determinación de los ANA es un paso muy importante en el estudio de los pacientes con sospecha de EAS. Sin embargo, su prevalencia y relevancia clínica sigue sin estar clara en la población general y, principalmente en cohortes con una baja probabilidad pre-test de positividad de ANA y de desarrollar una EAS.

En nuestro conocimiento, esta tesis supone el primer estudio, realizado en una cohorte española con baja probabilidad pre-test para el desarrollo de EAS, que compara si los nuevos ensayos automatizados en fase sólida (ANA Screen por BioPlex de Bio-Rad y CDT Screen por ImmunoCAP 250 de ThermoFisher) pueden sustituir a la técnica convencional de IFI en el cribado de autoanticuerpos y en la predicción de las EAS, ajustándose a la tendencia actual de solicitud de los ANA, y con un seguimiento de más de 12 años.

Además, nuestro trabajo es el primero publicado en España que relaciona los parámetros de autoinmunidad con las principales características sociodemográficas y, en considerar como otro aspecto novedoso de la investigación, la relevancia de la carga de autoanticuerpos mediante el ensayo ANA Screen y su asociación con estas características sociodemográficas.

La IFI sobre células HEp-2 continua siendo el método de referencia recomendado por el Colegio Americano de Reumatología (ACR) y la Alianza Europea de Asociaciones de Reumatología (EULAR) para el cribado de ANA debido a su gran sensibilidad. Sigue siendo un criterio de cribado para la clasificación del lupus eritematoso sistémico<sup>6,54,x</sup>, y cualquier método nuevo de determinación de ANA debe ser igual o superior al rendimiento diagnóstico de la IFI<sup>6</sup>. No obstante, el método de IFI es laborioso, está sujeto a cierta variabilidad interobservador y, a pesar de su alta sensibilidad, tiene una baja especificidad<sup>15</sup>. Por ello, al solicitar una prueba de ANA debemos tener en cuenta la probabilidad pre-test de la población a estudio, teniendo en cuenta que las EAS tienen mayor incidencia en sujetos jóvenes y mujeres de mediana edad, y que ésta disminuye en poblaciones de edad avanzada<sup>12</sup>.

En las últimas décadas, se han desarrollado nuevos EFS para intentar reemplazar la IFI, debido al cambio de paradigma en la solicitud de este tipo de pruebas, a la baja probabilidad pre-test actual y al flujo de trabajo en los laboratorios de Inmunología<sup>25,26,27</sup>. Estudios recientes han destacado el papel de los EFS para la detección de los autoanticuerpos más relevantes de las principales EAS y para confirmar su especificidad en los casos de resultado de cribado positivo mediante IFI. Esto ha conducido a un debate sobre cuál debería ser el mejor método de cribado para los ANA. Los EFS son menos sensibles, pero más específicos para la detección de EAS asociadas a ANA respecto a la IFI<sup>25,31</sup>. Es fundamental conocer los diferentes puntos de corte que utilizan los ensayos para dar un resultado como positivo, ya que las diferencias observadas en el rendimiento entre ensayos están relacionadas en gran medida con ellos<sup>32,33</sup>.

Aunque la sensibilidad de los EFS haya aumentado, la IFI sigue siendo la técnica con mayor porcentaje de resultados positivos de ANA. Son muchos los autores que han analizado el uso de la IFI o de los EFS en los últimos años, pero siempre en poblaciones seleccionadas con alta probabilidad pre-test, incluidos varios trabajos españoles que han demostrado un aumento de la sensibilidad de los EFS frente a la IFI, como los realizados por el grupo del Dr. Antonio Serrano, inmunólogo del Hospital 12 de Octubre de Madrid, que ya en 2017 compararon la IFI frente a la técnica de ANA Screen en una muestra seleccionada de 411 sujetos de su propio hospital, donde ANA Screen obtuvo una sensibilidad superior respecto a la IFI<sup>90</sup>. En 2019, otro trabajo del mismo grupo de investigadores, trató de establecer un algoritmo diagnóstico para el cribado de los ANA, en este caso valorando el rendimiento conjunto de la IFI con la técnica de ANA Screen, en una muestra de 7.000 sujetos con clínica sospechosa de EAS<sup>91</sup>. Más recientemente, en 2021,

González-Rodríguez et al. comparan la IFI con la técnica de CTD Screen, de nuevo en una población seleccionada de 300 sujetos con sospecha de EAS. Los resultados obtenidos mediante la combinación de ambos métodos fueron más precisos que cualquiera de ellos por separado. Este enfoque podría tener un valor diagnóstico, como sugieren los trabajos más recientes en poblaciones seleccionadas, ya que los resultados doble positivo o negativo por ambas técnicas, tienen un rendimiento diagnóstico mayor<sup>34,35,92</sup>.

### **5.1 Frecuencia de positividad de los ANA**

Nuestros resultados muestran una prevalencia global de positividad de ANA del 25,8% por IFI en dilución sérica 1/160, del 13,6% con la técnica de ANA Screen y del 7,9% con la de CTD Screen. Hemos confirmado la mayor prevalencia de ANA+ por IFI sobre células HEp-2 frente a los EFS en una cohorte de sujetos con baja probabilidad pre-test para la presencia de ANA. Este hallazgo también ha sido observado por otros investigadores que sugieren que los resultados de ANA+ mediante la IFI son más propensos a falsas interpretaciones en entornos clínicos con baja probabilidad pre-test para desarrollar una EAS, como es la Atención Primaria<sup>93</sup>. Hay que señalar que en nuestro estudio el resultado de ANA+ por IFI es superior a otros trabajos publicados con muestras de población general no seleccionada, como el publicado recientemente por Dinse et al. donde obtuvieron una prevalencia global del 16,1%, aunque con limitaciones en la inclusión de los sujetos, lo que pudo infraestimar la prevalencia real<sup>73,74,94,95</sup>.

La IFI utilizando células HEp-2 sigue siendo el método con mayor prevalencia de ANA+ en comparación con los EFS. Esto podría deberse a que el sustrato en células HEp-2 presenta más de 100-150 autoantígenos, no sólo dirigidos contra antígenos nucleares, sino también citoplasmáticos o mitóticos, lo que le otorga un papel importante en el estudio de las EAOE. Por otro lado, los EFS solo suelen incluir los autoantígenos más relevantes para el diagnóstico de las diferentes EAS como el DNAdc, Sm, SSA/Ro60, SSB/La, RNP, CENP-B, Jo1 y Scl-70, entre otros. De la misma manera no incluyen otros específicos de EAOE como los antimitocondriales (AMA) o antimúsculo liso (AML)<sup>96</sup>. De hecho, dependiendo del tipo de ensayo y de la casa comercial, tienen diferente composición antigénica. En nuestro caso, ANA Screen y CTD Screen eran capaces de detectar 13 y 14 tipos de autoanticuerpos, respectivamente.

Es probable que estas diferencias también estén relacionadas con las características de las poblaciones estudiadas y la evaluación de los ANA entre los distintos laboratorios. Tras hacer una exhaustiva revisión de la literatura, es difícil encontrar un consenso a la hora de llevar a cabo estos estudios. El uso de diferentes diluciones como punto de corte para la IFI entre los laboratorios y su comparación con diferentes EFS hace que los resultados sean inconsistentes y difíciles de comparar<sup>8,78</sup>.

Cuando analizamos específicamente los títulos de ANA+ por IFI, encontramos que la mayoría se detectaron a títulos bajos (1/160 y 1/320) y tan sólo un 5,72% de los sujetos presentaron un título alto (1/640 o 1/1280). Cuando se estratificó por sexo, las mujeres tuvieron una mayor frecuencia de ANA+ a título bajo de 1/320 (7,3% vs 3,4% en los varones); y alto de >1/1280 (4,2% vs 1,8% respectivamente). Nuestros datos están en consonancia con otros resultados en población no seleccionada, donde los títulos de ANA+ fueron con diluciones bajas y principalmente en las mujeres<sup>8,73</sup>.

La mayor parte de los estudios están realizados en poblaciones muy seleccionadas, con pacientes que ya presentan una EAI o una alta probabilidad pre-test de desarrollarla. Además,

muchos de los trabajos con mayor impacto utilizan diluciones séricas de 1/40 o 1/80, como punto de corte para la IFI<sup>8,73,74</sup>, quizás debido a las características intrínsecas de sus sistemas sanitarios<sup>20,73</sup>. Este dato lo hemos corroborado en recientes revisiones sistemáticas. Así, Naides et al. en una encuesta sobre prácticas de laboratorio publicada en 2020, destacan que el 50% de los laboratorios del mundo aceptaron un título de 1/40 como límite<sup>8,97</sup>. Y es que aunque la propia ICAP acepta como dilución mínima 1/80, existe abundante evidencia que recomienda 1/160, como la utilizada por nuestro laboratorio de inmunología<sup>94,98</sup>. Recientes trabajos presentan de nuevo la dificultad de adaptarlos a nuestro estudio, habitualmente porque a pesar de ser poblaciones sanas y hacer un cribado con la IFI a título 1/160 son cohortes pequeñas y con edades comprendidas entre los 18 y los 60 años, que tampoco se ajustan a las características de nuestra cohorte<sup>99,100,101</sup>.

### **5.2 Frecuencia de ANA+ estratificado por sexo**

Cuando la población a estudio se estratificó por sexo, la prevalencia de ANA+ fue significativamente mayor en las mujeres que en los hombres<sup>73,74</sup>, del mismo modo que en la población general e independientemente del método utilizado. Este resultado se asemeja al reportado en otros estudios poblacionales. Hay numerosa evidencia que demuestra que la proporción de ANA+ aumenta en las mujeres durante los años reproductivos<sup>96</sup>. La razón del predominio de mujeres con EAI no está totalmente explicado, aunque el hallazgo de un patrón de predominio femenino en la producción de ANA, sugiere que las causas hormonales, entre otras, pueden desempeñar un papel esencial en este proceso. Algunos autores han señalado la elevación de los niveles de estrógenos o de prolactina en la modulación de la prevalencia y la activación de las células B autorreactivas como explicación del sesgo de sexo asociado a la producción de ANA y EAS<sup>94</sup>. Otros autores mencionan también como posibles causas las alteraciones inmunológicas asociadas al cromosoma X o la presencia de microquimerismos en el periodo fetal<sup>19,102,103,104</sup>.

### **5.3 Frecuencia de ANA+ estratificado por edad**

Cuando consideramos la edad de los participantes, encontramos que a medida que aumenta ésta, también aumenta la prevalencia de ANA+<sup>10,47,73,105</sup>, independientemente del método utilizado, aunque fue más evidente cuando se utilizaron los EFS (ANA Screen y CTD Screen)<sup>10,79,106,107</sup>. En este punto, conviene señalar que, en nuestro estudio, cuando analizamos los resultados estratificados por edad y, por la propia naturaleza de nuestra cohorte, el grupo etario de sujetos menores de 50 años tuvo una baja representación.

Si bien la mayor parte de los trabajos sugieren que el envejecimiento está asociado con el aumento de prevalencia de ANA+, esta tendencia no es evidente en todos los casos<sup>73</sup>. Xavier et al. en 1995, comunicó por primera vez datos sobre el incremento en la expresión de ANA con la edad, sobre todo en la sexta y séptima décadas de la vida, datos que se han corroborado en estudios posteriores<sup>10,107</sup>. Las razones del aumento de resultados positivos para los ANA en individuos sanos y ancianos no son bien conocidos. Se cree que pueden influir tanto factores genéticos o ambientales sobre la regulación y actividad inmunitaria —principalmente de los linfocitos T—, como la propia inmunosenescencia junto a un estado catabólico-proinflamatorio asociado a la senectud que conduce a la formación de autoantígenos<sup>10,20,108,109,110</sup>. No obstante, Los datos sobre el papel de los ANA en población sana y anciana, provienen de estudios con muestras clínicas seleccionadas con EAS. En este sentido, se ha señalado la asociación entre la positividad de ANA e infecciones, cáncer, diversas exposiciones ambientales, incluidas

sustancias químicas (principalmente sílice y disolventes<sup>108</sup>), enfermedades cardíacas, riesgo cardiovascular, deficiencia de vitamina D o ciertos medicamentos<sup>111</sup> como hidralacina, procainamida, ciclosporina A, minociclina e inhibidores del TNF, entre otros<sup>112,113,114,115,116,117</sup>.

#### **5.4 Rendimiento de las pruebas diagnósticas**

A la hora de comparar los dos métodos diagnósticos empleados en nuestro estudio, es imprescindible conocer el rendimiento de las diferentes técnicas de laboratorio para la determinación de ANA, porque dependiendo de la metodología utilizada, la sensibilidad y la especificidad serán diferentes. Esto debe considerarse en función del origen de la población estudiada. La solicitud de ANA ha aumentado en los últimos años en poblaciones con baja probabilidad pre-test, como los ancianos, debido en parte a la generalización de su solicitud, incluyendo el ámbito de la Atención Primaria. Es importante conocer esta tendencia, porque debido a esta baja probabilidad pre-test, la probabilidad post-test para la positividad de los ANA también será baja<sup>13,14</sup>.

Muchos autores recomiendan que cada laboratorio debería determinar la dilución o punto de corte en función de la prevalencia regional de ANA y EAS, así como ofrecer la información sobre el método y el título utilizado al resto de clínicos para considerar dar como positivo o negativo un valor frente a la sospecha de un paciente con EAS<sup>13</sup>. En el fondo, se trata de un avance más hacia la medicina personalizada, con parámetros cada vez más ajustados a valores regionales, como ya ocurre en otras áreas de la medicina como la microbiología, con las resistencias antibióticas<sup>118</sup>, o con el riesgo de fractura ósea, con la herramienta FRAX<sup>119</sup>.

Nuestros datos con los tres métodos diagnósticos, tras comparar las diferentes sensibilidades (que mostramos en la sección de “Resultados” con el diagrama de Venn) fueron 583 positivos para la IFI frente a 175 positivos con ANA Screen y 61 con CTD Screen. Cuando valoramos dos métodos al mismo tiempo observamos que el resultado más sensible fue la combinación de la IFI con ANA Screen, con 158 positivos. Estos resultados muestran un bajo porcentaje de solapamiento entre las dos técnicas, lo que sugiere que en una población con baja probabilidad pre-test para el desarrollo de ANA y EAS, no son técnicas intercambiables sino complementarias. A pesar de que los resultados parezcan contradictorios nunca hay una correlación del 100% y, en nuestro estudio podemos afirmar que obtuvimos mayor número de positivos con los métodos por separado que con la combinación de ambos.

Con respecto a las principales EAI incluidas en el estudio observamos que algunos sujetos ya presentaban al inicio alguna EAS, EAOE o AR. Aunque la mayoría no presentaron ninguna EAI durante el seguimiento, si hubo un total de 107 sujetos que las desarrollaron, entre las que destacan el SS, el LES y la ES, entre las sistémicas y las tiroidopatías autoinmunes, entre las organoespecíficas. Respecto a las EAS, cabe señalar que coinciden con las tres EAS más frecuentes encontradas en el estudio de Pérez et al., aunque en distinta proporción<sup>90</sup>. Al analizar el grupo de EAS con los tres métodos diagnósticos, observamos que la IFI detectó más pacientes con LES que los EFS, y estos detectaron mayor número de casos de ES y de SS.

Cuando analizamos los índices epidemiológicos de los tres métodos, fue el ANA Screen mediante ALBIA el que demostró la sensibilidad más alta en pacientes con EAS cuando se clasificaron en total y basal, frente a la IFI, siendo esta superior en el seguimiento, lo que indica que los EFS han mejorado su sensibilidad para la detección de este tipo de autoanticuerpos. Además, ambos EFS (ANA Screen y CTD Screen) y, sobre todo este último, tuvieron una mayor especificidad para la detección de ANA, un mayor valor predictivo positivo y una mayor razón de verosimilitud positiva, en comparación con el ensayo IFI, datos congruentes con la literatura reciente<sup>31,32,34</sup>.

Para analizar a los sujetos que presentaron una EAS, una EAOE o una AR al inicio o durante el seguimiento, separamos los resultados obtenidos con los tres métodos diagnósticos en: triple positividad (IFI + ANA Screen + CTD Screen), doble positividad (ANA screen + CTD Screen) y positividad de cada método por separado (IFI, ANA Screen y CTD Screen). Observamos que la triple positividad para ANA, detectada por IFI y ambos EFS, mostró una asociación con el diagnóstico de EAS, al inicio y durante el seguimiento, y con el diagnóstico de EAOE y AR, al inicio, pero no al final del seguimiento. Este patrón de significación se repitió también con la doble positividad y con cada método por separado.

Cuando analizamos únicamente los dos EFS, obtuvimos un mejor rendimiento en las EAS y las EAOE, respecto de la triple positividad, probablemente debido al mayor número de sujetos analizados, pero obtuvimos el mismo rendimiento en el caso de la AR. Considerando el desarrollo de EAS en una población con una baja probabilidad pre-test para ANA+, se observó que la detección de ANA+ utilizando EFS es un procedimiento adecuado. Por el contrario, para el manejo de las EAOE y de la AR se requieren estudios adicionales.

### **5.5 Características sociodemográficas de la cohorte**

Respecto a las variables demográficas estudiadas y, respecto al nivel educativo y al ejercicio físico, las mujeres de nuestra cohorte presentaron un mayor porcentaje de estudios primarios, así como de sedentarismo y de realización de ejercicio moderado, respecto a los varones. Los hombres presentaron un mayor porcentaje de estudios en formación profesional y universitaria y, realizaban más ejercicio físico intenso. Al analizar los factores de riesgo cardiovascular también presentaron una mayor prevalencia de tabaquismo, de diabetes, de hipertensión arterial, de dislipemia y de consumo de alcohol.

En línea con los resultados publicados por otros autores, la prevalencia de ANA no varió con el nivel educativo<sup>73</sup>. Además, nosotros no observamos diferencias en la prevalencia de ANA según las categorías del IMC, a diferencia de otros estudios en los que se observó que la presencia de ANA es menos frecuente en individuos con sobrepeso y obesidad, que en aquellos con normopeso<sup>20,73</sup>. En este sentido, Satoh et al., publicaron en 2012, las primeras estimaciones representativas de EE.UU. sobre la prevalencia de ANA y su asociación con ciertas características sociodemográficas, con los datos obtenidos entre 1999 y 2004 a través del programa National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) perteneciente al Centers for Disease Control and Prevention (CDC). En este trabajo evaluaron, por primera vez, algunas características como el tabaquismo, el consumo de alcohol, los valores de proteína C reactiva, el nivel educativo y la obesidad, siendo esta última la única que mostró una significación estadística, con una relación inversa entre el peso y la prevalencia de ANA+. Esta investigación inicial fue continuada por Dinse et al., en colaboración con el grupo de Frederick Miller, que en 2022 actualizaron los datos previos de 2020<sup>20</sup> y los de Satoh. (2012). Los autores sugirieron un posible cambio de la asociación inicialmente inversa, donde los sujetos con sobrepeso y obesidad tuvieron menor prevalencia de ANA+, a los actuales que muestran una relación positiva del sobrepeso y la obesidad con el aumento en la prevalencia de ANA+<sup>74</sup>.

