

Comparação das Metodologias de Elisa (Enzimaimunoensaio) e HA (Hemaglutinação) frente aos Anticorpos Anti-ENA's (Antígenos Nucleares Extraíveis)

Aurilene P. S. Maelaro¹, Karine R. M. Jimenez¹, Mitiko Sugiyama², Odair Casado Virtos Júnior²

1 - Laboratórios Leader – Diagnósticos e Apoio - SP

2 - Farmacêuticos-bioquímicos

Resumo

Os auto-anticorpos anti-ENA's são utilizados para auxiliar no diagnóstico de Lupus Eritematoso Sistêmico (LES) e da Doença Mista do Tecido Conjuntivo (DMTC), bem como para excluir outras doenças reumáticas. Os ENA's são constituídos de: Sm, RNP, SS-A (Ro), SS-B (La), Jo-1 e Scl-70. O objetivo do trabalho foi comparar as metodologias de Elisa e HA nas determinações de anti-ENA's. Foram testados soros de 61 pacientes num período de dois meses, de agosto a setembro de 2007, no Laboratório Leader, SP. Foram utilizados os kits da marca Hemagen para as duas metodologias para cada fração de ENA, além dos kits de Screening para ambas as metodologias. Os resultados apresentaram correlação de 100% entre as duas metodologias, em todas as frações de ENA's testadas.

Palavras-Chave: Auto-imunidade, ENA's, hemaglutinação e Elisa

Summary

Comparison of methods of evaluation of anti ENA's antibodies: hemmaglutination and Elisa

The anti ENA antibodies are useful to diagnose SLE and other rheumatic diseases. The ENA's are: Sm, RNP, SS-A (Ro), SS-B (La), Jo-1 and Scl-70. The objective was to compare two methods of evaluation of anti ENA's antibodies: hemmaglutination and Elisa. 61 samples were tested during 2 months using kits of both methods. The kits are manufactured by Hemagen and these tests were evaluated at Leader Laboratories in São Paulo-SP. The tests results showed a 100% correlation between both methods in every ENA fraction tested.

Keywords: Autoimmunity, ENA's, hemmaglutination, ELISA

Introdução

Enzimaimunoensaio (Elisa)

Princípio do Teste: Esta técnica é utilizada para detecção de anticorpos presentes no soro. Os antígenos purificados são ligados à superfície interna de cada microcavidade das microplacas. Durante a incubação inicial, os anticorpos contra os ENA's (Antígenos Nucleares Extraíveis), presentes no soro do paciente, ligam-se especificamente ao antígeno imobilizado e assim permanecem após a primeira lavagem.

Um segundo anticorpo, conjugado à enzima peroxidase, que reco-

nhece as cadeias leves e pesadas da IgG humana, liga-se aos anticorpos do paciente presentes após a primeira incubação. Nas cavidades em que o conjugado permanece ligado, a enzima cataliza uma reação colorimétrica no substrato TMB. Após o bloqueio da reação enzimática, a coloração amarela é lida fotometricamente. Esta metodologia apresenta alta sensibilidade e especificidade.

Hemaglutinação (HA)

Princípio do Teste: A utilização de eritrócitos humanos associados aos métodos atuais de preparação antigênica e liofilização possibilita

o desenvolvimento de numerosos ensaios de terceira geração para a detecção de auto-anticorpos. Através da reação celular com o anticorpo específico no soro, os eritrócitos aglutinam.

ENA's

Anticorpos (Acs) antinucleares são aqueles dirigidos contra constituintes moleculares normais do núcleo celular. Seu reconhecimento teve início com Hargraves que, em 1948 observou leucócitos polimorfonucleares com capacidade de ingerir grandes corpúsculos de inclusão amorfos basofílicos.

