

Universidad de Ciencias Médicas de La Habana
Centro Nacional de Genética Médica

Determinación de anticuerpos anticitoplasma de neutrófilos mediante inmunofluorescencia Indirecta para el diagnóstico de las vasculitis

Antineutrophil cytoplasmic antibodies determination for vasculitis diagnosis

Goitybell Martínez Téllez^I, María Antonia Ramos Ríos^{II}, Bárbara Torres Rives^{III}, Vicky SánchezRodríguez^{IV}, Maité Martiato Hendrich^V, Niester Abreu Pantín^{VI}

^ILicenciada en Ciencias Farmacéuticas. *Master* en Química Farmacéutica. Instructor. Investigador Agregado. Centro Nacional de Genética Médica.

e-mail: goity@infomed.sld.cu

^{II}Doctora en Medicina. Residente de Inmunología. Centro Nacional de Genética Médica. e-mail: mramos@cngen.sld.cu

^{III}Especialista Primer Grado en Inmunología. *Master* en Genética Médica. Profesor Auxiliar. Investigador Agregado. Centro Nacional de Genética Médica.

e-mail: barbara@cngen.sld.cu

^{IV}Técnico en Procesos Biológicos. Centro Nacional de Genética Médica.

e-mail: vicky@cngen.sld.cu

^VLicenciada en Tecnología de la Salud. Centro Nacional de Genética Médica.

e-mail: maite@cngen.sld.cu

^{VI}Doctor en Medicina Veterinaria. Centro Nacional de Genética Médica.

e-mail: niester@cngen.sld.cu

AGRADECIMIENTOS

Los autores de este trabajo agradecemos la colaboración recibida para la obtención de controles positivos al Instituto de Hematología e Inmunología (Lic. Ana María Guerrero Hernández) y al Hospital Clínico-quirúrgico Hermanos Ameijeiras (Dra. Elena Kokuina).

RESUMEN

Introducción: los anticuerpos anticitoplasma de neutrófilos contribuyen al diagnóstico de las vasculitis sistémicas.

Objetivo: demostrar el valor diagnóstico de la determinación de estos anticuerpos mediante inmunofluorescencia indirecta realizando su estandarización y validación.

Material y Métodos: se realizó la estandarización y validación de la determinación de anticuerpos anticitoplasma de neutrófilos mediante inmunofluorescencia indirecta. La muestra estuvo constituida por 20 pacientes con vasculitis sistémica, 45 con enfermedades reumáticas y 24 individuos sanos.

Resultados y Discusión: la sensibilidad, especificidad, valores predictivos y eficacia del método fueron adecuados y se obtuvo una buena concordancia con los ensayos de referencia. Estos anticuerpos estuvieron presentes en los pacientes con vasculitis (54%), con artritis reumatoide (19%) y con lupus eritematoso sistémico (37%).

Conclusiones: el método desarrollado tiene una gran utilidad diagnóstica y puede ser aplicado en el estudio de las vasculitis sistémicas, encontrándose una buena concordancia entre los patrones y las especificidades antigénicas.

Palabras clave: vasculitis, estandarización, validación, Inmunofluorescencia Indirecta.

ABSTRACT

Introduction: antineutrophil cytoplasmic antibodies contribute to the diagnosis of systemic vasculitis.

Objective: demonstrate the diagnostic value of Antineutrophil cytoplasmic antibodies assessing by indirect immunofluorescence doing its standardization and validation.

Material and methods: standardization and validation of antineutrophil cytoplasmic antibodies determination by indirect immunofluorescence. The sample consisted of 20 patients with systemic vasculitis, 45 with rheumatic diseases and 24 healthy individuals.

Results and Discussion: the sensitivity, specificity, and predictive values were adequate. Good method performance and good agreement was obtained with the reference tests. These antibodies were present in patients with vasculitis (54%), rheumatoid arthritis (19%) and systemic lupus erythematosus (37%).

Conclusions: the developed method has a great diagnostic usefulness and can be applied in the study of systemic vasculitis, finding a good match between the patterns and antigenic specificities

Key words: vasculitis, standardization, validation, indirect immunofluorescence.