Por otro lado, la prevalencia de estos autoanticuerpos varió según la actividad física y el consumo de alcohol de los participantes. Así, la prevalencia fue mayor en aquellos individuos con un estilo de vida sedentario y en exbebedores y no consumidores de alcohol, en comparación con los consumidores activos. Los resultados relacionados con la actividad física podrían ser importantes porque la presencia de ANA se ha asociado con una disminución de la elasticidad carotídea, lo que sugiere que los mecanismos que dan lugar a la producción de ANA

podrían estar involucrados en el desarrollo de aterosclerosis precoz, con el aumento de riesgo vascular que implica<sup>120</sup>.

Otros autores también han demostrado que el consumo moderado de alcohol se ha asociado con una disminución del riesgo de LES<sup>121,122,123</sup>. Asimismo, también se ha descrito que el alcohol actúa como factor protector frente al desarrollo de otras EAS, como la diabetes<sup>124</sup>, la esclerosis múltiple<sup>125</sup>, o especialmente, la AR<sup>126,127</sup>. En el caso de la AR, tras la exposición al alcohol, se ha identificado una reducción de diferentes factores, como la presentación de antígenos, la capacidad de activación de células T de las células presentadoras de antígenos, la maduración y proliferación de células B, la producción de IL-21 por parte de las células T auxiliares foliculares, la IgG específica de antígeno y las citocinas proinflamatorias. Además, la respuesta inmune Th2, la función de los macrófagos M2 y las citocinas antiinflamatorias (IL-10, TGF- $\beta$ ) parecen aumentar<sup>128</sup>. Todos estos factores podrían estar asociados con una disminución del riesgo de AR. En nuestro estudio, observamos una tendencia creciente, aunque no significativa, en la carga de anticuerpos de los sujetos no bebedores en comparación con los bebedores activos.

Además, a pesar de que algunos estudios sugieren que el tabaquismo es un factor de riesgo para el desarrollo de LES, AR y otras EAI<sup>129</sup> así como protector para otras<sup>130</sup> como la colitis, encontramos una mayor frecuencia de resultados positivos para ANA en sujetos no fumadores, independientemente del método de detección utilizado. Estos resultados concuerdan con otros trabajos recientes donde el tabaquismo activo se asoció débilmente con niveles más bajos de ANA<sup>74</sup>.

Utilizando las técnicas de IFI y de CTD Screen, se encontró un aumento significativo en la prevalencia de ANA en aquellos sujetos con niveles séricos de PCR más altos, lo que confirma la participación de la inflamación sistémica en el desarrollo de la EAS. De la misma manera, este hallazgo podría estar relacionado con los procesos de inmunosenescencia y autoinmunidad que se observan en los sujetos de mayor edad, en quienes se ha descrito el desarrollo de células T autorreactivas, así como un aumento en la producción de autoanticuerpos<sup>131,132,133</sup>. Además, existe una relación entre la inmunosenescencia y el desarrollo de un fenotipo secretor asociado a la senescencia (SASP), que se ha asociado con la progresión de la enfermedad neoplásica y con trastornos autoinmunitarios<sup>133,134,135,136</sup>.

Finalmente, se analizó la prevalencia de ANA según el estado civil de los sujetos. Se encontró un aumento significativo en la prevalencia de ANA, mediante IFI y CTD Screen, en aquellos participantes que estaban separados, solteros o viudos. Por el contrario, obtuvimos la menor prevalencia de ANA en los sujetos casados. El interés por estudiar el estado civil no es nuevo, ya en el año 2018 se presentó el estudio SWEDENHEART<sup>137</sup>, en el cual se analizaba la relación de diferentes factores de riesgo con la probabilidad de supervivencia al año tras un primer episodio de infarto agudo de miocardio. Los resultados de este estudio mostraron que los sujetos que estaban casados o cohabitaban, tuvieron una mayor supervivencia en comparación con los que estaban solteros, eran divorciados o viudos, los cuales tenían una mayor mortalidad. Los autores observaron que varios factores podían ser los responsables del mayor riesgo de mortalidad en los individuos que viven solos, como un apoyo familiar más limitado durante el período de recuperación después de una cirugía, el abuso de sustancias y la depresión. No hemos encontrado ningún otro estudio que aporte datos sobre la relación entre el estado civil y la prevalencia de ANA+.

Se podría especular que nuestros hallazgos sobre la asociación de ANA con diferentes factores sociodemográficos y de comportamiento podrían estar relacionados con el tamaño de la muestra o incluso atribuirlos al azar. Sin embargo, en nuestro estudio, cuanto mayor es la especificidad de la prueba<sup>138</sup>, mayor es la significación estadística de algunas variables

sociodemográficas relevantes analizadas, como la edad, el consumo de alcohol, la actividad física y los niveles séricos de PCR (como un marcador sustituto de inflamación). Debido a la escasez de datos y estas posibles asociaciones, se necesitan más estudios para confirmar nuestros hallazgos.

### **5.6 Carga de autoanticuerpos: ¿Hacia una nueva metodología de evaluación del riesgo?**

Una de las principales novedades de nuestro estudio es haber considerado la relevancia de la carga de autoanticuerpos, como se ha descrito en el SAF, utilizando el ensayo ANA Screen y su asociación con diferentes características sociodemográficas.

En el SAF es una enfermedad autoinmune sistémica que se caracteriza por la producción de autoanticuerpos dirigidos contra determinados factores de la coagulación produciendo una mayor tendencia a la formación de trombosis arterial y/o venosa, así como de la morbilidad obstétrica. Dependiendo del número, el isotipo y el título de aFL, es posible establecer diferentes perfiles de riesgo<sup>138</sup>.

En las últimas décadas ha aumentado el interés por los aFL debido a su posicionamiento como factores de riesgo, y no solo como prueba diagnóstica, para desarrollar un SAF. El riesgo de presentar manifestaciones clínicas parece estar relacionado con los niveles moderados-altos de estos autoanticuerpos. Además, dentro de ellos, se cree que el anticoagulante lúpico (AL) está más fuertemente asociado con el riesgo de SAF clínico que los aCL y  $\beta$ 2GPI.

Publicaciones recientes<sup>139</sup>, desarrollan las conclusiones expuestas previamente en el Estudio APS ACTION 2011, donde diferentes perfiles de aFL positivos se asocian con un mayor riesgo de manifestaciones clínicas de SAF. Estos perfiles incluyen la “triple positividad” (pruebas positivas para AL, aCL y aB2GPI) y la positividad de AL en sí misma; así como el estudio de diferentes títulos de aCL y aB2GPI clasificados en <20u (negativo); 20 a <40u (positivo débil); 40 a <80 (positivo moderado) y  $\geq$ 80u como positivo alto, y su relación con la positividad de AL y de desarrollar un SAF. En 2017, Perez et al. analizaron la carga de autoanticuerpos mediante ANA Screen en una población seleccionada con un seguimiento de tres años<sup>90</sup>. Los resultados confirmaron el aumento del número de autoanticuerpos positivos en el momento del diagnóstico de la EAI, y como la presencia de tres o más autoanticuerpos positivos se asociaron con un valor predictivo positivo del 97% para su desarrollo.

En nuestro estudio, al focalizarnos en la relevancia de la carga de anticuerpos usando la técnica de ANA Screen y sus asociaciones con las características sociodemográficas seleccionadas, observamos que la carga de anticuerpos también era mayor en las mujeres y aumentaba con la edad. Estos resultados, así como las posibles implicaciones clínicas y pronósticas, deben ser confirmadas en otras cohortes. No obstante, debido a la relevancia a la hora de establecer el perfil de riesgo de sujetos de base poblacional podría servir como base a futuras investigaciones.

#### **Ventajas de nuestro estudio**

1. El gran número de sujetos incluidos (n=2997) pertenecientes a una cohorte poblacional bien establecida con una baja probabilidad pre-test de EAS y un seguimiento a largo plazo de más de 12 años, lo que refleja la tendencia actual de solicitud de ANA y nos permiten sacar conclusiones más sólidas.

2. No conocemos ningún otro estudio español que haya incluido un número tan elevado de participantes, con un período de seguimiento tan prolongado, donde se haya evaluado la asociación entre la prevalencia de ANA+ y las características sociodemográficas de la población a estudio.
3. Todos los ensayos para detectar los ANA se realizaron en el mismo laboratorio del Servicio de Inmunología del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, supervisados por los mismos inmunólogos lo que reduce mucho la variabilidad interobservador.
4. El laboratorio de Inmunología de nuestro centro emplea como punto de corte para la IFI la dilución 1/160 como recomienda la evidencia actual.
5. Todos los datos de la base han sido recogidos por el mismo investigador y las historias de los pacientes con potenciales EAI, se han revisado conjuntamente con un experto.
6. Se analizó el suero de todos los sujetos con los dos EFS sin estar condicionado por un resultado previo de ANA+ determinados por IFI.

### **Limitaciones de nuestro estudio**

1. Las inherentes a un estudio transversal.
2. La evaluación de las especificidades antigénicas en aquellos pacientes con resultados positivos para ANA en el ensayo de detección utilizando EFS solo fue posible utilizando ANA Screen y no CTD Screen.
3. Al analizar los sueros con CTD Screen no se evaluaron todos los tipos de autoanticuerpos por falta de reactivos para todos los sueros, por lo que ciertos resultados han podido verse infraestimados.
4. El pequeño tamaño de ciertos subgrupos puede haber limitado el poder estadístico del estudio para detectar diferencias en la prevalencia de ANA.

## **6. CONCLUSIONES**



**Primera:** Aunque la sensibilidad de los EFS haya aumentado, hemos confirmado la mayor prevalencia de ANA+ por IFI sobre células HEP-2, frente a los EFS en una cohorte de sujetos con baja probabilidad pre-test para la presencia de enfermedad autoinmune.

**Segunda:** La detección de ANA mediante IFI puede ser más útil en poblaciones con alta probabilidad pre-test debido a su mayor sensibilidad, pero en poblaciones con una baja probabilidad pre-test es más útil aplicar técnicas con mayor especificidad, como los EFS.

**Tercera:** Considerando el desarrollo de EAS en una población con una baja probabilidad pre-test, se observó que la detección de autoanticuerpos utilizando EFS es un procedimiento adecuado. Por el contrario, para el estudio de EAOE y AR, se requieren estudios adicionales.

**Cuarta:** Se detectó un bajo porcentaje de solapamiento entre las técnicas de IFI y de EFS, lo cual sugiere que, en una población con baja probabilidad pre-test para el desarrollo de EAS no son técnicas intercambiables sino complementarias.

**Quinta:** Independientemente de la técnica utilizada, la prevalencia de ANA+ fue mayor en las mujeres y aumentó con la edad de los sujetos.

**Sexta:** Los resultados de nuestro estudio respaldan la afirmación de que el ejercicio y el consumo moderado de alcohol se asocian con una menor prevalencia de ANA.

**Séptima:** Encontramos un aumento significativo en la prevalencia de ANA en aquellos sujetos con niveles séricos de PCR más alto, lo que apoya la participación de la inflamación sistémica en el desarrollo de las EAS.

**Octava:** La carga de autoanticuerpos fue mayor en las mujeres y aumentó con la edad, pero no se asoció con ninguna otra de las características sociodemográficas analizadas.



## **7. BIBLIOGRAFÍA**



1. Cervera R, Espinosa G, Ramos M, Hernández-Rodríguez J, Prieto S, Espígol-Frigolé G. Enfermedades autoinmunes sistémicas: Diagnóstico y Tratamiento. 6ª ed. Madrid: Panamericana; 2021. p. 3-5.
2. Lleo A, Invernizzi P, Gao B, Podda M, Gershwin ME. Definition of human autoimmunity – autoantibodies versus autoimmune disease. *Autoimmun Rev.* 2010;9(5).
3. Bustabad S, Seoane-Mato D, Sánchez-Piedra C, *et al.* Episer2016: Estudio de prevalencia de las enfermedades reumáticas en población adulta en España. Madrid: Fundación Española de Reumatología; 2018.
4. Puig L, Ruiz de Morales J, Dauden E, *et al.* La prevalencia de diez enfermedades inflamatorias inmunomediadas (IMID) en España. *Rev Esp Salud Pública.* 2019;93:25 de marzo e201903013.
5. Tobón GJ, Pers J-O, Cañas CA, Rojas-Villarraga A, Youinou P, Anaya J-M. Are autoimmune diseases predictable? *Autoimmun Rev.* 2012;11(4):259–66.
6. Aringer M, Costenbader K, Daikh D, Brinks R, Mosca M, Ramsey-Goldman R, *et al.* 2019 European League against Rheumatism/American College of Rheumatology classification criteria for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheumatol.* 2019;71(9):1400–12.
7. Irure-Ventura J, López-Hoyos M. The past, present, and future in antinuclear antibodies (ANA). *Diagnostics.* 2022;12(3):647.
8. Pashnina IA, Krivolapova IM, Fedotkina Tv., Ryabkova VA, Chereshneva Mv., Churilov LP, *et al.* Antinuclear autoantibodies in health: autoimmunity is not a synonym of autoimmune disease. *Antibodies.* 2021;10:1–26.
9. Tan EM, Feltkamp TEW, Smolen JS, Butcher B, Dawkins R, Fritzler MJ, *et al.* Range of antinuclear antibodies in “healthy” individuals. *Arthritis Rheum.* 1997;40:1601–11.
10. Xavier RM, Yamauchi Y, Nakamura M, Tanigawa Y, Ishikura H, Tsunematsu T, *et al.* Antinuclear antibodies in healthy aging people: a prospective study. *Mech Ageing Dev.* 1995;78:145–54.
11. Grygiel-Górniak B, Rogacka N, Puszczewicz M. Antinuclear antibodies in healthy people and non-rheumatic diseases – diagnostic and clinical implications. *Reumatologia.* 2018;56:243–248.
12. Gaubitz M. Epidemiology of connective tissue disorders. *Rheumatology.* 2006;45:iii3–4.
13. Bossuyt X. Clinical performance characteristics of a laboratory test. A practical approach in the autoimmune laboratory. *Autoimmun Rev.* 2009;8:543–8.
14. American college of rheumatology ad hoc committee on immunologic testing guidelines. Guidelines for immunologic laboratory testing in the rheumatic diseases: an introduction. *Arthritis Rheum.* 2002;47:429–33.

15. Mahler M, Meroni PL, Bossuyt X, Fritzler MJ. Current concepts and future directions for the assessment of autoantibodies to cellular antigens referred to as anti-nuclear antibodies. *J Immunol Res*. 2014; 2014:315179.
16. Im JH, Chung MH, Park YK, Kwon HY, Baek JH, Lee SY, *et al*. Antinuclear antibodies in infectious diseases. *Inf Disp*. 2020;52:177–85.
17. Damoiseaux J, Dotan A, Fritzler MJ, Bogdanos DP, Meroni PL, Roggenbuck D, *et al*. Autoantibodies and SARS-CoV2 infection: the spectrum from association to clinical implication: report of the 15th Dresden Symposium on Autoantibodies. *Autoimmun Rev*. 2022; 21(3):103012.
18. Grygiel-Górniak B, Rogacka N, Rogacki M, Puszczewicz M. Antinuclear antibodies in autoimmune and allergic diseases. *Reumatologia*. 2017; 55:298–304.
19. Meier HCS, Sandler DP, Simonsick EM, Weng N, Parks CG. Sex differences in the association between antinuclear antibody positivity with diabetes and multimorbidity in older adults: results from the Baltimore longitudinal study of aging. *Exp Gerontol*. 2020; 135:110906.
20. Dinse GE, Parks CG, Weinberg CR, Co CA, Wilkerson J, Zeldin DC, *et al*. Increasing prevalence of antinuclear antibodies in the United States. *Arthritis Rheumatol*. 2020;72(6):1026–35.
21. Barnett K, Mercer SW, Norbury M, Watt G, Wyke S, Guthrie B. Epidemiology of multimorbidity and implications for health care, research, and medical education: a cross-sectional study. *Lancet*. 2012; 380:37–43
22. Amador-Patarroyo MJ, Rodriguez-Rodriguez A, Montoya-Ortiz G. How does age at onset influence the outcome of autoimmune diseases? *Autoimmune Dis*. 2012;2012:251730.
23. Marder W, Vinet É, Somers EC. Rheumatic autoimmune diseases in women and midlife health. *Women MidLife Health*. 2015;1:11.
24. Stuhlmüller B, Schneider U, González-González JB, Feist E. Disease specific autoantibodies in idiopathic inflammatory myopathies. *Front Neurol*. 2019;10:438.
25. Op de Beeck K, Vermeersch P, Verschueren P, Westhovens R, Mariën G, Blockmans D, *et al*. Detection of antinuclear antibodies by indirect immunofluorescence and by solid phase assay. *Autoimmun Rev*. 2011; 10:801–8.
26. Bossuyt X, Luyckx A. Antibodies to extractable nuclear antigens in antinuclear antibody-negative samples. *Clin Chem*. 2005;51:2426–7.
27. Mahler M, Kessenbrock K, Szmyrka M, Takasaki Y, Garcia-De La Torre I, Shoenfeld Y, *et al*. International multicenter evaluation of autoantibodies to ribosomal P proteins. *Clin Vaccine Immunol*. 2006;13: 77–83.
28. Ceribelli A, Fredi M, Taraborelli M, Cavazzana I, Franceschini F, Quinzanini M, *et al*. Anti-MJ/NXP-2 autoantibody specificity in a cohort of adult Italian patients with polymyositis/dermatomyositis. *Arthritis Res Ther*. 2012;14:R97.

29. Fritzler MJ, Choi MY, Mahler M. The antinuclear antibody test in the diagnosis of antisynthetase syndrome and other autoimmune myopathies. *J Rheumatol*. 2018;45:444–5.
30. Olsen NJ, Choi MY, Fritzler MJ. Emerging technologies in autoantibody testing for rheumatic diseases. *Arthritis Res Ther*. 2017; 19:172.
31. Willems P, de Langhe E, Claessens J, Westhovens R, van Hoeyveld E, Poesen K, *et al*. Screening for connective tissue disease-associated antibodies by automated immunoassay. *Clin Chem Lab Med*. 2018;56: 909–18.
32. Claessens J, Belmonto T, de Langhe E, Westhovens R, Poesen K, Hùe S, *et al*. Solid phase assays versus automated indirect immunofluorescence for detection of antinuclear antibodies. *Autoimmun Rev*. 2018;17:533–40.
33. Orme ME, Andalucia C, Sjölander S, Bossuyt X. A hierarchical bivariate meta-analysis of diagnostic test accuracy to provide direct comparisons of immunoassays vs. indirect immunofluorescence for initial screening of connective tissue diseases. *Clin Chem Lab Med*. 2020;59:547–61.
34. Bossuyt X, Claessens J, de Langhe E, Belmonto T, Westhovens R, Hue S, *et al*. Antinuclear antibodies by indirect immunofluorescence and solid phase assays. *Ann Rheum Dis* 2020;79:E65.
35. Orme ME, Andalucia C, Sjölander S, Bossuyt X. A comparison of a fluorescence enzyme immunoassay versus indirect immunofluorescence for initial screening of connective tissue diseases: systematic literature review and meta-analysis of diagnostic test accuracy studies. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2018;32:521–34.
36. Hargraves MM, Richmond H, Morton R. Presentation of Two Bone Marrow Elements; the Tart Cell and the L.E. Cell. *Proc. Staff. Meet. Mayo Clin*. 1948;23:25–28.
37. Hargraves MM. Discovery of the LE cell and its morphology. *Mayo Clin Proc*. 1969; 44(9):579–99.
38. Hargraves MM. Production *in vitro* of L. E. cell phenomenon: use of normal bone marrow elements and blood plasma from patients with acute disseminated lupus erythematosus. *Proc Staff Meet Mayo Clin*. 1949; 24(9): 234-237.
39. Holman HR, Kunkel HG. Affinity between the lupus erythematosus serum factor and cell nuclei and nucleoprotein. *Science*. 1957;126(3265):162–3.
40. Rothfield NE, Phythyon JM, Mc Ewen C *et al*. The role of antinuclear reactions in the diagnosis of systemic lupus erythematosus: a study of 53 cases. *Arthritis Rheum* 1961; 4: 223-239.
41. Robbins WC, Holman HR, Deicher H, Kunkel HG. Complement fixation with cell nuclei and DNA in lupus erythematosus. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1957;96, 575–579.

