

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUÍMICAS
INSTITUTO DE SERVICIOS DE LABORATORIO DE DIAGNOSTICO E
INVESTIGACIÓN EN SALUD (SELADIS)**



**ANTICUERPOS ANTICITOPLASMA DE NEUTROFILO (ANCA) EN PACIENTES
CON ENFERMEDADES AUTOINMUNES**

ELABORADO POR : VERÓNICA ESTELA SARMIENTO QUISPE

ASESORA: Mrs. JACQUELINE CALLA DE MAGARIÑOS

**Trabajo de Especialidad para optar al Grado de Especialidad en
Diagnostico de Laboratorio : Mención Inmunología**

**LA PAZ BOLIVIA
2015**

INDICE

CONTENIDO	PAGINA
Resumen	
1. Introducción.....	1
2. Marco Teórico	4
2.1 Generalidades	4
2.2 Etiología de las enfermedades autoinmunes	4
2.3 Patogénesis autoinmune	4
2.4 Vasculitis	5
2.4.1 Clasificación	5
2.4.2 Etiología de las Vasculitis	6
2.4.3 Fisiopatología	7
2.4.4 Manifestaciones clínicas	8
2.4.5 Manifestaciones clínicas cutáneas	9
2.4.6 Síndromes Vasculíticos.....	9
2.4.6.1. Arteritis Temporal	9
2.4.6.2. Poliarteritis Nodosa	9
2.4.6.3. Poliangeitis Microscópica	10
2.4.6.4. Granulomatosis de Wegener	10
2.4.6.5. Vasculitis Granulomatosa y Alergica de Churg Strauss.	11
2.4.6.6. Vasculitis por Hipersensibilidad cutanea.....	11
2.4.7 Aproximación Diagnostica de las Vasculitis	12
2.5 Glomerulonefritis	14
2.5.1 Fisiopatología de la Glomerulonefritis	14
2.5.2 Glomerulonefritis Rápidamente Progresiva	15
2.5.3 Clasificación de las GNRP	15
2.5.4 Diagnóstico	17
2.5.5 Factores de Mal pronostico	17
2.6 Métodos de Diagnóstico	17
2.6.1 Técnicas empleadas en la detección de ANCA	17
2.6.2 Anticuerpos Anticitoplasma de Neutrofilo	18

2.6.3 Exámenes generales básicos de Laboratorio	23
3. Antecedentes	27
4. Planteamiento del Problema	32
5. Justificación	33
6. Pregunta de Investigación	34
7. Objetivos	35
8. Diseño de la Investigación	36
8.1 Aislamiento de Polimorfonucleares	38
8.2 Estandarización del ensayo Inmunoenzimático	39
8.2.1 Fijación de células en fase dolidas	39
8.2.2 Procedimiento del Ensayo Inmunoenzimático	40
8.2.3 Interpretación de Resultados ELISA estandarizado	40
8.2.4 Control de calidad ELISA estandarizado	40
8.3 Estandarización del Ensayo de Inmunofluorescencia Indirecta IFI ...	40
8.3.1 Preparación de Sustrato	40
8.3.2 Interpretación de Resultados IFI estandarizado	41
8.3.3 Control de calidad ELISA estandarizado	41
9. Resultados	42
9.1 Estandarización de la Prueba Inmunoenzimática ELISA	43
9.1.1. Aislamiento de Polimorfonucleares	43
9.1.2. Ensayo Inmunoenzimático ELISA	44
9.1.3 Evaluación de la prueba Inmunoenzimática ELISA	45
9.1.3.1 Determinación del punto de corte	45
9.1.3.2 Determinación de la Sensibilidad y Especificidad diagnóstica de la prueba estandarizada ELISA	46
9.1.3.3 Prueba Inmunoenzimática de Referencia	46
9.2. Estandarización de la Prueba de Inmunofluorescencia Indirecta ...	47
9.2.1 Aislamiento de Polimorfonucleares	47
9.2.2 Titulación del Conjugado fluoresceinado	47
9.2.3 Determinación de la Sensibilidad y Especificidad Diagnóstica de la prueba Estandarizada IFI	48
9.2.4 Prueba de Inmunofluorescencia Indirecta de Referencia	48
9.2.5 Correlación de la prueba IFI estandarizado y la prueba	

de referencia IFI	49
9.2.6 Determinación de la Sensibilidad y Especificidad Diagnóstica de las Pruebas estandarizadas IFI y ELISA.....	49
9.3. Correlaciones	50
9.3.1 Correlaciones de la prueba ELISA estandarizada con diversos parámetros laboratoriales	50
9.3.2 Correlaciones prueba Inmunofluorescencia Indirecta estandarizada con diversos parámetros laboratoriales.....	53
10. Discusiones	55
11. Conclusiones	61

Recomendaciones

Bibliografía

Anexos

INDICE DE CUADROS

CONTENIDO	PAGINA
Cuadro N° 1	
Clasificación de Vasculitis	6
Cuadro N° 2	
Relación de Autoanticuerpos con enfermedades autoinmunes	25

INDICE DE FIGURAS

CONTENIDO	PAGINA
Figura N° 1	
Mecanismo de Acción de los ANCA sobre los Leucocitos Polimorfonucleares	20
Figura N° 2	
Acción de los ANCA en el endotelio vascular	22

INDICE DE TABLAS

CONTENIDO	PAGINA
Tabla N° 1 Concentración óptima de Polimorfonucleares para el ensayo ELISA ...	44
Tabla N° 2 Promedio y DS de Absorvancias de muestras procesadas de pacientes positivos, negativos y controles normales	45
Tabla N° 3 Resumen Parámetros estadísticos de la Prueba ELISA estandarizada y la prueba de referencia para la detección de ANCA	47
Tabla N° 4 Titulación del Conjugado anti-Ig humana FITC sobre PMN	48
Tabla N° 5 Resumen Parámetros estadísticos de la Prueba IFI estandarizados para la detección de ANCA total	49
Tabla N° 6 Correlación de la Prueba IFI estandarizada y la Prueba IFI de referencia..	50
Tabla N° 7 Resumen Parámetros estadísticos de las pruebas estandarizadas IFI y ELISA para la detección de ANCA total	50
Tabla N° 8 Índice de correlación de las pruebas estandarizadas IFI y ELISA con los diferentes parámetros bioquímicos medidos en cada paciente.....	55