INTRODUCCIÓN

Las vasculitis asociadas a anticuerpos anticitoplasma de neutrófilos pertenecen al grupo de vasculitis de pequeños vasos y son enfermedades autoinmunes sistémicas, donde la determinación de anticuerpos anticitoplasma de neutrófilos (ANCA) es el biomarcador más importante.^{1, 2, 3} Su incidencia varía de 0,3 a 20 casos por millón de habitantes.^{4,5}

Los ANCA son autoanticuerpos dirigidos contra proteínas de los gránulos citoplasmáticos de neutrófilos y monocitos. Se determinan mediante inmunofluorescencia indirecta y por el método de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA).⁶ Para un mejor diagnóstico se realiza primero la inmunofluorescencia indirecta y después el ELISA, por lo que se logra la máxima sensibilidad y especificidad.⁷⁻¹⁰

Son detectados generalmente en los pacientes con ciertos síndromes vasculíticos como la granulomatosis con poliangeítis (granulomatosis de Wegener), la poliangeítis microscópica, la poliangeítis con granulomatosis eosinofílica (Síndrome de Churg-Strauss).¹¹

Existen dos patrones principales de fluorescencia en la determinación de ANCA mediante inmunofluorescencia indirecta. El patrón citoplasmático (cANCA), tiene como antígeno principal la Proteinasa 3. Más de 90% de los pacientes con granulomatosis con poliangeítis activa poseen anticuerpos contra PR3.^{12,13} El patrón perinuclear (pANCA) ocurre solamente cuando los neutrófilos son fijados en etanol, el cual permeabiliza la membrana de los gránulos citoplasmáticos y permite que la mieloperoxidasa, antígeno principal del pANCA, salga y se una a la membrana nuclear. Cuando los neutrófilos son fijados en formalina el patrón pANCA se observa como cANCA, ya que la mieloperoxidasa se mantiene en los gránulos. El patrón pANCA se observa de 70% a 80% de pacientes con poliangeítis microscópica y en la granulomatosis eosinofílica.^{3, 9, 14,15}

OBJETIVO

Fue demostrar el valor diagnóstico de la determinación de los ANCA mediante inmunofluorescencia indirecta, realizando su estandarización y validación en el Laboratorio de Inmunología perteneciente al Centro Nacional de Genética Médica.

MATERIAL Y MÉTODOS

La muestra estuvo constituida por 65 pacientes, quienes asistieron a la consulta de Inmunología del Centro Nacional de Genética Médica de enero de 2011 a diciembre de 2013: con vasculitis asociadas a ANCA (8 con granulomatosis con poliangeítis, 3 con granulomatosis eosinofílica, 2 con poliangeítis microscópica), según criterios establecidos,¹¹ 7 con sospecha de vasculitis asociadas a ANCA, 10 con artritis reumatoidea, 35 con lupus eritematoso sistémico (LES) y 24 individuos sanos para un tamaño de muestra de 89.

Determinación de ANCA mediante Inmunofluorescencia Indirecta

Se realizó el aislamiento de neutrófilos en Ficoll mediante el Método de Boyum.¹⁶ La determinación de ANCA por inmunofluorescencia indirecta se realizó según el método empleado por Savige y col. (1999).¹⁷

Estandarización: Se evaluaron los controles obtenidos en el laboratorio, las láminas portaobjetos con neutrófilos y su conservación, la dilución de la muestra y el conjugado.¹⁸

Validación: Se determinó la sensibilidad y especificidad diagnósticas, los valores predictivos, la eficacia y el índice de concordancia^{18, 19} con los ensayos de referencia de inmunofluorescencia indirecta (Immunoconcepts, Alemania) y de ELISA anti-proteinasa 3 y antimieloperoxidasa (ORGENTEC, Alemania).

Métodos estadísticos: Se utilizó el programa Statistica 8.0. Se realizó la prueba de χ^2 con la corrección de Yates. Como criterio de significación estadística se tomó $p < 0,05$.

Aspectos éticos: Se cumplieron los principios enunciados en la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial actualizada en el 2008.²⁰ El consentimiento informado de participación fue entregado a todos los pacientes con indicación de ANCA en la consulta, con tiempo suficiente para decidir su participación y antes de las extracciones de sangre. Se les explicó verbalmente el objetivo de la investigación. La información obtenida fue de carácter confidencial.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la titulación (máxima dilución a la que se observó fluorescencia) de los controles del laboratorio en el ensayo de referencia (Figura), se observó que el control negativo se mantuvo de esta forma a todas las diluciones, el control positivo de cANCA tuvo un título 1/160 y el control positivo de pANCA presentó un título de 1/640, lo cual demuestra que los controles obtenidos en el laboratorio son adecuados, según lo reportado en la literatura.¹⁸