42. Friou GJ, Finch SC, D'etre KD. Interaction of nuclei and globulin from lupus erythematosus serum demonstrated with fluorescent antibody. *J Immunol* 1958;80(4):324-9.
43. Friou GJ. Clinical application of a test for lupus globulin-nucleohistone interaction using fluorescent antibody. *Yale J Biol Med* 1958; 31(1):40-7.
44. Iglesias A, Méndez P, Rojas C, *et al.* Historia de los anticuerpos antinucleares. *Rev Colomb Reumatol*. 2002;9(4):288-311.
45. Beck JS. Variations in the morphological patterns of "autoimmune" nuclear fluorescence. *Lancet* 1961;1(7188):1203-5.
46. Regueiro JR, Naves EM, Larrea CL, Rodríguez SG, Almuzara AC. *Inmunología: Biología y patología del sistema inmunitario*. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2022.
47. Tornero J, Blanco FJ. *Tratado de enfermedades reumáticas de la SER*. España: Editorial Médica Panamericana S.A.; 2019.
48. Weller TH, Coons AH. Fluorescent antibody studies with agents of varicella and herpes zoster propagated in vitro. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1954, 86, 789–794.
49. Wang L, Wang F, Gershwin ME. Human autoimmune diseases: A comprehensive update. *J Intern Med*. 2015;278(4):369–95.
50. Agmon-Levin N, Damoiseaux J, Kallenberg C, Sack U, Witte T, Herold M, *et al.* International recommendations for the assessment of autoantibodies to cellular antigens referred to as anti-nuclear antibodies. *Ann Rheum Dis*. 2013;73(1):17–23.
51. Chan EK, Damoiseaux J, Carballo OG, Conrad K, de Melo Cruvinel W, Francescantonio PL, *et al.* Report of the first international consensus on standardized nomenclature of antinuclear antibody HEP-2 cell patterns 2014–2015. *Front Immunol*. 2015;20:6:412.
52. Chan EK, von Mühlen CA, Fritzler MJ, Damoiseaux J, Infantino M, Klotz W, *et al.* The international consensus on ANA Patterns (ICAP) in 2021—the 6th workshop and current perspectives. *J App Lab Med*. 2022;7(1):322–30.
53. Irure-Ventura J, Rodríguez C, Vergara-Prieto E, Vargas ML, Quirant B, Jurado A, Fernández-Pereira L, Martínez-Cáceres E, San José M, López-Hoyos M. Rare Immunofluorescence patterns of autoantibodies on HEp-2 cells defined by ICAP identify different autoimmune diseases in the absence of associated specificities: A spanish multicentre study. *Rheumatology* 2021;60:3904–12.
54. Barrios Y, Jurado A, Martínez L, Montes M, Rodríguez B, Roy G, Irure J, Vargas ML. Recomendaciones del GEAI sobre la determinación de anticuerpos antinucleares y sus especificidades. *Sociedad Española de Inmunología*. 2022. Disponible en: [https://inmunologia.org/images/site/RECOMENDACIONES\\_DEL\\_GEAI\\_SOBRE\\_LA\\_DET ERMINACION%20DE\\_ANTICUERPOS\\_ANTINUCLEARES\\_final.pdf](https://inmunologia.org/images/site/RECOMENDACIONES_DEL_GEAI_SOBRE_LA_DET ERMINACION%20DE_ANTICUERPOS_ANTINUCLEARES_final.pdf)
55. Meroni PL, Schur PH. Ana Screening: An old test with new recommendations. *Ann Rheum Dis*. 2010;69(8):1420–2.

56. Damoiseaux J, Andrade LE, Carballo OG, Conrad K, Francescantonio PL, Fritzler MJ, *et al.* Clinical relevance of hep-2 indirect immunofluorescent patterns: The international consensus on ANA patterns (ICAP) perspective. *Ann Rheum Dis.* 2019;78(7):879–89.
57. Willems P, De Langhe E, Westhovens R, Vanderschueren S, Blockmans D, Bossuyt X. Antinuclear antibody as entry criterion for classification of systemic lupus erythematosus: pitfalls and opportunities. *Ann Rheum Dis.* 2019;78(8):e76.
58. Vulsteke J-B, Van Hoovels L, Willems P, Vander Cruyssen B, Vanderschueren S, Westhovens R, *et al.* Titre-specific positive predictive value of antinuclear antibody patterns. *Ann Rheum Dis.* 2021;80(8)e128.
59. Bossuyt X, De Langhe E, Borghi MO, Meroni PL. Understanding and interpreting antinuclear antibody tests in systemic rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol.* 2020;16(12):715–26.
60. López S, Fernández I, Fernández L. *Inmunología.* Sociedad Española de Inmunología. 2017. 36(4):18-22.
61. Mahler M, Bentow C, Serra J, Fritzler MJ. Detection of autoantibodies using chemiluminescence technologies. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 2016;38(1):14–20.
62. Tan EM. Autoantibodies to nuclear antigens (ANA): their immunobiology and medicine. *Adv Immunol* 1982;33:167–240.
63. Satoh M, Chan EK, Sobel ES, Kimpel DL, Yamasaki Y, Narain S, *et al.* Clinical implication of autoantibodies in patients with systemic rheumatic diseases. *Expert Rev Clin Immunol.* 2007;3(5):721–38.
64. Gundín S, Irure-Ventura J, Asensio E, Ramos D, Mahler M, Martínez-Taboada V, *et al.* Measurement of anti-DFS70 antibodies in patients with ANA-associated autoimmune rheumatic diseases suspicion is cost-effective. *Auto Immun Highlights.* 2016;7(1):10.
65. Jeong S, Hwang H, Roh J, Shim JE, Kim J, Kim GT, Tag HS, Kim HS. Evaluation of an automated screening assay, compared to indirect immunofluorescence, an extractable nuclear antigen assay, and a line immunoassay in a large cohort of asian patients with antinuclear antibody-associated rheumatoid diseases: A multicenter retrospective Study. *J Immunol Res.* 2018, 2018, 9094217.
66. González C, García-Berrocal B, Pérez M, Navajo JA, Herraes O, González-Buitrago JM. Laboratory screening of connective tissue diseases by a new automated ENA screening assay (Elia Symphony) in clinically defined patients. *Clin Chim Acta.* 2005;359(1–2):109–14.
67. Arbuckle MR, McClain MT, Rubertone MV, Scofield RH, Dennis GJ, James JA, *et al.* Development of autoantibodies before the clinical onset of systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med.* 2003;349(16):1526–33.

68. Eriksson C, Kokkonen H, Johansson M, Hallmans G, Wadell G, Rantapää-Dahlqvist S. Autoantibodies predate the onset of systemic lupus erythematosus in northern Sweden. *Arthritis Res Ther*. 2011;13(1):R30.
69. Abeles AM, Abeles M. The clinical utility of a positive antinuclear antibody test result. *Am J Med*. 2013;126(4):342–8.
70. Schouwers S, Bonnet M, Verschueren P, Westhovens R, Blockmans D, Mariën G, *et al*. Value-added reporting of antinuclear antibody testing by automated indirect immunofluorescence analysis. *Clin Chem Lab Med*. 2014;52(4).
71. Tozzoli R, Bizzaro N, Tonutti E, Villalta D, Bassetti D, Manoni F, *et al*. Guidelines for the laboratory use of autoantibody tests in the diagnosis and monitoring of autoimmune rheumatic diseases. *Am J Clin Pathol*. 2002;117(2):316–24.
72. Vermeersch P. Comparative analysis of different approaches to report diagnostic accuracy. *Arch Intern Med*. 2010;170(8):734.
73. Satoh M, Chan EK, Ho LA, Rose KM, Parks CG, Cohn RD, *et al*. Prevalence and sociodemographic correlates of antinuclear antibodies in the United States. *Arthritis Rheum*. 2012;64(7):2319–27.
74. Dinse GE, Parks CG, Weinberg CR, Co CA, Wilkerson J, Zeldin DC, *et al*. Increasing prevalence of antinuclear antibodies in the United States. *Arthritis Rheum*. 2022;74(12):2032–41.
75. Zurro AM, Francisco CPJ, Badia JG. Atención Primaria (8.ª edición). Barcelona, España: Elsevier; 2019. p. 198-223.
76. Dahlgren G, Whitehead M. Concepts and principles for tackling social inequities in health: Levelling up part 2. World Health Organization, 2006. Disponible en: <https://www.sanidad.gob.es/areas/promocionPrevencion/promoSaludEquidad/equidadYDesigualdad/docs/estrategiasDesigual.pdf>
77. Kono M, Nagafuchi Y, Shoda H, Fujio K. The impact of obesity and a high-fat diet on clinical and immunological features in systemic lupus erythematosus. *Nutrients*. 2021;13(2):504.
78. Touil H, Mounts K, De Jager PL. Differential impact of environmental factors on systemic and localized autoimmunity. *Front Immunol*. 2023;14.
79. Martínez J, br JM, Hernández JL, Pinedo G, Llorca J, Obregón E, *et al*. Bone turnover markers in Spanish postmenopausal women: the Camargo cohort study. *Clin Chim Acta* 2009;409:70–4.
80. Olmos JM, Hernández JL, García-Velasco P, Martínez J, Llorca J, González-Macías J. Serum 25-hydroxyvitamin D, parathyroid hormone, calcium intake, and bone mineral density in Spanish adults. *Osteoporos Int* 2016;27:105–13.

81. Olmos JM, Hernández JL, Pariente E, Martínez J, Valero C, González- Macías J. Trabecular bone score and bone quantitative ultrasound in Spanish postmenopausal women. The Camargo Cohort Study. *Maturitas* 2020;132:24–9.
82. Hernández JL, Olmos JM, Pariente E, Martínez J, Valero C, García-Velasco P, *et al.* Metabolic syndrome and bone metabolism: the Camargo cohort study. *Menopause* 2010;17:955–61.
83. Olmos JM, Hernández JL, Martínez J, Castillo J, Valero C, Pérez Pajares I, *et al.* Bone turnover markers and bone mineral density in hypertensive postmenopausal women on treatment. *Maturitas*. 2010;65:396-402.
84. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. Actividad Física para la Salud y Reducción del Sedentarismo. Recomendaciones para la población. Estrategia de Promoción de la Salud y Prevención en el SNS. Madrid; 2015. Disponible en: <https://www.sanidad.gob.es/areas/promocionPrevencion/actividadFisica/recomendaciones.htm>
85. Candás B, Pocoví M, Romero C, Vella JC, Esteban M, Castro MJ, *et al.* Estrategia para el diagnóstico de las dislipidemias. Recomendación 2018. *Rev Lab Clin*. 2019;12(4):e21-e33.
86. Alberti KG, Zimmet P, Shaw J. Metabolic syndrome - A new world-wide definition. A consensus statement from the International Diabetes Federation. *Diabet Med*. 2006;23:469-80.
87. Holick MF. Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr*. 2004;80(6):1678S-88S.
88. Andrade LEC, Klotz W, Herold M, Conrad K, Rönnelid J, Fritzler MJ, *et al.* International consensus on antinuclear antibody patterns: definition of the AC-29 pattern associated with antibodies to DNA topoisomerase I. *Clin Chem Lab Med*. 2018;56:1783–8.
89. Aringer M, Leuchten N, Johnson SR. New criteria for lupus. *Curr Rheumatol Rep*. 2020;22:1–8.
90. Pérez D, Smith A, Johnson M, *et al.* Predictive autoimmunity using autoantibodies: Screening for anti-nuclear antibodies. *Clin Chem Lab Med*. 2018, 56(10):1771–1777.
91. Naranjo L, Shovman O, Pérez D, Infantino M, Cabrera-Marante O, Lozano F, Gilburd B, Manfredi M, Serrano M, Morillas L, *et al.* Algorithm for antinuclear antibodies in subjects with clinical suspicion of autoimmune diseases. *Clin Exp Rheumatol*. 2020;38:633–639.
92. González Rodríguez C, Martínez A, López R, *et al.* Comparison of the analytical and clinical performances of two different routine testing protocols for antinuclear antibody screening. *J Clin Lab Anal*. 2021;35(9).
93. Avery TY, van de Cruys M, Austen J, Stals F, Damoiseaux JGMC. Antinuclear antibodies in daily clinical practice: prevalence in primary, secondary, and tertiary care. *J Immunol Res*. 2014;2014:401739.

94. Marin GG, Cardiel MH, Cornejo H, Viveros ME. Prevalence of antinuclear antibodies in 3 groups of healthy individuals: blood donors, hospital personnel, and relatives of patients with autoimmune diseases. *J Clin Rheumatol*. 2009;15:325–9.
95. Hayashi N, Koshiba M, Nishimura K, Sugiyama D, Nakamura T, Morinobu S, et al. 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. *Mod Rheumatol*. 2008;18:153–60.
96. Andrade LEC, Damoiseaux J, Vergani D, Fritzler MJ. Antinuclear antibodies (ANA) as a criterion for classification and diagnosis of systemic autoimmune diseases. *J Transl Autoimmun*. 2022;5:100145.
97. Naides SJ, Genzen JR, Abel G, Bashleben C, Ansari MQ, Marin. Antinuclear Antibodies (ANA) testing method variability: A survey of participants in the College of American Pathologists' (CAP) Proficiency Testing Program. *J. Rheumatol*. 2020;47:1768–1773.
98. Didier K, Bolko L, Giusti D, Toquet S, Robbins A, Antonicelli F, Servettaz A. Autoantibodies associated with connective tissue diseases: What meaning for clinicians? *Front. Immunol*. 2018; 26:9:541.
99. Wang K-Y, Yang Y-H, Chuang Y-H, Chan P-J, Yu H-H, Lee J-H, et al. The initial manifestations and final diagnosis of patients with high and low titers of antinuclear antibodies after 6 months of follow-up. *J Microbiol Immunol Infect*. 2011; 44(3):222–8.
100. Fernandez SA, Lobo AZ, Oliveira ZN, Fukumori LM, Prigo AM, Rivitti EA. Prevalence of antinuclear autoantibodies in the serum of normal blood donors. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo*. 2003;58(6):315–9.
101. Sharma N, Sharma V, Kumar S, Thakur S, et al. Prevalence of antinuclear antibodies among healthy blood donors: An experience of a Regional Blood Transfusion Center. *Indian J Med Res*. 2023;75:133–135.
102. Grimaldi CM. Sex and systemic lupus erythematosus: the role of the sex hormones estrogen and prolactin on the regulation of autoreactive B cells. *Curr Opin Rheumatol*. 2006; 18:456–461.
103. Oliver JE, Silman AJ. Why are women predisposed to autoimmune rheumatic diseases? *Arthritis Res Ther*. 2009; 11:252.
104. Parks CG, Miller FW, Satoh M, et al. Reproductive and hormonal risk factors for antinuclear antibodies (ANA) in a representative sample of U.S. women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2014;23:2492–502.
105. Yadin O, Sarov B, Naggan L, Slor H, Shoenfeld Y. Natural autoantibodies in the serum of healthy women—a five-year follow-up. *Clin Exp Immunol*. 1989;75:402.
106. Nilsson BO, Skogh T, Ernerudh J, Johansson B, Lofgren S, Wikby A, et al. Antinuclear antibodies in the oldest-old women and men. *J Autoimmun*. 2006;27:281–8.

107. Hurme M, Korkki S, Lehtimäki T, Karhunen PJ, Jylhä M, Hervonen A, *et al.* Autoimmunity and longevity: Presence of antinuclear antibodies is not associated with the rate of inflammation or mortality in nonagenarians. *Mech Ageing Dev.* 2007 May;128(5–6):407–8.
108. Miller FW. Environmental agents and autoimmune diseases. *Adv Exp Med Biol.* 2011;711:61–81.
109. Singh RP, Waldron RT, Hahn BH. Genes, tolerance and systemic autoimmunity. *Autoimmun Rev.* 2012;11:664–9.
110. Weyand CM, Goronzy JJ. Aging of the immune system. Mechanisms and therapeutic targets. *Ann Am Thorac Soc.* 2016;13(Suppl 5):S422–S428.
111. Chang C, Gershwin ME. Drugs and autoimmunity: A contemporary review and mechanistic approach. *J Autoimmun.* 2010;34:J266–J275.
112. Litwin CM, Binder SR. ANA testing in the presence of acute and chronic infections. *J Immunoassay Immunochem.* 2016;37:439–52.
113. Tan EM. From rheumatic diseases to cancer-role of autoantibodies as diagnostic biomarkers. *Arthritis Res Ther* 2012;14(suppl 1):O2.
114. Liang KP, Kremers HM, Crowson CS, Snyder MR, Therneau TM, Roger VL, *et al.* Autoantibodies and the risk of cardiovascular events. *J Rheumatol.* 2009;36:2462–9.
115. Solow EB, Vongpatanasin W, Skaug B, Karp DR, Ayers C, de Lemos JA. Antinuclear antibodies are associated with all-cause mortality and cardiovascular outcomes in the general population. *J Am Coll Cardiol.* 2015;65:2669–70.
116. Ritterhouse LL, Crowe SR, Niewold TB, Kamen DL, Macwana SR, Roberts VC, *et al.* Vitamin D deficiency is associated with an increased autoimmune response in healthy individuals and in patients with systemic lupus erythematosus *Ann Rheum Dis.* 2011;70(9):1569–74.
117. Rubin RL. Drug-induced lupus. *Expert Opin Drug Saf.* 2015;14:361–78.
118. Bell BG, Schellevis F, Stobberingh E, Goossens H, Pringle M. A systematic review and meta-analysis of the effects of antibiotic consumption on antibiotic resistance. *BMC Infect Dis.* 2014;14(1):13-20.
119. Kanis JA, Harvey NC, Johansson H, Liu E, Vandenput L, Lorentzon M, *et al.* A decade of FRAX: How has it changed the management of osteoporosis? *Aging Clin Exp Res.* 2020 Feb;32(2):187–96.
120. Pertovaara M, Kahonen M, Juonala M, Laitinen T, Taittonen L, Lehtimäki T, *et al.* Autoimmunity and atherosclerosis: the presence of antinuclear antibodies is associated with decreased carotid elasticity in young women. The cardiovascular risk in young finns study. *Rheumatology.* 2009;48:1553–6.

