

REPRODUTIBILIDADE DA AVALIAÇÃO DO TÍTULO DE AUTOANTICORPOS EM CÉLULAS HEp-2 EM LABORATÓRIOS BRASILEIROS

Diogo Casagrande Nunes de Sousa¹ Gabriel Antônio Ferreira Alves¹ Igo de Oliveira Neves Wilson de Melo Cruvinel¹²³

¹ Escola de Ciências Médicas e da Vida (Curso de Medicina e Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Saúde), Pontifícia Universidade Católica de Goiás (PUC-GO).

² Controllab, Rio de Janeiro – Brasil.

³ Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Saúde, PUC-GO.

E-mail do autor correspondente: melocruvinel@gmail.com

Resumo

A imunofluorescência indireta em células HEp-2 (IFI/HEp-2) é o principal método de triagem para detecção de autoanticorpos em doenças autoimunes sistêmicas, sendo influenciada por variabilidade interlaboratorial e pela subjetividade na leitura. Diante da importância da correta identificação de amostras negativas para assegurar a especificidade do exame, este estudo realizou uma revisão narrativa sobre padronização e reprodutibilidade do método, complementada por uma análise descritiva da capacidade dos laboratórios brasileiros de reconhecer amostras não reagentes. Foram avaliados os resultados de três amostras negativas distribuídas pela Controllab a 67 laboratórios clínicos, considerando-se como correto o resultado classificado como negativo na triagem. A taxa média de concordância foi de 88,25%, enquanto 11,8% dos laudos apresentaram resultados falso-positivos. Esses achados demonstram desempenho globalmente satisfatório, mas evidenciam que a ausência de fluorescência específica ainda pode ser interpretada de forma inconsistente entre laboratórios. Conclui-se que o fortalecimento de práticas de padronização, a participação em programas de controle de qualidade e o treinamento contínuo são essenciais para aprimorar a confiabilidade da IFI/HEp-2 na rotina diagnóstica.

Palavras-chave: autoanticorpos; células HEp-2; imunofluorescência indireta; reprodutibilidade interlaboratorial; controle de qualidade.

Introdução

Os autoanticorpos representam marcadores essenciais na classificação e no diagnóstico das doenças autoimunes sistêmicas, compondo critérios laboratoriais amplamente utilizados em diferentes enfermidades (ANDRADE et al., 2022). O ensaio de imunofluorescência indireta em células HEp-2 (IFI/HEp-2), tradicionalmente conhecido como teste de anticorpos antinucleares (ANA), é o método de triagem mais sensível para a detecção de uma ampla variedade de autoanticorpos e constitui ferramenta indispensável na investigação dessas doenças (CHAN et al., 2015). Resultados positivos no IFI/HEp-2 integram critérios de classificação em diversas condições autoimunes, como lúpus eritematoso sistêmico, artrite idiopática juvenil, hepatite autoimune e colangite biliar primária (DAMOISEAUX et al., 2019; ANDRADE et al., 2022).

A interpretação correta dos padrões morfológicos observados no IFI/HEp-2 oferece informações relevantes sobre as especificidades dos autoanticorpos, auxiliando na distinção entre doenças autoimunes, condições não autoimunes e indivíduos saudáveis. Dessa forma, o reconhecimento adequado dos padrões e a avaliação criteriosa dos títulos exercem papel central na aplicação clínica do exame (MERONI; SCHUR, 2010; DAMOISEAUX et al., 2019).

Apesar de sua alta sensibilidade, o método apresenta limitações inerentes, incluindo variabilidade inter e intralaboratorial, subjetividade na leitura e dependência da experiência do observador. Essas limitações tornam-se especialmente relevantes na interpretação de amostras de baixa reatividade ou naquelas que deveriam ser classificadas como negativas, uma vez que pequenas variações podem resultar em resultados falso-positivos com repercussões clínicas significativas (SILVA et al., 2022).

Para reduzir essas inconsistências, esforços de padronização foram implementados ao longo das últimas décadas. O Brasil foi pioneiro ao instituir o Consenso Brasileiro de ANA em Células HEp-2 (CBA), que posteriormente inspirou a criação do International Consensus on ANA Patterns (ICAP) em 2014 (DELLAVANCE et al., 2003; CHAN et al., 2015; ANDRADE et al., 2024). Ambos os consensos enfatizam a necessidade de resultados claros e padronizados, destacando a importância da correta identificação de amostras negativas para garantir especificidade e evitar investigações desnecessárias (CRUVINEL et al., 2022; VON MÜHLEN et al., 2021).

Programas de Avaliação Externa da Qualidade (EQA), como o UK NEQAS, demonstram melhorias contínuas na reprodutibilidade do método, mas também evidenciam que a leitura de padrões discretos ou a ausência de fluorescência permanece um desafio técnico recorrente (INFANTINO et al., 2025; GARRAFA et al., 2025). Assim, avaliar a capacidade dos laboratórios de identificar corretamente amostras negativas é fundamental para o monitoramento da qualidade analítica e para o alinhamento às recomendações técnicas.