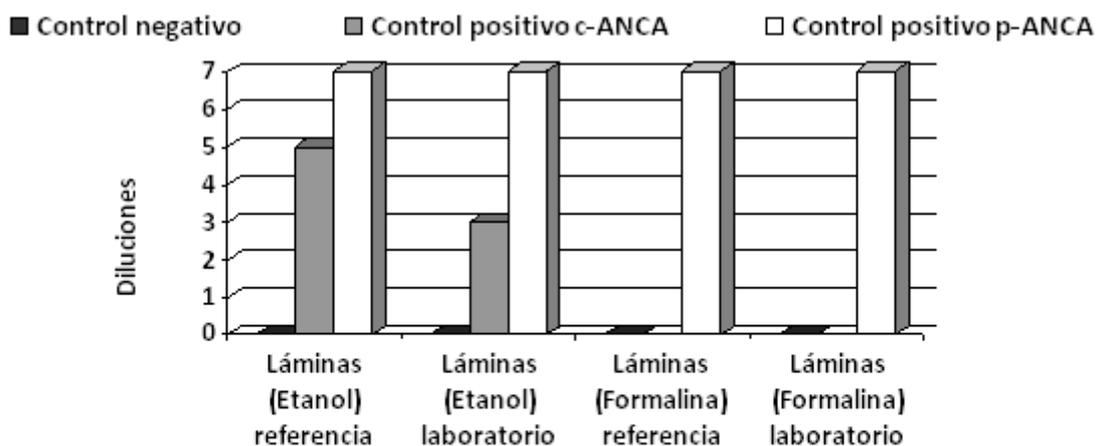


Figura. Evaluación de los controles al realizar la determinación anticuerpos anticitoplasma del neutrófilo, en el sistema del laboratorio y el ensayo de referencia. Dilución: 1: 1/10, 2: 1/20, 3: 1/40, 4: 1/80, 5: 1/160, 6: 1/320, 7: 1/640. c ANCA: Patrón de fluorescencia citoplasmática. p ANCA: Patrón de fluorescencia perinuclear.

En la evaluación, en el sistema soporte-sustrato desarrollado en el laboratorio con respecto al ensayo de referencia, utilizando los controles obtenidos (Figura), se observó un buen grado de concordancia para el control negativo y el control positivo pANCA. El control positivo cANCA mostró un título mayor en el sistema soporte sustrato del ensayo de referencia. Estas diferencias consideramos que se deben a la metodología empleada para el aislamiento de los neutrófilos. No obstante cumple con los requisitos establecidos ya que existe una buena discriminación con el control negativo y no se observaron reacciones inespecíficas.

Como se observa en la Tabla 1, en las láminas conservadas por 1 mes de 2-8 °C, el control positivo cANCA no presentó fluorescencia y aunque el control positivo pANCA mantuvo su título, se observaron reacciones inespecíficas. Sin embargo, en las láminas conservadas a -20°C, se obtuvieron resultados adecuados.¹⁸ El control negativo no mostró fluorescencia en láminas incubadas a diferentes tiempos. El control positivo cANCA mostró un título de 1/160 en todos los tiempos de conservación, el control pANCA disminuyó el título a medida que aumentó el tiempo de conservación en las láminas con neutrófilos fijados en etanol. En las láminas con neutrófilos fijados en formalina, no varió la fluorescencia de los controles con el tiempo de conservación. El tiempo óptimo de conservación del soporte con el sustrato es de 3 meses, ya que con este tiempo se alcanza la mayor fluorescencia de los controles.

Tabla 1. Influencia de las condiciones de almacenamiento de las láminas portaobjetos en la determinación de anticuerpos anticitoplasma del neutrófilo

| Tipo de lámina | Tiempo (Meses) | Temperatura (°C) | Control negativo | Control c ANCA | Control p ANCA |
|----------------|----------------|------------------|------------------|----------------|----------------|
| Etanol | 1 | 2-8 * | 0 | 0 | 1/640 ** |
| Etanol | 1 | -20 | 0 | 1/160 | 1/640 |
| Etanol | 3 | -20 | 0 | 1/160 | 1/640 |
| Etanol | 4 | -20 | 0 | 1/160 | 1/160 |
| Formalina | 1 | -20 | 0 | - | 1/160 |
| Formalina | 3 | -20 | 0 | - | 1/160 |
| Formalina | 4 | -20 | 0 | - | 1/160 |

ANCA: Anticuerpos anti citoplasma del neutrófilo.

*Se observaron los neutrófilos deshidratados. **Se observaron reacciones inespecíficas.

