

Anticuerpos anti-citoplasma de neutrófilos: un desafío para el laboratorio de autoinmunidad

MANLAB®

Diagnóstico Bioquímico y Genómico

 12 min.


Los anticuerpos anti-citoplasma de neutrófilos (ANCA) fueron detectados por primera vez en 1982, asociados a glomerulonefritis y enfermedades sistémicas. Se encuentran involucrados en la patogénesis de las diferentes formas de vasculitis autoinmunes y son marcadores serológicos muy útiles para el diagnóstico y control evolutivo de determinadas formas de vasculitis sistémicas. En el

siguiente trabajo un equipo de profesionales del Sector de Autoinmunidad de Laboratorio MANLAB nos describe la importancia en la evaluación de ANCA en el laboratorio, del grado de concordancia entre distintos operadores y entre las distintas marcas de improntas.



Guillermo G. Nuñez*,
Josefina Chinton**,
Vanesa Chávez***,

Marcela Ferrería***

*Dr. Bioquímica; ** Residente de 3º año;
*** Bioquímicas

Laboratorio MANLAB
Sector Autoinmunidad



E-mail:
guillermo.nunez@manlab.com.ar



Quimioluminiscencia

Access²


Reproductive

AFP (ONTD)
DHEA-S
Estradiol
hFSH
hLH
Inhibin A
PIGF
(preeclampsia)*
sVEGF R1
(preeclampsia)*
Progesterone
Prolactin
Testosterone
Total βhCG
Unconjugated Estriol
SHGB (sex hormone binding globulin)



Thyroid

Free T3
Free T4
HYPERsensitive hTSH
(3rd generation)
Thyroglobulin
Thyroglobulin Ab
Total T3
Total T4
TPO Ab



Anemia

Vitamin B12
Erythropoietin
Ferritin
Folate
Intrinsic Factor Ab
RBC Folate
Soluble Transferrin
Receptor



Tumor Markers

AFP
BPH-A*
CEA
CA 15-3 Antigen
CA 19-9 Antigen
CA 125 Antigen
Hybritech®PSA
Hybritech® free PSA
[-2]proPSA*



Skeletal

Bone Metabolism
Intact PTH (Routine / Intra-Operative)
Ostase® Bone Alkaline Phosphatase
Ultrasensitive hGH
Vitamin D*



Infectious Disease

Toxo IgM
Toxo IgG
Rubella IgM
Rubella IgG
CMV IgM*
CMV IgG*
Blood Virus
HAV IgM
HAV Ab
HBs Ag
HBs Ag
HBs Ag
Confirmatory
HBs Ab
HBc IgM
HBc Ab
HCV Ab
HIV 1/2 Ab*



Specialty

Diabetes
Ultrasensitive Insulin
Allergy
Total IgE

Inflammation
Interleukin-6



Cardiac

AccuTni® Troponin I
β2-Glycoprotein 1 Ab*
CK-MB
Myoglobin



Adrenal/ Pituitary

Cortisol
(Serum and Urine)

* Consultar disponibilidad


BIODIAGNOSTICO

Av. Ing. Huergo 1437 P.B. "1" C1107APB - Buenos Aires - Argentina - Tel./Fax: +54 11 4300-9090

info@biodiagnostico.com.ar www.biodiagnostico.com.ar



Introducción

Las vasculitis comprenden una serie de enfermedades que tienen en común la presencia de inflamación, necrosis e infiltración de la pared vascular. Los vasos afectados pueden ser de cualquier tamaño y localizarse en diferentes órganos o sistemas. Las lesiones vasculares son más frecuentes en riñón, pulmón y piel. Como consecuencia de la inflamación se produce una disminución del flujo vascular o incluso una interrupción completa del mismo. La afección inflamatoria difusa vascular determina la aparición de síntomas generales (fiebre, astenia, pérdida de peso, etc.) y el desarrollo de manifestaciones clínicas locales como consecuencia de la isquemia o el infarto visceral por oclusión de los vasos (síntomas neurológicos, dolor abdominal, compromiso renal, etc.). En función de la localización de los vasos afectados, su diferente tamaño y los distintos hallazgos histológicos de la biopsia (en la que predominará la lesión necrosante o la granulomatosa) se pueden identificar 11 tipos distintos de vasculitis. El diagnóstico de vasculitis sistémica se basa en la evaluación clínica asociada a los resultados de laboratorio. A partir de la descripción de los anticuerpos anti-citoplasma de neutrófilo (ANCA) se ha prestado mayor atención a su utilidad en el diagnóstico y su rol en la patogenia de las vasculitis sistémicas. Se demostró que los ANCA tienen un rol importante en la clasificación de las vasculitis sistémicas que están fuertemente asociadas a su presencia, como la granulomatosis de Wegener, la poliangeitis microscópica, el síndrome de Churg Strauss y la granulomatosis rápidamente progresiva (1). Además de vasculitis, los ANCA también se encuentran presentes en otras situaciones clínicas, como en una gran variedad de desórdenes inflamatorios como la polimialgia reumática, el síndrome de hipereosinofilia, la colitis ulcerosa, la artritis crónica juvenil, el síndrome Sjögren, la sarcoidosis, y las enfermedades intestinales inflamatorias crónicas (2). Los ANCA están presentes entre el 50% y el 70% de los

