







PREVALENCIA Y CARACTERIZACIÓN DE ANTICUERPOS ANTI NUCLEOCITOPLASMÁTICOS EN UNA POBLACIÓN PEDIÁTRICA.

AUTORES:

GONZÁLEZ MS¹, 
ALEGRE M¹, 
GELPI P¹, 
LAURITO LP², 
ALCALDE MB² 
GUAI V³ 

¹ Sala de Inmunoserología y Química, Laboratorio Central, H.I.A.E.P. "Sor María Ludovica", La Plata.

² Residencia Bioquímica Postbásica con Orientación en Inmunología, H.I.A.E.P. "Sor María Ludovica", La Plata.

³ Residencia en Bioquímica Clínica, Laboratorio Central, Hospital General de Agudos Carlos G. Durand³, CABA.

Correspondencia: MARIA BELEN ALCALDE
E-mail: inmunoserologia.lab@gmail.com

RESUMEN

Introducción: La presencia de anticuerpos antinucleares (AAN) es el denominador común de muchas enfermedades autoinmunes sistémicas (EAS) y tiene un importante rol diagnóstico. Sin embargo, estos anticuerpos también pueden estar presentes en ausencia de enfermedad autoinmune, como en infecciones y desórdenes hematológicos, e incluso en individuos sanos. **Objetivo:** Describir la prevalencia de AAN, los patrones, títulos y presencia de anticuerpos específicos en pacientes pediátricos. **Materiales y métodos:** Se realizó un estudio descriptivo retrospectivo de corte transversal, en individuos de 0 a 18 años que concurren al Laboratorio Central del HIAEP "Sor María Ludovica", entre enero 2022 y diciembre 2023, con solicitud de AAN. Para cada caso se registró sexo, edad, resultados de AAN y anticuerpos específicos. **Resultados:** El estudio incluyó 752 solicitudes de AAN, de las cuales el 48,8% resultaron positivas. Del total de pacientes con resultado positivo, el 68,4% fueron de sexo femenino, la edad promedio fue 9 años y la moda 13 años. El título y el patrón observados con mayor frecuencia fueron 1/80 (47,3%) y nuclear moteado (67,8%) respectivamente. El mayor porcentaje de positividad para anticuerpos específicos se encontró a títulos >1/1280 (75%) y disminuyó conforme lo hizo el título de AAN. **Conclusión:** En la población estudiada se encontró un alto porcentaje de positividad de AAN, presentando la mayoría de las muestras un patrón nuclear moteado, títulos bajos y anticuerpos específicos negativos. El significado clínico de estos hallazgos debería ser mejor estudiado.

PALABRAS CLAVES:

Enfermedades autoinmunes. Niños. Anticuerpos antinucleares. Inmunofluorescencia indirecta.

ABSTRACT

Introduction: The presence of antinuclear antibodies (ANA) is a common feature of many systemic autoimmune diseases and plays an important diagnostic role. However, these antibodies can also be present in the absence of autoimmune disease, such as in infections and hematological disorders, and even in healthy individuals. **Objective:** To describe the prevalence of ANA, patterns, titers and presence of specific antibodies in pediatric patients. **Materials and Methods:** A retrospective descriptive cross-sectional study was conducted on individuals aged 0 to 18 years who attended the Central Laboratory of HIAEP "Sor María Ludovica" between January 2022 and December 2023 with an ANA request. For each case, sex, age, ANA results, and specific antibodies were recorded. **Results:** The study included 752 ANA requests, of which 48.8% were positive. Of the total number of patients with a positive result, 68.4% were female, the average age was 9 years, and the most frequent age was 13 years. The most frequently observed titer and pattern were 1/80 (47.3%) and nuclear speckled (67.8%) respectively. The highest percentage of positivity for specific antibodies was found at titres >1/1280 (75%), and it decreased as the ANA titre decreased. **Conclusion:** A high percentage of ANA positivity was found in the studied population, with most samples showing a speckled nuclear pattern, low titres, and negative specific antibodies. The clinical significance of these findings should be further studied.