Nesse contexto, compreender como os laboratórios brasileiros classificam amostras sem fluorescência específica torna-se essencial para identificar fontes de variabilidade e fortalecer práticas de padronização. O presente estudo tem como objetivo avaliar a capacidade interlaboratorial de identificar amostras negativas no teste de IFI/HEp-2, inserindo essa análise em uma revisão narrativa sobre reprodutibilidade e padronização da técnica.

Métodos

Este estudo foi desenvolvido em duas etapas complementares. A primeira consistiu em uma revisão narrativa da literatura, utilizando publicações científicas e documentos técnicos relacionados à padronização, reprodutibilidade e relevância clínica da imunofluorescência indireta em células HEp-2, incluindo consensos nacionais e internacionais, estudos de variabilidade interlaboratorial e dados provenientes de programas de Avaliação Externa da Qualidade (EQA). Essa etapa teve caráter contextual e buscou fundamentar a importância da correta identificação de amostras negativas no exame.

A segunda etapa correspondeu à análise interlaboratorial restrita exclusivamente às três amostras negativas previamente distribuídas pela Controllab a 67 laboratórios clínicos brasileiros. Embora essas amostras integrassem um painel mais amplo de avaliação, para este artigo consideraram-se apenas os resultados referentes à ausência de fluorescência específica. Cada resposta foi classificada como correta quando a amostra foi identificada como negativa, isto é, sem fluorescência compatível com reatividade em diluição mínima de triagem. Resultados iguais ou superiores a 1:80 foram considerados discordantes, representando falsos-positivos. Para avaliar o desempenho dos laboratórios, calcularam-se dois indicadores: a Taxa de Concordância (TC), correspondente ao percentual de classificações corretas, e o Índice de Discordância (ID), definido como 100% menos a TC. Nenhuma outra métrica foi incluída, em concordância com o objetivo específico de avaliar apenas amostras negativas.

Resultados

A análise das três amostras negativas revelou uma taxa média de concordância de 88,25%, indicando que a maior parte dos laboratórios classificou corretamente essas amostras como não reagentes. Em contrapartida, 11,8% dos laboratórios atribuíram títulos iguais ou superiores a 1:80, caracterizando resultados falso-positivos e compondo o Índice de Discordância. Esses achados refletem a variabilidade analítica presente mesmo na avaliação de amostras sem fluorescência específica e evidenciam a possibilidade de superestimação da fluorescência residual ou de influência de fatores técnicos na leitura microscópica.

Discussão

A correta identificação de amostras negativas no ensaio de IFI em células HEp-2 é essencial para a segurança diagnóstica e para o uso adequado do exame na prática clínica. Neste estudo, a taxa de concordância de 88,25% indica que a maioria dos laboratórios brasileiros reconhece de forma consistente amostras verdadeiramente não reagentes. Apesar disso, a ocorrência de 11,8% de falsos-positivos demonstra que a variabilidade analítica persiste mesmo na ausência de fluorescência específica.

Falsos-positivos podem surgir por fatores como fluorescência de fundo, variações na titulação do conjugado fluorescente, diferenças na sensibilidade óptica dos equipamentos, desgaste da lâmpada e interpretação subjetiva do observador. Estudos nacionais e internacionais mostram que, mesmo após avanços de padronização promovidos pelos consensos CBA-HEp-2 e ICAP, a leitura de padrões discretos continua sendo um dos principais pontos de divergência entre laboratórios.

Programas de Avaliação Externa da Qualidade, como o UK NEQAS, demonstram avanços consistentes na uniformização dos resultados ao longo dos anos, mas também ressaltam que a leitura de amostras negativas exige rigor técnico e constante monitoramento da qualidade. Esses resultados reforçam a necessidade de aderência às recomendações dos consensos, utilização de controles internos, manutenção preventiva de microscópios, validação regular de lâminas e treinamento contínuo dos profissionais.

Portanto, embora o desempenho geral seja satisfatório, a proporção de resultados discordantes observada indica que a identificação de amostras negativas permanece um ponto crítico na rotina analítica. O fortalecimento de práticas de padronização e o investimento contínuo em capacitação são fundamentais para aprimorar a reprodutibilidade e garantir maior confiabilidade diagnóstica no IFI/HEp-2.