pacientes con colitis ulcerosa, entre el 10% y el 30% de los pacientes con enfermedad de Crohn, en el 90% de los pacientes con hepatitis autoinmune tipo 1, en el 90% de los pacientes con síndrome de Felty y en el 30% de los pacientes con artritis reumatoidea activa (3). El diagnóstico de la colitis ulcerosa y de la enfermedad de Crohn se realiza principalmente en base a criterios clínicos, radiológicos, endoscópicos e histológicos pero entre el 10% y el 15% de los pacientes no cumplen con estos criterios de diagnóstico. Se sabe además que los ANCA son más frecuentes en la colitis ulcerosa aunque la determinación aislada de ANCA no resulta útil para diferenciar entre ambas patologías intestinales, pero la combinación de los ANCA más la detección de anticuerpos anti *Saccharomyces cerevisiae* (ASCA) ayuda a diferenciar entre una y otra patología (3).

Los ANCA también desempeñan un rol importante en el seguimiento de la granulomatosis de Wegener. Los pacientes que padecen la enfermedad en forma activa presentan títulos mayores que aquellos en remisión y la presencia de ANCA está relacionada con la recaída de vasculitis sistémicas. Algunos autores consideran que el aumento del título de ANCA es indicativo de la recaída inminente de la enfermedad. Sin embargo para otros, el cambio en el título de ANCA carece de valor pronóstico (1).

Con respecto a la especificidad de los ANCA, se sabe que estos anticuerpos están dirigidos contra antígenos que se encuentran en los gránulos citoplasmáticos de los neutrófilos y monocitos.

El método estándar para la detección de ANCA es la inmunofluorescencia indirecta (IFI) que utiliza neutrófilos humanos fijados con etanol. Los patrones que se pueden identificar por este método son:

c-ANCA: patrón clásico de fluorescencia citoplasmática con acentuación central o interlobular.

c-ANCA atípico: patrón difuso o "flat", sin

acentuación interlobular.

p-ANCA: patrón perinuclear, con o sin extensión nuclear. Esto se debe a que la visualización de la extensión nuclear depende de los neutrófilos utilizados como sustrato, de la intensidad de fluorescencia y de la experiencia del observador (3).

ANCA atípico: incluye todos los otros patrones IFI de reactividad específica para neutrófilos o monocitos. Con frecuencia se trata de una combinación de fluorescencia citoplasmática y perinuclear.

La fijación con etanol de los neutrófilos produce desorganización de las membranas de gránulos que contienen antígenos catiónicos, principalmente mieloperoxidasa (MPO) y elastasa los cuales migran al núcleo. Este fenómeno conduce a la generación del patrón p-ANCA. Existen varios antígenos que pueden dar lugar al patrón p-ANCA, como por ejemplo la lactoferrina, la cathepsina G, la proteína movilizadora de yodo (BPI), entre otros; aunque la mayoría de los p-ANCA se deben autoanticuerpos dirigidos contra la mieloperoxidasa (MPO). El patrón c-ANCA se produce principalmente por anticuerpos dirigidos contra una serina proteasa presente en los gránulos azurófilos de los neutrófilos, llamada proteinasa 3 (PR3). La PR3 al ser un antígeno aniónico no se ve afectado por la fijación con etanol y permanece en el citoplasma. El patrón c-ANCA atípico usualmente presenta especificidad por la proteína incrementadora de la permeabilidad bacteriana; lo que explicaría su presencia en infecciones crónicas y en enfermedades inflamatorias crónicas (3). Los patrones c-ANCA y c-ANCA atípico pueden confundirse. La presencia de anticuerpos anti-PR3 puede muchas veces distinguir un paciente con granulomatosis de Wegener de pacientes con enfermedad intestinal crónica u otras enfermedades autoinmunes (3). La fijación con formalina produce un entrecruzamiento de los antígenos con otras proteínas citoplasmáticas impidiendo su migración. (4, 5). Idealmente se recomienda la detección conjunta de ANCA por inmunofluorescencia

indirecta y la presencia de anticuerpos para cada uno de los antígenos involucrados. Su determinación conjunta aumenta la sensibilidad y especificidad de la prueba. (5, 6). Se sugiere también la detección de anticuerpos anti-nucleares (AAN) por IFI que pudieran enmascarar un patrón p-ANCA.