121. Barbhaiya M, Lu B, Sparks JA, *et al.* Influence of alcohol consumption on the risk of systemic lupus erythematosus among women in the Nurses' Health Study cohorts. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2017; 69:384–92.
122. Cozier YC, Barbhaiya M, Castro-Webb N, *et al.* Relationship of cigarette smoking and alcohol consumption to incidence of systemic lupus erythematosus in a prospective cohort study of Black women. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2019;71:671–7.
123. Hahn J, Leatherwood C, Malspeis S, Liu X, Lu B, Roberts AL, *et al.* Associations between daily alcohol consumption and systemic lupus erythematosus-related cytokines and chemokines among US female nurses without SLE. *Lupus*. 2020;29:976–82.
124. Crandall JP, Polsky S, Howard AA, Perreault L, Bray GA, Barrett-Connor E, *et al.* Alcohol consumption and diabetes risk in the Diabetes Prevention Program. *Am J Clin Nutr*. 2009;90(3):595-601.
125. Fahim M, Zadeh AR, Shoureshi P, Ghadimi K, Cheshmavar M, Sheikhinia N, *et al.* Alcohol and multiple sclerosis: an immune system-based review. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol*. 2020;12(2):58-69.
126. Di Giuseppe D, Alfredsson L, Bottai M, Askling J, Wolk A. Long term alcohol intake and risk of rheumatoid arthritis in women: a population based cohort study. *BMJ*. 2012; 10:345:e4230.
127. Turk JN, Zahavi ER, Gorman AE, Murray K, Turk MA, Veale DJ. Exploring the effect of alcohol on disease activity and outcomes in rheumatoid arthritis through systematic review and meta-analysis. *Sci Rep*. 2021;11:1–6.
128. Azizov V, Zaiss MM. Alcohol consumption in rheumatoid arthritis: a path through the immune system. *Nutrients*. 2021;13(4):1324.
129. Klareskog L, Padyukov L, Alfredsson L. Smoking as a trigger for inflammatory rheumatic diseases. *Curr Opin Rheumatol*. 2007;19:49–54.
130. Perricone C, Versini M, Ben-Ami D, Gertel S, Watad A, Segel MJ, *et al.* Smoke and autoimmunity: The fire behind the disease. *Autoimmun Rev*. 2016 Apr;15(4):354–74.
131. Amoriello R, Mariottini A, Ballerini C. immunosenescence and autoimmunity: exploiting the T-cell receptor repertoire to investigate the impact of aging on multiple sclerosis. *Front Immunol*. 2021;12:5175.
132. Ruan P, Wang S, Yang M, Wu H. The ABC-associated immunosenescence and lifestyle interventions in autoimmune disease. *Rheumatol Immunol Res*. 2022;3(3):128-135.
133. Fukushima Y, Minato N, Hattori M. The impact of senescence-associated T cells on immunosenescence and age-related disorders. *Inflamm Regen*. 2018;38:1–6.
134. Coppe JP, Desprez PY, Krtolica A, Campisi J. The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annu Rev Pathol*. 2010;5:99.

135. Ohtani N. The roles and mechanisms of senescence-associated secretory phenotype (SASP): can it be controlled by senolysis?. *Inflamm Regen*. 2022;42:1–8.
136. Ray D, Yung R. Immune senescence, epigenetics and autoimmunity. *Clin Immunol*. 2018;196:59-63.
137. Nielsen S, Giang KW, Wallinder A, Rosengren A, Pivodic A, Jeppsson A, Karlsson M. Social factors, sex, and mortality risk after coronary artery bypass grafting: A population-based cohort study. *J Am Heart Assoc*. 2019;8(6):e011490.
138. Ruffatti A, Del Ross T, Ciprian M, Bertero MT, Sciascia S, Scarpato S, *et al*. Risk factors for a first thrombotic event in antiphospholipid antibody carriers: a prospective multicentre follow-up study. *Ann Rheum Dis*. 2011;70:1083–6.
139. Gkrouzman E, Willis R, Andrade D, Tektonidou MG, Pengo V, Ruiz-Irastorza G, Belmont HM, Fortin PR, Gerosa M, Signorelli F, Atsumi T, Branch DW, *et al*. APS ACTION. Associations Among Antiphospholipid Antibody Types, Isotypes, and Titers: An AntiPhospholipid Syndrome Alliance for Clinical Trials and InternatiOnal Networking (APS ACTION) Study. *Lab Invest*. 2023 Jun;103(6):100147.



## **8. ANEXOS**



## 8.1 ANEXO I

### Publicación 1.

*"Comparison of ANA testing by indirect immunofluorescent or solid-phase assay in a low pre-test probability population for systemic autoimmune disease: the Camargo Cohort"*

Martinez-Revuelta, Daniel, Irure-Ventura, Juan, López-Hoyos, Marcos, Olmos, José Manuel, Pariente, Emilio, Martín-Millán, Marta, Nan, Daniel, Comins-Boo, Alejandra, Martínez-Taboada, Víctor Manuel and Hernández, José Luis. "Comparison of ANA testing by indirect immunofluorescence or solid-phase assays in a low pre-test probability population for systemic autoimmune disease: the Camargo Cohort" *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)* 61, no. 6 (2023): 1095-1104.  
<https://doi.org/10.1515/cclm-2022-1136>



## 8.2 ANEXO II

### Publicación 2.

*“Prevalence and sociodemographic correlates of antinuclear antibody testing by indirect immunofluorescence or solid-phase assays in a Spanish population: the Camargo Cohort”*

Irure-Ventura, J., Martínez-Revuelta, D., López-Hoyos, M. et al. Prevalence and sociodemographic correlates of antinuclear antibody testing by indirect immunofluorescence or solid-phase assays in a Spanish population: the Camargo Cohort. *Immunol. Res.* 72, 260–270 (2024).  
<https://doi.org/10.1007/s12026-023-09430-z>





## Prevalence and sociodemographic correlates of antinuclear antibody testing by indirect immunofluorescence or solid-phase assays in a Spanish population: the Camargo Cohort

Juan Irure-Ventura<sup>1,2</sup> · Daniel Martínez-Revuelta<sup>3</sup> · Marcos López-Hoyos<sup>1,2,4</sup> · Marta Martín-Millán<sup>2,4,5</sup> · Daniel Nan<sup>2,4,5</sup> · Emilio Pariente<sup>3</sup> · Javier Pardo-Lledias<sup>2,4,5</sup> · Alejandra Comins-Boo<sup>1,2</sup> · José Manuel Olmos<sup>2,4,5</sup> · Víctor Manuel Martínez-Taboada<sup>2,4,6</sup> · José Luis Hernández<sup>2,4,5</sup>

Received: 6 June 2023 / Accepted: 16 October 2023  
© The Author(s) 2023

### Abstract

Autoantibodies are the hallmark of autoimmunity, and specifically, antinuclear antibodies (ANA) are one of the most relevant antibodies present in systemic autoimmune diseases (AID). In the present study, we evaluate the relationship between ANA and sociodemographic and biobehavioral factors in a population with a low pre-test probability for systemic AID. ANA were determined in serum samples at baseline visit from 2997 participants from the Camargo Cohort using indirect immunofluorescence assay, and two solid phase assays (SPA), addressable laser bead immunoassay, and fluorescence enzyme immunoassay. Sociodemographic and biobehavioral features of the subjects were obtained at baseline visit using a structured questionnaire. The prevalence of ANA positive results was significantly higher when indirect immunofluorescence assay was used as screening method in comparison with SPAs, being higher in females, older subjects, and those with higher C-reactive protein levels. Considering biobehavioral features, the prevalence was higher in those individuals with a sedentary lifestyle, and in ex- and non-alcohol users. Moreover, considering the relevance of the antibody load using ANA Screen, the prevalence of the antibody load also increased with age, especially in females. In conclusion, the prevalence of ANA varies depending on sociodemographic and biobehavioral features of the subjects, which could be relevant specifically in a population with a low pre-test probability for systemic AIDs.

**Keywords** Antinuclear antibodies (ANA) · Autoimmune disease (AID) · Indirect immunofluorescence (IIF) · Solid phase assays (SPA) · Pre-test probability · Sociodemographic and biobehavioral features

### Introduction

Autoantibodies are the hallmark of autoimmunity, and specifically, antinuclear antibodies (ANA) are one of the most relevant antibodies present in systemic autoimmune diseases (AID). The presence of ANA, together with anti-dsDNA antibodies and extractable nuclear antigens (ENA), is important for the classification, diagnosis, and monitoring of patients with systemic AID. The first evidence of the

existence of ANA was the description of the LE-cell phenomenon by Hargraves et al. in 1948 [1]. However, it was not until the early 1950s, due to the research performed by Coons, Kaplan, and Weller, when indirect immunofluorescence (IIF), using cryopreserved sections of rodent tissues as substrate, began to be used for the detection of ANA. Later on, in the mid-70s, it was discovered that human tissue culture cells, such as human epithelial type-2 cells (HEp-2 cells) derived from laryngeal carcinoma, were better than primary organ sections for the detection of ANA. This is so because the production of this type of cell in large numbers was easier and they had bigger nuclei and expressed antigens in various stages of the cellular cycle [2].

Despite being characteristic of systemic AID, ANA are not specific since they may be present in organ-specific AID [3], infections [4, 5], inflammatory disorders [6], neoplasms [7], or even in healthy individuals [8, 9].

Drs. J. Irure Ventura and D. Martínez-Revuelta contributed equally to the manuscript and shared the first authorship.

Prof. J. L. Hernández and V. M. Martínez-Taboada shared the senior authorship.

Extended author information available on the last page of the article

Published online: 04 November 2023

Springer

Currently, the IIF assay using Hep-2 cells as substrate, due to its high sensitivity, continues to be one of the recommended methods for the study of ANA, as expressed in the position statement of the American College of Rheumatology (ACR), published in 2010, and also by the European League Against Rheumatism, EULAR in 2019 [10]. Likewise, as demonstrated in a recent publication by the Spanish group of autoimmunity (GEAI), it continues to be the most widely used method for ANA detection [11]. Nevertheless, in recent years, several publications have questioned this position and question whether IIF should be replaced by solid-phase assays (SPA) [12–16]. Despite all this technological development for the study of ANA, the 2019 EULAR/ACR classification criteria for SLE maintain the presence of ANAs using Hep-2 cells or an equivalent positive test as an entry criterion for SLE patients [17]. However, it should be noted that the IIF assay using Hep-2 cells is a laborious process, that needs skilled operators, and therefore, the reliability of the results is directly related to the experience of the technician.

In comparison with the IIF assay, SPAs are less sensitive but more specific for the detection of ANA in systemic AID [18, 19]. In addition, different studies have shown that combining the results obtained with both techniques (IIF and SPA) is more accurate than performing either of the two tests separately [14, 16, 20]. In fact, the single presence of ANA by IIF is not specific of AID, since these autoantibodies appear in up to 30% of healthy individuals, a proportion that increases with age, especially in women [8, 21–23].

However, all of this evidence generally comes from well-characterized cohorts of patients with systemic AIDs, and yet there are scarce data on the value of ANAs detected by IIF and SPA in unselected populations and especially in cohorts with a low pretest probability. This is a very important aspect to consider due to how the request for ANA has evolved over the years. Historically, only rheumatologists and clinical immunologists ordered ANA for diagnosis of systemic AID. Over time, several clinicians, such as nephrologists, internists, and gastroenterologists joined in requesting ANA, and currently, almost any clinician and even general practitioners should request them [24]. Initially, as a consequence of this increase in the number of requested tests, the pre-test probability for ANA detection was very high, and in recent years, it has been significantly reduced, reaching currently a very low pre-test probability. Therefore, due to this low pre-test probability, the post-test probability for ANA positivity is also low. Taking into account this aspect, we consider that it is of great importance to study the presence of ANA through IIF and SPA in a low pre-test probability population for systemic AID, such as the Camargo Cohort [25] since ANA detection by IIF may be better when the pre-test probability is high, whereas SPA techniques are more

useful in populations with an overall low pre-test probability for systemic AID.

A less studied aspect is whether there is a relationship between the prevalence of ANA and the sociodemographic features of a population. Although some reports suggest a higher prevalence of ANA in females and older individuals [26, 27], the association between ANA and other sociodemographic factors is largely unknown. Therefore, in the present work, we evaluate the relationship between ANA and sociodemographic and biobehavioral factors in the Camargo Cohort, a well-established population with a low pre-test probability for systemic AID, which could reflect the current trend regarding the request for ANA.

## Methods

### Study population and serum collection

The Camargo Cohort study is a prospective community-based study designed to evaluate the prevalence and incidence of metabolic bone diseases and risk factors for osteoporosis and fragility fractures in Caucasian postmenopausal women and men older than 49 who attended a Primary Care Centre in Northern Spain for their regular health examination or medical reasons, whichever happened first. The study was set up between February 2006 and February 2011, and full details of this cohort have been previously reported [28–31].

In the present study, 2997 serum samples from all the subjects included in the Camargo Cohort have been analyzed. Specifically, the first available serum sample of each subject has been tested for the presence of ANA. This sample was selected to focus on an age range where age-associated increases in ANA become apparent with a low pretest probability.

The study was conducted according to the criteria set by the Declaration of Helsinki and was approved by the Regional Ethics Committee (CEIm Internal Code: 2020.309). All patients gave their written informed consent.

### Data collection and assessment of sociodemographic and biobehavioral features

At the baseline visit, subjects were interviewed by the investigators using a structured questionnaire that included age, sex, education level, smoking, alcohol consumption, physical exercise, cardiovascular risk factors, chronic disorders, body mass index (BMI), and serum C-reactive protein (CRP) levels. BMI was defined as the weight (kg) divided by height squared ( $m^2$ ), and was stratified as follows: underweight ( $<20$ ), normal weight (20–25), overweight (25.01–29.99), and obese ( $\geq 30$ ). Smoking was classified as current,

ex-smoker, and non-smoker. Current alcohol intake was defined as >20 g of alcohol per day, and subjects were classified as current, ex-, and non-alcohol consumers. Physical activity was classified as sedentary (armchair to bed), moderate (<3 h/week of active exercise), and intense (> 3 h/week of active exercise).

### ANA screening methods

At baseline, serum samples from each subject were obtained and used for ANA testing. Specifically, ANA was determined by three different methods including IIF on HEp-2 cells (Biosystems, Barcelona, Spain), and two SPAs, such as ANA Screen (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), and connective tissue disease (CTD) Screen (ThermoFisher, Freiburg, Germany).

### IIF assay on HEp-2 cells

Sera were diluted 1:160 with phosphate-buffered saline (PBS), which was considered the screening dilution. A cut-off 1:160 ANA titer was selected instead of 1:80 in order to obtain a high specificity (86.2% (CI 95% 80.4–90.5)) maintaining a relatively high sensitivity (95.8% (CI 95% 94.1–97.1)) [32]. A Zeiss fluorescence microscope with incident mercury light illumination and filters for activation/emission of fluorescein isothiocyanate (FITC) was used. Slides with fixed HEp-2 cells served as a source of nuclear antigens (Biosystems, Barcelona, Spain). FITC-conjugated rabbit anti-human IgG was used as the secondary antibody (Biosystems, Barcelona, Spain). Incubations, washing steps, and mounting microscope slides were done following the manufacturer's instructions. The slides were inspected under the fluorescence microscope at 400 magnification. Nuclear, cytoplasmic, and mitotic HEp-2 patterns were considered, and the nomenclature for ANA detected using IIF assay on HEp-2 cells was performed according to the International Consensus on ANA Patterns (ICAP) [33, 34].

### ANA Screen Bio-Rad

The BioPlex 2200 ANA Screen system (Bio-Rad, Hercules [CA], USA) based on ALBIA technology was used to detect 13 types of autoantibodies simultaneously, such as those directed against dsDNA, chromatin, centromere B, Scl-70, RNP (RNP-A, RNP-68), Sm, RNP/Sm, Ro (SSA-52, SSA-60), SSB/La, Jo-1, and ribosomal P protein, following manufacturer's instructions. The presence of anti-dsDNA antibody was classified as negative when levels were  $\leq 4$  IU/mL, indeterminate if 5 to 9 IU/mL, and positive when  $\geq 10$  IU/mL, as recommended by the manufacturer. For the other autoantibodies, the results were expressed as an antibody index (AI). An AI of 1.0 was the cut-off concentration that

corresponded to approximately the 99th percentile of values obtained from a non-disease population in the manufacturer's study. Results of  $\geq 1.0$  were reported as positive (range, 0.2–8.0 AI). A test result was considered positive for ANA if one or more of the antibody tests in the panel were positive.

### CTD Screen ThermoFisher

EliA CTD Screen (ThermoFisher, Freiburg, Germany) based on FEIA was run on Phadia 250 system (Thermo Fisher Scientific) to detect autoantibodies against 14 antigens, such as centromere (CENP-B), dsDNA, Jo-1, Mi-2, proliferating cell nuclear antigen (PCNA), polymyositis (PM)-Scl, ribosomal-P, RNA Pol III, Scl-70, Sm, SSA/Ro (Ro52 and Ro60), SSB/La, U1-RNP (RNP-70, A, and C), and fibrillarin, following manufacturer's instructions. The results obtained were interpreted as positive, indeterminate, or negative according to the cut-off values specified by the manufacturer (>1.0 ratio, positive; 0.7–1.0 ratio, indeterminate; <0.7 ratio, negative). A test result was considered positive for ANA when one or more of the antibody tests in the panel were positive.

### Statistical analysis

The distribution of continuous variables was assessed using Kolmogorov–Smirnov or Shapiro–Wilk tests when indicated. Results were expressed as mean  $\pm$  standard deviation for continuous variables and percentages for categorical data. Comparisons were based on the chi-squared test or Fisher test for categorical data and the Student's *t*-test or Mann-Whitney *U*-test for parametric and non-parametric continuous variables, respectively. A two-tailed *p*-value <0.05 was considered significant in all the calculations. Statistical analysis was performed using SPSS 28.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA).

## Results

### Prevalence of ANA according to the three assays and association with sociodemographic characteristics

The sociodemographic and biobehavioral variables of the subjects included in the study are shown in Table 1. The prevalence of ANA positive results in the subjects of the Camargo Cohort using the three methods for ANA detection, considering the different sociodemographic features, is shown in Table 2.

As previously stated, the prevalence of ANA positive results is significantly higher when IIF assay (25.8%) was used as screening method in comparison with SPAs, including ANA Screen (13.6%) and CTD Screen (7.9%) [25]. As

ex-smoker, and non-smoker. Current alcohol intake was defined as >20 g of alcohol per day, and subjects were classified as current, ex-, and non-alcohol consumers. Physical activity was classified as sedentary (armchair to bed), moderate (<3 h/week of active exercise), and intense (> 3 h/week of active exercise).

### ANA screening methods

At baseline, serum samples from each subject were obtained and used for ANA testing. Specifically, ANA was determined by three different methods including IIF on HEp-2 cells (Biosystems, Barcelona, Spain), and two SPAs, such as ANA Screen (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), and connective tissue disease (CTD) Screen (ThermoFisher, Freiburg, Germany).

### IIF assay on HEp-2 cells

Sera were diluted 1:160 with phosphate-buffered saline (PBS), which was considered the screening dilution. A cut-off 1:160 ANA titer was selected instead of 1:80 in order to obtain a high specificity (86.2% (CI 95% 80.4–90.5)) maintaining a relatively high sensitivity (95.8% (CI 95% 94.1–97.1)) [32]. A Zeiss fluorescence microscope with incident mercury light illumination and filters for activation/emission of fluorescein isothiocyanate (FITC) was used. Slides with fixed HEp-2 cells served as a source of nuclear antigens (Biosystems, Barcelona, Spain). FITC-conjugated rabbit anti-human IgG was used as the secondary antibody (Biosystems, Barcelona, Spain). Incubations, washing steps, and mounting microscope slides were done following the manufacturer's instructions. The slides were inspected under the fluorescence microscope at 400 magnification. Nuclear, cytoplasmic, and mitotic HEp-2 patterns were considered, and the nomenclature for ANA detected using IIF assay on HEp-2 cells was performed according to the International Consensus on ANA Patterns (ICAP) [33, 34].

