



UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE TECNOLOGIA MEDICA - LABORATORIO CLINICO

**Detección de Anticuerpos Antinucleares
Con la Técnica Indirecta de Inmunofluorescencia**

SEMINARIO DE GRADUACION

PRESENTADO POR:

**OLIMPIA CELINDA LARA LANDAVERDE
SANDRA MARGARITA GOMEZ FLORES**

PREVIA A LA OPCION DEL TITULO DE

LICENCIADO EN LABORATORIO CLINICO

ASESOR:

DRA. LEONOR ISABEL MURILLO DE LINARES



DICIEMBRE DE 1983.



T
616.0793
L318d

DETECCION DE ANTICUERPOS ANTINUCLEARES
CON LA TECNICA INDIRECTA DE INMUNOFLUORESCENCIA

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

FACULTAD DE MEDICINA

ESCUELA DE TECNOLOGIA MEDICA

DETECCION DE ANTICUERPOS ANTINUCLEARES
CON LA TECNICA INDIRECTA DE INMUNOFLUORESCENCIA

POR

OLIMPIA CELINDA LARA LANDAVERDE
SANDRA MARGARITA GOMEZ FLORES

Seminario presentado ante el Jurado Calificador de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de El Salvador, en satisfacción parcial de los requerimientos previos a la obtención del Título de Licenciado en Laboratorio Clínico.

Dra. Leonor Isabel Murillo de Linares
ASESOR

Diciembre de 1983

San Salvador

El Salvador

Centro América

A G R A D E C I M I E N T O S

A Dios Todopoderoso

A nuestra asesor: Dra. Isabel Murillo de Linares, quien desinteresadamente nos brindó toda su colaboración y apoyo.

Al Dr. Rómulo Sosa Cáceres, porque sin su valiosa ayuda no habría sido posible la realización de este seminario.

Al Dr. Carlos Flores, Dr. Salvador Sermeño y muy especialmente al T.M. Jaime Soundy, por la colaboración que nos brindaron.

Al personal de la Sección de Microbiología del Hospital Rosales.

Al personal de archivo del Instituto Salvadoreño del Seguro Social.

Y a todas las personas que en una u otra forma nos ayudaron a realizarlo.

DEDICATORIA

A mis padres: Andrés Lara
María Victoria de Lara

A mi esposo: Rafael Antonio Pacas

A mi hija: Sheyla Claudina

A mis hermanos, familiares y amigos

Olimpia

DEDICATORIA

A mi madre: Zoila Flores

A mis hermanos: Roberto, Jorge, Guillermo y Mauricio

A mi amiga: María Antonia de Iraheta con infinito
cariño y gratitud.

A mis familiares y amigos.

Sandra Margarita

I N D I C E

	Página
I. Resumen	1
II. Introducción	3
III. Objetivos del Trabajo	8
IV. Materiales y Métodos	9
V. Resultados	16
VI. Tablas	19
VII. Discusión	30
VIII. Apéndice	37
IX. Bibliografía	42

I. RESUMEN

Se realizó una investigación de anticuerpos antinucleares con la técnica de inmunofluorescencia indirecta (FANA) y preparación de células - LE. Con el método del coagulo estrujado, en muestras de sangre de 103 personas. De éstos, 31 con diagnóstico de lupus eritematoso sistémico (LES), 2 con síndrome de Sjögren, 4 con hepatitis, 36 con artritis -- reumatoide, 1 con tiroiditis autoinmune, 1 con porfiria intermitente -- aguda, 1 con eritema nodoso, 1 con osteoartritis, 1 con artritis séptica y 25 aparentemente sanos (15 jóvenes y 10 ancianos).

La técnica de FANA fue muy sensible para el diagnóstico de LES siendo positiva en 100% de los pacientes con esa enfermedad. En los pacientes con otras enfermedades autoinmunes la reactividad varió de 13 a 50%. De los individuos sanos 6 a 10% también reaccionaron con la prueba de FANA. La técnica de células LE fue menos sensible (41.9% de positivos) pero más específica para LES, ya que fue positiva sólo en pacientes con esa enfermedad.

El patrón homogéneo de inmunofluorescencia fue el observado con más frecuencia con la prueba FANA (78%). En pacientes con LES, artritis reumatoidea, síndrome de Sjögren, hepatitis, tiroiditis y dos aparentemente sanos. El patrón moteado se observó en 17% de los reactores siendo todos ellos pacientes con LES. El patrón nucleolar se observó en dos - pacientes con LES y uno con artritis reumatoidea.

Los resultados coincidieron en gran parte con lo reportado en la literatura sobre ese tipo de pruebas. Pequeñas diferencias observadas se atribuyeron al uso de otras técnicas. No fue posible por limitaciones de reactivos hacer diluciones para reportar el título de anticuerpos y desenmascarar patrones de fluorescencia, lo cual es muy valioso para la interpretación de las pruebas. En todas las pruebas se trabajó con diluciones del suero de 1:20.

La prueba de FANA mostró ser muy sensible y con los sets comerciales es fácil de realizar, por lo que puede recomendarse para hospitales generales en los que se atienden pacientes con enfermedades autoinmunes, en especial LES.

II. INTRODUCCION

Los anticuerpos antinucleares en las enfermedades autoinmunes son auto anticuerpos capaces de producir despolimerización de la cromatina nuclear (13,18). Pueden encontrarse en varios procesos patológicos, especialmente en lupus eritematoso sistémico; también se han reportado - en artritis reumatoidea, poliarteritis nudosa, glomerulonefritis, poliomiositis, dermatomiositis, escleroderma, síndrome de Sjögren, hepatitis negativa al antígeno australiano, etc. (2,6,9).

El lupus eritematoso es una enfermedad clasificada como inmunológica - ocurre con más frecuencia en mujeres y se caracteriza por erupción cutánea, artralgias, fiebre, lesiones renales, cardíacas y vasculares, - anemia, leucopenia y muchas veces trombocitopenia. Puede confundirse desde el punto de vista clínico con otros procesos inmunológicos y no inmunológicos. Las diferencias en la terapia de esos procesos y del LES (22) justifican la aplicación de pruebas de laboratorio que permitan definir claramente el diagnóstico. Las pruebas para detectar anti cuerpos antinucleares ayudan mucho en ese propósito sin embargo, una que no es serológica pero tradicionalmente la más usada ha sido la preparación de células LE, empleando la técnica del coágulo estrujado en la que es preciso comprobar la existencia de varias células LE. Cuando hay una leucopenia intensa, el test puede ser falsamente negativo, debido a la ausencia o disminución de células fagocíticas. El test po

sitivo indica la existencia de lupus eritematoso sistémico; sin embargo, en ocasiones puede observarse células o fenómenos LE en pacientes con -- otras enfermedades. Un test LE negativo no descarta la existencia de -- lupus eritematoso sistémico (17). Las limitaciones de esta prueba han estimulado el desarrollo de pruebas inmunológicas para detectar anticuerpos antinucleares, las cuales son más específicas y más sensibles (6). Entre ellas podemos mencionar método por radioinmunoensayo, método por he maglutinación.

Método por hemaglutinación, que detecta anticuerpos para dos proteínas -- ácidas, el antígeno Sm y la ribonucleoproteína nuclear. Los anticuerpos al antígeno Sm parecen ser altamente específicos para el lupus eritematoso sistémico (LES) y los anticuerpos para la proteína ribonucleica a pesar de no ser específica, cuando se encuentra en títulos elevados son diagnósticos del nuevo síndrome clínico de la enfermedad del tejido conectivo mixto, prueba de latex para anticuerpos precipitantes de nucleoproteína, método de detección de anticuerpos antinucleares por inmunofluorescencia y fijación de complemento.