KEYWORDS:

Autoimmune diseases. Children. Antinuclear antibodies. Indirect immunofluorescence.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades autoinmunes son el resultado de una falla en la regulación del sistema inmune que conduce a la producción de anticuerpos contra estructuras celulares y tejidos propios del organismo, generando daño y disfunción en uno o múltiples órganos y tejidos^{1,2}. Son de presentación variada y polimorfa y pueden afectar a distintos órganos o sistemas de forma local, centrándose en una o varias estructuras, o generalizada, en forma de síndromes que incluyen la presencia de astenia, anorexia, pérdida de peso o fiebre³. Hasta el momento se desconoce su etiología, pero la evidencia sugiere una interacción entre factores genéticos, sexuales, ambientales y de estilo de vida. Suelen ser más frecuentes en mujeres que en hombres, lo que podría estar asociado a una respuesta inmune humoral y celular más fuerte que desarrollan las mujeres. Los principales factores que generan las diferencias entre el sistema inmunológico femenino y masculino son las hormonas sexuales, el número de cromosomas X y la diferente respuesta a factores ambientales, como la dieta y la exposición microbiana³.

Desde el punto de vista clínico, las enfermedades autoinmunes son clasificadas en órgano específicas, como la Tiroiditis de Hashimoto (TH), Diabetes Mellitus tipo 1 (DMT1) y Hepatitis Autoinmune (HAI), o sistémicas, dentro de las cuales se encuentran el Lupus Eritematoso Sistémico (LES), Síndrome de Sjögren (SS), Esclerodermia (Scl), entre otras. Las enfermedades autoinmune sistémicas (EAS) se desarrollan debido al depósito de inmunocomplejos antígeno-anticuerpo, que generan daño en diversas estructuras del organismo. Afectan a todos los grupos etarios y están descritas en todas las razas y áreas geográficas. En Argentina se desconoce la verdadera incidencia y prevalencia de las EAS en la infancia y adolescencia. La literatura proveniente de países desarrollados considera a la artritis idiopática juvenil (AIJ) como la enfermedad más frecuente, cuya prevalencia oscila entre 1-4 cada 1000 niños y la incidencia es de 10-22 casos nuevos al año cada 100.000 niños. En orden de frecuencia le sigue el LES con una prevalencia que varía entre 10-30/100.000 niños y su incidencia es de 0,3 por cada 100.000 niños al año^{4,5}.

La presencia de anticuerpos antinucleares (AAN) es el denominador común de muchas EAS y su detección juega un rol fundamental en el diagnóstico de estas patologías. Los AAN, son un grupo de anticuerpos circulantes contra antígenos del núcleo, citoplasma y aparato mitótico de las células. A la familia de los AAN pertenecen una amplia y heterogénea gama de autoanticuerpos con diferentes especificidades antigénicas (anti ADN, RNP, Sm, Ro/SS-A, La/SS-B, PM/Scl, topoisomerasa o Scl70, etc). Su frecuencia es especialmente alta en LES, SS, Scl, AIJ, Enfermedad Mixta del Tejido Conectivo (EMTC), entre otras⁶. Su presencia puede ser indicativa de una enfermedad reumática sistémica, sin embargo, estos anticuerpos también pueden estar presentes en ausencia de enfermedad autoinmune, como resultado de infecciones (principalmente virales), desórdenes hematológicos, terapia farmacológica e incluso en individuos sanos⁷. Se ha encontrado una frecuencia de AAN en niños y adolescentes sanos de 12,6%⁸.

El ensayo de inmunofluorescencia indirecta (IFI) utilizando improntas de líneas celulares HEP-2 es considerado el método *gold standard* para la detección en suero de AAN, y además, es la técnica de rutina más comúnmente utilizada⁹. A través de esta técnica se detecta un amplio rango de anticuerpos que reaccionan contra antígenos presentes en distintas estructuras celulares, permitiendo la identificación de diversos patrones de fluorescencia, así como la titulación de los anticuerpos¹. Se trata de una técnica económica, simple, con elevada sensibilidad y especificidad, pero que requiere de personal capacitado⁹.