INDICE DE GRAFICOS

CONTENIDO	PAGINA
Grafico N° 1	
Distribución de frecuencia de acuerdo a la edad	42
Grafico N° 2	
Distribución de frecuencia de acuerdo al Diagnostico	42
Grafico N° 3	
Distribución de frecuencia de acuerdo al lugar de Nacimiento	43
Grafico N° 4	
Distribución de Frecuencia de acuerdo al Domicilio actual	43
Grafico N° 5	
Concentración óptima de PMN para el ensayo ELISA estandarizado.....	44
Grafico N° 6	
Cuadro de dispersión de Absorvancias de Pacientes Positivos, Negativos, y controles normales	45
Grafico N° 7	
Diagrama de cajas para las absorvancias de muestras de controles positivos, negativos y controles aparentemente sanos	46
Grafico N° 8	
Curva ROC para la determinación del punto de corte de la prueba estandarizada ELISA	46
Grafico N° 9	
Correlación entre las Absorvancias de la Prueba estandarizada	

ELISA y el Hematocrito de cada paciente.....	51
Grafico N° 10	
Correlación entre las Absorvancias de la Prueba estandarizada ELISA y la determinación de Creatinina en cada paciente.....	52
Grafico N° 11	
Correlación entre las Absorvancias de la Prueba estandarizada ELISA y la determinación de Proteinuria en cada paciente.....	52
Grafico N° 12	
Correlación entre las Absorvancias de la Prueba estandarizada ELISA y la Cuantificación de la fracción C3 del complemento en cada paciente	53
Grafico N° 13	
Correlación entre las Absorvancias de la Prueba estandarizada ELISA y la Prueba Anti – MPO ELISA en cada paciente	53
Grafico N° 14	
Correlación entre las Absorvancias de la Prueba estandarizada ELISA y la determinación de Anti – PR3 en cada paciente	54

RESUMEN

La afección renal es una complicación característica frecuente y grave de las enfermedades autoinmunes principalmente del Lupus Eritematoso Sistémico, junto a ellas se asocian los anticuerpos anticitoplasma de neutrofilo (ANCA) por la masiva presencia de los neutrófilos en la destrucción glomerular, constituyéndose un indicador diagnóstico de diversas vasculitis sistémicas.

El diagnostico se realiza mediante Inmunofluorescencia Indirecta y Ensayo Inmunoenzimatico, la disponibilidad de estas pruebas representan un alto costo económico para los pacientes que la requieren, por lo que nuestro trabajo tuvo por objetivo determinar ANCA total en pacientes con enfermedades autoinmunes a través de la estandarización de estos dos métodos, utilizando como prueba de referencia al kit comercial (Binding Site) y la historia clínica de los pacientes.

La población estudiada fue de 142 de los cuales 99 pacientes acudieron al hospital de Clínicas de la Ciudad de La Paz durante el periodo de 2002 - 2003, y paralelamente a ellos se estudió a 43 pacientes aparentemente sanos como controles.

La estandarización del IFI y ELISA se realizó en base a los métodos de referencia donde el sustrato fueron células Polimorfonucleares a una concentración óptima de 3.7×10^6 y 3.4×10^4 cel/ml respectivamente. Se obtuvo una sensibilidad de 76 % y especificidad 96 % para el método IFI. Para el ELISA la sensibilidad fue 87% y la especificidad y 91 %

Ambas pruebas estandarizadas fueron correlacionadas con la historia clínica y otras pruebas laboratoriales realizadas en cada paciente, estableciendo así la calidad analítica de los 2 métodos.

En conclusión las pruebas estandarizadas IFI y ELISA emplean reactivos propios, son estadísticamente significativos ya que demostraron tener una elevada sensibilidad y especificidad para detectar ANCA total, lo que permite una aplicación de la clínica médica para el estudio de vasculitis sistémicas principalmente asociadas a enfermedades autoinmunes.

1. INTRODUCCION

Las enfermedades autoinmunitarias se caracterizan por fenómenos autoinmunitarios, de los cuales los que son más fáciles de identificar son aquellos en los que existe producción de anticuerpos contra antígenos propios. (32)

La vasculitis es un síndrome que se presenta en enfermedades autoinmunitarias y que tiene un espectro de características clinicopatológicas afectando a vasos renales y glomérulos con un componente común y esencial, una reacción inflamatoria en las paredes vasculares que lleva a isquemia de los tejidos irrigados. Un número creciente de datos señala la patogénesis inmunitaria de las lesiones vasculares, en particular depósitos de complejos inmunes circulantes que desencadena el proceso inflamatorio a través de mediadores humorales y celulares. Varias vasculitis. (2,5)

Dentro del grupo de las vasculitis existe un importante grupo de enfermedades de afección no exclusivamente renal que se caracteriza por necrosis glomerular segmentaria y focal, proliferación de células epiteliales en forma de semilunas o *crescents* e infiltración de células inflamatorias periféricas fundamentalmente neutrófilos donde estas entidades cursan con la presencia en el suero de anticuerpos anticitoplasma de neutrófilo. Destacan entre ellas la granulomatosis de Wegener (GW) y la Poliangeitis microscópica (PAM) así como la glomerulonefritis rápidamente progresiva (GNRP).

La glomerulonefritis rápidamente progresiva (GNRP) es infrecuente. Se suele ignorar su patogenia y las causas inmediatas son diversas. Los estudios de inmunofluorescencia y biopsia permiten clasificar este proceso, aunque en algunos casos los datos de laboratorio sugieran más de un síndrome. (2)

Los ANCA reaccionan con diferentes proteínas de los gránulos azurófilos del neutrófilo, aparecen en general en pacientes con vasculitis y glomerulonefritis necrotizante.