### ANA Screen Bio-Rad

The BioPlex 2200 ANA Screen system (Bio-Rad, Hercules [CA], USA) based on ALBIA technology was used to detect 13 types of autoantibodies simultaneously, such as those directed against dsDNA, chromatin, centromere B, Scl-70, RNP (RNP-A, RNP-68), Sm, RNP/Sm, Ro (SSA-52, SSA-60), SSB/La, Jo-1, and ribosomal P protein, following manufacturer's instructions. The presence of anti-dsDNA antibody was classified as negative when levels were  $\leq 4$  IU/mL, indeterminate if 5 to 9 IU/mL, and positive when  $\geq 10$  IU/mL, as recommended by the manufacturer. For the other autoantibodies, the results were expressed as an antibody index (AI). An AI of 1.0 was the cut-off concentration that

corresponded to approximately the 99th percentile of values obtained from a non-disease population in the manufacturer's study. Results of  $\geq 1.0$  were reported as positive (range, 0.2–8.0 AI). A test result was considered positive for ANA if one or more of the antibody tests in the panel were positive.

### CTD Screen ThermoFisher

EliA CTD Screen (ThermoFisher, Freiburg, Germany) based on FEIA was run on Phadia 250 system (Thermo Fisher Scientific) to detect autoantibodies against 14 antigens, such as centromere (CENP-B), dsDNA, Jo-1, Mi-2, proliferating cell nuclear antigen (PCNA), polymyositis (PM)-Scl, ribosomal-P, RNA Pol III, Scl-70, Sm, SSA/Ro (Ro52 and Ro60), SSB/La, U1-RNP (RNP-70, A, and C), and fibrillarin, following manufacturer's instructions. The results obtained were interpreted as positive, indeterminate, or negative according to the cut-off values specified by the manufacturer (>1.0 ratio, positive; 0.7–1.0 ratio, indeterminate; <0.7 ratio, negative). A test result was considered positive for ANA when one or more of the antibody tests in the panel were positive.

### Statistical analysis

The distribution of continuous variables was assessed using Kolmogorov–Smirnov or Shapiro–Wilk tests when indicated. Results were expressed as mean  $\pm$  standard deviation for continuous variables and percentages for categorical data. Comparisons were based on the chi-squared test or Fisher test for categorical data and the Student's *t*-test or Mann-Whitney *U*-test for parametric and non-parametric continuous variables, respectively. A two-tailed *p*-value <0.05 was considered significant in all the calculations. Statistical analysis was performed using SPSS 28.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA).

## Results

### Prevalence of ANA according to the three assays and association with sociodemographic characteristics

The sociodemographic and biobehavioral variables of the subjects included in the study are shown in Table 1. The prevalence of ANA positive results in the subjects of the Camargo Cohort using the three methods for ANA detection, considering the different sociodemographic features, is shown in Table 2.

As previously stated, the prevalence of ANA positive results is significantly higher when IIF assay (25.8%) was used as screening method in comparison with SPAs, including ANA Screen (13.6%) and CTD Screen (7.9%) [25]. As

observed in the prevalence of ANA. Nevertheless, using IIF or CTD Screen, a higher, albeit non-significant, frequency of ANA positive results was observed in the subgroup of subjects without studies.

### Prevalence of positive ANA and association with selected biobehavioral features

Several differences were observed in the prevalence of ANA according to the selected biobehavioral characteristics (Table 3). While no differences were observed in the prevalence of ANA according to the BMI, the prevalence of these autoantibodies varied depending on the physical activity and the alcohol intake of the subjects. Specifically, ANA-positive results were more frequent in participants with a sedentary lifestyle in comparison with individuals that performed moderate or intense physical activity. These results were observed when the screening of ANA was performed using IIF assay ( $p = 0.03$ ) and CTD Screen ( $p = 0.01$ ). Likewise, this trend was also observed using ANA Screen, without reaching a significant difference. Regarding alcohol consumption, independently of the method used for

ANA detection, the prevalence of ANA was higher in ex- and non-alcohol consumers compared to current users. However, among the three methods used, only the CTD screen demonstrated to be significantly higher in both groups ( $p = 0.008$ ). When the prevalence of ANA was analyzed regarding the smoking habit, a higher frequency of ANA positive results was observed in non-smoker subjects independently of the screening method used. Nevertheless, the observed differences did not reach statistical significance. Finally, using CTD Screen, a significant increase in the prevalence of ANA was found in those subjects with higher CRP levels ( $p = 0.01$ ). This finding was also observed using IIF assay as a screening method for ANA detection.

### Prevalence of ANA titers by IIF and associations with selected sociodemographic and biobehavioral features

The prevalence of ANA by IIF assay, considering the different antibody titers observed, showed different associations with the selected biobehavioral measures.

**Table 3** Estimated prevalence of antinuclear antibodies (ANA) in the Camargo Cohort according to BMI, smoking, alcohol intake, physical activity, and C-reactive protein

Variable	ANA IIF + n (%)	$p^*$	ANA Screen + n (%)	$p^*$	CTD Screen + n (%)	$p^*$
BMI ( $kg/m^2$ ), n (%)		0.98		0.90		0.52
<20	0 (0.0)		0 (0.0)		0 (0.0)	
20–25	146 (26.8)		72 (13.6)		43 (8.1)	
25.01–29.99	326 (25.0)		168 (13.1)		77 (5.9)	
$\geq 30$	263 (26.0)		137 (13.8)		91 (9.0)	
Smoking, n (%)		0.08		0.93		0.35
Current	118 (26.7)		54 (12.4)		21 (4.8)	
Ex	154 (22.7)		82 (12.4)		39 (5.8)	
No	502 (26.8)		264 (14.3)		175 (9.4)	
Alcohol intake, n (%)		0.11		0.06		0.008
Current	172 (23.2)		81 (11.1)		35 (4.7)	
Ex	62 (26.5)		34 (14.9)		22 (9.5)	
No	540 (26.7)		285 (14.4)		178 (8.8)	
Physical activity, n (%)		0.03		0.96		0.01
Sedentary	50 (32.3)		29 (19.2)		24 (15.5)	
Moderate	330 (26.7)		160 (13.1)		101 (8.2)	
Intense	387 (24.5)		207 (13.4)		109 (6.9)	
CRP (mg/dl), n (%)		0.07		0.48		0.01
<0.10	236 (24.8)		105 (11.2)		51 (5.4)	
0.10–0.49	313 (25.5)		185 (15.3)		109 (8.9)	
0.50–1.0	106 (27.7)		48 (12.9)		30 (7.9)	
>1.0	70 (30.0)		32 (14.2)		26 (11.2)	

n: reflects the number of subjects within the sample. %: reflects the percentage of subjects in each subgroup. \* $p$  for trend for each ANA technique

Abbreviations: ANA antinuclear antibodies, IIF indirect immunofluorescence, BMI body mass index, CRP C-reactive protein

Specifically, ANA positive results were considered as 1/160 or >1/160, and the specific titer obtained was also taken into account.

As can be seen in Supplementary Table 1, when the study population was stratified by age, as expected due to the low pretest probability of the subjects included, a high frequency of negative results was obtained at all ages, ranging from 69.9 to 75.9%. When ANA results were stratified in negative, positive titers 1/160 or >1/160 and analyzed across the age strata, the *p* for trend was 0.036.

Considering the prevalence of ANA based on sex, a significantly higher frequency of negative results was observed in males ( $p < 0.0001$ ) (Table 4). Likewise, while no differences were observed in the frequency of 1/160 ANA positive results, a significant increase of titers >1/160 was observed in women ( $p < 0.0001$ ). Specifically, females showed a significant increase of ANA-positive results at titers of 1/320 and >1/1280 compared to males ( $p < 0.0001$ , and  $p = 0.0002$ , respectively).

When the different ANA titers were considered according to the education level of the participants (Supplementary Table 2) or the smoking habit (data not shown), no differences were observed. Moreover, considering ANA titers and alcohol intake (Supplementary Table 3) or serum CRP quartiles (Supplementary Table 4), we found a trend for lower ANA titers in current drinkers ( $p = 0.059$ ) and higher titers in participants in the higher quartiles of serum CRP levels ( $p = 0.058$ ).

On the contrary, when the different titers of ANA were considered in subjects according to their physical activity, several differences were observed, as depicted in Table 5. Thus, while no differences were observed regarding 1/160 ANA positive results, the prevalence of ANA positive results at titers >1/160 was significantly higher in sedentary subjects in comparison with those who carried out some physical activity ( $p = 0.0005$ ).

**Table 4** Frequency of ANA positive results by indirect immunofluorescence (IIF) assay stratified by sex

	Male	Female	<i>p</i>
ANA IIF negative, <i>n</i> (%)	830 (78.6)	1392 (71.7)	<0.0001
ANA IIF + 1/160, <i>n</i> (%)	141 (13.4)	272 (14.0)	0.66
ANA IIF + >1/160, <i>n</i> (%)	85 (8.0)	277 (14.3)	<0.0001
ANA IIF + 1/320, <i>n</i> (%)	36 (3.4)	145 (7.5)	<0.0001
ANA IIF + 1/640, <i>n</i> (%)	29 (2.7)	41 (2.1)	0.33
ANA IIF + 1/1280, <i>n</i> (%)	14 (1.3)	40 (2.1)	0.19
ANA IIF + >1/1280, <i>n</i> (%)	6 (0.6)	49 (2.5)	0.0002

*n*: reflects the number of subjects within the sample. %: reflects the percentage of subjects in each subgroup

Abbreviations: ANA antinuclear antibodies, IIF indirect immunofluorescence

**Table 5** Frequency of ANA positive results by indirect immunofluorescence (IIF) assay stratified by physical activity

	Sedentary	Moderate	Intense	<i>p</i>
ANA IIF negative, <i>n</i> (%)	105 (67.7)	907 (73.3)	1190 (75.4)	0.07
ANA IIF + 1/160, <i>n</i> (%)	17 (11.0)	179 (14.5)	213 (13.5)	0.36
ANA IIF + >1/160, <i>n</i> (%)	33 (21.3)	151 (12.2)	175 (11.1)	0.0005
ANA IIF + 1/320, <i>n</i> (%)	17 (11.0)	70 (5.7)	94 (6.0)	0.01
ANA IIF + 1/640, <i>n</i> (%)	3 (1.9)	32 (2.6)	35 (2.2)	0.93
ANA IIF + 1/1280, <i>n</i> (%)	6 (3.9)	28 (2.3)	19 (1.2)	0.08
ANA IIF + >1/1280, <i>n</i> (%)	7 (4.6)	21 (1.7)	26 (1.6)	0.02

*n*: reflects the number of subjects within the sample. %: reflects the percentage of subjects in each subgroup. *p* values represent the differences between sedentary subjects and those who perform any physical activity. *p*-value for trend = 0.002 for each exercise category

Abbreviations: ANA antinuclear antibodies, IIF indirect immunofluorescence

### Relevance of the antibody load and associations with sociodemographic and biobehavioral characteristics

The comparison between the antibody load observed in Camargo Cohort subjects using ANA Screen, which gives information about 14 specificities, and the selected sociodemographic features and biobehavioral measures is shown in Table 6. According to the number of autoantibodies, the subjects were classified as follows: antibody load 0 (no autoantibody, 86.4%), antibody load 1 (1 autoantibody, 12.4%), and antibody load  $\geq 2$  (2 or more autoantibodies, 1.2%). An increasing frequency of antibody loads 1 and  $\geq 2$  was detected as the age of the subjects increased ( $p = 0.001$ ).

Once again, when the sex of the participants was considered, a significantly higher frequency of positive results (antibody load 1 and  $\geq 2$ ) was observed in females. Regarding alcohol intake, the antibody load tended to be lower in current drinkers ( $p = 0.08$ ). No significant differences were observed in the different sociodemographic features and biobehavioral measures in terms of antibody load.

### Discussion

The determination of ANA is very important for the diagnosis of patients with suspected systemic AID. However, less is known about the true value of these autoantibodies in populations with a low pre-test probability for systemic AID,

**Table 6** Antibody load using ANA Screen assay according to selected sociodemographic features and biobehavioral characteristics of Camargo Cohort subjects

	Antibody load 0	Antibody load 1	Antibody load $\geq 2$	<i>p</i> *
Total, <i>n</i> (%)	2541 (86.4)	364 (12.4)	36 (1.2)	-
Age (yrs.), <i>n</i> (%)				0.001
<50	72 (90.0)	6 (7.5)	2 (2.5)	
50–59	939 (88.8)	112 (10.6)	7 (0.7)	
60–69	759 (85.7)	117 (13.2)	10 (1.1)	
70–79	513 (84.5)	83 (13.7)	11 (1.8)	
$\geq 80$	258 (83.2)	46 (14.8)	6 (1.9)	
Sex, <i>n</i> (%)				0.0001
Male	923 (89.0)	110 (10.6)	4 (0.4)	
Female	1618 (85.0)	254 (13.3)	32 (1.4)	
Education level, <i>n</i> (%)				0.56
None	37 (88.1)	4 (9.5)	1 (2.4)	
Elementary	1816 (86.3)	258 (12.3)	30 (1.4)	
Secondary	408 (86.4)	62 (13.1)	2 (0.4)	
Vocational training	89 (86.4)	14 (13.6)	0 (0.0)	
University	109 (86.5)	15 (11.9)	2 (1.6)	
BMI ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ), <i>n</i> (%)				0.68
<20	4 (100)	0 (0.0)	0 (0.0)	
20–25	456 (86.4)	66 (12.5)	6 (1.1)	
25.01–29.99	1111 (86.9)	153 (12.0)	15 (1.2)	
$\geq 30$	854 (86.2)	123 (12.4)	14 (1.2)	
Smoking, <i>n</i> (%)				0.62
Current	382 (87.6)	49 (11.2)	5 (1.1)	
Ex-smoker	579 (87.6)	78 (11.8)	4 (0.6)	
Non-smoker	1580 (85.7)	237 (12.9)	27 (1.5)	
Alcohol intake, <i>n</i> (%)				0.08
Current	646 (88.9)	74 (10.2)	7 (1.0)	
Ex	194 (85.1)	34 (14.9)	0 (0.0)	
No	1701 (85.6)	256 (12.9)	29 (1.5)	
Physical activity, <i>n</i> (%)				0.17
Sedentary	122 (80.8)	26 (17.2)	3 (2.0)	
Moderate	1058 (86.9)	142 (11.7)	18 (1.5)	
Intense	1339 (86.6)	193 (12.5)	14 (0.9)	
CRP ( $\text{mg}/\text{dl}$ ), <i>n</i> (%)				0.11
<0.10	835 (88.8)	96 (10.2)	9 (1.0)	
0.10–0.49	1025 (84.7)	170 (14.0)	15 (1.2)	
0.50–1.0	324 (87.1)	40 (11.8)	8 (2.2)	
>1.0	193 (85.8)	29 (12.9)	3 (1.3)	

*n*: reflects the number of subjects within the sample. %: reflects the percentage of subjects in each subgroup. “*p*” represents *p*-values for trend, except for sex (for each antibody load category)

Abbreviations: BMI body mass index, CRP C-reactive protein

and even less about their association with sociodemographic features in these populations.

The present study provides an estimation of the prevalence of ANA, using an IIF assay and two different SPAs, according to different sociodemographic factors and with selected biobehavioral measures. Our results show an overall prevalence of ANA of 25.8% by IIF at 1/160 serum dilution, 13.6% using ANA Screen, and 7.9% using CTD

Screen, which is higher in the case of IIF in comparison to other published reports in healthy selected populations [35–37]. These differences likely relate to the characteristic of the different study populations and the variations in ANA assessment across laboratories. The higher prevalence of ANA detected by IIF assay using HEp-2 cells, in comparison with SPA, could be due to the fact that HEp-2 cells have approximately 100–150 possible autoantigens, which

can be considered the bigger array of autoantigens, while not all specific autoantigens are included in SPAs. Likewise, independently of the methodology used for ANA detection, the frequency of positive results was higher in women than in men. Besides, considering the age of the participants, the older the subject the higher the prevalence of ANA, regardless of the method, although this increase was more evident when SPAs (ANA Screen and CTD Screen) were used [22, 38, 39]. This linear tendency was not observed using IIF, probably due to the presence of ANA patterns that are not associated with any detectable antigenic specificity, as reported in some studies [40]. Furthermore, in line with the results published by other authors, ANA prevalence did not vary with the education level [35].

Considering the association between ANA with selected biobehavioral variables, unlike other studies in which it was observed that the presence of ANA is less common in overweight and obese individuals than in normal-weight individuals [35], we did not observe differences in the prevalence of ANA according to the BMI categories. However, the prevalence of these autoantibodies varied depending on the physical activity and the alcohol intake of the participants. Thus, the prevalence was higher in those individuals with a sedentary lifestyle and in ex- and non-alcohol users compared to current alcohol consumers. The results related to physical activity could be important because the presence of ANA has been associated with decreased carotid elasticity, suggesting that mechanisms resulting in ANA production may be involved in the development of early atherosclerosis [41]. Other authors have also shown that moderate alcohol consumption has been associated with decreased systemic lupus erythematosus (SLE) risk [42]. Likewise, it has also been described in several studies that alcohol acts as a protective factor against the development of other AID, such as diabetes [43], multiple sclerosis, [44] or especially, rheumatoid arthritis (RA) [45, 46]. In the case of RA, upon alcohol exposure, different factors have been identified to be reduced, such as antigen-presentation, T cell activation capacity of antigen-presenting cells, B cell maturation and proliferation, IL-21 production by T follicular helper cells, antigen-specific IgG, and proinflammatory cytokines. Moreover, the Th2 immune response, M2 macrophage function, and anti-inflammatory cytokines (IL-10, TGF- $\beta$ ) [47] seem to be increased. All these factors could be associated with a reduced risk of RA. In the present study, we observed an increasing, albeit non-significant, trend in the antibody load in non-alcohol consumers compared to current drinkers.

In addition, despite some studies suggesting smoking as a risk factor for SLE, RA, and other AID [48], we found a higher frequency of ANA-positive results in non-smoker subjects independently of the screening method used. Finally, using IIF and CTD Screen, a significant increase in the prevalence of ANA was found in those subjects with

higher serum CRP levels, which could indicate the involvement of systemic inflammation in the development of systemic AID. In the same way, this finding could be related to the processes of immunosenescence and autoimmunity that are observed in aging people, in whom, the development of autoreactive T cells, as well as an increase in the production of autoantibodies, has been described [49–51]. Moreover, there is a relationship between immunosenescence and the development of a senescence-associated secretory phenotype (SASP), which has been associated with malignancy progression as well as with autoimmune disorders [51–54].

One could speculate that our findings regarding the association of ANA with different sociodemographic and behavioral factors might be related to the sample size or even by chance. However, in our study, the greater the specificity of the test [55], the greater the statistical significance of some relevant sociodemographic variables analyzed, such as age, alcohol intake, physical activity, and serum CRP levels (as a surrogate marker of inflammation). Due to the scarcity of data and these potential associations, further studies are needed to confirm our findings.