O anti-ENA não é realmente um anticorpo específico, porém um grupo de anticorpos dirigidos contra certos antígenos que consistem em RNA e proteínas. O antígeno ENA é extraído do timo utilizando-se solução salina tamponada com fosfatase, por conseguinte designado por Antígeno Extraível. A determinação de anticorpos anti-ENA leva aos seguintes anticorpos: anti-Sm, anti-RNP, anti-SS-A (Ro), anti-SS-B (La), anti-Scl-70 e o anticorpo anti-Jo-1.

Registra-se a presença de anticorpos antiglicoproteína nuclear de Smith (Sm) em 30% (faixa de 20% a 40%) dos pacientes com LES (Lupus Eritematoso Sistêmico) e em 8% dos pacientes com DMTC (Doença Mista do Tecido Conjuntivo), mas não em pacientes com a maioria das outras doenças reumáticas do colágeno. Por conseguinte, o anticorpo anti-Sm é muito específico para o LES.

Registra-se a ocorrência de anticorpos anti-RNP (anti-ribonucleoproteína) em quase 100% dos pacientes com DMTC e em cerca de 25% dos pacientes com LES, Lúpus Discóide e Esclerose Sistêmica Progressiva (Esclerodermia). O anticorpo anti-RNP (como o anti-Sm) encontra-se associado a um padrão pontilhado de FAN. Quando presente em altos títulos, o anticorpo anti-RNP sugere a DMTC.

Os anticorpos anti-SS-A (Ro) e anti-SS-B (La) reagem contra Antígenos Nucleares Extraíveis de Linfócitos B Humano (linhagem celular Wi12), que se desenvolveram em cultura de tecidos. O anti-SS-A é encontrado em cerca de 70% dos pacientes com Síndrome de Sjögren e Artrite Reumatóide e em 25% dos pacientes com LES. Observa-se a presença de SS-B em cerca de 50% dos pacientes com Síndrome de Sjögren na ausência de Artrite

Reumatóide, e em menos de 5% dos pacientes com Síndrome de Sjögren e Artrite Reumatóide. Mas nunca em pacientes com LES ou Artrite Reumatóide (AR).

O auto-anticorpo anti-Scl-70 é encontrado em 45% dos pacientes com Esclerodermia.

O auto-anticorpo anti-Jo-1 é bastante específico das miosites. É observado em 25% das Síndromes de Miosites (polimiosite, dermatomiosite) e em 35-45% dos casos de polimiosite.

Objetivo

Foram comparadas duas metodologias de determinação de parâmetros imunológicos: hemaglutinação e enzimaensaio. O presente trabalho visa a comparar suas sensibilidades e especificidades nas dosagens de ENA's.

A hemaglutinação passiva baseia-se na utilização de hemácias como suporte de antígeno. A leitura se faz visualmente. O resultado é positivo quando se forma uma rede homogênea de hemácias cobrindo todo o poço. O resultado negativo mostra-se com a formação de um botão compacto definido no centro do poço da microplaca.

O enzimaensaio ou Elisa (Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay) baseia-se na imobilização de um dos reagentes em fase sólida, enquanto outro reagente pode ser ligado a uma enzima com preservação tanto da atividade enzimática como imunológica. Como o substrato forma um produto colorido, a alteração de cor é monitorada visualmente ou através de leitora (espectrofotômetro), que determina a relação entre a intensidade de cor e a quantidade do que está sendo analisado na amostra.

Material e Métodos

Amostragem

Nos meses de agosto e setembro de 2007 foram pesquisados os anticorpos anti-ENA's em 61 pacientes no Laboratório Leader, SP.

Procedimentos

Foram utilizados os seguintes kits da marca Hemagen:

- Hemaglutinação
ENA Screening 4 HA - 64 testes
Jo-1 HA - 64 testes
RNP/Sm HA - 64 testes
SS-A/SS-B HA - 96 testes
Scl-70 HA - 64 testes
- Enzimaensaio
ENA Screening 6 Elisa - 96 testes
SS-A Elisa - 96 testes
SS-B Elisa - 96 testes
Jo-1 Elisa - 96 testes
Scl-70 Elisa - 96 testes
Sm Elisa - 96 testes
Sm/RNP Elisa - 96 testes

Os testes de Elisa foram realizados utilizando-se a lavadora de microplacas da marca Awareness (duplo pente) e leitora de Elisa da marca Biotek.