El grado de positividad indicado por el título de la IFI tiene importancia diagnóstica, ya que el valor predictivo positivo aumenta a títulos elevados¹⁰. Por otro lado, los distintos patrones observados se asocian a distintos anticuerpos específicos y éstos, a su vez, se relacionan con determinadas entidades clínicas. Por ejemplo, la cromatina nuclear (constituida principalmente por ADN e histonas) es uno de los principales blancos en la respuesta inmune, y

anticuerpos anti-ADN y anti-histona se encuentran presentes en enfermedades autoinmunes como LES, y generan un patrón nuclear homogéneo en la IFI-HEp-2. Otras proteínas nucleares inmunogénicas son Smith, SS-A/Ro, SS-B/La, las cuales se relacionan con patrones nucleares moteados y se asocian a SS o LES¹. De esta manera, los patrones obtenidos por IFI constituyen una guía, y junto con la identificación de anticuerpos específicos, como anticuerpos anti-ADN, anti-histona y anticuerpos contra antígenos nucleares extraíbles (ENA), pueden ayudar a discriminar entre los diferentes tipos de enfermedades autoinmunes.

En el año 2008 se llevó a cabo en Buenos Aires el Primer Consenso Argentino para la Estandarización de la Determinación de AAN por IFI-HEp-2, en donde se discutieron los aspectos metodológicos más importantes y se decidió llamar a la determinación "anticuerpos anti-núcleo-citoplasmáticos". Se consensuó la sigla representativa de la determinación, el nombre en español de los diferentes patrones y el uso de controles de calidad internos y externos, con el objetivo de que la unificación de los criterios permita la optimización de los resultados y su correcta interpretación. En este consenso se clasificaron a los patrones de fluorescencia de AAN en cuatro grandes grupos: nucleares, nucleolares, citoplasmáticos y del aparato mitótico; cada uno con su subclasificación correspondiente¹⁰.

Luego, en 2014 se realizó en Brasil el primer Consenso Internacional sobre Patrones de Anticuerpos Antinucleares (ICAP), cuyo objetivo fue promover la armonización de la nomenclatura y la interpretación de las pruebas de autoanticuerpos para maximizar su uso en la atención al paciente. En el mismo, presentaron un árbol clasificatorio para AAN con un código alfanumérico AC (anti-celular) asignado a cada patrón, que permite un acceso fácil y una referencia a los patrones de consenso que se encuentran disponibles en el sitio web del ICAP¹¹. Esta clasificación establece patrones de fluorescencia negativo (AC-0), nucleares (AC-1 a AC-14 y AC-29), citoplasmáticos (AC-15 a AC-23) y mitóticos (AC-24 a AC-28), y se proporciona para cada patrón la descripción de sus características principales, antígenos asociados, relevancia clínica y el nivel de detección según la expertis del observador¹².

Actualmente, en la población pediátrica hay pocos estudios sobre los resultados que arrojan el uso de pruebas bioquímicas para la detección de AAN y anticuerpos específicos. Es por ello que el objetivo de este trabajo fue describir la prevalencia de AAN, los patrones, títulos y presencia de anticuerpos específicos en pacientes pediátricos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un estudio descriptivo, retrospectivo de corte transversal sobre pacientes con solicitud de AAN de 0 a 18 años, que concurrieron al Laboratorio Central del H.I.A.E.P. "Sor María Ludovica" de La Plata (HIAEP SML), entre enero de 2022 y diciembre de 2023.

La información se recolectó del sistema informático del laboratorio (NOBILIS,

Wiener) registrando en forma anonimizada sexo, edad, resultados de AAN y anticuerpos específicos. Solo se consideró la primera consulta de cada paciente registrada en el periodo de tiempo antes consignado.

Las muestras de suero fueron separadas y conservadas a -20°C desde su recolección hasta su procesamiento. Las mismas fueron estudiadas siguiendo el esquema de trabajo de la Figura 1.