To our knowledge, this is the first study in which the relevance of the autoantibody load is considered, as has been described in antiphospholipid syndrome (APS). In the APS, depending on the number, the type, and the titer of antiphospholipid antibodies, it is possible to establish different risk profiles [55]. In our study, focusing on the relevance of the antibody load using ANA Screen and their associations with selected sociodemographic features and biobehavioral measures showed that among subjects with antibody loads 1 (one autoantibody) and  $\geq 2$  (two or more autoantibodies), in addition to the prevalence of ANA, the prevalence of the antibody load also increases with age.

Our study has some limitations. Firstly, those inherent to a cross-sectional study. Secondly, the evaluation of antigenic specificities in those patients with ANA positive results in the screening assay using SPA was only possible using the ANA screen and not the CTD screen. Thirdly, not all types of autoantibodies were assessed. Finally, the small simple size of certain subgroups may have limited our power to detect differences in ANA prevalence for some factors. Nevertheless, our study also has several strengths, such as the large number of subjects included belonging to a well-established population cohort with a low pre-test probability for systemic AID, and a long-term follow-up, which could reflect the current trend regarding the request for ANA and allow us to draw more robust conclusions. There is no other study in which so many subjects have been included, with such a long follow-up period, where the association between the presence of ANA and selected sociodemographic features and biobehavioral measures had been evaluated.

In conclusion, the prevalence of ANA is higher using IIF assay than SPA in a population-based cohort with a low

pretest probability for AIDs. However, independently of the technique used, the prevalence of ANA is higher in females and older subjects. Considering biobehavioral measures, ANA-positive results were frequent in those individuals with a sedentary lifestyle, as well as in ex-and non-alcohol consumers. Finally, it is important to highlight the study of the antibody load, since it may be relevant when establishing the risk profile of population-based subjects.

**Supplementary information** The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s12026-023-09430-z>.

**Acknowledgements** We acknowledge all the participants of the Camargo Cohort study.

**Author contribution** Conceptualization, DM-R, JI-V, VMM-T, ML-H, and JLH; methodology, VMM-T, ML-H, JI-V, JLH; software, DM-R, JI-V, JLH; validation, VMM-T, ML-H, JLH; formal analysis, JI-V, VMM-T, JLH; investigation, DM-R, JI-V, VMM-T, JLH; resources, VMM-T, ML-H, JLH; data curation, DM-R, DN, MM-M, EP, JP-L, AC-B, JMO; writing—original draft preparation, DM-R, JI-V, ML-H, VMM-T, JLH; writing—review and editing, ML-H, VMM-T, JLH; visualization, JI-V, DM-R, EP, DN, MM-M, ML-H, VMM-T, JLH, AC-B, JMO; supervision, ML-H, VMM-T, JLH; project administration, ML-H, VMM-T, JLH; funding acquisition, ML-H, VMM-T, JMO, JLH. All authors have accepted responsibility for the entire content of this manuscript and approved its submission.

**Funding** Open Access funding provided thanks to the CRUE-CSIC agreement with Springer Nature. This research has been supported by a grant from Instituto de Salud Carlos III (PI21.00532) that could be co-funded by European Union FEDER funds.

## Declarations

**Ethics approval** The study has been conducted according to all relevant national regulations, and institutional policies, following the Declaration of Helsinki, and has been approved by the Regional Ethics Committee (CE:Im Internal Code: 2020.309).

**Informed consent** Informed consent was obtained from all individuals involved in the study.

**Conflict of interest** The authors declare no competing interests.

**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

## References

- Hargraves MM, Richmond H, Morton R. Presentation of two bone marrow elements, the tart cell and the L.E. cell. *Proc Staff Meet Mayo Clin* 1948;23:25–8
- Irure-Ventura J, López-Hoyos M. The past, present, and future in antinuclear antibodies (ANA). *Diagnostics* (Basel). 2022;12. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35328200/> [cited 2023 Feb 11]
- Irure-Ventura J, Rodríguez C, Vergara-Prieto E, Vargas ML, Quirant B, Jurado A, et al. Rare immunofluorescence patterns of autoantibodies on HEp-2 cells defined by ICAP identify different autoimmune diseases in the absence of associated specificities: a Spanish multicentre study. *Rheumatology* (Oxford). 2021;60:3904–12. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33437990/> [cited 2023 Feb 11]
- Im JH, Chung MH, Park YK, Kwon HY, Bæk JH, Lee SY, et al. Antinuclear antibodies in infectious diseases. *Infect Dis (Lond)*. 2020;52:177–85. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31718355/> [cited 2023 Feb 11]
- Damoiseaux J, Dotan A, Fritzier MJ, Bogdanos DP, Meroni PL, Roggenbuck D, et al. Autoantibodies and SARS-CoV2 infection: the spectrum from association to clinical implication: Report of the 15th Dresden Symposium on Autoantibodies. *Autoimmun Rev*. 2022;21. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34896650/> [cited 2023 Feb 11]
- Grygiel-Górniak B, Rogacka N, Rogacki M, Puszczewicz M. Antinuclear antibodies in autoimmune and allergic diseases. *Reumatologia*. 2017;55:298–304. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29491538/> [cited 2023 Feb 11]
- Vlaega A, Falagan S, Gutiérrez-Gutiérrez G, Moreno-Rubio J, Merino M, Zambrana F, et al. Antinuclear antibodies and cancer: a literature review. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2018;127:42–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29891110/> [cited 2023 Feb 11]
- Tan EM, Feltkamp TEW, Smolen JS, Butcher B, Dawkins R, Fritzier MJ, et al. Range of antinuclear antibodies in “healthy” individuals. *Arthritis Rheum*. 1997;40:1601–11. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9324014/> [cited 2023 Feb 11]
- Dinse GE, Parks CG, Weinberg CR, Co CA, Wilkerson J, Zeldin DC, et al. Increasing prevalence of antinuclear antibodies in the United States. *Arthritis Rheumatol*. 2020;72:1026–35. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32266792/> [cited 2023 Feb 11]
- American College of Rheumatology Position Statement Subject: methodology of testing for antinuclear antibodies.
- Martínez-Martínez L, Irure-Ventura J, Jurado A, Roy G, Montes MA, Barrios Y, et al. Laboratory and clinical practices in antinuclear antibody detection and related antigens: recommendations from a Spanish multicentre survey. *Immunol Res*. 2023;71. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37195550/> [cited 2023 Sep 25]
- Pérez D, Gilburd B, Azoulay D, Showman O, Bizzaro N, Shoenfeld Y. Antinuclear antibodies: Is the indirect immunofluorescence still the gold standard or should be replaced by solid phase assays? *Autoimmun Rev*. 2018;17:548–52. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29635079/> [cited 2023 Feb 11]
- Orme ME, Andalucía C, Sjölander S, Bossuyt X. A hierarchical bivariate meta-analysis of diagnostic test accuracy to provide direct comparisons of immunoassays vs. indirect immunofluorescence for initial screening of connective tissue diseases. *Clin Chem Lab Med*. 2020;59:547–61. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32352399/> [cited 2023 Feb 11]
- Claessens J, Belmondo T, de Langhe E, Westhovens R, Praesen K, Hùe S, et al. Solid phase assays versus automated indirect

- immunofluorescence for detection of antinuclear antibodies. *Autoimmun Rev*. 2018;17:533–40. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29526634/> [cited 2023 Feb 11]
15. Bizzaro N. Can solid-phase assays replace immunofluorescence for ANA screening? *Ann Rheum Dis*. 2020;79 Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30530824/> [cited 2023 Feb 11]
  16. Bossuyt X, Claessens J, de Langhe E, Belmonto T, Westhovens R, Hue S, et al. Antinuclear antibodies by indirect immunofluorescence and solid phase assays. *Ann Rheum Dis*. 2020;79:E65. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31076390/> [cited 2023 Feb 11]
  17. Aringer M, Costenbader K, Daikh D, Brinks R, Mosca M, Ramsey-Goldman R, et al. European League Against Rheumatism/American College of Rheumatology classification criteria for systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis*. 2019;78:1151–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31383717/> [cited 2023 Feb 11]
  18. Op De Beeck K, Vermoersch P, Verschueren P, Westhovens R, Mariën G, Blockmans D, et al. Detection of antinuclear antibodies by indirect immunofluorescence and by solid phase assay. *Autoimmun Rev*. 2011;10:801–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21741497/> [cited 2023 Feb 11]
  19. Willems P, De Langhe E, Claessens J, Westhovens R, Van Hoeyveld E, Poesen K, et al. Screening for connective tissue disease-associated antibodies by automated immunoassay. *Clin Chem Lab Med*. 2018;56:909–18. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29306915/> [cited 2023 Feb 11]
  20. Orme ME, Andalucia C, Sjölander S, Bossuyt X. A comparison of a fluorescence enzyme immunoassay versus indirect immunofluorescence for initial screening of connective tissue diseases: systematic literature review and meta-analysis of diagnostic test accuracy studies. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2018;32:521–34. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31174821/> [cited 2023 Feb 11]
  21. Pashnina IA, Krivolapova IM, Fedotkina TV, Ryabkova VA, Cherezhneva MV, Churilov LP, et al. Antinuclear autoantibodies in health: autoimmunity is not a synonym of autoimmune disease. *Antibodies (Basel)*. 2021;10:1–26. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33668697/> [cited 2023 Feb 11]
  22. Xavier RM, Yamauchi Y, Nakamura M, Tanigawa Y, Ishikura H, Tsunematsu T, et al. Antinuclear antibodies in healthy aging people: a prospective study. *Mech Ageing Dev*. 1995;78:145–54. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7596195/> [cited 2023 Feb 11]
  23. Grygiel-Górnjak B, Rogacka N, Puszczewicz M. Antinuclear antibodies in healthy people and non-rheumatic diseases — diagnostic and clinical implications. *Reumatologia*. 2018;56:243–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30237629/> [cited 2023 Feb 11]
  24. Mahler M, Meroni PL, Bossuyt X, Fritzler MJ. Current concepts and future directions for the assessment of autoantibodies to cellular antigens referred to as anti-nuclear antibodies. *J Immunol Res*. 2014; [cited 2023 Feb 11];2014. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24020446/>
  25. Martínez-Revelta D, Irure-Ventura J, López-Hoyos M, Olmos JM, Pariente E, Martín-Millán M, et al. Comparison of ANA testing by indirect immunofluorescence or solid-phase assays in a low pre-test probability population for systemic autoimmune disease: the Camargo Cohort. *Clin Chem Lab Med*. 2023; [cited 2023 Feb 11]; Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36634098/>
  26. Fernandez SA, Lobo AZ, Oliveira ZN, Fukumori LM, Périgo AM, Rivitti EA. Prevalence of antinuclear autoantibodies in the serum of normal blood donors. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo*. 2003;58:315–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14762490/>
  27. Meier HCS, Sandler DP, Simonsick EM, Weng N, Parks CG. Sex differences in the association between antinuclear antibody positivity with diabetes and multimorbidity in older adults: results from the Baltimore Longitudinal Study of Aging. *Exp Gerontol*. 2020;135:110906.
  28. Martínez J, Olmos JM, Hernández JL, Pinedo G, Llorca J, Obregón E, et al. Bone turnover markers in Spanish postmenopausal women: the Camargo cohort study. *Clin Chim Acta*. 2009;409:70–4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19737549/> [cited 2022 Oct 2]
  29. Olmos JM, Hernández JL, García-Velasco P, Martínez J, Llorca J, González-Macías J. Serum 25-hydroxyvitamin D, parathyroid hormone, calcium intake, and bone mineral density in Spanish adults. *Osteoporos Int*. 2016;27:105–13. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26134682/> [cited 2022 Oct 2]
  30. Hernández JL, Olmos JM, Pariente E, Martínez J, Valero C, García-Velasco P, et al. Metabolic syndrome and bone metabolism: the Camargo Cohort Study. *Menopause*. 2010;17:955–61. Available from: [https://journals.lww.com/menopausejournal/Fulltext/2010/17050/Metabolic\\_syndrome\\_and\\_bone\\_metabolism\\_the.14.aspx](https://journals.lww.com/menopausejournal/Fulltext/2010/17050/Metabolic_syndrome_and_bone_metabolism_the.14.aspx) [cited 2022 Oct 2]
  31. Olmos JM, Hernández JL, Pariente E, Martínez J, Valero C, González-Macías J. Trabecular bone score and bone quantitative ultrasound in Spanish postmenopausal women. The Camargo Cohort Study. *Maturitas*. 2020;132:24–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31883659/> [cited 2022 Oct 2]
  32. Leuchten N, Hoyer A, Brinks R, Schoels M, Schneider M, Smolen J, et al. Performance of antinuclear antibodies for classifying systemic lupus erythematosus: a systematic literature review and meta-regression of diagnostic data. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2018;70:428–38. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28544593/> [cited 2023 Sep 25]
  33. Chan EKL, Damoiseaux J, Carballo OG, Conrad K, de Melo CW, Francescantonio PLC, et al. Report of the First International Consensus on Standardized Nomenclature of Antinuclear Antibody HEp-2 cell patterns 2014–2015. *Front Immunol*. 2015;6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26347739/> [cited 2022 Nov 22]
  34. Andrade LEC, Klotz W, Herold M, Conrad K, Rönnelid J, Fritzler MJ, et al. International consensus on antinuclear antibody patterns: definition of the AC-29 pattern associated with antibodies to DNA topoisomerase I. *Clin Chem Lab Med*. 2018;56:1783–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29813025/> [cited 2022 Nov 22]
  35. 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*. 2012;64:2319–27.
  36. Marin GG, Cardiel MH, Cornejo H, Viveros ME. Prevalence of antinuclear antibodies in 3 groups of healthy individuals: blood donors, hospital personnel, and relatives of patients with autoimmune diseases. *J Clin Rheumatol*. 2009;15:325–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20009966/> [cited 2023 Feb 12]
  37. Hayashi N, Koshihara M, Nishimura K, Sugiyama D, Nakamura T, Morinobu S, et al. 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. *Mod Rheumatol*. 2008;18:153–60. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18283522/> [cited 2023 Feb 12]
  38. Ruffatti A, Rossi L, Calligaro A, Del Ross T, Lagni M, Marson P, et al. Autoantibodies of systemic rheumatic diseases in the healthy elderly. *Gerontology*. 1990;36:104–11. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2376330/> [cited 2023 Feb 12]
  39. Nilsson BO, Skogh T, Emerudh J, Johansson B, Löfgren S, Wikby A, et al. Antinuclear antibodies in the oldest-old women and men. *J Autoimmun*. 2006;27:281–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17156973/> [cited 2023 Feb 12]
  40. Hurme M, Korkki S, Lehtimäki T, Karhunen PJ, Jylhä M, Hervonen A, et al. Autoimmunity and longevity: presence of antinuclear antibodies is not associated with the rate of inflammation or mortality in nonagenarians. *Mech Ageing Dev*. 2007;128:407–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17467040/> [cited 2023 Feb 12]

41. Pertovaara M, Kähkönen M, Juonala M, Laitinen T, Taittonen L, Lehtimäki T, et al. Autoimmunity and atherosclerosis: the presence of antinuclear antibodies is associated with decreased carotid elasticity in young women. *The Cardiovascular Risk in Young Finns Study. Rheumatology*. 2009;48:1553–6. Available from: <https://academic.oup.com/rheumatology/article/48/12/1553/1786780> [cited 2023 Feb 12]
42. Hahn J, Leatherwood C, Malspeis S, Liu X, Lu B, Roberts AL, et al. Associations between daily alcohol consumption and systemic lupus erythematosus-related cytokines and chemokines among US female nurses without SLE. *Lupus*. 2020;29:976–82. Available from: [https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0961203320929427?url\\_ver=Z39.88-2003&rft\\_id=ori%3Arid%3Acrsref.org&rft\\_dat=cr\\_pub+40pubmed](https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0961203320929427?url_ver=Z39.88-2003&rft_id=ori%3Arid%3Acrsref.org&rft_dat=cr_pub+40pubmed) [cited 2023 Feb 12]
43. Crandall JP, Polsky S, Howard AA, Perreault L, Bray GA, Barrett-Connor E, et al. Alcohol consumption and diabetes risk in the Diabetes Prevention Program. *Am J Clin Nutr*. 2009;90:595. Available from: <https://pmc/articles/PMC2728644/> [cited 2023 Feb 19]
44. Fahim M, Zadeh AR, Shoureshi P, Ghadimi K, Cheshmavar M, Sheikhaninia N, et al. Alcohol and multiple sclerosis: an immune system-based review. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol*. 2020;12:58. Available from: <https://pmc/articles/PMC7218739/> [cited 2023 Feb 19]
45. Di Giuseppe D, Alfredsson L, Bottai M, Askling J, Wolk A. Long term alcohol intake and risk of rheumatoid arthritis in women: a population based cohort study. *BMJ*. 2012;345. Available from: <https://www.bmj.com/content/345/bmj.e4230> [cited 2023 Feb 19]
46. Turk JN, Zahavi ER, Gorman AE, Murray K, Turk MA, Veale DJ. Exploring the effect of alcohol on disease activity and outcomes in rheumatoid arthritis through systematic review and meta-analysis. *Sci Rep*. 2021;11:1–6. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-021-89618-1> [cited 2023 Feb 19]
47. Azizov V, Zaiss MM. Alcohol consumption in rheumatoid arthritis: a path through the immune system. *Nutrients*. 2021;13. Available from: <https://pmc/articles/PMC8072698/> [cited 2023 Feb 19]
48. Klarenskog L, Padyukov L, Alfredsson L. Smoking as a trigger for inflammatory rheumatic diseases. *Curr Opin Rheumatol*. 2007;19:49–54. Available from: [https://journals.lww.com/co-rheumatology/Fulltext/2007/01000/Smoking\\_as\\_a\\_trigger\\_for\\_inflammatory\\_rheumatic.9.aspx](https://journals.lww.com/co-rheumatology/Fulltext/2007/01000/Smoking_as_a_trigger_for_inflammatory_rheumatic.9.aspx) [cited 2023 Feb 12]
49. Amoriello R, Mariottini A, Ballerini C. Immunosenescence and autoimmunity: exploiting the T-cell receptor repertoire to investigate the impact of aging on multiple sclerosis. *Front Immunol*. 2021;12:5175.
50. Ruan P, Wang S, Yang M, Wu H. The ABC-associated immunosenescence and lifestyle interventions in autoimmune disease. *Rheumatol Immunol Res*. 2022;3:128. Available from: <https://pmc/articles/PMC9895871/> [cited 2023 Feb 19]
51. Fukushima Y, Minato N, Hattori M. The impact of senescence-associated T cells on immunosenescence and age-related disorders. *Inflamm Regen*. 2018;38:1–6. Available from: <https://inflammregen.biomedcentral.com/articles/10.1186/s41232-018-0082-9> [cited 2023 Feb 19]
52. Coppé JP, Desprez PY, Krtolica A, Campisi J. The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annu Rev Pathol*. 2010;5:99. Available from: <https://pmc/articles/PMC4166495/> [cited 2023 Feb 19]
53. Ohtani N. The roles and mechanisms of senescence-associated secretory phenotype (SASP): can it be controlled by senolysis? *Inflamm Regen*. 2022;42:1–8. Available from: <https://inflammregen.biomedcentral.com/articles/10.1186/s41232-022-00197-8> [cited 2023 Feb 19]
54. Ray D, Yung R. Immune senescence, epigenetics and autoimmunity. *Clin Immunol*. 2018;196:59. Available from: <https://pmc/articles/PMC6548177/> [cited 2023 Feb 19]
55. Ruffatti A, Del Ross T, Cipriani M, Bertero MT, Sciascia S, Scarpato S, et al. Risk factors for a first thrombotic event in antiphospholipid antibody carriers: a prospective multicentre follow-up study. *Ann Rheum Dis*. 2011;70:1083–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21285115/> [cited 2023 Feb 19]

**Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

## Authors and Affiliations

Juan Irure-Ventura<sup>1,2</sup> · Daniel Martínez-Revuelta<sup>3</sup> · Marcos López-Hoyos<sup>1,2,4</sup>  · Marta Martín-Millán<sup>2,4,5</sup> · Daniel Nan<sup>2,4,5</sup> · Emilio Pariente<sup>3</sup> · Javier Pardo-Lledias<sup>2,4,5</sup> · Alejandra Comins-Boo<sup>1,2</sup> · José Manuel Olmos<sup>2,4,5</sup> · Víctor Manuel Martínez-Taboada<sup>2,4,6</sup> · José Luis Hernández<sup>2,4,5</sup>

✉ Marcos López-Hoyos  
marcos.lopez@scsalud.es

Juan Irure-Ventura  
juan.irure@scsalud.es

Daniel Martínez-Revuelta  
daniel.martinez@scsalud.es

Marta Martín-Millán  
marta.martinm@scsalud.es

Daniel Nan  
danielnarcis.nan@scsalud.es

Emilio Pariente  
emilio.pariente@scsalud.es

Javier Pardo-Lledias  
javier.pardo@unican.es

Alejandra Comins-Boo  
alejandra.comins@scsalud.es

José Manuel Olmos  
josemanuel.olmos@scsalud.es

Víctor Manuel Martínez-Taboada  
vmartinez64@gmail.com

José Luis Hernández  
jose.luis.hernandez@scsalud.es

- <sup>1</sup> Immunology Department, University Hospital Marqués de Valdecilla, 39008 Santander, Spain
- <sup>2</sup> Immunopathology Group, Marqués de Valdecilla University Hospital-IDIVAL, 39011 Santander, Spain
- <sup>3</sup> Family Medicine. Healthcare center Astillero, Santander, Spain
- <sup>4</sup> University of Cantabria, 39011 Santander, Spain
- <sup>5</sup> Internal Medicine Department, University Hospital Marqués de Valdecilla, 39008 Santander, Spain
- <sup>6</sup> Rheumatology Division, University Hospital Marqués de Valdecilla, 39008 Santander, Spain



## 8.3 ANEXO III

**CONSENTIMIENTO INFORMADO**

Los trastornos del metabolismo óseo y mineral (osteoporosis, enfermedad de Paget y déficit de vitamina D) son procesos frecuentes que producen un debilitamiento de la resistencia de los huesos, aumentando el peligro de tener una fractura.

En la mayoría de las ocasiones no dan síntomas antes de la fractura y por ello es importante diagnosticarlos precozmente. Para ello, además del preceptivo reconocimiento médico, disponemos de métodos auxiliares como son algunas determinaciones analíticas, la radiología y la densitometría. Con estas técnicas podemos detectar la presencia de estos trastornos antes de que aparezcan los síntomas y nos hacemos una idea aproximada de cuál es el riesgo de fractura.

El estudio en el que le proponemos participar va a consistir en acudir a su Centro de Salud para ser valorado por su médico de familia y realizar unas determinaciones analíticas (se le extraerán unos 30 cc de sangre, que es el equivalente a dos cucharadas soperas) y se realizará una radiografía de la columna y se medirá la densidad mineral ósea por densitometría.

Las pruebas que se le van a realizar son las mismas que se le hacen a un paciente en quien se quiera descartar la existencia de un trastorno del metabolismo óseo y mineral (osteoporosis, enfermedad de Paget o deficiencia de vitamina D). También se obtendrá una muestra de 5 ml de sangre que se almacenará para determinar si existe una predisposición genética a desarrollar alguna enfermedad ósea metabólica como la osteoporosis. El material genético no utilizado en el presente estudio se almacenará para estudios posteriores, siempre relacionados con la osteoporosis y otras enfermedades óseas metabólicas. Las pruebas que se van a realizar no implican ningún peligro. Y nos van a ayudar a estudiar su metabolismo mineral óseo y a orientarle sobre si precisa o no alguna medida de prevención o un tratamiento.

Los datos obtenidos son rigurosamente confidenciales y serán tratados de acuerdo con la Ley Orgánica de Confidencialidad de Datos Personales (Ley Orgánica 15/1999), y el material genético sólo será utilizado para investigar sobre la osteoporosis y otras enfermedades óseas metabólicas. Nadie tendrá acceso a ellos. Usted tiene derecho a solicitarnos en cualquier momento que eliminemos de los registros sus datos personales y a recibir los resultados de las exploraciones que le hagan.

Don/doña: \_\_\_\_\_ con DNI: \_\_\_\_\_

Dirección: \_\_\_\_\_ y Teléfono: \_\_\_\_\_

por medio de la presente reconozco:

1. Que he sido informado por \_\_\_\_\_ de los objetivos del "Estudio del metabolismo óseo y mineral de la población femenina postmenopáusica y masculina mayor de 50 años atendida por un Centro de Salud en Cantabria"
2. Que he comprendido todos los objetivos del estudio.
3. Entiendo que mi participación es voluntaria, que tengo derecho al acceso a todos mis datos y que puedo retirarme voluntariamente en cualquier momento del mismo sin que por ello se altere en lo más mínimo mi asistencia médica.

En prueba de ello, firmo el presente en Camargo a \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20 \_\_\_\_\_.

Fdo: \_\_\_\_\_

Fdo.Dr/a.: \_\_\_\_\_



## 8.4 ANEXO IV

*CRITERIOS DE CLASIFICACIÓN DE LAS EAS (Criterios ACR/EULAR:  
American College of Rheumatology / European Alliance of  
Associations for Rheumatology)*



## TABLAS DE CRITERIOS DE CLASIFICACIÓN (Criterios ACR / EULAR)

Las tablas con los criterios de clasificación están ordenadas cronológicamente con los criterios que estaban vigentes cuando se incluyeron los sujetos a la Cohorte Camargo y en segundo lugar con los criterios vigentes en el momento de revisar la historia clínica de los 2.997 sujetos de estudio.

### ARTRITIS REUMATOIDE (AR)

Criterios de clasificación anteriores, 1987. Sólo son de clasificación.

<b>Criterios de la American Rheumatism Association 1987 para la clasificación de artritis reumatoide (AR)</b>	
<b>CRITERIO</b>	<b>DEFINICIÓN</b>
<b>1. Rigidez matutina</b>	Rigidez matutina de al menos 1 h de duración
<b>2. Artritis de 3 o más áreas articulares</b>	Al menos 3 áreas articulares presentan simultáneamente tumefacción de partes blandas o derrame observados por un médico
<b>3. Artritis de las articulaciones de las manos</b>	Tumefacción en al menos una articulación: muñeca, MCP o IFP
<b>4. Artritis simétrica</b>	Afectación simultánea de las mismas áreas articulares en los 2 lados del cuerpo
<b>5. Nódulos reumatoides</b>	Nódulos subcutáneos sobre prominencias óseas o superficies extensoras o en regiones yuxtaarticulares observados por un médico
<b>6. Factor reumatoide sérico</b>	Demostración de aumento anormal del factor reumatoide sérico
<b>7. Cambios radiológicos</b>	Cambios típicos de AR en la radiografía de manos y muñecas, que deben incluir erosiones o descalcificación ósea localizada en las articulaciones afectadas

Un paciente será clasificado como AR si satisface al menos 4 de los 7 criterios. Los criterios 1 a 4 deben estar presentes durante al menos 6 semanas.

IFP: interfalángicas proximales; MCF: metacarpofalángicas

Criterios vigentes, 2010. Son de clasificación y de diagnóstico.

<b>Criterios de ACR/EULAR 2010 para la clasificación de la artritis reumatoide. Enfermedades autoinflamatorias clasificadas por criterios clínicos</b>	
Es necesario un índice $\geq 6/10$ para el diagnóstico de artritis reumatoide definida	
Debe existir:	
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Sinovitis (inflamación) confirmada en al menos una articulación</li> <li>2. Sinovitis no explicada por otra enfermedad</li> </ol>	
<b>Afectación articular<sup>a</sup></b>	
1 articulación grande	0 puntos
2-10 articulaciones grandes	1 punto
1-3 articulaciones pequeña (con o sin afectación de articulaciones grandes)	2 puntos
4-10 articulaciones pequeñas (con o sin afectación de articulaciones grandes)	3 puntos
>10 articulaciones (al menos una pequeña) <sup>b</sup>	5 puntos
<b>Serología<sup>c</sup></b>	
FR y ACPA negativos	0 puntos
FR y/o ACPA positivos (títulos bajos)	2 puntos
FR y/o ACPA ambos positivos (títulos altos)	3 puntos
<b>Reactantes de fase aguda</b>	
PCR y VSG normales	0 puntos
PCR y/o VSG elevadas	1 punto
<b>Duración de los síntomas</b>	
<6 semanas	0 puntos
>6 semanas	1 punto

*D. Aletaha, T. Neogui, A.J. Silman, J. Funovits, D.T. Felson, C.O.Bingham 3rd 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. Arthritis Rheum.,2010; 2569-2581*

a. La afectación articular se refiere a cualquier articulación dolorosa o inflamada en la exploración física que pueda ser confirmada por pruebas de imagen. Las articulaciones interfalángicas distales, primeras carpometacarpianas y primeras metatarsofalángicas son excluidas de la valoración.

-Articulaciones grandes: hombros, codos, cadera, rodillas y tobillos.

-Articulaciones pequeñas: metacarpofalángicas, interfalángicas proximales, 2ª a 5ª metatarsofalángicas, interfalángicas pies y carpos.

b. En este apartado puede ser combinación de articulaciones grandes y pequeñas, así como articulaciones témporomandibular, acromioclavicular, esternoclavicular, etc.

c. Se consideran títulos bajos valores  $\leq 3$  veces mayores que el límite superior de la normalidad. Títulos altos valores  $> 3$  veces la normalidad.

ACPA: anticuerpos antipéptido citrulinados; PCR: proteína C reactiva; FR: factor reumatoide; VSG: velocidad de sedimentación globular.

## Artritis reumatoide preclínica

**Definición según EULAR de artralgia sospechosa con riesgo de progresar a artritis reumatoide****Historia clínica:**

- Síntomas articulares de comienzo reciente  $\leq 1$  año
- Síntomas localizados en articulaciones metacarpofalángicas
- Duración de la rigidez matinal  $\geq 60$  minutos
- Empeoramiento de los síntomas articulares a primera hora de la mañana
- Historia de familiares de primer grado con artritis reumatoide

**Examen físico:**

- Dificultad para cerrar la mano
- Dolor a la presión de las articulaciones metacarpofalángicas (test squeeze positivo)

EULAR, European League Against Rheumatism; MCF, metacarpofalángicas

**Sensibilidad y especificidad para definir la existencia de artralgias con riesgo de AR**

NÚMERO DE PARÁMETROS	SENSIBILIDAD (%)	ESPECIFICIDAD (%)
$\geq 1$	100	14,1
$\geq 2$	98,4	53,8
$\geq 3$	90,2	74,4
$\geq 4$	70,5	93,6
$\geq 5$	32,8	100
$\geq 6$	16,4	100
$\geq 7$	1,6	100

**LUPUS ERITEMATOSO SISTEMICO (LES)**

<b>Criterios de clasificación del ACR modificados (1997)*</b>	
1. Eritema malar	
2. Lupus discoide	
3. Fotosensibilidad	
4. Úlceras orales	
5. Artritis no erosiva	
6. Serositis	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pleuritis</li> <li>• Pericarditis</li> </ul>
7. Enfermedad renal	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Proteinuria</li> <li>• Cilindros celulares</li> </ul>
8. Enfermedad neurológica	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Convulsiones</li> <li>• Psicosis</li> </ul>
9. Alteraciones hematológicas	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Anemia hemolítica</li> <li>• Leucopenia: <math>&lt; 4.000/mm^3</math> en <math>\geq 2</math> ocasiones</li> <li>• Linfopenia: <math>&lt; 4.000/mm^3</math> en <math>\geq 2</math> ocasiones</li> <li>• Trombocitopenia: <math>&lt; 100.000/mm^3</math></li> </ul>
10. Alteraciones inmunológicas	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Anticuerpos anti-ADN-dc</li> <li>• Anticuerpo anti-Sm</li> <li>• Anticuerpos anti-fosfolípidos positivos: <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Anti-cardiolipina IgG o IgM</li> <li>○ Anticoagulante lúpico positivo</li> <li>○ Prueba serológica para sífilis falsa positiva <math>\geq 6</math> meses</li> </ul> </li> </ul>
11. Anticuerpos nucleares	

*\*Con cuatro o más criterios se clasifica de lupus*

<b>Criterios de clasificación del LES propuestos por el grupo SLICC (2012)*</b>	
<b>CRITERIOS CLINICOS</b>	
1. Lupus cutáneo agudo	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Eritema malar</li> <li>• Lupus bulloso</li> <li>• Necrosis epidérmica tóxica</li> <li>• Lupus cutáneo subagudo</li> <li>• Erupción maculopapular lúpica</li> <li>• Fotosensibilidad</li> </ul>
2. Lupus cutáneo crónico	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Lupus discoide (localizado o generalizado)</li> <li>• Paniculitis lúpica (lupus profundus)</li> <li>• Hipertrófico o verrucoso</li> <li>• Túmido</li> <li>• Mucoso</li> <li>• Eritema pernio lúpico</li> <li>• Superposición discoide y liquen plano</li> </ul>
3. Úlceras orales y/o nasofaríngeas	
4. Alopecia no cicatricial	
5. Artritis no erosiva	
6. Serositis	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pleuritis</li> <li>• Pericarditis</li> </ul>
7. Enfermedad renal	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Proteinuria persistente</li> <li>• Cilindros celulares tubulares o mixtos</li> </ul>

ANEXOS

8. Enfermedad neurológica	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Convulsiones</li> <li>• Psicosis</li> <li>• Mononeuritis múltiple</li> <li>• Neuropatía periférica o craneal</li> <li>• Estado confusional agudo</li> </ul>
9. Anemia hemolítica	
10. Leucopenia < 4.000/mm <sup>3</sup> en ≥ 1 ocasión o linfopenia < 1.000/mm <sup>3</sup> en ≥ 1 ocasión	
11. Trombocitopenia: < 100.000mm <sup>3</sup> en ≥ 1 ocasión	
<b>CRITERIOS INMUNOLOGICOS</b>	
1. Anticuerpos antinucleares	
2. Anticuerpos anti-ADN-dc (x 2 veces el valor normal del laboratorio)	
3. Anticuerpos anti-Sm	
4. Anticuerpo antifosfolípidos	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Anticoagulante lúpico</li> <li>• VRDL falsa positiva</li> <li>• Anti-cardiolipina IgG o IgM a título</li> <li>• Anticuerpos anti-β<sub>2</sub> glucoproteína</li> </ul>
5. Complemento bajo (C3, C4 y/o CH50)	
6. Test de Coombs positivo en ausencia de anemia hemolítica	

*\*Se clasifica de LES con 4 o más de los 17 criterios propuestos que incluya al menos un criterio clínico y 1 criterio inmunológico, o nefritis confirmada por biopsia compatible con LES y presencia de ANA+ o anti-ADN*

**SINDROME DE SJÖGREN (SS)**

<b>Criterios de 2002 revisados para la clasificación del síndrome de Sjögren primario</b>
<p><b>SINTOMAS OCULARES</b> (una respuesta positiva, al menos, a una de las siguientes preguntas):</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. ¿Ha tenido usted molestias del tipo de sequedad en ojos, diaria, persistente durante más de 3 meses?</li> <li>2. ¿Tiene usted sensación frecuente de arenilla o gravilla en los ojos?</li> <li>3. ¿Utiliza lágrimas artificiales más de 3 veces al día?</li> </ol>
<p><b>SINTOMAS ORALES</b> (una respuesta positiva, al menos, a una de las siguientes preguntas):</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. ¿Ha tenido sensación diaria de boca seca durante más de 3 meses?</li> <li>2. ¿Ha tenido, de adulto, sensación de inflamación de las glándulas salivales, recurrente o persistente?</li> <li>3. ¿Tiene usted que beber líquidos para ayudarse a tragar la comida seca?</li> </ol>
<p><b>SINTOMAS OCULARES</b> (evidencia objetiva de afectación ocular definida como, al menos, una de las siguientes pruebas positivas):</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Test de Schirmer I, realizado sin anestesia <math>\leq 5</math> mm en 5 minutos</li> <li>2. Tinción de Rosa de Bengala o cualquier tinción ocular</li> </ol> <p>(puntuación <math>\geq 4</math>, según el sistema de Bijsterveld)</p>
<p><b>HISTOPATOLOGIA:</b> Presencia de sialoadenitis focal linfocítica en la biopsia de glándula salival menor (obtenida de mucosa con apariencia normal), evaluada por un patólogo experto, con un focus score <math>&gt; 1</math>, definido por el número de focos linfocíticos (adyacentes a acinos mucosos de apariencia normal y que contengan más de 50 linfocitos) por <math>4 \text{ mm}^2</math> de tejido glandular.</p>
<p><b>AFECTACION DE LAS GLANDULAS SALIVALES</b> (evidencia objetiva de afectación de las glándulas salivales, definida como una respuesta positiva, al menos, de las siguientes):</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Flujo salival no estimulado (<math>\leq 1,5</math> ml en 15 minutos)</li> <li>2. Sialografía parotídea con sialectasias difusas (patrón puntiforme, caviatario o destructivo), sin evidencia de obstrucción de los ductos principales.</li> <li>3. Gammagrafía de las glándulas salivales con retraso de la captación, disminución de la concentración y/o retraso de la excreción del radiotrazador.</li> </ol>
<p><b>AUTOANTICUERPOS</b> (presencia en suero de alguno de los siguientes): anti Ro o anti La o ambos</p>

**Normas revisadas para la clasificación****Síndrome de Sjögren primario:**

1. El paciente tiene una biopsia positiva o autoanticuerpos positivos y cumple 4 de 6 criterios (97% de sensibilidad; 90% de especificidad)
2. El paciente cumple 3 de los 4 criterios objetivos (es decir, los grupos III, IV, V, VI) (84% de sensibilidad; 95% de especificidad)

**Síndrome de Sjögren secundario:**

La presencia de una enfermedad asociada (otra conectivopatía) y la presencia de los grupos I o II más otros 2 de los grupos III, IV y V puede considerarse SS secundario.

**Criterios de exclusión:**

Radioterapia de cabeza o cuello previa, infección por VHC o VIH, linfoma preexistente, sarcoidosis, enfermedad del injerto contra el huésped, uso reciente de fármacos con efecto anticolinérgico.