El método de inmunofluorescencia para la detección de ANCA es una técnica cuyos resultados son, en cierta medida, subjetivos. Un factor importante que incide en los resultados es la calidad de las improntas para la identificación de cada uno de los patrones, lo que es motivo de discusiones y controversias entre distintos expertos del área (7). La variabilidad en los patrones de ANCA no necesariamente se debe a una mala interpretación del observador sino que puede deberse a otros factores técnicos (7).

Cabe destacar que la evaluación de la presencia de ANCA no debe realizarse

de rutina sino que debe estar acompañada de la evaluación clínica. En algunos casos donde el diagnóstico es dificultoso, la evaluación debe realizarse junto con una biopsia del tejido involucrado (1). Teniendo en cuenta lo anterior los objetivos de este trabajo fueron:

- Comparar los resultados obtenidos con distintas marcas comerciales disponibles de improntas para la detección de anticuerpos anti-citoplasma de neutrófilos (ANCA).
- Evaluar el grado de concordancia entre distintos operadores y entre las distintas marcas de improntas.
- Evaluar el grado de concordancia entre las distintas marcas de improntas con la determinación de Mieloperoxidasa (MPO) y Proteinasa 3 (PR3) por ELISA.

Materiales y métodos

Se utilizaron muestras de pacien-

tes tomadas al azar y deidentificadas. Cada una de las muestras fue analizada por inmunofluorescencia indirecta para la detección de anticuerpos anti-citoplasma de neutrófilos fijados con etanol y con formalina. Se utilizaron dos marcas de improntas: INOVA e IMMCO. Esta última en dos presentaciones: una en la que los neutrófilos fijados con etanol y formalina se encuentran en el mismo portaobjetos (IMMCO DOBLE) y otra en la que se encuentra en portaobjetos separados (IMMCO SIMPLE). Como conjugado se utilizó un antisuero de cabra anti-inmunoglobulina humana total marcada con isotiocianato de fluoresceína (FITC, Biocientífica) en una dilución 1/250 en PBS. Las muestras (n=17) se procesaron en una dilución 1/20 en PBS (Laboratorio IFI). Además, en cada una de las muestras se evaluó la presencia de anticuerpos antinucleares (AAN) que pudieran enmascarar un patrón p-ANCA.

Los ANA se evaluaron en impron-

BD Vacutainer® Líder en Soluciones Preanalíticas

El sistema BD Vacutainer® ha sido especialmente diseñado con el fin de asegurar el máximo confort para el paciente y brindar los estándares más altos en bioseguridad, tanto para el paciente como para el personal sanitario.



Para contactarse, llámenos al: 0800-444-55BD (23)
o escribanos a: vacutainer@bd.com

tas de células Hep2000 (Immunoconcepts) empleando un antisuero de cabra anti-inmunoglobulina G humana marcada con FITC. Los sueros se procesaron en una dilución 1/80. Las muestras fueron observadas e interpretadas por 3 operadores diferentes. Un cuarto operador procesó las muestras en orden diferente para cada una de las tres marcas evaluadas. La observación de los ANCA se realizó en un microscopio de fluorescencia con lámpara LED PRIMO STAR (Zeiss).

La determinación de MPO y PR3 se realizó mediante dos ELISAs comerciales (Orgentec) siguiendo las indicaciones del fabricante.

Junto con las muestras analizadas para el trabajo también se procesaron controles de calidad positivos y negativos.

Resultados y discusión

A partir de las muestras analizadas (n= 17) se obtuvo un 53% de concordancia entre los operadores y las distintas marcas de improntas comerciales utilizadas.

Las tres marcas coincidieron en el patrón observado (c-ANCA, p-ANCA, negativo o indeterminado) en el operador 1 en un 71% (12/17), en el operador 2 en un 59% (10/17) y en el operador 3 en un 76% (13/17). En aquellas muestras en las que no hubo coincidencia entre las 3 marcas (ya sea en el patrón o en el operador) se obtuvieron los resultados que se especifican en la Tabla 1. Con las improntas IMMCO SIMPLE la observación fue más dificultosa debido a una baja relación citoplasma: núcleo, observándose también mayor fluorescencia inespecífica. Teniendo en cuenta aquellas muestras donde hubo coincidencia entre los 3 operadores se evaluó si coincidían los patrones de ANCA observados con el antígeno MPO o PR3 (Tabla 2). Como se mencionó anteriormente el patrón p-ANCA se debe a la presencia de anticuerpos anti-MPO principalmente y el patrón c-ANCA debido a los anticuerpos anti-PR3. En aquellas muestras donde hubo coincidencia entre los tres operadores y las tres marcas de improntas (6/9, 67%) se mantuvo la relación