De todos los mencionados, el método de anticuerpos antinucleares por inmunofluorescencia indirecta (FANA) es el que mejor se adapta a las facilidades y necesidades de los laboratorios clínicos que cuentan con microscopios de fluorescencia y se ha convertido en una prueba de laboratorio usada con mucha frecuencia como parte del estudio en pacientes con enfermedades inmunológicas. Esta técnica permite demostrar todos los anticuerpos antinucleares puesto que todos los anticuerpos que reaccionan --

con el núcleo o componentes del mismo son detectados. Además esta técnica es extremadamente sensible, siendo positiva cuando otras pruebas son negativas. La alta sensibilidad de esta prueba permite la detección de anticuerpos antinucleares en una amplia variedad de enfermedades, en individuos de edad avanzada y jóvenes aparentemente normales (6). La disponibilidad comercial de los reactivos, simplifica la realización de la prueba y ha permitido que ésta sea realizada en mayor número de laboratorios (9).

La técnica de anticuerpos fluorescentes para detectar anticuerpos antinucleares (FANA), es una técnica indirecta en la que se hace reaccionar el suero del paciente con células humanas o de roedor fijadas en una lámina de vidrio. Después de lavar la lámina para eliminar los reactivos no fijados, se agrega anti-gamma globulina humana marcada con fluoresceína. Si el suero del paciente contiene anticuerpos antinucleares, éstos van a reaccionar con los determinantes antigénicos del núcleo en las células y van a ser fijadas a ellos. En el segundo paso esos mismos anticuerpos van a reaccionar por su fracción Fc con la anti-gamma globulina marcada con fluoresceína. En el microscopio de fluorescencia se observará en los casos positivos una fluorescencia verde manzano del núcleo celular que puede presentar cuatro patrones: Periférico, Homogéneo, Speckled o Moteado y Nucleolar (9). Algunos autores han asociado estos patrones con ciertas enfermedades y se considera que pueden tener valor pronóstico (5,22). La razón principal para ordenar la prueba de anticuerpos antinucleares por inmunofluorescencia (FANA) es para descartar un diagnóstico del lupus eritematoso sistémico. Un FANA ne-

gativo en un paciente cuyos síntomas clínicos sugieren LES descarta -- esencialmente el diagnóstico de un proceso activo. En pacientes con -- LES la prueba es de gran valor clínico porque el patrón y el título pueden reflejar la actividad de la enfermedad. Una ventaja de FANA sobre otras pruebas para anticuerpos antinucleares es la facilidad con que -- se realiza y la facilidad de su interpretación, además se necesita menos tiempo para verificarla comparado con la de células LE. Otras técnicas inmunológicas son incapaces de detectar todos los anticuerpos antinucleares en el suero del paciente con el mismo grado de sensibilidad que la técnica de FANA. Por ejemplo: Anticuerpos antideoxiribonucleico (anti DNA) aunque son más específicos para LES activo, generalmente no se encuentran presentes en los pacientes con LES en remisión (20).

A pacientes con hepatitis crónica activa también se les debe ordenar el FANA puesto que es frecuentemente positiva. Lo mismo en pacientes que reciben drogas que se conocen que inducen LES como la procainamida y la hidralacina (20). Estos individuos pueden presentar síntomas sugestivos de LES, o simplemente quejarse de dolores en las articulaciones y tener positivas el FANA y las preparaciones de células LE.

A pesar de que FANA positivos son encontrados en muchas enfermedades el significado clínico en pacientes con estas enfermedades no ha sido clarificado. Por ejemplo, la presencia de un título elevado de FANA en pacientes con esclerosis sistémica progresiva no tiene ningún significado clínico práctico puesto que no hay correlación de ningún hallazgo de la boratorio con la enfermedad.

Teniendo en cuenta que las pruebas de anticuerpos antinucleares son bien conocidas por el personal médico y con frecuencia son indicadas a los pacientes, se consideró de importancia realizar una investigación sobre la frecuencia con que se encuentran los anticuerpos antinucleares en pacientes con lupus eritematoso activo e inactivo, en pacientes con otras en-fermedades autoinmunes y en personas sanas. Para esto se utilizó la -- técnica de anticuerpos antinucleares por inmunofluorescencia y la búsqueda de células LE a fin de evaluar la factibilidad de realizar dichas pruebas en nuestro medio.

III. OBJETIVOS DEL TRABAJO

1. Determinar y comparar la frecuencia con que se presentan los anticuerpos antinucleares por inmunofluorescencia (FANA), su título y patrones de fluorescencia en pacientes con lupus eritematoso sistémico, en pacientes con otros procesos autoinmunes y en personas sanas.
2. Evaluar la factibilidad de realización del método de anticuerpos fluorescentes para detectar anticuerpos antinucleares en nuestro medio.
3. Comparar los resultados de la técnica del coágulo estrujado para detectar células LE con los obtenidos por la técnica de anticuerpos fluorescentes para anticuerpos antinucleares (FANA) en las personas que se estudien.

IV. MATERIALES Y METODOS

Población Estudiada

Se estudiaron 103 personas: 31 con lupus eritematoso (5 activos y 26 en remisión), 36 con artritis reumatoidea, 4 con hepatitis, 2 con síndrome de Sjögren, 3 con enfermedades autoinmunes, 1 con osteoartritis, 1 con artritis séptica y 25 personas aparentemente normales (15 adultos y 10 ancianos mayores de 60 años). De los 103 individuos estudiados 71 eran mujeres y 32 hombres; el más joven tenía 20 años y el de mayor edad 76. A todas las personas se les tomaron sus datos personales (edad, sexo, oficio, procedencia, estado civil, etc.). A los pacientes se les interrogó en referencia a su historia clínica (manifestaciones clínicas, tiempo de evolución, actividad de la enfermedad, datos de laboratorio, etc.). Para ello se utilizó un formulario del cual se adjunta un ejemplar (Fig.1).

El número de personas estudiadas y su distribución por sexo y edad se muestran en la tabla 1.

Colección de las Muestras

A todos se les tomó en ayunas una muestra de sangre (10 ml.), la cual se depositó en dos tubos y se dejó coagular en ambos. El suero de la muestra que iba a ser utilizado para FANA se separó de inmediato del

coagulo y se guardó en refrigeración hasta el momento de hacer la prueba para detectar anticuerpos antinucleares con el microscopio de fluorescencia (FANA). Para la prueba de células LE se esperó una hora para que el coagulo se retrajera e inmediatamente se hicieron las preparaciones de células LE.

Técnica para la Detección de Anticuerpos Antinucleares por el Método de Inmunofluorescencia Indirecta (FANA)

Se usó el equipo Lab-Tek ANA Test Kit, de la casa Miles, el cual está -- disponible comercialmente. El equipo consta de láminas de vidrio en las cuales se ha fijado células derivadas de embrión humano, control de suero humano positivo, que da una reacción 4+, control suero humano negativo, conjugado de anti IgG humana con isotiocianato de fluoresceína. La anti IgG humana es preparada en carneros.

Prueba Cualitativa

1. Se preparó la cámara húmeda, agregando agua a las tiras absorbentes en el fondo de la bandeja de incubación proporcionada con el equipo. Se tapó con su respectiva cubierta.
2. Se preparó solución salina fosfato buffer PH 7.3 ± 2 , disolviendo el paquete con reactivos en suficiente agua para completar un litro.
3. Se rehidrataron los sueros control positivos y negativos agregando al vial respectivo 2 ml. de buffer. Este volumen fue dividido en

alícuotas de 0.2 ml para ser usadas cada vez que se realizara la prueba. Se usó de inmediato o se almacenó en freezer a -20°C .