Conclusão

A taxa de concordância observada na identificação das amostras negativas demonstrou que a maioria dos laboratórios brasileiros reconhece adequadamente a ausência de reatividade no ensaio de IFI em células HEp-2. Entretanto, a ocorrência de 11,8% de resultados falso-positivos evidencia que ainda existem fontes de variabilidade capazes de impactar a interpretação de amostras sem fluorescência específica. Esses achados reforçam que, mesmo em situações aparentemente simples do ponto de vista analítico, a leitura da imunofluorescência permanece suscetível à subjetividade e a diferenças técnicas entre laboratórios. Assim, a adoção rigorosa das recomendações dos consensos nacionais e internacionais, aliada à participação contínua em programas de controle de qualidade e ao treinamento permanente de profissionais, é fundamental para aprimorar a reprodutibilidade e garantir maior segurança diagnóstica na avaliação de autoanticorpos em células HEp-2.

Referências

ANDRADE, L. E. et al. Antinuclear antibodies (ANA) as a criterion for classification and diagnosis of systemic autoimmune diseases. *Journal of Translational Autoimmunity*, v. 5, p. 100145-100153, 2022. DOI: 10.1016/j.jtauto.2022.100145.

CHAN, E. K. L. et al. Report of the first international consensus on standardized nomenclature of antinuclear antibody HEp-2 cell patterns 2014–2015. *Frontiers in Immunology*, Lausanne, v. 6, p. 412, 2015. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00412>.

DAMOISEAUX, J. et al. Clinical relevance of HEp-2 indirect immunofluorescent patterns: the International Consensus on ANA Patterns (ICAP) perspective. *Annals of the Rheumatic Diseases*, v. 78, n. 7, p. 879–889, 2019.

MERONI, P. L.; SCHUR, P. H. ANA screening: an old test with new recommendations. *Annals of the Rheumatic Diseases*, v. 69, n. 8, p. 1420–1422, 2010.

ALMAGRO, R. et al. Association between antinuclear antibody titers and connective tissue diseases in a Rheumatology Department. *Reumatología Clínica*, Madrid, v. 13, n. 3, p. 150–155, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.reuma.2016.03.019>.

AGUSTINELLI, R. A. et al. Distinctive features of positive anti-cell antibody tests (indirect immunofluorescence on HEp-2 cells) in patients with non-autoimmune

diseases. *Lupus*, London, v. 28, n. 5, p. 629–634, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1177/0961203319838348>.

SILVA, M. J. et al. Interkit reproducibility of the indirect immunofluorescence assay on HEp-2 cells depends on the immunofluorescence reactivity intensity and pattern. *Frontiers in Immunology*, v. 12, p. 1–11, 2022. DOI: 10.3389/fimmu.2021.781007.

DELLAVANCE, A. et al. II Consenso Brasileiro de Fator Antinuclear em Células HEp-2: definições para padronização da pesquisa de autoanticorpos contra o núcleo, nucléolo, citoplasma e aparelho mitótico e suas associações clínicas. *Revista Brasileira de Reumatologia*, São Paulo, v. 43, n. 3, p. 129–140, 2003.

ANDRADE, L. E. C. et al. Reflecting on a decade of the international consensus on ANA patterns (ICAP): accomplishments and challenges from the perspective of the 7th ICAP workshop. *Autoimmunity Reviews*, v. 23, n. 9, p. 103608, 2024.

CRUVINEL, W. de M. et al. VI Brazilian consensus guidelines for detection of anti-cell autoantibodies on HEp-2 cells. *Revista Brasileira de Reumatologia*, v. 62, n. 1, 2022.

VON MÜHLEN, C. A. et al. How to report the antinuclear antibodies (anti-cell antibodies) test on HEp-2 cells: guidelines from the ICAP initiative. *Immunologic Research*, v. 69, p. 594–608, 2021.

WEI, Q. et al. Analysis of antinuclear antibody titers and patterns by using HEp-2 and primate liver tissue substrate indirect immunofluorescence assay in patients with systemic autoimmune rheumatic diseases. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, v. 34, n. 12, 2020.

DAMOISEAUX, J. et al. Response to “Titre-specific positive predictive value of anti-nuclear antibody patterns” by Vulsteke et al. *Annals of the Rheumatic Diseases*, v. 80, n. 8, p. e129–e129, 2019.

INFANTINO, M. et al. Harmonization of anti-nuclear antibody testing (ANA) by indirect immunofluorescence assay: Results from ten years of UK NEQAS external quality assessment. *Clinica Chimica Acta*, v. 567, 2025.

GARRAFA, E. et al. Evolution of autoimmune diagnostics over the past 10 years: lessons learned from the UK NEQAS external quality assessment (EQA) programs. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*, 2025.

DELLAVANCE, A. et al. 3º Consenso Brasileiro para pesquisa de autoanticorpos em células HEp-2 (FAN): recomendações para padronização do ensaio de pesquisa de autoanticorpos em células HEp-2, controle de qualidade e associações clínicas. *Revista Brasileira de Reumatologia*, v. 49, n. 2, p. 89–98, 2009.