As amostras foram avaliadas, com padrões previamente conhecidos, dos tipos: misto nuclear e nucleolar pontilhado com placa metafásica positiva (SCL-70), padrões pontilhados fino (SS-A e SS-B) e pontilhado grosso (Sm e RNP) com placa metafásica negativa e padrões citoplasmáticos pontilhado fino, apresentado pontos definidos em grande número e densidade, células em divisão e nucléolo não-fluorescente (JO1), visualizados na metodologia de imunofluorescência indireta (IFI) e amostras não-reagentes, foram realizadas conforme o informe técnico presente nos kits.

	FAN	HAI Screen4	Screen 6 Elisa	DO Screen 6	HAI RNP	RNP Elisa	DO Rnp	HAI SM	SM Elisa
1	Negativo	Negativo	Negativo	0,158	Negativo	Negativo	0,082	Negativo	Negativo
2	Negativo	Negativo	Negativo	0,205	Negativo	Negativo	0,145	Negativo	Negativo
3	1/160 NPG	Positivo 1/100	Positivo	1,465	Positivo 1/100	Positivo	0,967	Negativo	Negativo
4	Negativo	Negativo	Negativo	0,343	Negativo	Negativo	0,112	Negativo	Negativo
5	Negativo	Negativo	Negativo	0,268	Negativo	Negativo	0,052	Negativo	Negativo
6	Negativo	Negativo	Negativo	0,298	Negativo	Negativo	0,103	Negativo	Negativo
7	1/640 NPG	Positivo 1/200	Positivo	1,682	Positivo 1/400	Positivo	1,644	Positivo 1/200	Positivo
8	Negativo	Negativo	Negativo	0,419	Negativo	Negativo	0,106	Negativo	Negativo
9	Negativo	Negativo	Negativo	0,289	Negativo	Negativo	0,174	Negativo	Negativo
10	Negativo	Negativo	Negativo	0,208	Negativo	Negativo	0,093	Negativo	Negativo
11	Desconhecido	Negativo	Negativo	0,295	Negativo	Negativo	0,112	Negativo	Negativo
12	Negativo	Negativo	Negativo	0,215	Negativo	Negativo	0,099	Negativo	Negativo
13	1/160 PFD	Negativo	Negativo	0,381	Negativo	Negativo	0,098	Negativo	Negativo
14	Desconhecido	Negativo	Negativo	0,198	Negativo	Negativo	0,245	Negativo	Negativo
15	1/2560 PG	Positivo 1/200	Positivo	1,68	Positivo 1/200	Positivo	1,633	Negativo	Negativo
16	Desconhecido	Negativo	Negativo	0,394	Negativo	Negativo	0,263	Negativo	Negativo