4. Se preparó la solución de trabajo de los sueros control agregando 1.8 ml de buffer a 0.2 ml de suero reconstituido. Si el suero estaba en el freezer, se descongeló a temperatura ambiente y luego se le agregaron 1.8 ml de buffer.
5. Se diluyó 1:20 el suero del paciente agregando 1.9 ml de buffer a 0.1 ml de suero. Se mezcló bien y se probó de inmediato.
6. Se agregaron 3 gotas de muestra utilizando una pipeta Pasteur (equivalente a 100 microlitros) a los pozos de antígeno (células) en la lámina. Con la pipeta se esparció cuidadosamente la muestra en toda el área. Se usó una pipeta para cada muestra.
7. Se colocó la lámina en la cámara húmeda y se incubó a temperatura ambiente por 30 minutos.
8. Se lavó la lámina con buffer en forma delicada y sin contaminar entre sí las áreas de prueba.
9. Se lavaron las láminas, haciendo tres cambios de buffer en jarras de coplin. Se sacudió el exceso de buffer, no se permitió que las láminas se secaran.
10. Se cubrió cada área de prueba con tres gotas de anti IgG humana marcada con fluorescencia (utilizando una pipeta Pasteur, equivalente a 100 microlitros). Con la punta de la pipeta se esparció el conjugado en toda el área.

11. Se colocaron las láminas en la cámara húmeda y se incubó a temperatura ambiente por 30 minutos.
12. Se lavaron y enjuagaron las láminas como se describió en los pasos 8 y 9.
13. Se añadieron dos o tres gotas de colorante de azul de Evans por -- área de examen y se incubaron por dos minutos a temperatura ambiente en la cámara húmeda.
14. Se lavaron y enjuagaron las láminas.
15. Se removió el plástico de la lámina teniendo cuidado de no tocar las células. Para esto se removió el plástico en una esquina de la lámina y lentamente se haló con tensión uniforme.
16. Teniendo cuidado de que la lámina no se secase, se depositó en cada área de examen 2 ó 3 gotas de glicerol buffer, se cubrió cada - área con una laminilla de vidrio. Se leyó antes de una hora después de preparada. Si por alguna razón eso no era posible, se guardaron las láminas en la oscuridad en refrigeración. En ningún caso se leyeron después de 12 horas de preparadas las láminas.
17. Usando un microscopio de fluorescencia (apéndice) se leyeron las láminas y se anotó el patrón de fluorescencia en cada área. Se observó con el objetivo 40X.
18. Siempre se comparó la intensidad de la fluorescencia en las áreas de examen con sueros control positivo y negativo.

Interpretación del Aspecto Microscópico de las Preparaciones Tratadas por Inmunofluorescencia Indirecta

Positivo: Se consideró positiva la prueba cuando se observó fluorescencia verde manzano en el núcleo de las células. En todos los casos positivos se determinó el patrón de fluorescencia: homogéneo, se observó fluorescencia verde manzano en todo el núcleo celular (Fig.2 p.25) moteado o un punteado fluorescente en el núcleo celular (Fig.3 p.26) nucleolar, la fluorescencia se observó solo en los nucleolos (Fig.4 p.27) periférico en este patrón la fluorescencia se observa en la periferia del núcleo de la células (Fig.5 p.28). Negativo: La prueba se consideró negativa si no se observó fluorescencia verde manzano mayor que la observada con el control negativo en el núcleo de las células.

Se tomó muy en cuenta que es importante determinar el título en los casos positivos, pero debido a limitaciones de reactivos no nos fue posible llevar a cabo esas titulaciones.

Técnica del Coagulo Estrujado para el Estudio de Células LE

1. La sangre se dejó coagular por una hora, después de lo cual se retiró el líquido sobrenadante y se colocó el coagulo en un tamiz fino, se desmenuzó y luego se puso en tubos de Wintrobe y se centrifugó a 3000 rpm, durante 20 minutos.
2. Con la capa de leucocitos se prepararon dos frotis por cada muestra,

se dejaron secar al aire y se tiñeron con colorante de Wright (13). Estas preparaciones se examinaron con el objetivo de inmersión en microscopio de luz*.

Resultados

Positivo: Se consideró positivo cuando se observaron dos células LE en el frotis de sangre. Estas suelen ser polimorfonucleares neutrófilos (a veces un monocito o un eosinófilo) que han ingerido el núcleo alterado de otro polimorfonuclear. La célula está ocupada por una masa esférica, homogénea que se tiñe de color pardo púrpura (Fig.6 p.29). Los lóbulos del polimorfonuclear suelen encontrarse en la periferia de la masa (13,17). Negativo: Se consideró negativo cuando no se observaron células LE en los frotis de sangre.

* American Optical Corporation Spencer. Model No.1036A. C.5 volts. 2.75 amperes. Instrument Division Buffalo 15 N.Y. made in U.S.A. Objetivo 100X. N.A. 1.25 Oil IMM CAT 1079. Made in U.S.A.

Figura 1

HOJA DE REFERENCIA
INVESTIGACION DE ANTICUERPOS ANTINUCLEARES

Nombres y apellidos	No. de afiliación		
Edad	Sexo	Estado civil	Ocupación
Domicilio actual		Teléfono	
Diagnóstico: _____			
Manifestaciones clínicas: _____			

Localización de lesiones: _____			
Actividad de la enfermedad: _____			
Tratamiento: _____			
Exámenes de laboratorio solicitados:			
ANA título _____	Patrón _____	Fecha _____	Lugar _____
Células L.E. _____	Hemograma completo _____		
Prueba de latex _____	Ht-Hb _____		
Antiestreptolisinas _____	Otros _____		
Eritrosedimentación _____			
Acido úrico _____			
Proteína C. Reactiva _____			
Orina _____			
Observaciones _____			

V. RESULTADOS

La tabla 2 (p.20) presenta la comparación de los resultados obtenidos con la técnica del coagulo "estrujado" para investigar células LE y la técnica indirecta de anticuerpos fluorescentes (FANA) en pacientes con lupus eritematoso, pacientes con otro diagnóstico y en individuos sanos. Con la técnica del coagulo "estrujado" fueron positivos 13 de las 103 - personas estudiadas (12.6%). La reactividad fue mayor con la técnica de FANA con la cual reaccionaron 41 de las 103 personas estudiadas (39%). La prueba de células LE fue positiva en 13 (41.9%) de los 31 pacientes con lupus eritematoso. Las otras personas examinadas fueron negativas. La prueba FANA dio resultados positivos en todos los 31 (100%) pacientes con lupus eritematoso.

También dio positiva en los pacientes con otros diagnósticos (8 de 47, 17%), personas jóvenes sanos (1 de 15, 6.7%) y ancianos (1 de 10, 10%).

En la tabla 3 (p.21) se presenta la distribución según el diagnóstico de la reactividad del suero de todos los 103 individuos estudiados con la técnica de FANA. Los 31 pacientes con lupus eritematoso incluidos - en el estudio fueron positivos (100% de reactividad) tanto en los casos activos como en los que se encontraban en remisión. Dos pacientes catalogados como síndrome de Sjögren fueron estudiados con la prueba de FANA obteniéndose resultado positivo en uno de ellos con patrón homogéneo --

(50%). Se analizó también el suero de tres pacientes con otras enfermedades autoinmunes (tiroiditis crónica autoinmune, porfiria más pielonefritis y eritema nodoso) habiendo sido positivo únicamente el que tenía diagnóstico de tiroiditis crónica autoinmune (33% de reactividad). Solo 1 (25%) de 4 pacientes con hepatitis crónica fue reactivo y 5 de 36 pacientes (13%) con artritis reumatoidea. Se estudió también un paciente con osteoartritis y uno con artritis séptica, siendo ambos negativos.

Los patrones de lectura de la prueba positiva de FANA del suero de pacientes con diferente diagnóstico y personas sanas se detallan en la tabla 4 (p.22). Se observa que de 41 muestras positivas, 32 dieron un patrón homogéneo de fluorescencia. Este patrón es el que con mayor frecuencia se encuentra asociado con lupus eritematoso así, de 31 pacientes con esta enfermedad, 23 dieron ese patrón de positividad, 7 dieron patrón moteado y 1 patrón nucleolar. De los 5 pacientes con artritis reumatoidea que reaccionaron, 4 dieron patrón homogéneo y un patrón nucleolar. Los pacientes con síndrome de Sjögren, otras enfermedades autoinmunes, hepatitis, individuos sanos jóvenes y ancianos dieron resultado positivos con patrón homogéneo. En total reaccionaron 41 personas con la técnica de FANA de ellos 32 se catalogaron como patrón homogéneo (78%), 7 como patrón moteado (17%) y 2 como nucleolar (4.9%). No observamos en ningún caso patrón periférico.