Figura 1. Esquema de trabajo

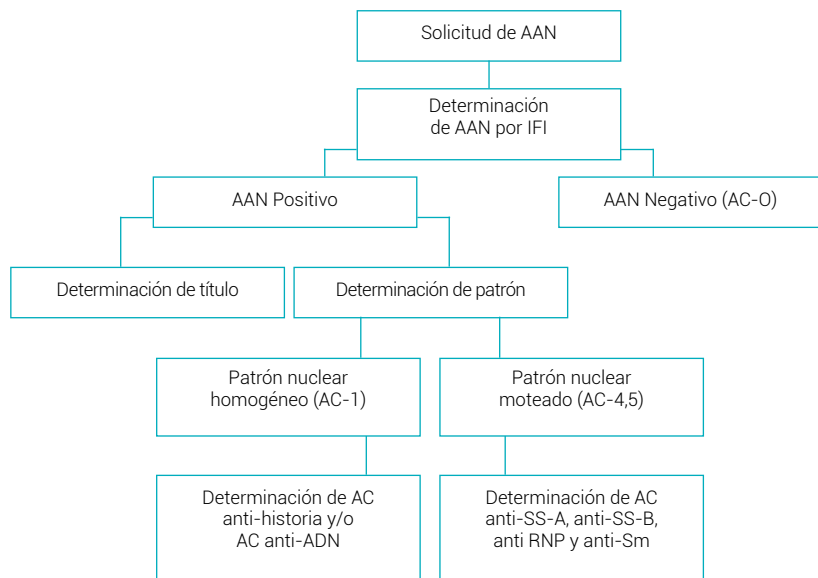


Figura 1: Las muestras fueron estudiadas en primera instancia para AAN por IFI. En los casos con resultados positivos se realizó el estudio subsiguiente de anticuerpos específicos según el patrón hallado, como se ejemplifica en la figura para los patrones AC-1 y AC-4,5. En el caso de resultados de AAN por IFI negativos no se realizaron otras pruebas.

AAN: anticuerpos anti-nucleares, AC: anti-celular, ADN: ácido desoxirribonucleico, IFI: inmunofluorescencia indirecta, SS-A: antígeno A relacionado al Síndrome de Sjögren, SS-B: antígeno B relacionado al Síndrome de Sjögren, Sm: antígeno Smith, RNP: ribonucleoproteína.

La determinación de los AAN se realizó a través de la técnica de inmunofluorescencia indirecta, empleando improntas de células Kallestad HEp-2 (BIO-RAD) y conjugado anti-IgG acoplado a FITC (Biocientífica). El título de corte utilizado, por debajo del cual el resultado se consideró negativo, fue 1/80. Se emplearon controles positivos y negativos en cada corrida. Los AAN, fueron evidenciados por la presencia de un patrón de fluorescencia en el núcleo, citoplasma y/o aparato mitótico de las células HEp-2, a través del microscopio de fluorescencia marca Leica modelo DM750 con lámpara de LED. Los patrones de fluorescencia buscados fueron los 29 descritos hasta el momento por ICAP. Para la determinación de autoanticuerpos específicos se utilizaron según disponibilidad los ensayos ENAscreen (Orgentec), QUANTA Lite RNP ELISA,

QUANTA Lite Sm ELISA, QUANTA Lite SS-A ELISA, QUANTA Lite SS-B ELISA, QUANTA Lite Histona ELISA, QUANTA Lite Actin ELISA (INOVA Diagnostics) y el inmunoensayo en línea (LIA) recomLine ANA/ENA IgG (MIKROGEN DIAGNOSTIK), siguiendo las especificaciones de los respectivos fabricantes.

La determinación de anticuerpos anti-ADN se llevó a cabo por IFI utilizando un título de corte de 1/20 en improntas de *Crithidia Luciliae* (BIO-RAD) y conjugado anti-IgG acoplado a FITC (Biocientífica).

Análisis de datos: Los datos fueron volcados en planillas Excel. Las variables cuantitativas se informaron como medidas de tendencia central y las cualitativas como frecuencias y porcentajes.

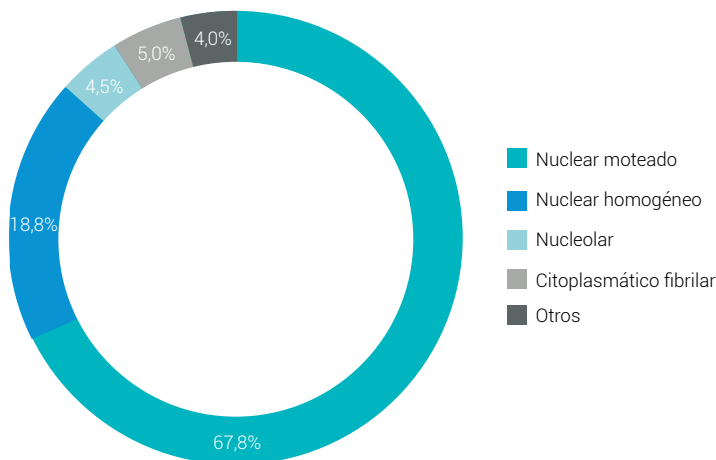
Aspectos Éticos: El proyecto fue presentado para su evaluación al Comité Institucional de Revisión de Protocolos de Investigación (CIRPI).