17	Desconhecido	Negativo	Negativo	0,213	Negativo	Negativo	0,051	Negativo	Negativo
18	Desconhecido	Negativo	Negativo	0,185	Negativo	Negativo	0,115	Negativo	Negativo
19	Desconhecido	Positivo 1/200	Positivo	1,657	Positivo 1/100	Positivo	1,439	Positivo 1/200	Positivo
20	Desconhecido	Negativo	Negativo	0,185	Negativo	Negativo	0,063	Negativo	Negativo
21	Desconhecido	Negativo	Negativo	0,142	Negativo	Negativo	0,106	Negativo	Negativo
22	1/160 PG	Negativo	Negativo	0,187	Negativo	Negativo	0,097	Negativo	Negativo
23	1/320 PF	Negativo	Indeterminado	0,591	Negativo	Negativo	0,125	Negativo	Negativo
24	1/160 PF	Negativo	Negativo	0,152	Negativo	Negativo	0,163	Negativo	Negativo
25	Desconhecido	Positivo 1/100	Positivo	1,53	Negativo	Positivo	0,995	Positivo 1/400	Positivo
26	Desconhecido	Negativo	Negativo	0,102	Negativo	Negativo	0,422	Negativo	Negativo
27	Negativo	Negativo	Negativo	0,162	Negativo	Negativo	0,093	Negativo	Negativo
28	Negativo	Negativo	Negativo	0,189	Negativo	Negativo	0,295	Negativo	Negativo
29	Negativo	Negativo	Negativo	0,179	Negativo	Negativo	0,101	Negativo	Negativo
30	Negativo	Negativo	Positivo	1,369	Positivo 1/50	Negativo	0,113	Negativo	Negativo
31	Negativo	Negativo	Negativo	0,27	Negativo	Negativo	0,094	Negativo	Negativo
32	Negativo	Negativo	Positivo	1,473	Negativo	Negativo	0,103	Negativo	Negativo
33	Negativo	Negativo	Negativo	0,383	Negativo	Negativo	0,085	Negativo	Negativo
34	1/320 Misto	Negativo	Negativo	0,323	Negativo	Negativo	0,145	Negativo	Negativo
35	1/320 PF	Positivo 1/100	Positivo	1,59	Negativo	Negativo	0,097	Negativo	Negativo
36	Negativo	Negativo	Negativo	0,214	Negativo	Negativo	0,162	Negativo	Negativo
37	Negativo	Negativo	Negativo	0,182	Negativo	Negativo	0,145	Negativo	Negativo
38	1/320 CEN	Negativo	Negativo	0,063	Negativo	Negativo	0,113	Negativo	Negativo
39	1/80 PF	Positivo 1/100	Positivo	1,675	Negativo	Negativo	0,142	Negativo	Negativo
40	Negativo	Negativo	Indeterminado	0,996	Negativo	Negativo	0,203	Negativo	Negativo