La distribución de la reactividad obtenida en los antígenos antinucleares según la edad y el sexo de la población estudiada se detallan en la tabla 5 (p.24). Cincuenta y siete personas del sexo femenino tenían --

procesos patológicos posiblemente autoinmunes; de ellos 34 dieron resultados positivos con la prueba de FANA (59.6%). Solo 21 pacientes del sexo masculino fueron incluidos en el estudio de los cuales 5 fueron positivos (23.8%). Entre los individuos sanos estudiados 10 eran del sexo femenino y solo 1 (10%) fue positivo; 15 fueron del sexo masculino y de ellos sólo 1 fue positivo (6%). La reactividad fue mayor en los ancianos de 60 años o más (10%) que en los adultos menores de esa edad (6%). El patrón de fluorescencia en ambos casos fue de tipo homogéneo.

T A B L A 1

DISTRIBUCION DE LA POBLACION SEGUN EDAD Y SEXO

A Ñ O S	E N F E R M O S		S A N O S	
	FEMENINOS	MASCULINOS	FEMENINOS	MASCULINOS
20 - 29	18	1	1	4
30 - 39	19	6	3	4
40 - 49	12	4	2	1
50 - 59	6	3	-	-
60 - 69	1	4	3	3
70 - 79	1	3	1	3
TOTAL	57	21	10	15

T A B L A 2

COMPARACION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS CON LA TECNICA DEL COAGULO ESTRUJADO PARA INVESTIGACION DE CELULAS LE Y LA TECNICA INDIRECTA DE ANTICUERPOS FLUORESCENTES EN PACIENTES CON LUPUS ERITEMATOSO, PACIENTES CON OTRO DIAGNOSTICO Y EN INDIVIDUOS SANOS

Diagnóstico	Técnica del coagulo estrujado para investigación de células LE		Técnica indirecta de anticuerpos fluorescentes	
	Positivos	%	Positivos	%
Lupus Eritematoso	13/31*	41.9	31/31*	100
Otro Diagnóstico	0/47		8/47	17.0
Sanos Jóvenes	0/15		1/15	6.7
Sanos Ancianos	0/10		1/10	10
Total	13/103	12.6	41/103	39.8

* El denominador indica el total de personas estudiadas y el numerador los casos positivos

T A B L A 3

DISTRIBUCION SEGUN EL DIAGNOSTICO DE LA REACTIVIDAD DEL SUERO DE TODOS LOS
103 INDIVIDUOS ESTUDIADOS CON LA TECNICA INDIRECTA DE INMUNOFLUORESCENCIA

DIAGNOSTICO	REACCION POSITIVA CON ANA	%
Lupus Eritematoso	31/31	100
Síndrome de Sjögren	1/2	50
Otras Enfermedades Autoinmunes	1/3	33
Hepatitis	1/4	25
Artritis Reumatoidea	5/36	13
Osteoartritis	0/1	--
Artritis Séptica	0/1	--
Sanos Jóvenes	1/15	6
Sanos Ancianos	1/10	10
Reactividad Total	41/103	38.9

T A B L A 4

PATRON DE LECTURA DE LA PRUEBA POSITIVA DE ANTICUERPOS FLUORESCENTES (FANA)
DEL SUERO DE PACIENTES CON DIFERENTES DIAGNOSTICOS Y PERSONAS SANAS

Patrón de Fluorescencia	D I A G N O S T I C O S											React. Total	%
	Lupus Eri- tematoso	Artritis Reumatoidea	Osteo- Artritis	Artritis Séptica	Síndrome Sjögren	Enferm. Autoin- munes	Hepatitis	Sanos Jóvenes	Sanos Ancianos				
Homogéneo	23	4	-	-	1	1	1	1	1	-	-	32	78.0
Periférico	--	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Moteado	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7	17.1
Nucleolar	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	4.9
Total	31	5	-	-	1	1	1	1	1	-	-	41	100

T A B L A 5

REACTIVIDAD A ANTIGENO NUCLEARES FANA, DISTRIBUCION DE LA
POBLACION ESTUDIADA SEGUN EDAD Y SEXO

A Ñ O S	E N F E R M O S			S A N O S				
	FEMENINOS	%	MASCULINOS	%	FEMENINOS	%	MASCULINOS	%
20 - 29	12/18*	34.2	0/1	-	0/1	-	1/4	16.6
30 - 39	9/19	26.0	1/6	16.6	0/3	-	0/4	-
40 - 49	8/12	22.8	1/4	16.6	0/2	-	0/1	-
50 - 59	4/6	11.4	1/3	16.6	-	-	0/3	-
60 - 69	1/1	2.8	1/4	16.6	0/3	-	0/3	-
70 - 79	0/1	-	1/3	16.6	1/1	2.8	0/3	-
TOTAL	34/57	59.6	5/21	23.8	1/10	10.0	1/15	6.0

* El denominador indica el número de personas estudiadas y el numerador los casos positivos

ENFERMEDADES RELACIONADAS CON ANTICUERPOS ANTINUCLEARES

ENFERMEDADES	PATRON DE NUCLEO TEÑIDO POR INMUNOFUORESCENCIA	ESPECIFICIDAD DE ANTICUERPOS
LES	PERIFERICO	DNA o nucleoproteínas
	HOMOGENEO	Nucleoproteínas
	MOTEADO	Antígeno Sm o ribonucleoproteínas
Drogas que inducen lupus (procainamida, hidralazina)	HOMOGENEO	Nucleoproteínas
Enfermedades del tejido conectivo mixto	MOTEADO	Ribonucleoproteínas
Escleroderma	MOTEADO	Ribonucleoproteínas (baja incidencia)
	NUCLEOLAR	4-6S RNA. Otros desconocidos
Síndrome de Sjögren's	MOTEADO	Desconocido
	NUCLEOLAR	4-6S RNA. Otros desconocidos
	HOMOGENEO	Desconocido
Artritis reumatoidea	HOMOGENEO	Desconocido

Tomado de Tan Eng M. y Col. The Clinical Significance of Antinuclear Antibodies. Postgraduate Medicine, 54: 143, 1973.

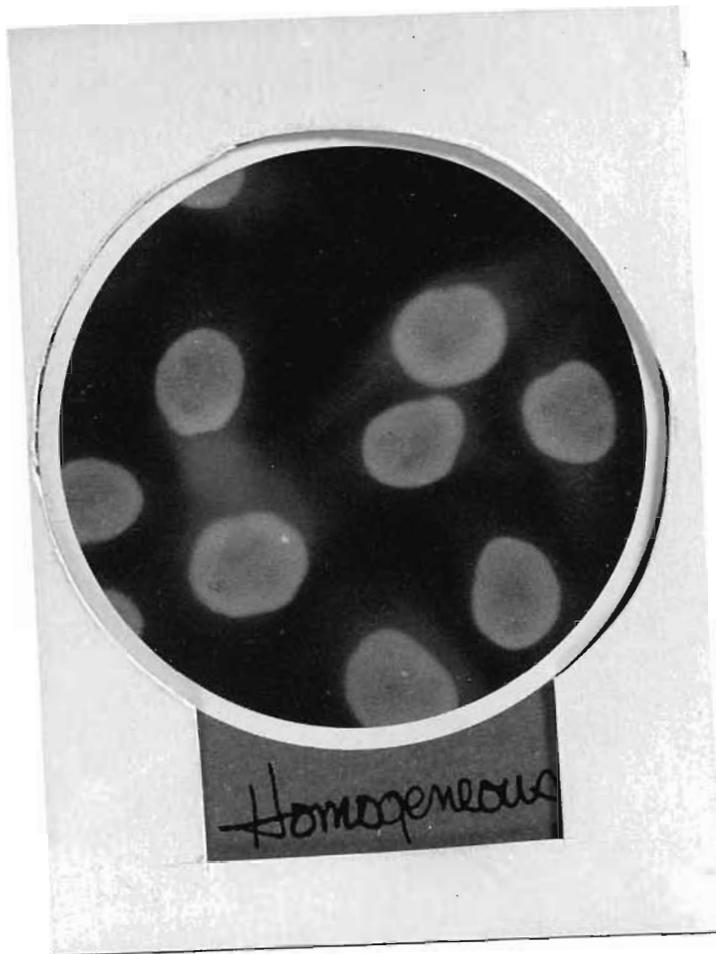


Figura 2

Patrón Homogéneo de Fluorescencia

Se observa fluorescencia verde manzano en todo el núcleo celular.