RESULTADOS

El estudio incluyó 752 solicitudes de AAN, de las cuales 367 (48,8%) resultaron positivas, con títulos $\geq 1/80$. La edad promedio de los pacientes con prueba de AAN positiva fue de 9 años (moda 13 años) y el 68,4% (251) fueron niñas.

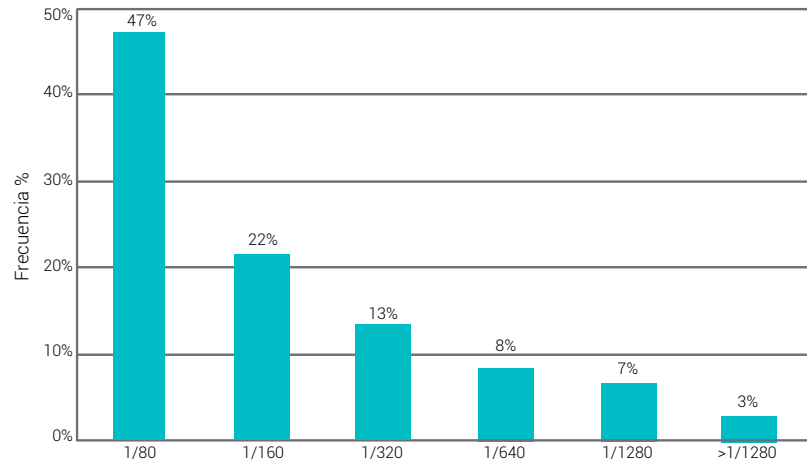
Las muestras con AAN positivos presentaron una amplia variedad de patrones: nuclear homogéneo (AC-1), centromérico (AC-3), nuclear moteado (AC-4,5), gránulos nucleares escasos (AC-7), nucleolar (AC-8,9,10), citoplasmático fibrilar (AC-15,16,17), citoplasmático granular (AC-19,20), citoplasmático reticular (AC-21), centrosoma (AC-24), NuMA-símil (AC-26) y puente intercelular (AC-27). En el Gráfico 1 se muestra la distribución de los patrones hallados. Se informaron un total de 400 patrones en las 367 muestras positivas, considerando que en algunas muestras se pudo evidenciar la presencia de más de un patrón en simultáneo. El patrón predominante fue el nuclear moteado ($n=271$; 67,8%).

Gráfico 1. Frecuencia de patrones encontrados en muestra con AAN ($n=400$)



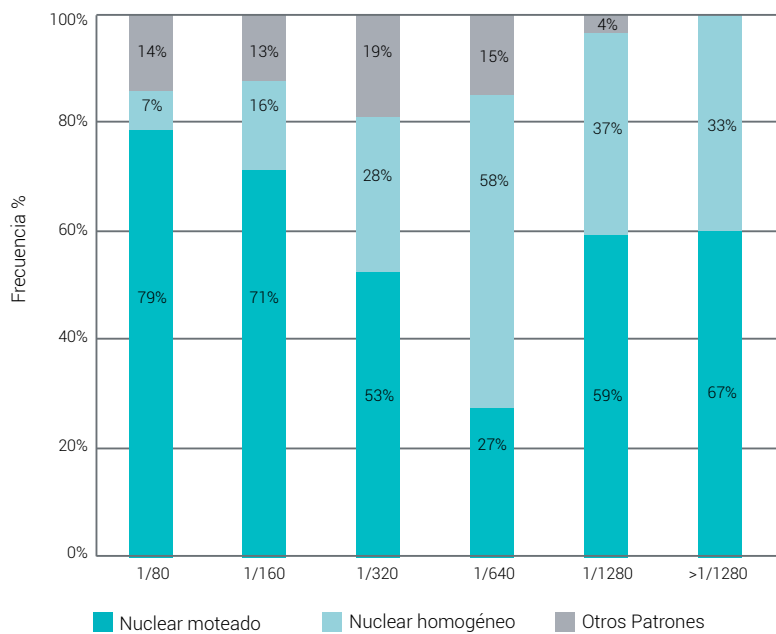
En relación al título de los AAN, en casi la mitad de los casos se obtuvo un valor de 1/80, correspondiente al punto de corte. Gráfico 2.