DO SM	HAI SSA	SSA Elisa	DO SSA	HAI SSB	SSB Elisa	DO SSB	Scl Elisa	DO Scl	JO Elisa	DO Jo
0,125	Negativo	Negativo	0,113	Negativo	Negativo	0,271	Negativo	0,107	Negativo	0,113
0,23	Negativo	Negativo	0,109	Negativo	Negativo	0,178	Negativo	0,183	Negativo	0,201
0,163	Negativo	Negativo	0,263	Negativo	Negativo	0,171	Negativo	0,228	Negativo	0,263
0,119	Negativo	Negativo	0,221	Negativo	Negativo	0,216	Negativo	0,202	Negativo	0,221
0,217	Negativo	Negativo	0,384	Negativo	Negativo	0,235	Negativo	0,301	Negativo	0,193
0,198	Negativo	Negativo	0,198	Negativo	Negativo	0,406	Negativo	0,231	Negativo	0,201
1,632	Negativo	Negativo	0,2	Negativo	Negativo	0,117	Negativo	0,221	Negativo	0,194
0,107	Negativo	Negativo	0,228	Negativo	Negativo	0,098	Negativo	0,526	Negativo	0,541
0,183	Negativo	Negativo	0,194	Negativo	Negativo	0,191	Negativo	0,206	Negativo	0,249
0,251	Negativo	Negativo	0,096	Negativo	Negativo	0,171	Negativo	0,199	Negativo	0,113
0,116	Negativo	Negativo	0,254	Negativo	Negativo	0,163	Negativo	0,215	Negativo	0,205
0,103	Negativo	Negativo	0,264	Negativo	Negativo	0,251	Negativo	0,283	Negativo	0,166
0,197	Negativo	Negativo	0,254	Negativo	Negativo	0,206	Negativo	0,406	Negativo	0,205
0,214	Negativo	Negativo	0,316	Negativo	Negativo	0,231	Negativo	0,119	Negativo	0,101
0,192	Negativo	Negativo	0,194	Negativo	Negativo	0,299	Negativo	0,098	Negativo	0,194
0,109	Negativo	Negativo	0,204	Negativo	Negativo	0,301	Negativo	0,301	Negativo	0,204
0,201	Negativo	Negativo	0,191	Negativo	Negativo	0,204	Negativo	0,204	Negativo	0,191
0,141	Negativo	Negativo	0,299	Negativo	Negativo	0,171	Negativo	0,171	Negativo	0,171
1,663	Negativo	Negativo	0,265	Negativo	Negativo	0,216	Negativo	0,216	Negativo	0,163
0,201	Negativo	Negativo	0,214	Negativo	Negativo	0,199	Negativo	0,234	Negativo	0,194
0,179	Negativo	Negativo	0,225	Negativo	Negativo	0,215	Negativo	0,271	Negativo	0,251
0,152	Negativo	Negativo	0,215	Negativo	Negativo	0,298	Negativo	0,171	Negativo	0,193
0,171	Negativo	Negativo	0,185	Negativo	Negativo	0,413	Negativo	0,279	Negativo	0,197
0,158	Negativo	Negativo	0,193	Negativo	Negativo	0,322	Negativo	0,204	Negativo	0,244
1,817	Negativo	Negativo	0,24	Negativo	Negativo	0,287	Negativo	0,198	Negativo	0,203
0,209	Negativo	Negativo	0,145	Negativo	Negativo	0,113	Negativo	0,178	Negativo	0,278
0,201	Negativo	Negativo	0,163	Negativo	Negativo	0,205	Negativo	0,212	Negativo	0,263
0,221	Negativo	Negativo	0,271	Negativo	Negativo	0,147	Negativo	0,285	Negativo	0,219
0,206	Negativo	Negativo	0,171	Negativo	Negativo	0,304	Negativo	0,178	Negativo	0,251
0,203	Negativo	Negativo	0,279	Negativo	Negativo	0,231	Negativo	0,317	Negativo	0,216
0,151	Negativo	Negativo	0,212	Negativo	Negativo	0,301	Negativo	0,209	Negativo	0,217
0,152	Negativo	Negativo	0,27	Negativo	Negativo	0,231	Negativo	0,451	Negativo	0,163
0,206	Negativo	Negativo	0,317	Negativo	Negativo	0,317	Negativo	0,231	Negativo	0,229
0,109	Negativo	Negativo	0,154	Negativo	Negativo	0,178	Negativo	0,459	Negativo	0,197
0,103	Negativo	Negativo	0,306	Negativo	Negativo	0,223	Negativo	0,258	Negativo	0,242
0,203	Negativo	Negativo	0,092	Negativo	Negativo	0,171	Negativo	0,199	Negativo	0,297
0,201	Negativo	Negativo	0,121	Negativo	Negativo	0,151	Negativo	0,221	Negativo	0,301
0,091	Negativo	Negativo	0,254	Negativo	Negativo	0,217	Negativo	0,241	Negativo	0,203
0,062	Indeterminado 1/50	Indeterminado	0,425	Negativo	Negativo	0,253	Negativo	0,301	Negativo	0,251
0,163	Negativo	Negativo	0,312	Negativo	Negativo	0,229	Negativo	0,384	Negativo	0,257