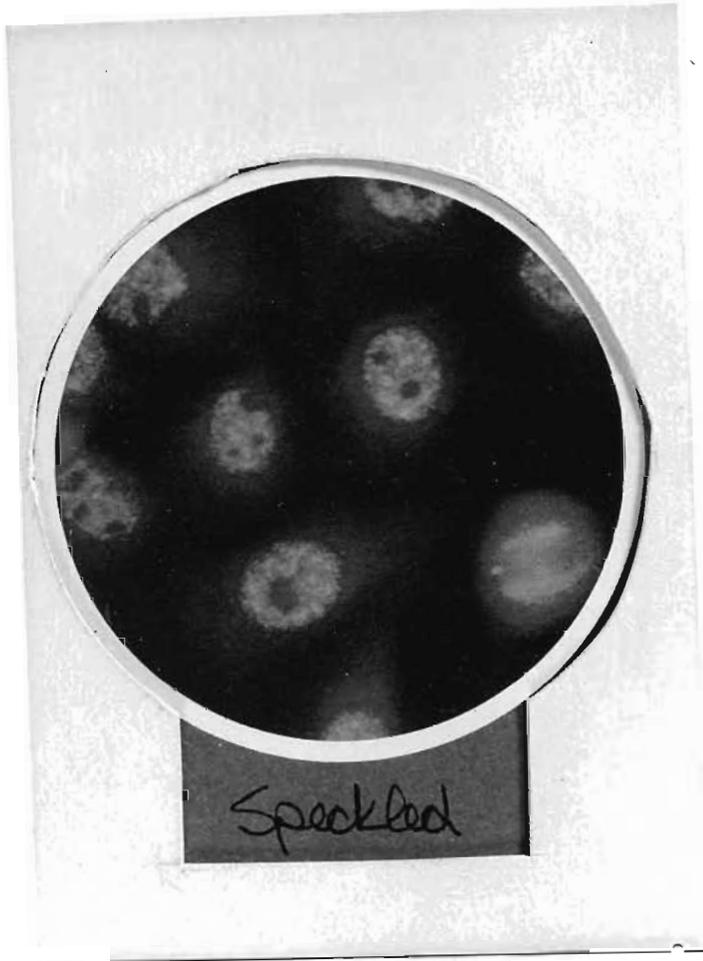


Figura 3

Patrón Moteado de Fluorescencia

Se observa punteado fluorescente en el núcleo celular



Figura 4

Patrón nucleolar de fluorescencia

La fluorescencia se observa en los nucleolos

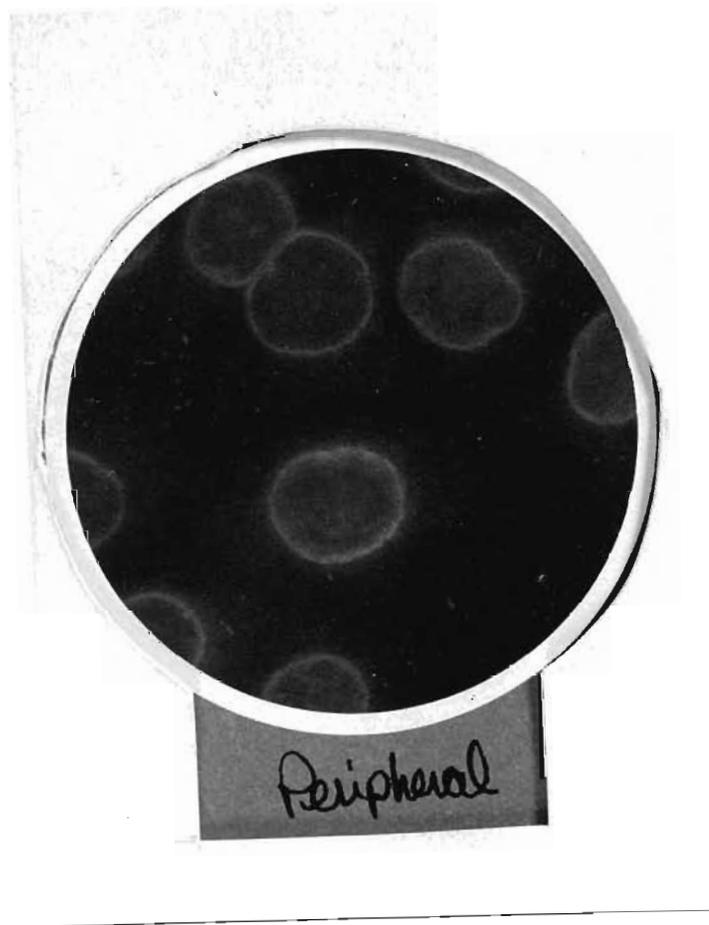


Figura 5

Patrón Periférico de Fluorescencia

La fluorescencia se observa en la periferia del núcleo celular

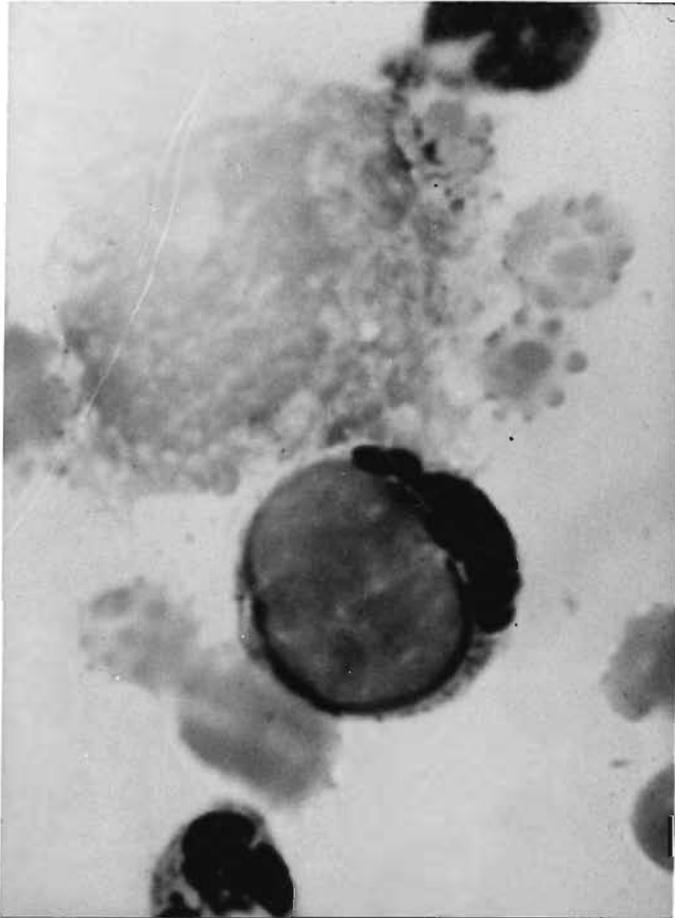


Figura 6
Célula L.E. en Frotis de Sangre

VII. DISCUSION

La técnica de anticuerpos antinucleares por inmunofluorescencia indirecta (FANA) mostró ser extremadamente sensible en los casos de lupus eritematoso, los cuales mostraron 100% de reactividad (tabla 2). Otros -- autores (4,6,8,10,20) utilizando diferentes sustratos, encontraron de 96 a 99% de sensibilidad. Todos coinciden en señalar que es la más sensible de las técnicas actualmente en uso para la detección de anticuerpos antinucleares y para el diagnóstico de lupus.