Gráfico 2. Distribución de títulos hallados



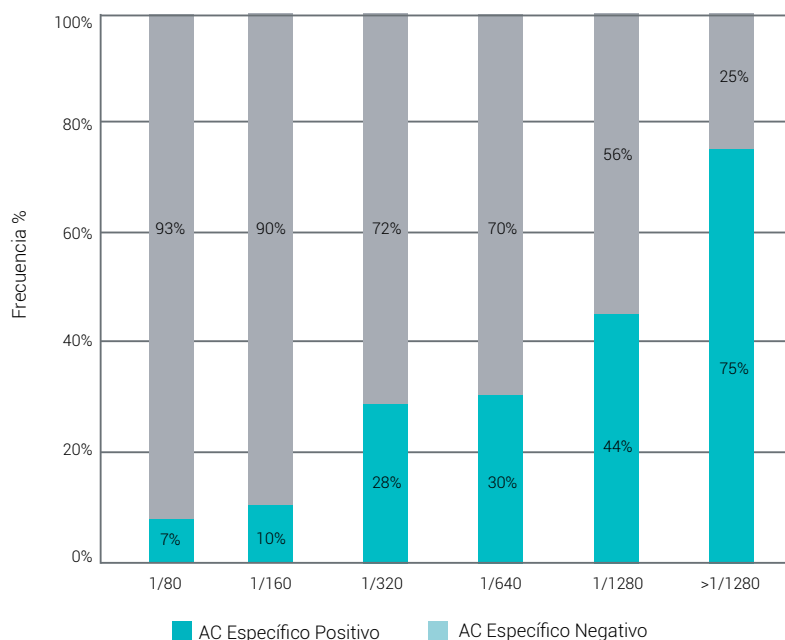
En el Gráfico 3 se muestra la frecuencia de los patrones nuclear moteado y homogéneo según el título. El patrón nuclear moteado tuvo una mayor frecuencia a títulos bajos (1/80 y 1/160), en tanto que el nuclear homogéneo, lo hizo a títulos medios y altos ($\geq 1/320$).

Gráfico 3. Frecuencia de los patrones nuclear moteado y homogéneo según el título



En el 75% de los patrones con títulos >1/1280 se encontró algún anticuerpo específico asociado. Gráfico 4.

Gráfico 4. Frecuencia de anticuerpos específicos según el título



De las 271 muestras con patrón AC-4,5, el 10,3% (n=28) tuvo al menos un ENA positivo. Por otro lado, de las 75 muestras con patrón AC-1, 38,0% (n=27) presentaron anticuerpos anti-ADN y/o anticuerpos anti-histona.

DISCUSIÓN

En el presente estudio se encontró un tasa de positividad del 48,8% de las solicitudes de AAN. Este hallazgo fue mayor que lo reportado en el trabajo de Baba et al. que se realizó sobre una población pediátrica con solicitud de AAN, donde tan solo el 28,1% de las determinaciones resultaron positivas¹³. Dicha discordancia podría deberse a que el HIAEP SML cuenta con servicios especializados que realizan una oportuna solicitud de la determinación, es decir cuando los pacientes presentan signos y síntomas compatibles con enfermedades autoinmunes. Sin embargo, también es importante tener en cuenta que gran parte de los resultados positivos encontrados presentaron un patrón nuclear moteado en bajo título, hallazgo que se observa con frecuencia en individuos sin enfermedades autoinmunes, tal como se describe en distintos estudios^{8, 14-18}.

La literatura informa que la distribución de las enfermedades autoinmunes respecto al sexo cumple una relación mujer:hombre de 5:1^{19,20}. En nuestro estudio se encontró que el 68% de las determinaciones de AAN positivas correspondió a la población femenina, lo que resultó en una relación 3:1. Es importante resaltar que la edad más frecuente entre los pacientes con re-

sultado positivo fue de 13 años, lo cual puede estar asociado a los cambios hormonales que presentan los adolescentes en la etapa de la pubertad. Las hormonas sexuales influyen directamente en la respuesta inmune al interactuar con los receptores hormonales presentes en las células inmunes, pudiendo desencadenar la activación de diversos mecanismos que conducen al desarrollo de una patología de origen autoinmune².