La dilución óptima de trabajo del conjugado fue de 1/100 y de los controles 1/20 (Tabla 2), lo cual coincide con lo reportado en la literatura para la determinación de ANCA.^{3, 4,5}

Tabla 2. Evaluación de la dilución de la muestra y el conjugado al realizar la determinación anticuerpos anticitoplasma del neutrófilo

| Control | Diluciones de controles | Láminas de etanol | | | Láminas de formalina | | |
|-----------------|-------------------------|--------------------------|----------|----------|--------------------------|----------|----------|
| | | Diluciones del conjugado | | | Diluciones del conjugado | | |
| | | 1/80 | 1/100 | 1/120 | 1/80 | 1/100 | 1/120 |
| Negativo | 1/10 | negativo | negativo | negativo | negativo | negativo | negativo |
| | 1/20 | negativo | negativo | negativo | negativo | negativo | negativo |
| | 1/40 | negativo | negativo | negativo | negativo | negativo | negativo |
| Positivo p-ANCA | 1/10 | positivo | positivo | positivo | positivo | positivo | negativo |
| | 1/20 | positivo | positivo | positivo | positivo | positivo | negativo |
| | 1/40 | positivo | positivo | positivo | positivo | positivo | negativo |
| Positivo c-ANCA | 1/10 | positivo | positivo | positivo | - | - | - |
| | 1/20 | positivo | positivo | positivo | - | - | - |
| | 1/40 | positivo | positivo | positivo | - | - | - |

ANCA: Anticuerpos anti citoplasma del neutrófilo.

Los ANCA determinados mediante inmunofluorescencia indirecta estuvieron presentes en 7 pacientes con vasculitis asociada a ANCA (54%) y en 3 pacientes con sospecha de vasculitis asociada a ANCA (43%). Estos valores son inferiores a los reportados en la literatura,^{3, 9, 14, 15} debido fundamentalmente a la diversidad de criterios clínicos para el diagnóstico de las vasculitis. De los pacientes con lupus eritematoso sistémico 13 presentaron ANCA (37%) y 2 pacientes con artritis reumatoidea (19%), valores inferiores a los reportados en la literatura; se encontró asociación de los ANCA tanto para el lupus eritematoso sistémico ($p < 0,0284$) como para la artritis reumatoidea ($p < 0,007$). Solamente 2 individuos sanos presentaron ANCA (8%).

Los resultados obtenidos para la determinación de los parámetros de validación del ensayo se muestran en la Tabla 3. La sensibilidad diagnóstica obtenida en los pacientes con vasculitis asociada a ANCA fue de 100% y la especificidad diagnóstica de 91% con respecto al ensayo de referencia. Los valores predictivos positivos y negativos fueron 90% y 100% respectivamente. La eficacia obtenida para el ensayo fue de 95%. El índice Kappa obtenido fue de 0,9. Este índice demuestra una buena concordancia con el ensayo de referencia de inmunofluorescencia indirecta según la literatura.^{18, 19}

Tabla 3. Positividad de anticuerpos anticitoplasma del neutrófilo utilizando el método desarrollado en el laboratorio y el ensayo de referencia

| Ensayo del laboratorio | Ensayo de referencia de inmunofluorescencia indirecta | | Ensayo de referencia ELISA | |
|------------------------|---|-----------|----------------------------|-----------|
| | Positivos | Negativos | Positivos | Negativos |
| Positivos | 9 | 1 | 8 | 1 |
| Negativos | 0 | 10 | 0 | 11 |

ELISA: Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima.

La sensibilidad y especificidad de los patrones cANCA y pANCA obtenidos mediante Inmunofluorescencia indirecta en pacientes con vasculitis con respecto a la positividad frente la proteinasa 3 y la mieloperoxidasa determinados mediante ELISA fueron de 100% y 92% para ambos patrones, los valores predictivos fueron el positivo de 89% y el negativo de 100%. La eficacia fue de 95% y el índice Kappa de 0,9, lo cual demuestra una buena concordancia con el ensayo de referencia de ELISA según lo reportado en la literatura.^{18, 19}

Todos los patrones presentes en los pacientes con artritis reumatoidea fueron pANCA atípicos, mientras que en el lupus eritematoso sistémico (LES) se obtuvieron tanto patrones cANCA como pANCA atípicos.

Los resultados obtenidos permiten la utilización de esta técnica en la práctica clínica en el Laboratorio de inmunología del Centro Nacional de Genética Médica, donde se reciben muestras para la realización de estudios de autoinmunidad provenientes de diferentes provincias del país, a través de la red de Genética Médica.