Como contraste, la técnica del coagulo estrujado para la investigación de células LE fue menos sensible ya que sólo en 13 de los 31 (41%) pacientes con lupus eritematoso se observaron células LE. Es sabido que las técnicas para hacer preparaciones de células LE son poco sensibles reportándose sólo 50 a 75% de positividad en casos activos de lupus eritematoso (10,17). Por los resultados obtenidos en nuestro caso, la técnica del coagulo estrujado fue específica ya que fue positiva únicamente en los casos de lupus eritematoso siendo negativa en individuos sanos o que adolecían de otras enfermedades, incluyendo varias catalogadas como procesos autoinmunes. Sin embargo, esta especificidad es solo aparente ya que otros autores (17) han encontrado células LE en la sangre de pacientes con artritis reumatoidea, escleroderma y otras enfermedades autoinmunes pero utilizando otros procedimientos, por ejemplo el método de las perlas de vidrio (17).

En especial queremos hacer mención de las enfermedades incluídas en este estudio que dieron positiva la prueba de FANA (tabla 3). Se sabe -- que la prueba de FANA es muy sensible ya que detecta cualquier reacción antígeno anticuerpo, por esta razón fue positiva en pacientes con artritis reumatoidea, síndrome de Sjögren, tiroiditis autoinmune, hepatitis y en personas aparentemente sanas, además en los pacientes con LES activo y en remisión. Esta reactividad ha sido ya descrita por otros autores y refleja la alta frecuencia de producción de autoanticuerpos contra componentes nucleares en varios procesos patológicos autoinmunes -- (5,10,15). Los pacientes con LES desarrollan típicamente una serie de fenómenos autoinmunes, incluyendo la presencia de anticuerpos anticelulares, anticitoplásmicos y especialmente antinucleares. Nosotros encontramos un 100% de reactividad para esta enfermedad utilizando células de embrión humano como sustrato y otros autores (5,6,10,25) han reportado de 96 a 99% utilizando diferentes sustratos.

El síndrome de Sjögren puede ser primario, pero a veces se asocia con otras enfermedades autoinmunes tales como artritis reumatoidea y LES. Los dos pacientes con este síndrome en este estudio eran secundarios. Uno de ellos fue positivo (50%). Otros autores (7) han encontrado un 70% de positividad en pacientes con esa enfermedad. El paciente con tiroiditis autoinmune fue positivo. Sin embargo, esta diferencia probablemente se debe al pequeño número de pacientes estudiados en este trabajo.

La hiperglobulinemia extrema en pacientes con hepatitis puede acompañarse de pruebas serológicas positivas (antinuclear, wasserman, factor reumatoide). No se sabe si la hepatitis crónica progresiva resulta de una infección viral persistente o si la lesión inmunológica del hígado es la que establece esta lesión progresiva. En el estudio se incluyeron cuatro casos con diagnóstico de hepatitis crónica activa, de los cuales sólo uno fue positivo para FANA. El número es tan pequeño que tal vez no amerite mencionarse. Sin embargo, otros autores han reportado del 50 al 60% de reactividad para FANA en esta enfermedad (15).

De 36 pacientes con artritis reumatoidea estudiados, 5 fueron positivos para FANA (13%). Otros autores (1,8,20) han reportado de 30 a 89%. En los grupos de jóvenes y ancianos aparentemente sanos encontramos un caso positivo en cada grupo, ésto se explica porque según otros autores --- (6,8,9,25) se puede encontrar hasta un 10% de positividad en jóvenes y ancianos sin que tenga importancia clínica, porque la presencia de estos anticuerpos no siempre se asocia con enfermedad. En general, los resultados de la positividad de FANA en estas enfermedades lo explica Bellanti (2). Este autor dice la ocurrencia de fenómenos autoinmunes, considerada antes un evento raro, se conoce ahora que es bastante frecuente. También se ha asociado con defectos de la respuesta inmunes y no siempre se asocia con enfermedad. Tales enfermedades en algunos casos son específicas de órganos, como en la tiroiditis, etc. pero lo más frecuente es que haya producción de anticuerpos contra varios antígenos reflejando un problema de activación policlonal que se expresa con la producción de varias clases de autoanticuerpos, entre ellos de

Los más frecuentemente observados son los anticuerpos antinucleares. Se ha reportado en casos de artritis reumatoidea, hepatitis crónica activa, síndrome de Sjögren y en LES. La ocurrencia de hiperglobulinemia con autoanticuerpos de diferentes especificidades, responsables de las pruebas falsas biológicas positivas con VDRL, RPR y otras pruebas para el diagnóstico de sífilis y responsables también de la positividad para la prueba de FANA.

Los patrones de fluorescencia observados se presentan en la (tabla 4). Puede observarse que predominó el patrón homogéneo con un porcentaje de 78% de casos. Al momento se ha reportado que este patrón de fluorescencia es producido por antinucleoproteína (complejo DNA-histona) (15). El siguiente en frecuencia fue el patrón moteado con un porcentaje de 17.1%. Este patrón se encuentra en sueros que contienen el antígeno nuclear soluble en salina el cual es de naturaleza proteica y contiene carbohidratos (Ag. Sm) (15). Además, también se encuentra en sueros con anticuerpos contra ribonucleoproteínas. En referencia al patrón nucleolar en el presente trabajo se encontró en 4.9% de los casos. En este patrón los anticuerpos están dirigidos contra el RNA nucleolar. No se observó patrón periférico.

Es sabido que la presencia de un determinado patrón de fluorescencia depende de la especificidad de los anticuerpos antinucleares presentes en el suero del paciente por alguno de los diferentes antígenos nucleares.

En base a la observación clínica se ha querido correlacionar el patrón de fluorescencia con algunas enfermedades como se presenta en la tabla 6

(25), como puede observarse no hay un patrón específico de cada enfermedad. Los resultados de este trabajo en general concidieron con lo propuesto en esa tabla. Sin embargo, nuestros resultados difieren en que encontramos un caso de LES con patrón nucleolar, patrón que no se reporta en la tabla para esa enfermedad. Lo mismo nos sucedió con artritis reumatoidea; además en los casos de LES no observamos fluorescencia de patrón periférico el cual Tan y Col (25) mencionan que se encuentra en LES.

Los anticuerpos para el DNA nativo de doble cadena que producen un patrón nuclear periférico, se encuentran más frecuentemente y casi exclusivamente en pacientes con LES (15). Los patrones homogéneos pueden enmascarar otros patrones de fluorescencia debido a que en algunos sueros los diferentes tipos de anticuerpos pueden estar presentes a diferentes títulos. Por esto es importante hacer la prueba cuantitativa (por dilución del suero) para que se hagan evidentes los diferentes patrones de fluorescencia. Esto permite evaluar el grado de actividad del LES y la respuesta al tratamiento. En este trabajo debido a limitaciones de reactivos no fue posible llevar a cabo esa titulación pero hubiera dado mucha información adicional.

No haber observado patrón periférico en nuestro estudio pudo deberse a que no se realizaron titulaciones del suero mayores de 1:20 y otro patrón pudo enmascarar el patrón periférico. Además, existe la posibilidad de que el diagnóstico de LES esté equivocado.