	FAN	HAI Screen4	Screen 6 Elisa	DO Screen 6	HAI RNP	RNP Elisa	DO Rnp	HAI SM	SM Elisa
41	Desconhecido	Negativo	Positivo	1,654	Negativo	Positivo	0,992	Negativo	Negativo
42	Desconhecido	Negativo	Negativo	0,203	Negativo	Negativo	0,271	Negativo	Negativo
43	Negativo	Negativo	Negativo	0,201	Negativo	Negativo	0,196	Negativo	Negativo
44	Negativo	Negativo	Negativo	0,071	Negativo	Negativo	0,301	Negativo	Negativo
45	Desconhecido	Negativo	Negativo	0,082	Negativo	Negativo	0,162	Negativo	Negativo
46	Negativo	Negativo	Negativo	0,081	Negativo	Negativo	0,172	Negativo	Negativo
47	Negativo	Negativo	Negativo	0,188	Negativo	Negativo	0,213	Negativo	Negativo
48	Negativo	Negativo	Negativo	0,152	Negativo	Negativo	0,112	Negativo	Negativo
49	Negativo	Negativo	Negativo	0,263	Negativo	Negativo	0,105	Negativo	Negativo
50	Negativo	Negativo	Negativo	0,214	Negativo	Negativo	0,284	Negativo	Negativo
51	Negativo	Negativo	Negativo	0,105	Negativo	Negativo	0,106	Negativo	Negativo
52	Negativo	Negativo	Negativo	0,124	Negativo	Negativo	0,103	Negativo	Negativo
53	Negativo	Negativo	Negativo	0,168	Negativo	Negativo	0,115	Negativo	Negativo
54	Negativo	Negativo	Negativo	0,383	Negativo	Negativo	0,071	Negativo	Negativo
55	Negativo	Negativo	Negativo	0,071	Negativo	Negativo	0,206	Negativo	Negativo
56	Negativo	Negativo	Negativo	0,164	Negativo	Negativo	0,116	Negativo	Negativo
57	Negativo	Negativo	Negativo	0,182	Negativo	Negativo	0,261	Negativo	Negativo
58	Negativo	Negativo	Negativo	0,128	Negativo	Negativo	0,108	Negativo	Negativo
59	Negativo	Negativo	Negativo	0,099	Negativo	Negativo	0,305	Negativo	Negativo
60	Negativo	Negativo	Negativo	0,079	Negativo	Negativo	0,205	Negativo	Negativo
61	Negativo	Negativo	Negativo	0,253	Negativo	Negativo	0,172	Negativo	Negativo
62	Negativo	Negativo	Negativo	0,213	Negativo	Negativo	0,203	Negativo	Negativo
63	Negativo	Negativo	Negativo	0,171	Negativo	Negativo	0,305	Negativo	Negativo
64	Negativo	Negativo	Negativo	0,188	Negativo	Negativo	0,124	Negativo	Negativo
65	Negativo	Negativo	Negativo	0,082	Negativo	Negativo	0,088	Negativo	Negativo