La negatividad de los ANCA no excluye ninguno de los diagnósticos.

Los ANCA son marcadores útiles de la evolución de la enfermedad ya que:

- En la granulomatosis de Wegener el patrón es C-ANCA y pueden detectarse en más de un 90 % de pacientes con enfermedad activa.

- En las formas limitadas el porcentaje de positivos disminuye a un 60 - 70 %
- En los casos de remisión clínica baja a un 30 %
- La reducción de los niveles de ANCA también es importante cuando hay remisión inducida por el tratamiento; se producen nuevas elevaciones en las recidivas.
- Un pequeño porcentaje con LES tiene anticuerpos anti-Elastasa y sus sueros originan patrones P-ANCA en la Inmunofluorescencia sobre neutrófilos. (8,12)

Hasta ahora la técnica más común para la determinación de anticuerpos anticitoplasma de neutrófilo es el análisis por Inmunofluorescencia indirecta, donde el suero, se pone en contacto con la preparación de leucocitos polimorfonucleares previamente fijados con etanol o formalina e incubados con un anticuerpo secundario fluoresceinado, el cual es observado en un microscopio de fluorescencia. (1)

Por esta técnica se reconocen dos patrones de fluorescencia: **perinuclear (p-ANCA)**, **citoplasmático (c-ANCA)**.

El patrón **c-ANCA** corresponde con un alto porcentaje de fiabilidad al tipo de ANCA con especificidad PR-3 (ANCA PR-3). Sin embargo, el patrón pANCA es más difícil de clasificar, posiblemente coincidirá con el tipo ANCA anti-MPO, aunque no puede descartarse los casos de anti-BPI, anti-CATEPSINA G, anti-ELASTINA, etc.

En consecuencia y para discriminar exactamente el tipo ANCA con el que se pueda tratar en el laboratorio se debe recurrir a métodos de detección más precisos como lo es el test de ELISA que proporciona un alto grado de especificidad. Este método consiste en recubrir una placa con el antígeno de elección al cual se le añade la muestra de suero y tras varios lavados e incubación con un anticuerpo conjugado y una fase de revelado, podemos llegar a determinar con precisión la presencia o la ausencia del anticuerpo ANCA en el suero. (1)

En 1999 se realizó un estudio en nuestro medio con el propósito de obtener polimorfonucleares (PMN), sueros control positivos anticuerpos anticitoplasma de neutrófilo ANCA y conjugado para mejorar el diagnóstico de laboratorio.

La técnica utilizada para la evaluación de estos sueros fue la inmunofluorescencia indirecta IFI, para ello se planteó la observación de animales de experimentación, se aislaron polimorfonucleares (PMN) humanos por la técnica de gradiente de doble densidad, las cuales se inocularon en conejos. Se logró obtener anticuerpos

anticitoplasma de neutrófilo ANCA en un título 1:8 por inmunodifusión doble, y se emplearon como sustratos en la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI).

Además, se preparó el conjugado: anticuerpos de cordero antigamaglobulinas de conejo marcados con fluoresceína, el mismo que se purificó por cromatografía de exclusión molecular. Posteriormente se procedió a la titulación del anticuerpo y del conjugado. Se encontró que la titulación 1:5000 del conjugado obtenido es la que permite observar patrones granulares cuando se utiliza el antisuero en dilución 1:500. (39)

El presente trabajo de investigación fue dirigido a obtener reactivos primarios propios para la detección de ANCA estandarizando los métodos por Inmunofluorescencia Indirecta y ensayo inmunoenzimático en base a las recomendaciones y referencias que emite el Consenso Internacional de Métodos de Detección de ANCA, y usando como prueba de referencia el kit comercial (Binding Site) utilizados en el Instituto SELADIS.

La estandarización de los métodos presentan valores de sensibilidad y especificidad óptimos que demuestran ser una metodología eficiente y de bajo costo, (38) para los pacientes que acuden al Instituto SELADIS y además permite el análisis de un número considerable de muestras simultáneamente.

2. MARCO TEORICO

2.1 GENERALIDADES

Una de las propiedades fundamentales del sistema inmune, radica en la capacidad de discriminar entre antígenos propios y no propios. Es así, como los linfocitos maduros funcionalmente competentes son capaces de reconocer y responder a antígenos extraños, pero no pueden reconocer y/o responder a antígenos propios.

El sistema inmunitario presenta enorme diversidad y, como el repertorio de especificidades que expresan las células B y T se genera en forma aleatoria, puede incluir elementos con especificidad frente a determinados componentes propios. Por ello el organismo dispone de unos mecanismos e autotolerancia que le permiten diferenciar los determinantes propios de los ajenos y evitar así la autorreactividad. Sin embargo cualquier mecanismo puede fallar en un momento dado. Los mecanismos de reconocimiento de lo propio no constituyen una excepción a esta regla, y se conocen una serie de enfermedades debidas a fenómenos autoinmunitarios en las que se producen cantidades masivas de autoanticuerpos y células T autorreactivas. (32)

2.2 ETIOLOGÍA DE LAS ENFERMEDADES AUTOINMUNES

Pese a la complejidad de selección que inducen la autotolerancia durante el proceso de desarrollo de los linfocitos, el organismo contiene una gran cantidad de linfocitos potencialmente autorreactivos. Este es el caso de las células T tímicas (timocitos) que no son eliminadas por algún subconjunto de péptido propios (epitopes propios). Normalmente los CPA tímicos portadores de un epítape propio promueven la selección negativa que da lugar a la destrucción de las células T autorreactivas. Sin embargo existen algunas epitopes crípticos propios que aparecen en las células presentadoras de antígeno (CPA) a concentraciones relativamente bajas, porque no son procesados eficazmente y/o porque presentan baja afinidad por los surcos de las moléculas Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH), por lo que no son capaces e inducir tolerancia en las células T autorreactivas. (33)