El patrón de fluorescencia más frecuentemente detectado fue el AC-4,5, seguido, en menor medida, por el AC-1, mientras que los patrones de fluorescencia restantes fueron menos prevalentes. Esta relación se encuentra conservada tanto en el trabajo de Hilário *et al.*⁸, como también en el de Aksu *et al.*⁹. Asimismo, según lo reportado por la autora Vázquez Castillo, en países de la región se encontró una prevalencia de patrones muy similares, tal es el caso de Perú, en donde el patrón más común fue el moteado fino, y en Colombia, donde los patrones más frecuentes fueron el homogéneo y el moteado¹.

Analizando los resultados de las solicitudes de AAN se observó que el 69% de las muestras positivas exhibieron títulos bajos (1/80 o 1/160), mientras que sólo un 22% correspondió a títulos medios (1/320 o 1/640) y menos de un 10%, a títulos altos (título \geq 1/1280). Debe destacarse que el grado de positividad indicado por el título tiene importancia diagnóstica, ya que el valor predictivo positivo aumenta a títulos elevados¹⁴. Teniendo en cuenta esto, es de esperar que la confirmación diagnóstica de una enfermedad autoinmune se observe, mayoritariamente, en los pacientes con títulos medios a altos.

Al momento de evaluar los anticuerpos específicos correspondientes al patrón hallado, se encontró que a títulos altos el porcentaje de muestras con anticuerpos específicos positivos fue mayor; es decir, que a títulos elevados, aumentó la sensibilidad de detección de los anticuerpos específicos, hecho reconocido por la CLSI¹⁴.

Este trabajo aporta información valiosa acerca de la prevalencia de AAN, de los patrones y títulos hallados por IFI-HEp2 y de la presencia de anticuerpos contra antígenos específicos asociados, problemática escasamente estudiada en la población pediátrica. Sin embargo, una limitación es no haber incluido en el análisis datos clínicos de los pacientes.

Es sabido que, un resultado de AAN positivo, con título alto y presencia de anticuerpos específicos, acompañado de signos, síntomas clínicos y pruebas complementarias, tienen gran utilidad cuando son interpretados por un médico especializado para diagnosticar una enfermedad autoinmune sistémica. Por lo contrario, para interpretar los resultados positivos en bajo título, con patrón nuclear moteado y en ausencia de anticuerpos específicos, muy prevalentes en este estudio, es importante tener en cuenta que se trata de un hallazgo frecuente en individuos sin enfermedad autoinmune y que en un contexto de baja probabilidad de enfermedad previo a la prueba, se pueden esperar resultados falsos positivos, es decir individuos con prueba de AAN positiva sin enfermedad autoinmune. Sería de gran interés poder evaluar la

relación entre los resultados de AAN obtenidos en el laboratorio y los datos clínicos de los pacientes en futuros estudios.

CONCLUSIÓN

En la población estudiada se encontró un alto porcentaje de positividad de AAN, presentando, la mayoría de las muestras, un patrón nuclear moteado, títulos bajos y anticuerpos específicos negativos.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Área de Capacitación y Formación de Recursos Humanos del IDIP, en especial a la Mg. Bioq. Ana Varea, por el asesoramiento y acompañamiento en la escritura de este manuscrito.

BIBLIOGRAFÍA:

1. Vázquez Castillo TV, Solís Martínez RA. Frecuencia de patrones de anticuerpos antinucleares en pacientes con sospecha de enfermedades sistémicas reumáticas autoinmunes. *Horiz Sanitario*. 2020;19(3):385–92.
2. Ortona E, Pierdominici M, Maselli A, Veroni C, Aloisi F, Shoenfeld Y. Sex-based differences in autoimmune diseases. *Ann Ist Super Sanità*. 2016;52(2):205–12.
3. Vilardell Tarrés M, A. Selva O'Callaghan. Reumatología y enfermedades sistémicas. Parte II: Enfermedades sistémicas. En: Rozman C, Cardellach F, editores. *Medicina Interna*. 19a ed. Barcelona: Elsevier; 2020. p. 1041–88.
4. Gaudio J, Botta C, Graña D, Silveira G, Goñi MI. Enfermedades autoinmunes sistémicas y tuberculosis: una mala asociación. *Rev Urug Med Int* 2017; 2(1): 32–38.
5. Espada G. Enfermedades reumáticas en la infancia. Programa Nacional de Actualización Pediátrica 2011 (PRONAP). Sociedad Argentina de Pediatría. Módulo 3. Capítulo 1.
6. García Munitis P, Ruiz Díaz M, Etcheverry M, Schiel A. Revisión: ¿Qué hacer con un test positivo para anticuerpos antinucleares en Pediatría? *Rev Argent Reumatol*. 2018; 29(4):40–43.
7. Perilloux BC, Shetty AK, Leiva LE, Gedalia A. Antinuclear Antibody (ANA) and ANA Profile Tests in Children with Autoimmune Disorders: A Retrospective Study. *Clinical Rheumatology*. 2000; 19(3):200–203.
8. Hilário MOE, Len CA, Roja SC, Terrerri MT, Almeida G, Andrade LEC. Frecuencia de anticuerpos antinucleares en niños y adolescentes sanos. *Clin Pediatr (Phila)* 2004; 43(7):637–642.
9. Aksu G, Gulez , Azarsiz E, Karaca N, Kutukçuler N. Determination of cut-off titers and agreement between immunofluorescence and immunoblotting methods for detecting antinuclear antibodies in children. *J Clin Lab Anal*. 2010; 24(4):230–236.
10. Carballo OG, Ingénito FB, Ginaca AA, Carabajal P, Costa MA, Balbaryski J. Primer Consenso Argentino para la Estandarización de la Determinación de Anticuerpos Anti-Nucleares por Inmunofluorescencia Indirecta-HEp-2. *Acta bioquím. clíni. latinoam*. 2012; 46(1):3–13.
11. Chan EKL, Damoiseaux J, Carballo OG, Conrad K, de Melo Cruvinel W, Francescantonio PLC, et al. Informe del primer consenso internacional sobre nomenclatura estandarizada de patrones de células de anticuerpos antinucleares HEp-2 2014-2015. *Frente Immunol*. 2015; 6:412.
12. Chan EKL, von Mühlen CA, Fritzler MJ, Damoiseaux J, Infantino M, Klotz W, et al. El Consenso Internacional sobre patrones ANA (ICAP) en 2021: el 6º Taller y perspectivas actuales. *J Appl Lab Med*. 2022; 7(1):322–330.
13. Baba Ö, Kısaoğlu H, Kalyoncu M. Significance of the immunofluorescence staining patterns and titres of the antinuclear antibody test in pediatric rheumatology setting. *Turk J Med Sci*. 2023; 53(1):193–198.
14. Clinical and Laboratory Standards Institute. CLSI I/LA02-A2. Quality assurance of laboratory tests for autoantibodies to nuclear antigens: (1) indirect fluorescence assay for microscopy and (2) microtiter enzyme immunoassay methods. Wayne, PA, USA: CLSI; 2006.
15. Sperotto F, Cuffaro G, Brachi S, Seguso M, Zulian F. Prevalence of antinuclear antibodies in schoolchildren during puberty and possible relationship with musculoskeletal pain: a longitudinal study. *J Rheumatol* 2014; 41:1405–1408.
16. Somers EC, Monrad SU, Warren JS, Solano M, Schnaas L, HernandezAvila M, et al. Antinuclear antibody prevalence in a general pediatric cohort from Mexico City: discordance between immunofluorescence and multiplex assays. *Clin Epidemiol* 2017; 9:1–8.
17. Wananukul S, Voramethkul W, Kaewopas Y, Hanvivatvong O. Prevalence of positive antinuclear antibodies in healthy children. *Asian Pac J Allergy Immunol* 2005;23:153–157.
18. Agustinelli RA, Rodrigues SH, Mariz HA, Prado MS, Andrade LEC. Distinctive features of positive anti-cell antibody tests (indirect immunofluorescence on HEp-2 cells) in patients with nonautoimmune diseases. *Lupus* 2019; 28:629–634.
19. Fairweather D, Frisancho-Kiss S, Rose NR. Sex differences in autoimmune disease from a pathological perspective. *Am J Pathol*. 2008; 173(3):600–609.
20. Carpinelli MM, Giménez V, Ferreira L, Rovira C, Picaguá E, Granados E. Frecuencia de los patrones de anticuerpos antinucleares en pacientes con sospecha clínica de LES. *Mem Inst Investig Cienc Salud*. 2010; 8(2):27–33.