SIGLAS

NPG Nuclear Pontilhado Grosso
 PFD Pontilhado Fino Denso
 PG Pontilhado Grosso
 PF Pontilhado Fino
 CEN Centromérico

CT pos 1.092

CT neg 0.141

Cut-off 0.543

Branco 0.039

Ct pos 0.784

Ct neg 0.054

Low 0.364

Medium 0.583

High 0.930

Os ensaios realizados em paralelo apresentaram correlação de 100% na reatividade, não havendo divergências e não apresentando reações inconclusivas. Os testes não reagentes também foram confirmados nas duas metodologias

analizadas, não apresentando quaisquer divergências (Tabela de Resultados 1).

Conclusão

As metodologias de hemaglu-

tinação e enzimaímoensaio tiveram concordância de 100%. Portanto, as duas metodologias de dosagens de Anticorpos Anti-ENA's possuem a mesma sensibilidade e especificidade.



DO SM	HAI SSA	SSA Elisa	DO SSA	HAI SSB	SSB Elisa	DO SSB	Scl Elisa	DO Scl	JO Elisa	DO Jo
0,229	Positivo	Positivo	1,809	Negativo	Negativo	0,197	Negativo	0,171	Negativo	0,299
0,241	Negativo	Negativo	0,225	Negativo	Negativo	0,242	Negativo	0,231	Negativo	0,211
0,063	Negativo	Negativo	0,342	Negativo	Negativo	0,297	Negativo	0,235	Negativo	0,221
0,209	Negativo	Negativo	0,098	Negativo	Negativo	0,301	Negativo	0,151	Negativo	0,196
0,204	Negativo	Negativo	0,105	Negativo	Negativo	0,203	Negativo	0,217	Negativo	0,231
0,226	Negativo	Negativo	0,254	Negativo	Negativo	0,171	Negativo	0,221	Negativo	0,251
0,217	Negativo	Negativo	0,116	Negativo	Negativo	0,307	Negativo	0,206	Negativo	0,207
0,163	Negativo	Negativo	0,109	Negativo	Negativo	0,246	Negativo	0,207	Negativo	0,325
0,198	Negativo	Negativo	0,192	Negativo	Negativo	0,212	Negativo	0,317	Negativo	0,215
0,197	Negativo	Negativo	0,304	Negativo	Negativo	0,116	Negativo	0,312	Negativo	0,197
0,231	Negativo	Negativo	0,197	Negativo	Negativo	0,204	Negativo	0,197	Negativo	0,241
0,209	Negativo	Negativo	0,116	Negativo	Negativo	0,175	Negativo	0,151	Negativo	0,302
0,301	Negativo	Negativo	0,105	Negativo	Negativo	0,176	Negativo	0,217	Negativo	0,33
0,231	Negativo	Negativo	0,097	Negativo	Negativo	0,206	Negativo	0,184	Negativo	0,371
0,211	Negativo	Negativo	0,213	Negativo	Negativo	0,302	Negativo	0,191	Negativo	0,281
0,217	Negativo	Negativo	0,263	Negativo	Negativo	0,254	Negativo	0,413	Negativo	0,093
0,216	Negativo	Negativo	0,255	Negativo	Negativo	0,117	Negativo	0,298	Negativo	0,152
0,171	Negativo	Negativo	0,247	Negativo	Negativo	0,171	Negativo	0,215	Negativo	0,119
0,204	Negativo	Negativo	0,258	Negativo	Negativo	0,275	Negativo	0,271	Negativo	0,251
0,261	Negativo	Negativo	0,162	Negativo	Negativo	0,196	Negativo	0,193	Negativo	0,224
0,098	Negativo	Negativo	0,164	Negativo	Negativo	0,218	Negativo	0,226	Negativo	0,305
0,254	Negativo	Negativo	0,125	Negativo	Negativo	0,194	Negativo	0,293	Negativo	0,109
0,299	Negativo	Negativo	0,287	Negativo	Negativo	0,245	Negativo	0,184	Negativo	0,251
0,193	Negativo	Negativo	0,285	Negativo	Negativo	0,119	Negativo	0,094	Negativo	0,284
0,221	Negativo	Negativo	0,163	Negativo	Negativo	0,111	Negativo	0,231	Negativo	0,392
Branco 0.069			Branco 0.073			Branco 0.051		Branco 0.020		Branco 0.038
Ct pos 1.270			Ct pos 1.361			Ct pos 1.491		Ct pos 1.573		Ct pos 1.974
Ct neg 0.082			Ct neg 0.107			Ct neg 0.098		Ct neg 0.095		Ct neg 0.133
Low 0.326			Low 0.536			Low 0.347		Low 0.596		Low 0.553
Medium 0.716			Medium 1.288			Medium 1.080		Medium 1.208		Medium 1.433
High 1.589			High 2.187			High 1.946		High 1.816		High 2.105

Referências Bibliográficas

- Ferreira AW e Avila SLM. *Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Auto-Imunes*. RJ- Guanabara Koogan, 1996.
- Ravel R. *Laboratório Clínico – Aplicações Clínicas dos Dados Laboratoriais*. RJ - Guanabara Koogan – 1995.
- Pagana KD, Pagana TJ. *Manual de Testes Diagnósticos e Laboratoriais*. RJ - Guanabara Koogan – 2001.
- Luppino RA. *Dissertação de Mestrado: Comportamento dos Anticorpos Antinucleares em doenças Difusas do Tecido Conjuntivo*. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo - Orientador Prof. Dr. Alexandre Gabriel Jr. São Paulo. 1984.