2.3 PATOGÉNESIS AUTOINMUNE

Los procesos autoinmunitarios suelen ser patogénicos. Cuando se detectan autoanticuerpos asociados a una determinada enfermedad posible que:

- El proceso autoinmunitario sea causante de las lesiones a través de varios mecanismos efectores como :
 - * Lisis mediada por complemento de las células en las que se halle el antígeno
 - * Formación de complejos inmunes circulantes con el antígeno, depositados en diferentes órganos.
- Los autoanticuerpos se produzcan como respuesta a los auto antígenos liberados como consecuencia de las lesiones tisulares que provoca la enfermedad.
- Exista algún factor que provoque al mismo tiempo las lesiones y la autoinmunidad

Se desconocen los mecanismos etiológicos de las enfermedades autoinmunitarias, y no existe una opinión unánime en relación a las causas que puedan ser más probables. (32)

2.4 VASCULITIS

Las vasculitis son un grupo heterogéneo de enfermedades que se caracterizan por inflamación en la pared de los vasos sanguíneos y un espectro amplio de manifestaciones clínicas derivadas fundamentalmente de la isquemia tisular y la necrosis. El daño vascular puede ser un proceso primario o puede estar asociado a otra entidad, como enfermedades del tejido conectivo o autoinmunes, infecciones y neoplasias. La localización de los vasos afectados, su tamaño y los hallazgos histopatológicos constituyen características diferenciales que definen a los diferentes síndromes vasculíticos, aunque las superposiciones son frecuentes. El diagnóstico debe sospecharse en pacientes con sintomatología general asociadas con disfunción de uno o varios órganos. Entre los hallazgos habituales se incluyen fiebre, afectación del estado general, artralgias, dolor abdominal, hipertensión arterial, insuficiencia renal con sedimento urinario patológico o enfermedad neurológica. Algunas manifestaciones clínicas son muy sugestivas de vasculitis, como la púrpura palpable, la mononeuritis múltiple , o la combinación de enfermedad pulmonar y renal. (8,35)

Se conoce como vasculitis sistémicas a un amplio número de entidades clínicas de etiología desconocida que clínicamente se caracterizan por su capacidad de afectar,

múltiples órganos, produciendo cuadros multisistémicos, presentándose como vasculopatías inflamatorias. (8)

2.4.1 CLASIFICACION

Las clasificaciones de las vasculitis se basan principalmente en criterios morfológicos como el tamaño de los vasos afectados o el tipo de infiltrado inflamatorio (granulocítico o linfomonocitario). No existe la clasificación ideal. La heterogeneidad entre los diversos síndromes, su solapamiento clínico-patológico y la ausencia de un agente etiológico reconocido en la mayoría de ellos, ha dificultado un consenso generalizado para su clasificación. La clasificación más extendida en la actualidad es la adoptada en la Conferencia de Consenso de Chapel Hill (CCCH) en 1994, que diferencia los diversos síndromes vasculíticos según el tamaño del vaso lesionado. Las conclusiones más importantes de la CCCH son la definición de una nomenclatura estandarizada, y la aceptación de la poliangeítis microscópica (PAM) como entidad distinta y delimitada de la PAN clásica y de la enfermedad de Wegener. Esta clasificación se refiere exclusivamente a 10 tipos de vasculitis y no reconoce la existencia de vasculitis secundarias. (8.12)

Cuadro N° 1 Clasificación de Vasculitis (12)

<p>Vasculitis de vasos pequeños (vénulas, capilares y arteriolas).</p> <ul style="list-style-type: none"> • Granulomatosis de Wegener • Síndrome de Churg-Strauss • Poliangeítis microscópica. • Vasculitis cutánea leucocitoclástica • Púrpura de Schönlein-Henoch. • Crioglobulinemia mixta esencial 	<p>Vasculitis de grandes vasos (aorta y sus ramas principales)</p> <ul style="list-style-type: none"> • Arteritis de células gigantes • Arteritis de Takayasu <p>Otras Vasculitis</p> <ul style="list-style-type: none"> • Tromboangeítis obliterante (enfermedad de Buerger). • Enfermedad de Cogan. • Vasculitis aislada del sistema nervioso central. • Enfermedad de Behçet.
<p>Vasculitis de vasos de calibre mediano (arterias viscerales principales).</p> <ul style="list-style-type: none"> • Poliarteritis nodosa clásica (PAN). • Enfermedad de Kawasaki. 	

2.4.2 ETIOLOGÍA DE LAS VASCULITIS

La etiología es desconocida y los mecanismos que conducen a la lesión son diversos. Se han implicado distintos agentes etiológicos como infecciones, fármacos (vasculitis por hipersensibilidad) y otros factores ambientales. Entre las infecciones que pueden causar vasculitis se incluyen enfermedades bacterianas (mycobacterias, neisseria, rickettsias, espiroquetas), fúngicas (aspergillus, cándidas) y víricas (virus de la hepatitis B y panarteritis nodosa, hepatitis C y crioglobulinemia mixta, parvovirus B19, varicela zóster, citomegalovirus, VIH).

A diferencia de las vasculitis producidas por Neisserias sp o Rickettsias, en la mayoría de los casos no se conoce su causa. Se han identificado diversos agentes desencadenantes, por ejemplo:

- Virus: como el de la hepatitis B y C.
- Bacterias: Streptococos, Stafilococos, Treponema pallidum, Micoplasma pneumoniae.
- Fármacos. La mayoría actúa como hapteno, otras estimulan la formación de anticuerpos como la hidracina y la procainamida.
- Enfermedades asociadas: como neoplasias hematológicas y colagenosis.
- Es muy probable que los diversos agentes externos necesiten un fundamento genético en un individuo para desencadenar el cuadro vasculítico así por ejemplo, se ha asociado el HLA-DR4 con arteritis de células gigantes, el HLA-B2 con la Granulomatosis de Wegener. (7,8,12)

2.4.3 FISIOPATOLOGÍA

El mecanismo más frecuente de daño vascular consiste en el depósito de inmunocomplejos circulantes, fundamentalmente de tamaño intermedio, ya que los mayores son rápidamente aclarados por el sistema retículo endotelial y los menores no activan el complemento.