La fluorescencia nuclear homogénea se ha dicho también que es característica de LES, sin embargo no todos los pacientes con LES tienen anticuerpos antinucleoproteínas en su suero y estos patrones de fluorescencia pueden ser vistos en otras enfermedades. La escleroderma y el síndrome de Sjögren son las enfermedades en las que se ha observado más frecuentemente el patrón nucleolar, su frecuente asociación con la presencia de anticuerpos antinucleolares ha impulsado a algunos investigadores a considerar la fluorescencia nucleolar virtualmente diagnóstica de esas enfermedades. Sin embargo, los anticuerpos antinucleolares pueden encontrarse solos o con otros anticuerpos antinucleares en otras enfermedades del tejido conectivo. Los patrones de fluorescencia varían con cada enfermedad y con la dilución del suero (15).

Es de notar que los resultados obtenidos en este estudio (tabla 5) muestran un porcentaje de positividad mayor en pacientes del sexo femenino (59.6%) que en el masculino (23.8%). Se sabe que las enfermedades autoinmunes afectan más al sexo femenino. El grupo etario más afectado en el estudio puede verse que fue el de 20 a 49 años. Coincide con otros autores (7,14) donde se dice que este tipo de enfermedades ocurren con más frecuencia en este grupo etario.

Es evidente que la prueba de anticuerpos antinucleares por inmunofluorescencia indirecta es de mucho valor para el diagnóstico de LES y otras enfermedades autoinmunes, en particular cuando se detectan los patrones de fluorescencia, los títulos de anticuerpos y se correlaciona con el cuadro clínico, es fácil de realizar, necesita poco tiempo, su interpretación es sencilla y es mucho más sensible que la prueba del coágulo

estrujado, pues reacciona con todos los anticuerpos antinucleares presentes en el suero de los pacientes (10). Pero tiene las limitaciones siguientes: la dificultad de la obtención de los reactivos en nuestro medio, el costo mayor de ellos que de los utilizados para la prueba de células LE y la necesidad de microscopio de inmunofluorescencia y personal entrenado en su manejo.

VIII. APENDICE

Componentes y Función del Microscopio de Luz Ultravioleta: Uno de los componentes esenciales del microscopio de anticuerpos fluorescentes es la fuente de energía, este debe proveer una poderosa luz, en especial la región de longitudes de onda corta del espectro azul o ultravioleta. Para las técnicas de anticuerpos fluorescentes, las lámparas de alta presión de vapor de mercurio como la Osram HBO 200 o su equivalente son las más satisfactorias.

Entre más fuerte sea la fuente de energía, se producirá más luz, pero no solamente en la región de ondas cortas del espectro sino también en el rango visible y en especial en el de los rayos infrarojos productores de calor; por lo tanto, para evitar ésto, es necesario colocar un filtro de calor que se utiliza con doble propósito; el de proteger a los filtros primarios o excitadores y a la muestra o el frotis a observar. Este filtro debe tener una buena transmisión de luz ultravioleta. Los siguientes filtros están hechos para absorber toda la luz visible, o más exactamente, para absorber por completo toda la luz de longitud mayor que la luz excitante; por otra parte, esta combinación de filtros debe de transmitir completamente toda la luz excitante de longitud de onda corta. Además de estos "filtros excitadores", usualmente se coloca un filtro celeste pálido que se usa para corregir contrastes. El propósito de éste es hacer el fondo del campo de visibilidad en el mi-

microscopio fluorescente aún más negro. En cuanto a los espejos, los microscopios de fluorescencia deben tener espejos de cuarzo de superficie frontal. Se prefieren capas de aluminio porque dan mejor reflectividad, acompañado de un elemento óptico esencial, el condensador. Los hay de dos tipos, condensadores de campo claro y de campo oscuro. El condensador de luz excitadora. No hay ningún problema en iluminar hasta los campos más amplios vistos con objetivo de bajo poder, la apertura está totalmente abierta para permitir el máximo paso de energía excitadora a través del sistema. La desventaja es que con este condensador, no se obtiene un campo de fondo tan oscuro como el que se obtiene con el condensador de campo oscuro (hay bastante peligro de autofluorescencia con estos condensadores). Debe usarse una filtración mayor de luz excitante. Para dar un ejemplo práctico, un condensador de campo claro requiere un filtro BG12 de 6 mm. en cambio uno de campo oscuro, lo requiere de 3 mm. Los condensadores de campo oscuro dan imágenes de mucho contraste. A menudo se trabaja con muestras que dan fluorescencia muy débil, lo mejor entonces es obtener un fondo más oscuro o un incremento en el contraste. El gran contraste que da el sistema de campo -- oscuro se debe al hecho de que prácticamente nada de luz excitante entra al objetivo, con excepción de una pequeña cantidad de ella que es dispersada por la muestra. Estos condensadores por lo tanto también ofrecen la mejor protección al ojo del observador. Un filtro de barrera, bloqueador o secundario que absorba luz ultravioleta debe usarse por supuesto en cada caso.

Una buena regla para recordar es que, la apertura de los objetivos en un microscopio de fluorescencia equipado con un condensador de campo oscuro debe ser por lo menos 0.05 unidades de apertura numérica del condensador. En un ejemplo práctico ésto significa que, con un condensador de campo oscuro de 1.20 de apertura numérica, no se puede usar un objetivo con apertura de más de 1.15; si no es así no se obtiene un buen campo oscuro. La apertura dada para el condensador se puede alcanzar solamente con aceite entre condensador y lámina portaobjeto.

El tipo de condensadores de campo oscuro más frecuentemente usados es el cardioide de diseño bicéntrico. Son esencialmente sistemas reflectores. Para uso de microscopio de fluorescencia se fabrican estos sistemas con vidrio de alta transmisión de luz ultravioleta. Los condensadores así diseñados, dan imágenes de gran contraste y brillantez, -- por otro lado, su uso se restringe solo con objetivos de alto poder, no se puede iluminar completamente el campo que es con objetivos de bajo poder o mediano poder para ver la lámina, se espera fluorescencia solo en el centro del campo microscópico. Pero de todos modos las ventajas de este sistema son tan grandes que hoy en día la mayoría de microscopios de fluorescencia están equipados con ellos.

Ya se sabe que se debe usar un aceite de inmersión con baja fluorescencia intrínseca, también es importante usar aceite de baja viscosidad, porque los aceites de alta viscosidad forman burbujas muy fácilmente y éstas arruinan el contraste.