<b>Perfil del paciente, criterios de clasificación EULAR/ACR 2016 para el diagnóstico de SS primario</b>	
<b>Perfil del paciente</b>	
<p><b>1.</b> Al menos 1 síntoma de sequedad ocular o bucal:  Xeroftalmía: al menos 1 de las siguientes:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Molestia ocular diaria <math>\geq</math> 3 meses</li> <li>• Sensación de arenilla en ojos</li> <li>• Uso de lágrimas artificiales <math>\geq</math> 3 veces al día</li> </ul> <p>Xerostomía: al menos 1 de las siguientes:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Boca seca <math>\geq</math> 3 meses</li> <li>• Bebe líquidos con frecuencia para tragar alimentos secos</li> </ul> <p><b>2.</b> O sospecha de SS por ESSDAI: al menos un dominio positivo</p>	
<b>Criterios diagnósticos de clasificación</b>	
Biopsia positiva: $\geq$ 1 focus/4 mm <sup>2</sup>	<b>Puntuación</b> 3
Anti-Ro positivo	3
Índice de tinción ocular (OSS) $\geq$ 5 o Índice van Bijsterveld $\geq$ 4 (al menos, en un ojo)	1
Test Schirmer $\geq$ 5mm, al menos, en un ojo*	1
Flujo salival no estimulado $\leq$ 0,1 ml/15 min*	1
Total máximo	9
<b>Criterios de exclusión:</b> radiación cabeza-cuello, hepatitis por VHC, sarcoidosis, amiloidosis, enfermedad de injerto contra huésped, enfermedad asociada a IgG4	
<b>Diagnóstico del síndrome de Sjögren primario:</b> puntuación $\geq$ 4 y ningún criterio de exclusión.	

\*Fármacos "secantes o xerogénicos" (anticolinérgicos, antihistamínicos, etc...): retirar antes de la prueba

**ESCLEROSIS SISTÉMICA (ES)**

Criterios antiguos. 1980.

<b>Criterios diagnósticos de la esclerosis sistémica del American College of Rheumatology</b>
<p>Criterio mayor</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Esclerosis cutánea proximal a articulaciones MCF de las manos o MTF de los pies</li> </ul> <p>Criterios menores</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Esclerodactilia</li> <li>• Cicatrices en pulpejos o pérdida de sustancia de estos</li> <li>• Fibrosis pulmonar basal</li> </ul>

*MCF: metacarpofalángicas; MTF: metatarsofalángicas*

<b>Síndromes esclerodermiformes</b>
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Inflamatorios e inmunológicamente mediados           <ol style="list-style-type: none"> <li>a. Fascitis eosinofílica</li> <li>b. Enfermedad de injerto contra huésped</li> <li>c. Liquen escleroso o atrófico</li> <li>d. Síndrome POEMS</li> <li>e. Síndrome de superposición (LES, dermatomiositis, etc)</li> </ol> </li> <li>2. Metabólicos           <ol style="list-style-type: none"> <li>a. Fenilcetonuria</li> <li>b. Porfiria cutánea tarda</li> <li>c. Hipotiroidismo (mixedema)</li> </ol> </li> <li>3. De depósito           <ol style="list-style-type: none"> <li>a. Escleromixedema</li> <li>b. Amiloidosis sistémica</li> <li>c. Fibrosis nefrogénica sistémica</li> <li>d. Escleredema</li> <li>e. Lipodermatoesclerosis</li> </ol> </li> <li>4. Ocupacionales           <ol style="list-style-type: none"> <li>a. Cloruro de polivinilo</li> <li>b. Disolventes orgánicos</li> <li>c. Sílice</li> <li>d. Resinas epoxi</li> </ol> </li> <li>5. Genéticos           <ol style="list-style-type: none"> <li>a. Enfermedades progeroides (progeria, acrogeria, síndrome de Werner)</li> <li>b. Síndrome de la piel rígida</li> </ol> </li> <li>6. Tóxicos y yatrogénicos           <ol style="list-style-type: none"> <li>a. Bleomicina</li> <li>b. Pentazocina</li> <li>c. Carbidopa</li> <li>d. Síndrome eosinofilia-mialgia (L-triptófano)</li> <li>e. Síndrome por aceite tóxico (aceite de colza desnaturalizado con anilinas)</li> <li>f. Fibrosis post-radiación</li> </ol> </li> </ol>

*POEMS, acrónimo de Polyneuropathy, Organomegaly, Endocrine abnormality, M-protein, plasma cell dyscrasia and Skin lesions; LES, lupus eritematoso sistémico*

Criterios ACR/EULAR 2013. Son de diagnóstico.

Criterios de clasificación de la esclerosis sistémica según ACR/EULAR (2013)		
Ítems	Sub-Ítems	Puntos
Esclerosis cutánea proximal a MCF de las manos (Criterio suficiente)		9
Esclerosis cutánea de los dedos (si se presentan ambos escoger el subapartado de puntuación más alta)	Edema de manos, 'puffy fingers'	2
	Esclerodactilia (distal a MCF, pero proximal a IFP)	4
Lesiones en pulpejos de los dedos (escoger subapartado de mayor puntuación)	Úlceras digitales	2
	Lesiones deprimidas digitales ('pitting scars')	3
Telangiectasias		2
Capilaroscopia patológica (dilataciones y/o pérdida capilar)		2
Hipertensión arterial pulmonar y/o afectación pulmonar intersticial (máx. 2)	Hipertensión arterial pulmonar	2
	Enfermedad pulmonar intersticial	2
Fenómeno de Raynaud		3
Auto-anticuerpos relacionados con la esclerodermia (máx. 3)	Anticentrómero	3
	Anti-topoisomerasa I (Scl70)	3
	Anti-ARN polimerasa III	3

MCF, metacarpofalángicas; IFP, interfalángicas proximales

\*El engrosamiento proximal de la piel a MCF es suficiente para diagnóstico. Cuando éste no se cumple, el resto de los criterios sumando las puntuaciones máximas de deben alcanzar una **puntuación es  $\geq 9$**  para la clasificación. Sensibilidad 91% y especificidad 92% (frente a 75 y 72%, respectivamente, de los criterios ACR 1980).

Estos criterios no son aplicables en pacientes que presenten un endurecimiento de la piel que no afecte a los dedos o con una enfermedad que aunque se asemeje a la esclerosis, se corresponde más a otra enfermedad en función de los síntomas clínicos observados (por ejemplo fibrosis sistémica nefrogénica, forma diseminada de esclerosis localizada, fascitis eosinofílica, edema endurecido de la piel en relación con diabetes, mixedema, eritromelalgia, porfiria, liquen escleroso, enfermedad de injerto contra huésped, queiroartropatía diabética).

*Van den Hoogen F, Khanna D, Frasen J, Johnson SR, Baron M, Tindall A et al. 2013 classification criterio for systemic sclerosis: an ACR/EULAR collaborative initiative. Arthritis Rheum 2013;65:2737-47; Ann Rheum Dis 2013;72:1747-55*

**MIOPATIAS INFLAMATORIAS IDIOPÁTICAS (MII)**

Criterios antiguos. 1975-2004.

<b>Clasificación de las miopatías inflamatorias (modificado de Bohan y Peter<sup>1</sup> y Hoogendijk<sup>2</sup>)</b>
1. Polimiositis idiopática (PM)
2. Dermatomiositis idiopática (DM)
3. PM/DM juvenil (MIJ)
4. PM/DM asociada a enfermedades colágeno-vasculares (síndrome de solapamiento)
5. PM/DM asociada a cáncer
6. Miositis por cuerpos de inclusión (MCI)
7. Miopatía necrotizante inmunomediada (MNIM)
8. Miositis no especificada

<b>Criterios de clasificación para el diagnóstico de polimiositis (Bohan y Peter)<sup>1</sup></b>	
Debilidad muscular simétrica y proximal	Afectación en la mayoría de los casos de cintura escapular y pelviana. En casos agudos o de larga evolución puede existir también debilidad distal
Elevación sérica de enzimas musculares	Marcadores de lesión muscular: CPK, LDH, GOT, GPT o aldolasa
Alteraciones electromiográficas compatibles	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Aumento de la actividad de inserción, con actividad en reposo, manifestada por fibrilaciones y ondas agudas positivas (diente de sierra)</li> <li>• Potenciales de unidad motora de características miopáticas con disminución de la amplitud y duración e incremento de la polifasia</li> <li>• Descargas peculiares repetitivas de alta frecuencia (pseudomiotónicas)</li> </ul>
Biopsia muscular compatible	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Presencia de fibras degeneradas y necróticas, junto a un infiltrado inflamatorio formado por linfocitos y macrófagos con algunas células plasmáticas y, ocasionalmente, PMN en fases iniciales. El infiltrado tiene una localización perivascular y perifascicular</li> </ul>
Lesiones cutáneas típicas	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Erupción eritematosa de color rojo violáceo, moteada o difusa, localizada en párpados superiores (eritema heliotropo), mejillas, puente de la nariz, zona superior del tórax y proximal de los brazos</li> </ul>
<b>Polimiositis (criterios 1-4)</b> <b>-Definida:</b> 4 criterios <b>-Probable:</b> 3 criterios <b>-Posible:</b> 2 criterios	<b>Dermatomiositis (el criterio 5 siempre presente):</b> <b>-Definida:</b> 3 de criterios del 1-4 <b>-Probable:</b> 2 de criterios del 1-4 <b>-Posible:</b> 1 de criterio del 1-4

*MCF, metacarpofalángicas; IFP, interfalángicas proximales; IFD, interfalángicas distales*  
 Criterios ACR/EULAR 2017.

<b>Criterios de clasificación EULAR/ACR de miopatías inflamatorias idiopáticas (MII) del adulto y juveniles (2017)<sup>3</sup></b>		
	Sin biopsia	Con biopsia
Edad de comienzo de los primeros síntomas		
• 18-40 años	1,3	1,5
• >40 años	2,1	2,2
Debilidad muscular		
• Debilidad simétrica objetiva, proximal, usualmente progresiva, de extremidades superiores	0,7	0,7
• Debilidad simétrica objetiva y proximal, de extremidades inferiores, generalmente progresiva	0,8	0,5
• Los músculos flexores del cuello son más débiles que los extensores del cuello	1,9	1,6
• En las piernas hay mayor debilidad de músculo proximales que de distales	0,9	1,2
Manifestaciones cutáneas		
• Rash en heliotropo	3,1	3,2
• Pápulas de Gottron	2,1	2,7
• Signo de Gottron	3,3	3,7
Otras manifestaciones clínicas:		
• Disfagia o dismotilidad esofágica	0,7	0,6
Hallazgos de laboratorio		
• Anticuerpos anti-jo-1 positivos	3,9	3,8
• Elevación de las concentraciones séricas de CK*, LDH*, GOT* o GPT*	1,3	1,4
Hallazgos en biopsia muscular		
• Infiltrado de endomisio por células mononucleares, sin invadir fibras musculares		1,7
• Infiltrado perimisio y/o perivascular de células mononucleares		1,2
• Atrofia perifascicular		1,9
• Vacuolas ribeteadas		3,1

\*Concentraciones séricas por encima del límite superior de la normalidad

Interpretación:

- MII PROBABLE puntuación >5,5 sin biopsia y >6,7 con biopsia muscular

- MII DEFINITIVA puntuación >7,5 sin biopsia y >8,7 con biopsia

<b>Criterios de clasificación de miositis por cuerpos de inclusión (Griggs)<sup>3</sup></b>	
<b>Características clínicas</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Duración &gt; 6 meses</li> <li>• Edad de inicio &gt; 30 años</li> <li>• Debilidad proximal y distal de los brazos, y al menos uno de los siguientes:               <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Debilidad de los flexores de los dedos</li> <li>○ Flexores de la muñeca &gt; extensores</li> <li>○ Debilidad del cuádriceps ≤ Grado 4 MRC</li> </ul> </li> </ul>
<b>Características de laboratorio</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Creatina cinasa &lt; 12 x o normal</li> <li>• Biopsia muscular:               <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Miopatía inflamatoria (con invasión parcial)</li> <li>○ Vacuolas ribeteadas</li> <li>○ Uno de los 2 siguientes:                   <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Depósitos amiloides intracelulares</li> <li>▪ Tubulofilamentos de 15 a 18 nm por ME</li> </ul> </li> </ul> </li> </ul>
<p><b>MCI definida:</b> todas las características de la biopsia muscular. Ninguna de las características clínicas / de laboratorio son obligatorias</p> <p><b>MCI posible:</b> invasión parcial sin otras características patológicas + característica clínica y otras características de laboratorio</p>	

MRC, Medical Research Council; MCI, myositis del cuerpo de inclusión; ME, microscopía electrónica

<b>Criterios diagnósticos de miositis necrotizante inmunomediada (Hoogendijk)<sup>2</sup></b>	
1. Criterios clínicos	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Edad de debut &gt; 18 años</li> <li>• Inicio subagudo o agudo</li> <li>• Debilidad muscular</li> <li>• Patrón de debilidad: simétrica y proximal &gt; distal, musculatura flexora cuello &gt; extensora</li> </ul>
2. Elevación de CK	
3. Biopsia muscular	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Necrosis y degeneración de células musculares</li> <li>• Escaso / nulo infiltrado inflamatorio</li> </ul>
4. Otras pruebas complementarias	<ul style="list-style-type: none"> <li>• EMG: irritabilidad muscular</li> <li>• RM con STIR: incremento difuso o parcheado</li> <li>• Anticuerpos específicos de miositis</li> </ul>
Diagnóstico: requiere cumplir criterios 1 a 3 y, al menos, 1 del apartado 4	

<sup>1</sup>Bohan A, Peter JB. Polymyositis and dermatomyositis (first of two parts). *N Engl J Med* 1975 Feb 13;292(7):344-7

<sup>2</sup>Hoogendijk JE, Amato AA, Lecky BR, Choy EH, Lundberg IE, Rose MR, et al. 119<sup>th</sup> ENMC international workshop: trial design in adult idiopathic inflammatory myopathies, with the exception of inclusion body myositis, 10-12 October 2003, Naarden, The Netherlands. *Neuromuscul Disord* 2004 May;14(5):337-45

<sup>3</sup> Lundberg IE, Tjärnlund A, Bottai M, Werth VP, Pilkington C, de Visser M et al. 2017 European League Against Rheumatism/ American College of Rheumatology classification criteria for adult and juvenile idiopathic inflammatory myopathies and their major subgroups. *Ann Rheum Dis* 2017; 7; 76: 1955-1964

**ENFERMEDAD MIXTA DEL TEJIDO CONECTIVO (EMTC)**

<b>Criterios propuestos para el diagnóstico y clasificación de la enfermedad mixta del tejido conectivo (EMTC)</b>				
<b>Sharp (1987)</b>	<b>Criterios mayores</b>	<b>Criterios menores</b>	<b>Diagnóstico</b>	<b>S(%) / E(%)</b>
	Miositis	Alopecia	Cuatro criterios mayores y anti-U 1 RNP (+)	42/87,7
	Afectación pulmonar <ul style="list-style-type: none"> <li>• DLCO &lt; 70%</li> <li>• HTAP</li> <li>• Vasculopatía proliferativa en biopsia pulmonar</li> </ul>	Leucopenia Anemia Pleuritis Pericarditis		
	Fenómeno de Raynaud o hipomotilidad esofágica	Artritis Neuropatía del trigémino Exantema malar Trombocitopenia	Dos criterios mayores de ellos 3 primeros + 2 menores y anti-U1 RNP (+)	
	Esclerodactilia o edema de manos			
	Anti-ENA > 1/10.000 y U1 RNP (+) y anti-Sm (-)	Miositis leve Historia de manos tumefactas	La presencia de anti-SM se considera criterio de exclusión	
<b>Alarcón-Segovia y Villareal (1987)</b>	<b>Criterio serológico</b>	<b>Criterios clínicos</b>	<b>Diagnóstico</b>	<b>S(%) / E(%)</b>
	Anti-U1 RNP a títulos altos	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Edema de manos</li> <li>2. Fenómeno de Raynaud</li> <li>3. Sinovitis*</li> <li>4. Miositis*</li> <li>5. Acroesclerosis</li> </ol>	El criterio serológico + al menos 3 criterios clínicos *Entre los tres criterios se deben incluir el 3 o el 4 *Si no están incluidos se precisan 4 criterios	
<b>Kasukawa (1987)</b>	<b>Criterios comunes</b>	<b>Criterios mixtos</b>	<b>Diagnóstico</b>	<b>S(%) / E(%)</b>
	Fenómeno de Raynaud Tumefacción de manos o dedos	Lúpicos Poliartritis Linfadenopatía Eritema facial Serositis (pleura o pericardio) Leucotrombocitopenia	Al menos 1 de los 2 síntomas comunes + 1 o más de los síntomas mixtos en al menos 2 de las 3 categorías	75/99,8
	*Anti-U 1 RNP positivos	Esclerodérmicos Esclerodactilia Fibrosis pulmona o alteración restrictiva o de la DLCO Hipomotilidad o dilatación esofágica	*Acompañado de anti-U 1 RNP (+)	
		Miopáticos Debilidad muscular Aumento de enzimas musculares Patrón miopático en EMG		
<b>Kahn (1991)</b>	<b>Criterios serológicos</b>	<b>Criterios clínicos</b>	<b>Diagnóstico</b>	<b>S(%) / E(%)</b>
	Títulos elevados de anti-U 1 RNP	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Fenómeno de Raynaud</li> <li>2. Sinovitis</li> <li>3. Miositis</li> <li>4. Tumefacción de dedos</li> </ol>	Criterio serológico + fenómeno de Raynaud y al menos 2 de los 3 síntomas inflamatorias (2,3 o 4)	

Modificada de Ortega-Hernández y Shoenfeld, 2012

DLCO: capacidad de difusión de oxígeno; E: especificidad; EMG: electromiograma; HTAP: hipertensión arterial pulmonar; S: sensibilidad

**POLIMIOSITIS (PM) Y DERMATOMIOSITIS (DM)**

<b>Criterios diagnósticos de polimiositis y dermatomiositis de Bohan</b>
<b>CRITERIOS CLÍNICOS</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Debilidad muscular proximal y simétrica: afección de la cintura escapular y pélvica</li> <li>• Elevación de enzimas musculares (CPK, LDH, GOT, GPT y aldolasa)</li> <li>• Alteraciones electromiográficas compatibles</li> <li>• Biopsia muscular con fibras degeneradas y necróticas junto con un infiltrado inflamatorio de linfocitos y macrófagos perivascular y perifascicular</li> <li>• Exantema en heliotropo en párpados y pápulas de Gottron en zonas extensoras de dedos</li> </ul>
<b>POLIMIOSITIS</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Definida: 4 criterios</li> <li>• Probable: 3 criterios</li> <li>• Posible: 2 criterios</li> </ul>
<b>DERMATOMIOSITIS (en todos los casos debe incluirse el criterio 5)</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Definida: 3 puntos</li> <li>• Probable: 2 criterios</li> <li>• Posible: 1 criterio</li> <li>• Se debe excluir: <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Enfermedades neurológicas centrales o periféricas</li> <li>○ Infecciones del músculo</li> <li>○ Ingesta de fármacos o tóxicos</li> <li>○ Enfermedades musculares metabólicas</li> <li>○ Rabdomiólisis de causa conocida</li> <li>○ Historia familiar sugestiva de distrofia muscular</li> <li>○ Presencia de granulomas sarcoideos en la biopsia</li> </ul> </li> </ul>

*Bohan A, Peter JB. Polymyositis and dermatomyositis. N Eng J Med, 1975;292:344-47*