El depósito de inmunocomplejos en la pared vascular, activa el complemento (por eso se observa disminución del complemento en suero), provoca la atracción de polimorfonucleares y su activación, con la subsecuente liberación de enzimas lisosomales y mediadores químicos de inflamación que lesionarían la pared vascular.

Otros mecanismos implicados son la producción de anticuerpos anticitoplasma de los neutrófilos (ANCA), anticuerpos anticélula endotelial, y la respuesta inmunológica mediada por células T frente a antígenos presentes en la pared arterial. Sea cual sea la

etiología y patogenia, el resultado es la aparición de un infiltrado denso de leucocitos polimorfonucleares y células mononucleares. Estas células producen mediadores (citokinas y factores de crecimiento) capaces de perpetuar el proceso inflamatorio mediante la producción de factores quimiotácticos como IL-1, IL-4 y TNF-alfa, con la consiguiente aparición de manifestaciones sistémicas (pérdida de peso, fiebre) y oclusión vascular (por espasmo, trombosis, o proliferación de la íntima con fibrosis). En algunos casos puede añadirse el efecto de factores moduladores como hormonas sexuales (algunas vasculitis como la enfermedad de Takayasu afectan de manera preferente a mujeres en edad fértil) y el sustrato genético (asociación DRB1* arteritis temporal y HLA-B51- enfermedad de Behçet) (12)

Ocasionalmente los linfocitos pueden lesionar directamente al vaso, sin mediar la estirpe monocito-macrófago, bien mediante la actividad de las células natural killer, bien mediante la unión previa de autoanticuerpos a antígenos vasculares y de aquellos a receptores FC de los linfocitos.

Existen casos particulares de vasculitis en los que no parece estar implicada la desregulación del sistema inmune, ciertos tóxicos pueden desencadenar vasculitis células neoplásicas puede lesionar directamente la pared vascular.

2.4.4 MANIFESTACIONES CLINICAS

Existen diversas situaciones clínicas que hacen sospechar la presencia de una vasculitis sistémica como son:

- Fiebre de origen desconocido
- Cuadro de deterioro constitucional no explicado
- Evidencia clínica de afección multisistémica
- Fenómenos isquémicos, sobre todo en la edad media de la vida de los jóvenes
- Mononeuritis múltiples
- Púrpura palpable
- Glomerulonefritis rápidamente proliferativa

Estas se producen por daños isquémicos tisulares secundarios a la vasculitis bien por los fenómenos inflamatorios alrededor de los vasos afectados. Cuando el vaso ha sido dañado irreversiblemente se produce fenómenos cicatrizales, las manifestaciones de isquemia progresan, incluso tras controlarse adecuadamente la inflamación mediante el uso de glucocorticoides y citotóxico. (7)

2.4.5 MANIFESTACIONES CLINICO CUTÁNEAS

Las manifestaciones clínicas cutáneas de las vasculitis en la piel orientan hacia el diagnóstico, pero no son específicas de ninguna forma de vasculitis. Las manifestaciones más características son el desarrollo de purpura palpable y de nódulos, pero pueden observarse otras manifestaciones cutáneas tales como petequias, equimosis, máculas eritematosas, lesiones de urticaria, livedo reticulares, necrosis, úlceras, vesículas, pustulas, ampollas, lesiones a tipo *pioderma angrenoso*, lesiones de tipo eritema-nodoso y lesiones a tipo síndrome de Sweet. Las vasculitis con afectación de vasos pequeño calibre en la piel se manifiestan principalmente por la púrpura, que con frecuencia es palpable y afecta principalmente a extremidades inferiores.

La **púrpura** suele desarrollarse en brotes secuenciales, inicialmente son máculas de coloración rojiza, que evolucionan hacia **placas y pápulas**, que pueden ser desde unos milímetros hasta varios centímetros de diámetro. Las lesiones más grandes son más equimóticas que purpúricas. El color puede evolucionar desde el rojo, purpúrico hasta parduzco, en relación a la evolución de la degradación de la sangre extravasada. Histológicamente la lesión aguda más frecuente es una vasculitis **neutrofilica leucocitoclastica**. En algunos pacientes, especialmente aquellos en los que la vasculitis mediada por inmunocomplejos se acompaña de una gran activación de complemento pueden dar lugar a focos de edema cutáneo que se manifiesta clínicamente por brotes de urticaria, que generalmente dura más de 24 horas, y evoluciona hacia lesiones purpúricas. (7)

2.4.6 SÍNDROMES VASCULITICOS

2.4.6.1 ARTERITIS TEMPORAL (VASCULITIS DE CELULAS GIGANTES)

La arteritis temporal es una forma de vasculitis que afecta a varias arterias de calibre mediano y gran calibre afectando especialmente a las rama extracraneales de la carótida. Afecta especialmente a personas mayores de 50 años, es de causa desconocida. Cursa con afectación segmentaria de los vasos con presencia de un infiltrado mononuclear linfocítico e histiocítico afectando especialmente a la capa media de las arterias.