MPO – p-ANCA y PR3-c-ANCA. En una de ellas se observó un patrón p-ANCA pero no se detectó la presencia de anticuerpos anti-MPO ni anti-PR3 lo cual puede deberse a la presencia de anticuerpos anti-lactoferrina, catepsina G o BPI los cuales no fueron evaluados. En una muestra no se observó ningún patrón p- o c-ANCA pero si se detectaron anticuerpos anti-PR3 lo cual podría deberse a pequeñas diferencias en la especificidad y sensibilidad entre IFI y ELISA. Como conclusión final del trabajo se recomienda la sucesiva determinación de ANCA en el mismo laboratorio debido a la variabilidad interobservador como así también la utilización de la misma marca de improntas para evitar variabilidad debido a cambios en las mismas.



Tabla 2: Resultados de MPO y PR3

	MPO (U/mL)	PR3 (U/mL)	ANCA
1	0,7	83,7	C++
2	1,9	0,9	NEG
3	2,6	1,4	P+
4	38,4	0,6	P++
5	3,1	0,5	NEG
6	2,7	83,8	C++
7	5,5	52,3	NEG
8	2	3	NEG
9	NR	NR	NEG

Valor de corte: mayor o igual 5 U/ml

NR: no realizado (control PBS)



Tabla 1: Resultados de ANCA discrepantes obtenidos con las diferentes marcas de improntas y operadores

MUESTRA	OPERADOR 1			OPERADOR 2			OPERADOR 3		
	INOVA	IMMCO DOBLE	IMMCO SIMPLE	INOVA	IMMCO DOBLE	IMMCO SIMPLE	INOVA	IMMCO DOBLE	IMMCO SIMPLE
1	P+	INDET	P+	INDET	NEG	INDET	P+	NEG	P+
2	C+++	C+++	P++	C+++	C+++	P+++	C+++	C++	INDET
3	NEG	NEG	NEG	INDET	INDET	INDET	NEG	NEG	NEG
4	C+	C+	P++	INDET	C++	P++	INDET	C+	P+
5	P++	P++	P++	INDET	P++	INDET	P++	P+	P++
6	C+++	C+	NEG	C+++	C+++	NEG	C+++	C++	C+
7	NEG	NEG	NEG	NEG	C+	NEG	NEG	NEG	NEG
8	P++	NEG	NEG	INDET	NEG	NEG	P+	NEG	NEG

INDET: Indeterminado (imagen no concluyente). C: c- ANCA . P: p-ANCA. Las cruces corresponden a la intensidad de fluorescencia

Bibliografía

- 1-McLaren, J.S., Stimson, R.H., McRorie, E.R., Coia, J.E., Luqmani, R.A. The diagnostic value of antineutrophil cytoplasmic antibody testing in a routine clinical setting. Q. J. Med. 2000, 94: 615-621.
- 2-Schönermarck, U., Lamprecht, P., Csernok, E., Gross, W.L. Prevalence and spectrum of rheumatic diseases associated with proteinase 3 antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) myeloperoxidase-ANCA. Rheumatology 2001, 40: 178-184.
- 3-Savige, J., Dimech, W., Fritzier, M., Goeken, J., Hagen, C., Jannette, C., McEvoy, R., Pusey, C., Pollock, W., Trevisin, M., Wong, R. Addendum to the international consensus statement on testing and reporting of anti-neutrophil cytoplasmic antibodies. Quality control guidelines, Comments and Recommendations for testing in other autoimmune diseases. Am. J. Clin. Pathol. 2003, 120: 312-318.
- 4-Savige, J., Davies, D., Falk, R., Jannette, C., Wiik, A. Antineutrophil cytoplasmic antibodies and associated diseases: A review of the clinical and laboratory features. Kidney Int., 2000, 57: 846-862.
- 5-Hughes, R.G., Surmacz, M.J., Karim, A.R., Bradwell, A.R. (2008). Atlas of Tissue Autoantibodies. 3rd Ed. The Binding Site Ltd.
- 6-Vassilopoulos, D., Niles, J., Villa Forte, A., Arroliga, A. Sullivan, E., Merkel, P., Hoffman, G. Prevalence of antineutrophil cytoplasmic antibodies in patients with various pulmonary diseases or multiorgan dysfunction. Arthritis and Rheumatism (Arthritis Care & Research), 2003, 49 (2): 151-155.
- 7-Pollock, W., Clarke, K., Gallagher, K., Hall, J., Luckhurst, E., McEvoy, R., Melny, J., Neil, J., Nikoloutsopoulos, A, Thompson, T., Trevisin, M., Savige, J. Immunofluorescent patterns produced by antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) vary depending on neutrophil substrate and conjugate. J. Clin. Pathol. 2002, 55: 680-683.