CONCLUSIONES

El método de inmunofluorescencia indirecta para la determinación de ANCA estandarizado y validado tiene una gran utilidad diagnóstica y puede ser aplicado en el estudio de las vasculitis dependientes de ANCA, encontrándose una gran

concordancia entre los patrones y las especificidades antigénicas que más se asocian a estas enfermedades. Es importante tener en cuenta la presencia de los ANCA en otras enfermedades como el lupus eritematoso sistémico y la artritis reumatoidea.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Watts RA, Scott DG. Recent developments in the classification and assessment of vasculitis. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2009; 23(3):429-43.
2. Charles J, Falk RJ. New insight into the pathogenesis of vasculitis associated with antineutrophil cytoplasmic autoantibodies. *Current Opinion in Rheumatology*. 2008; 20:5560.
3. Talor MV, Stone JH, Stebbing J, Barin J, Rose NR, Burek CL. Antibodies to selected minor target antigens in patients with anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA). *Clinical and Experimental Immunology*. 2007; 150:4248.
4. Rodrigues CE, Velloso ER, Pereira RM, Bonfá E, Teixeira FK, Bueno C, *et al*. A novel 60 kDa reactivity in cyclic neutropenia: high titer cytoplasmic ANCA immunostaining pattern and negative anti-proteinase-3 antibody. *Joint Bone Spine*. 2011; 78:319-20.
5. Khasnis A, Langford CA. Update on vasculitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2009; 123(6):1226-36.
6. Eisenberger U, Hess C. Systemic ANCA-associated vasculitis diagnosis and therapy. *Ther Umsch*. 2008; 65(5):295-301.
7. Carlson JA. The histological assessment of cutaneous vasculitis. *Histopathology*. 2010; 56:3-23.
8. Holle JU, Bley T, Gross WL. Classification and therapy of vasculitis according to recommendations of the European League Against Rheumatism (EULAR) *Radiologe*. 2010 Oct; 50(10):846-54.
9. Atul Khasnis y Carol A. Langford. Actualización sobre vasculitis. *JACI* .2009; 123:1226-36.
10. Yuksel C, Ayli MD, Yuksel A, *et al*. Propylthiouracil-induced vasculitis associated with ANCA: a case report. *Ren Fail* 2007; 29:235-237.
11. Jennette J, Falk R, Bacon P, *et al*. Revised International Chapel Hill Consensus Conference Nomenclature of Vasculitides. *Arthritis Rheum*. 2012; 65: 1-11.
12. Kallenberg CG. Pathogenesis of PR3-ANCA associated vasculitis. *J Autoimmun*. 2008; 30(1-2):29-36.
13. Nakano H, Ozaki S. Review article. Antineutrophil cytoplasmic antibody in small vessel vasculitis. *Rinsho Byori*. 2010; 58(5):480-9.
14. Kain R, Exner M, Brandes R, Ziebermayr R, Cunningham D, Alderson CA, Davidovits A, Raab I, Jahn R, Ashour O, Spitzauer S, Sunder-Plassmann G, Fukuda

M, Klemm P, Rees AJ, Kerjaschki D. Molecular mimicry in pauci-immune focal necrotizing glomerulonephritis. *Nat Med.* 2008; 14:1088-1096.

15. Csernok E, Holle J, Hellmich B, Willem J, Tervaert C, Kallenberg CG, *et al.* Evaluation of Capture ELISA for the detection of antineutrophil cytoplasmic antibodies directed against proteinase 3 in Wegener's granulomatosis: first results from a multicenter study. *Rheumatology.* 2004; 43:174-80.

16. Boyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 19. *Scand J Clin Invest.* 1968; 21 (Suppl 97): 77-89.

17. Savige J, Gilles D, Berson E y col. International Concensus statement on testing and reporting of antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA). *Am J Clin Pathol.* 1999; 111: 507-513.

18. Torres B, Seguí F, Martínez G, Ochoa RF, Duany J, Rangel S. Validación de un método de inmunofluorescencia indirecta para la determinación de anticuerpos contra el músculo liso. *Revista Eugenio Espejo.* 2013; 5 (1): 34-46.

19. Ochoa RF. «Validación de los inmunoensayos empleados para evaluar la inmunogenicidad de vacunas». En: Ochoa RF. *Bases Metodológicas para la evaluación de anticuerpos en ensayos clínicos de vacunas mediante técnicas inmunoenzimáticas.* 1 ed. Ciudad de La Habana: Finlay; 2004, p. 57-78.

20. Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial. Principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos. Asociación Médica Mundial: 2003-2007; 2008. Disponible en: <http://www.wma.Net/S/Policy/B3.Htm>.

Recibido: 1 de abril 2013

Aprobado: 30 de mayo de 2013