Clínicamente se caracteriza por la asociación de fiebre, anemia, elevación de la velocidad de eritrosedimentación y cefaleas intensas. Las lesiones cutáneas son raras y consisten en el desarrollo de úlceras necróticas en el territorio temporal. (7)

2.4.6.2 POLIARTERITIS NODOSA (PAN)

Vasculitis sistémica en la que existe una vasculitis necrotizante de arterias de pequeño y mediano calibre, con marcada afectación renal y visceral. La afectación es segmentaria y tiene predilección por las zonas de bifurcación vascular. Afecta principalmente a varones de mediana edad. Con frecuencia asocia manifestaciones generales como fiebre, mal estado general, y pérdida de peso, afectación renal (principal causa de muerte), afectación neurológica periférica con un patrón de afectación de mononeuritis múltiple o polineuropatía, afectación cutánea incluyendo el desarrollo de nódulos cutáneos, lesiones de urticaria, no existe afectación de arterias pulmonares.

El origen de este síndrome es desconocido, se ha detectado antígenos de la hepatitis B en algunos casos, el hallazgo de inmunocomplejos depositados a nivel de la pared vascular diferencia a este síndrome de la poliangeitis microscópica. Los cambios histológicos consisten en una inflamación transmural pleomórfica con polimorfonucleares, necrosis fibrinoide, hemorragia y formación de aneurismas.

Existe una forma de poliarteritis nodosa limitada a la piel, de curso benigno, donde la afectación visceral está ausente, siendo las manifestaciones más frecuentes el desarrollo de nódulos cutáneos, livedo reticularis y ulceración cutánea. (7)

2.4.6.3 POLIANGEITIS MICROSCÓPICA

Forma de vasculitis necrotizante de pequeños vasos sin depósitos inmunes (o escasos) en los vasos afectados. Comparte muchas manifestaciones con la PAN, con vasculitis necrotizante de arterias de pequeño y mediano calibre, con afectación renal y desarrollo de glomerulonefritis, pero a diferencia de la PAN en la poliangeitis microscópica existe afectación pulmonar con capilaritis pulmonar y hemorragia. En estos pacientes es posible detectar la presencia de anticuerpos anticitoplasma de neutrófilo con patrón perinuclear (p-ANCA). Un 30 % de los pacientes tienen lesiones cutáneas en forma de púrpura palpable, hemorragias en astillas y úlceras cutáneas, localizadas preferentemente en miembros inferiores.(7)

2.4.6.4 GRANULOMATOSIS DE WEGENER (GW)

Consiste en la tríada clínica de **vasculitis granulomatosa** del tracto superior e inferior, glomerulonefritis y grados variables de vasculitis de pequeño vaso. Los pacientes con GW generalmente presentan síntomas de vías respiratorias superiores, frecuentemente sinusitis, obstrucción y perforación nasal que puede dar lugar a una deformidad en silla de

montar. Otros síntomas frecuentes incluyen otitis media, dolor de oído y disminución de la capacidad auditiva. La afectación cutánea está presente en menos de la mitad e los pacientes en forma de púrpura palpable, úlceras o nódulos cutáneas.

Histológicamente se caracteriza por la presencia de vasculitis de pequeños vasos con la presencia granulomas intra y extra vasculares.

La mayoría de los cambios analíticos de la granulomatosis de Wegener son inespecíficos con elevación de la velocidad de eritrosedimentación, anemia, trombocitosis, y ocasionalmente leucocitosis. El marcador serológico característico de esta enfermedad, es el hallazgo de anticuerpos anticitoplasma de neutrófilo ANCA, estos anticuerpos se han detectado en varias enfermedades pero en la GW tiene importancia para el diagnóstico y seguimiento de los enfermos importante porque puede deberse a la activación de los neutrófilos que contribuyen al daño vascular. (7)

2.4.6.5. VASCULITIS GRANULOMATOSA Y ALERGICA DE CHURG STRAUSS

Vasculitis granulomatosa con afectación de múltiples órganos, especialmente el pulmón que se caracteriza por afectar a vasos de tamaños variables con formación de granulomas intra y extra vasculares, con intensa presencia de eosinófilos en el infiltrado y por afectar a pacientes con historia de asma, atopia y eosinofilia periférica. Este síndrome esta considerado resultado de una proliferación de linfocitos CD4, Th2 estimulada por diversos alergenios inhalados, vacunas, fármacos, infecciones. Los linfocitos Th2 producen interleucina 5 que estimula a los eosinófilos que producen daño tisular.

Suele asociar sintomatología sistémica con fiebre, mal estado general, y pérdida de peso. La manifestación clínica principal es el desarrollo e asma, que suele afectar a personas con antecedentes de atopia. Las crisis asmáticas se agravan con el curso de la enfermedad y suelen acompañarse de infiltrados pulmonares con alteraciones radiológicas. El 50 % de los pacientes mueren con afección cardiaca, el 70 % desarrollan lesiones cutáneas, en forma de nódulos, denominados granulomas extravasculares de Churg Strauss, como en otras enfermedades reumáticas. (7,9)

2.4.6.6 VASCULITIS POR HIPERSENSIBILIDAD O LEUCOCITOCLASTICA CUTÁNEA

El término de vasculitis leucocitoclastica o necrotizante cutánea engloba un grupo amplio y heterogéneo de síndromes que se caracterizan por la inflamación, mediada por inmunocomplejos de vasos capilares, vénulas y ocasionalmente arteriolas cutáneas, con

cambios histológicos que se describen bajo el término de vasculitis leucocitoclástica (edema endotelial, infiltración por polimorfonucleares, cariorexis, hemorragia y trombosis). Las manifestaciones clínicas son dermatológicas, urticaria, eritema multiforme, y livedo reticularis.