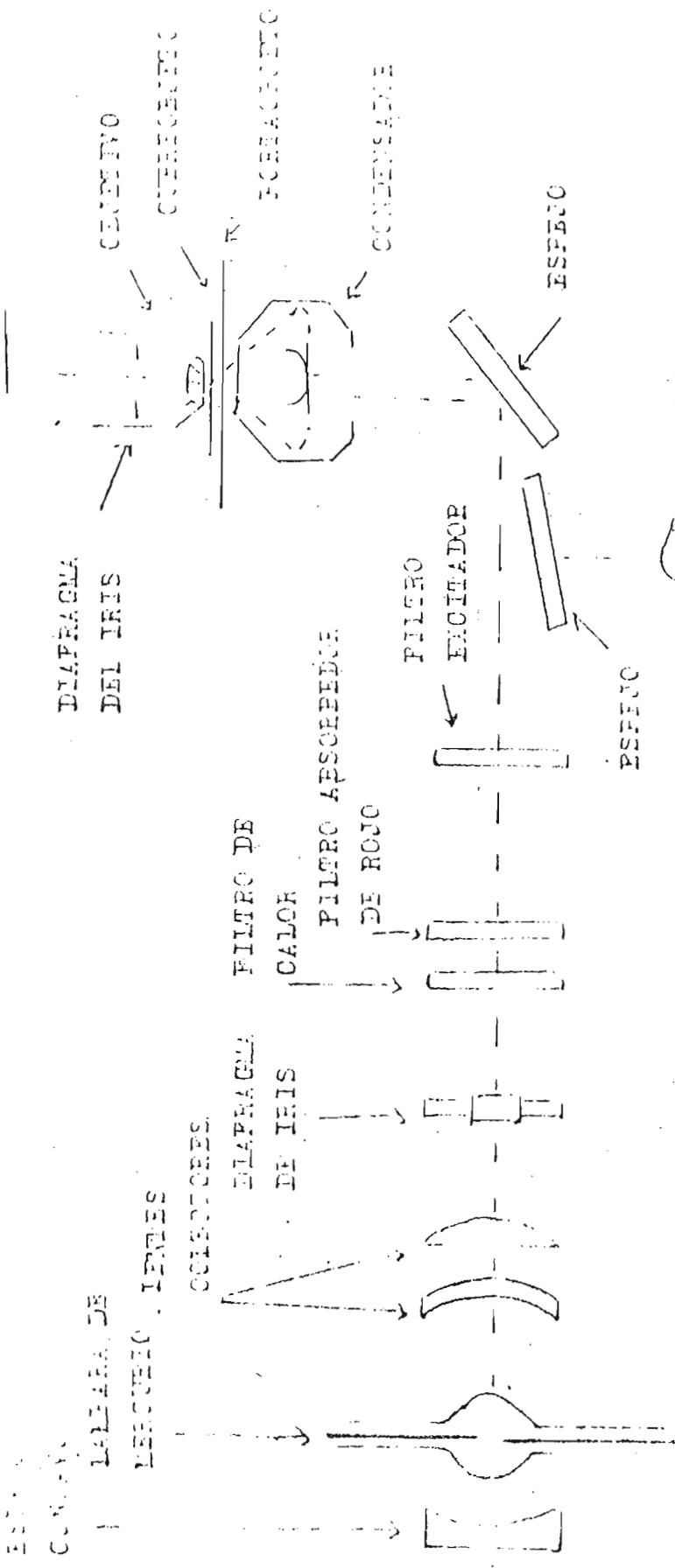
Un campo oscuro efectivo se logra cuando la lámina portaobjeto no es tan gruesa. El grosor para láminas es de 1.2 mm; pero hay algunos condensadores que requieren láminas de 1 mm solamente.

Los filtros de barrera o secundarios, sirven para quitar todo el remanente de luz excitadora, para que sólo la fluorescencia llegue al ojo del observador. De acuerdo a su propósito y función, la transmisión del espectro de los filtros de barrera es complementario al de los filtros excitadores; donde la transmisión de los filtros excitadores termina, el filtro de barrera se abre.

En nuestro trabajo, la combinación utilizada en el microscopio fue la siguiente: Lámpara Osram HBO 200 w/4; filtro de calor: KG1; filtro excitador: BG12; filtro de contraste: BG38; filtro de barrera: OG1.

REPRESENTACION ESQUEMATICA DEL EQUIPO

PARA MICROSCOPIO DE FLUORESCENCIA



LABORATORIO DE MERCURIO	200	250	300	350	400	450	500	550	600	650	700	750	800	850	900	950	1000
LABORATORIO DE MERCURIO																	
LABORATORIO DE MERCURIO																	

LABORATORIO DE MERCURIO

(26)

IX. BIBLIOGRAFIA

1. Aitcheson, C., Peebles C., Joslin F., and Tan E. M. Characteristics of Antinuclear Antibodies in Rheumatoid Arthritis. *Arthritis and Rheumatism*. 23:528-537, 1980.
2. Bellanti, J.A. *Inmunología*. "2a.Edición. Editorial Interamericana, México 1981, pp. 404-500.
3. Christian, Ch. L. Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis and Rheumatism*, 25: 887-888, 1982.
4. Cleymaet, J.E. and Nakamura R.M. Indirect Immunofluorescent Antinuclear Antibody Test: Comparison of Sensitivity and Specificity of Different Substrates. *Am J. Clin, Pathol*. 58: 388-393, 1972.
5. Deegan, M.J.M. Systemic Lupus Erythematosus. *Arch. Pathol. Lab. Med*. 104:399, 1980.
6. Fretzler, M.J. Fluorescent Antinuclear Antibody Test in Rose and Freedman. *Manual of Clinical Immunology American Society for Microbiology*. 1980. Washington D.C. 2a. Edition, pp. 852-857.
7. Gerald, P.R., Currier Mc.E. y Stanley L.W. *Compendio de las Enfermedades Reumáticas*, 1980, pp. 30-68

8. Husain, M., Nef J.D., Townsend J. and Lucasa F. Antinuclear Antibodies: Clinical Significance of Titers and Fluorescent Patterns. Am. J. Clin. Pathol. 61: 59-65, 1974.
9. Instructivo del ANA LAB TECK KIT DIVISION, Miles Laboratories Inc. Ill., U.S.A..
10. Kawamura Jr. Fluorescent Antibody Techniques and Their Applications. Baltimore, University Park Press, 1977.
11. Koffler D., Biesecker G., and Katz Sh. M. Immunopathogenesis of Systemic Lupus Erythematosus. Arthritis and Rheumatism. 25: 858-861, 1982.
12. Kozin, F. Fowlr B.A. and Koethe S.M. a Comparison of the Sensitivities and Specificities of Different Sustrates for the Fluorescent Antinuclear Antibody Test. Am J. Clin. Pathol. 74: 785-790, 1980.
13. Lynch, M.J. Raphael, S.Mellor L.D., Spare, P.D. Inwood M.J. "Métodos de Laboratorio", 2a. Edición, Editorial Interamericana, México, 1972, pp. 737-738.
14. Loeb C. Tratado de Medicina Interna, 13a. Edición, Editorial Interamericana, 1972, pp. 844-863.
15. Manual de Inmunología. Center for Desease Control. Atlanta, Georgia, U.S.A.

16. Parada, E.S. "Detección Rápida de Enterobacterias causantes de enfermedad diarréica en el niño, utilizando la técnica de anticuerpos fluorescentes (1)". Seminario de Graduación. Escuela de Tecnología Médica. Facultad de Medicina, Universidad de El Salvador, 1980. pp.33-37.
17. Plat. W.R. Atlas de Hematología. 1a. Edición. Barcelona. Editorial Jims, 1972, pp. 333-334.
18. Quiñónez, G.E. Las bases de la Inmunología Humana. 2a. Edición. Editorial Universitaria, 1976. pp.58.
19. Rubin R.L., Joslin F.G., and Tan E.M. Specificity of Anti-Histone Antibodies in Systemic Lupus Erythematosus. Arthritis and Rheumatism, 25: 779, 782, 1982.
20. Rothfield, N.F. Detection of Antibodies to Nuclear Antigens by Immunofluorescence in Rose and Freedman. Manual of Clinical Immunology American Society for Microbiology. Washington D.C. First Edition, 1976. pp.645-650.
21. Scopelitis E., Biundo J., and Alspaugh M.A. Anti-SS-A Antibody and Other Antinuclear Antibodies in Systemic Lupus Erythematosus Arthritis and Rheumatism, 23: 287-292, 1980.
22. Shulman L.E., and Harvey A. Mc. Systemic Lupus Erythematosus in Parker Clinical Immunology, 1980. W.B. Saunders Co. Philadelphia pp. 781-798.

23. Sharp G.C. Anti-nRNP and Anti-Sm Antibodies. *Arthritis and Rheumatism*, 25: 757-759, 1982.
24. Tan E.M., Rodnan G.P., García I., Diversity of Antinuclear Antibodies in Progressive Systemic Sclerosis. *Arthritis and Rheumatism* 23: 617-624, 1980.
25. Tan E.M., Nortway J.D., Pinnas J.L. The Clinical Significance of Antinuclear Antibodies. *Postgraduate Medicine*. 54: 143, 1973.
26. Tan E.M. Special Antibodies for the Study of Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis and Rheumatism*, 25: 753-756, 1982.