Existen varias formas clínicas de este tipo de vasculitis que se pueden agrupar separadamente,. Cuando la vasculitis leucocitoclástica afecta a niños se describe como **Síndrome de Henoch-Schonlei**. Las lesiones clínicas son polimorfas, las más características son la púrpura palpable, pero pueden desarrollar pápulas, urticaria, angioedema vesicular, necrosis y livedo reticularis, estas lesiones afectan principalmente a miembros inferiores y glúteos, ocasionalmente pueden acompañar con fiebre, malestar, artralgias o mialgias, con frecuencia también asocian afección articular, gastrointestinal, muscular, de nervios periféricos, y renal. En general suele reservarse este síndrome para aquellos casos en que se demuestran la presencia de inmunocomplejos circulantes de clase IgA o la presencia de depósitos inmunes en piel de clase IgA. (9,13)

2.4.7. APROXIMACIÓN DIAGNÓSTICA A LAS VASCULITIS

HISTORIA CLÍNICA. Las manifestaciones clínicas que hacen sospechar la presencia de una vasculitis incluyen la presencia de púrpura palpable, mononeuritis múltiple, la combinación de enfermedad renal y pulmonar o enfermedad multiorgánica de origen incierto, la fiebre de origen desconocido, la cefalea de reciente comienzo en ancianos, el dolor abdominal de causa desconocida y los síntomas isquémicos en pacientes jóvenes. Hay que investigar la toma reciente de fármacos (posible causa de una vasculitis leucocitoclástica), historia de hepatitis (el virus de la hepatitis C es responsable de la mayoría de los casos de crioglobulinemia mixta y algunos casos de poliarteritis nodosa), y la existencia de datos clínicos o un diagnóstico previo de otra enfermedad que se asocie a las vasculitis (como conectivopatías o neoplasias). (8)

EXPLORACIÓN FÍSICA. Una exploración física cuidadosa es de gran ayuda para determinar la extensión de las lesiones vasculares y la distribución de los órganos afectados. Como se mencionó anteriormente, ciertos hallazgos como la mononeuritis múltiple o la púrpura palpable, son altamente sugestivos de la existencia de un proceso vasculítico subyacente. (24)

EXAMENES DE LABORATORIO. Son fundamentales en el diagnóstico de algunos tipos de vasculitis y para establecer qué órganos están afectados y el grado de afectación clínica. Entre las pruebas básicas se deben incluir: creatinina, enzimas musculares, estudios de función hepática, VSG, serología de hepatitis, sedimento urinario, radiología de tórax y electrocardiograma. En algunos casos es necesario añadir el estudio del líquido céfalo-raquídeo, estudios de imagen del sistema nervioso central, test de función pulmonar y cultivos microbiológicos. Además, se dispone de otros test más específicos de vasculitis que serán determinantes para el diagnóstico. Una prueba de anticuerpos antinucleares (ANA) positivo sugiere la presencia de una enfermedad del tejido conectivo subyacente, en particular lupus eritematoso sistémico. Se detectan niveles bajos de complemento en la crioglobulinemia y la vasculitis hipocomplementémica, pero a diferencia de las colagenopatías, la hipocomplementemia no aparece en la mayoría de las vasculitis. Por último, como también se ha comentado previamente, la presencia de ANCA dirigidos contra MPO o PR3 resulta de gran ayuda en el diagnóstico de granulomatosis de Wegener (90 por ciento cANCA/PR3 positivos), la poliangeitis microscópica (70 por ciento pANCA/MPO positivos) y el síndrome de Churg Strauss (60-75 % pANCA/MPO positivos).

BIOPSIA. Es la clave fundamental para el diagnóstico de una vasculitis. La biopsia se debe realizar en lugares clínicamente afectados; las biopsias "a ciegas" tienen escasa rentabilidad diagnóstica. Los hallazgos histológicos son necesarios para conocer el tipo de infiltrado inflamatorio, el grado de progresión de la enfermedad y para diferenciar las lesiones agudas de aquéllas debidas a daño vascular crónico. Todos estos factores son imprescindibles para plantear el tratamiento más adecuado. (24)

ARTERIOGRAFÍA. Es útil en caso de vasculitis de vasos grandes y medianos como la arteritis de Takayasu, la arteritis de células gigantes con afectación del arco aórtico o la poliangeitis nodosa. Los hallazgos no son en ningún caso patognomónicos, pero son de gran ayuda para apoyar el diagnóstico en combinación con otros datos clínicos. La angiografía de las arterias renal o mesentérica en la poliarteritis nodosa puede mostrar aneurismas, oclusión e irregularidades en la pared vascular. En pacientes con sospecha de padecer esta enfermedad en los que no se dispone de un área con evidencia clínica suficiente para obtener una biopsia, se debería realizar una arteriografía mesentérica,

especialmente en presencia de dolor abdominal. Por el contrario, la arteriografía carece de utilidad en las vasculitis de pequeño vaso como la poliangeítis microscópica. (24)

2.5 GLOMERULONEFRITIS

2.5.1 FISIOPATOLOGÍA DE LA GLOMERULONEFRITIS

La glomerulonefritis y nefritis tubulointersticial inducidas inmunitariamente, son causa de mas o menos la mitad de todos los casos de insuficiencia renal de etapa final, así como de mortalidad, morbilidad y gasto consecuente, las reacciones nefritógenas antígeno-anticuerpo, con mucha frecuencia originan de manera directa o indirecta depósitos de complejos inmunitarios glomerulares. La activación subsecuente de sistemas mediadores humorales y celulares ocasiona focos de inflamación glomerular.. estos daños inducidos por anticuerpos pueden restringirse a un tipo simple de célula renal, cuando participan los antígenos d superficie de dicha célula. También debe considerarse la activación inmunitaria de sistemas mediadores, como se supone que se produce en la lesión vasculítica relacionada con anticuerpos anticitoplasma de neutrófilo ANCA. (24)

Los depósitos inmunitarios se presentan cuando los anticuerpos nefritógenos reaccionan directamente con antígenos en los riñones Los principales antígenos nefritógenos están la membrana basal glomerular (MBG). Los anticuerpos también pueden reaccionar con antígenos no renales, a menudo exógenos, que han quedado atrapados en la MBG por mecanismos fisiológicos, inmunitarios o fisicoquímicos, como la reacción de las moléculas catiónicas con la pared capilar glomerular polianiónica. (1,4)

La **insuficiencia renal total o semitotal**, habitualmente se da por la inflamación aguda de los glomérulos cesa 10 a 15 días después y los riñones recuperan su función normal en la mayoría de los pacientes, en un lapso de varias semanas, sin embargo en ocasiones se destruyen muchos glomérulos mas allá de la posibilidad de recuperación y en un pequeño porcentaje de pacientes se instala un deterioro renal progresivo que continua indefinidamente, llegando a producirse una enfermedad crónica dañando también a los tubulos, la membrana basal se engruesa de manera progresiva y es invadida por tejido fibroso . En las etapas tardías de la enfermedad, la filtración glomerular se reduce en forma importante debido a la disminución el numero de capilares filtrantes en los glomérulos y también al engrosamiento de las membranas glomerulares. En las etapas finales de la enfermedad el tejido fibroso reemplaza a muchos glomérulos (5)

2.5.2 GLOMERULONEFRITIS RÁPIDAMENTE PROGRESIVA (GNRP)

Son entidades caracterizadas por el desarrollo rápido a menudo irreversible de insuficiencia renal asociada al desarrollo de lesiones glomeruloinflamatorias con predominio y proliferación extracapilar.

Las (GNRP) o extracapilares, engloban un conjunto de entidades clínico-patológicas, caracterizadas clínicamente por un descenso rápido y progresivo de la función renal, acompañado de proteinuria y de un sedimento nefrítico y desde el punto de vista anatomopatológico, por el hallazgo de semilunas en más del 50% de los glomérulos. Las semilunas están constituidas por una proliferación e infiltración circunferencial de células de aspecto epitelial que se disponen externamente al ovillo glomerular, en el espacio urinario de Bowman. Algunos pacientes pueden presentar asociada una glomerulonefritis (GN) necrotizante o GN proliferativa endocapilar difusa (1,4)

2.5.3. CLASIFICACIÓN DE LAS GNRP:

En la mayor parte de los casos son idiopáticas. Pueden ser primarias o secundarias, según que la afectación renal aparezca de forma aislada o el contexto de otra enfermedad o proceso patológico. A su vez, las formas primarias pueden aparecer aisladas (idiopáticas) o bien complicando a otra enfermedad glomerular primaria.

ENFERMEDAD GLOMERULAR PRIMARIA

- a. Aislada, no asociada a otra enfermedad glomerular : (5)
 - Tipo I, mediada por Anticuerpos anti-MBG, sin hemorragia pulmonar.
 - Tipo II, asociada a depósito de inmunocomplejos.
 - Tipo III, paucimune, con escasos depósitos de IgG y formación de ANCA.
- b. Asociada a otra enfermedad glomerular primaria :GN mesangiocapilar, fundamentalmente tipo II, GN membranosa, con o sin antiMBG, Nefropatía IgA, GN fibrilar e inmunotactóide, GN esclerosante focal (raro)

ENFERMEDAD GLOMERULAR SECUNDARIA

- Asociada a enfermedad infecciosa: GN postestreptocócica, endocarditis infecciosa, abscesos viscerales, hepatitis B y C, infección por mycoplasma, histoplasmosis, influenza.
- Asociada a enfermedad multisistémica LES, S. de Goodpature (con Ac antiMBG y hemorragia pulmonar), S. de Schönlein Henoch, Vasculitis : poliangeitis

microscópica, granulomatosis de Wegener, S. de Churg-Strauss, Crioglobulinemia mixta. Policondritis recidivante. Carcinomas: pulmón, vejiga, próstata. Linfomas.

- Asociada a fármacos: Alopurinol, rifampicina, D-penicilamina, hidralacina, enalapril y fenilbutazona. (5)

Atendiendo al modelo patogénico y forma de los depósitos se clasifican en :

Tipo I : Mediadas por anticuerpos antimembrana basal glomerular (Ac antiMBG). Presenta depósitos lineales de Ac tipo IgG sobre la MBG y en menor proporción sobre las membranas basales tubulares. Los Ac reaccionan frente a un Ag del extremo C-terminal de la cadena α_3 del colágeno IV .Representa el 6% de las GNRP. Puede asociar hemorragia pulmonar, en cuyo caso se denomina, Síndrome de Goodpasture. En éste se evidencian depósitos lineales de IgG en las membranas alveolares

Este tipo de GNRP puede también aparecer complicando a una GN membranosa o bien aparecer de novo en el postrasplante de pacientes diagnosticados de Síndrome de Alport.

Tipo II : Mediada por depósitos granulares de inmunocomplejos circulantes (CIC) o formados in situ. Estos CIC se depositan junto con complemento en el mesangio y otras áreas del ovillo glomerular. Asocian con frecuencia hipocomplementemia. Puede aparecer aislada o asociada a otras glomerulonefritis primarias, fundamentalmente nefropatía IgA, GN membranoproliferativa o fibrilar o bien secundaria a infecciones o enfermedades sistémicas, fundamentalmente púrpura de Schönlein Henoch, LES, artritis reumatoide, crioglobulinemia, hipertensión maligna o neoplasias. Constituye el 20% de las GNRP.

Tipo III : Se caracteriza por la ausencia de depósitos inmunes y la aparición de áreas de necrosis segmentaria y de ahí que también se denomine GN necrotizante pauciinmune que pueden asociarse ANCA. Existen formas ANCA positivas primarias, sin afectación sistémica, que se consideran una forma de vasculitis limitada al riñón. Las formas secundarias se asocian a vasculitis p-ANCA o c-ANCA como la poliangeitis microscópica, Síndrome de Churg-Strauss o Granulomatosis de Wegener, con claro predominio (4 :1) de asociación con las primeras. Constituyen el 70% de las GNRP.

2.5.4. DIAGNÓSTICO:

Se establece en base a la sospecha clínica en un paciente con disminución rápida y progresiva del filtrado glomerular, acompañada de proteinuria, generalmente no nefrótica, hematuria casi siempre microscópica con hematíes dismórficos y cilindros granulosos-hemáticos en el sedimento. Suele ir precedido de sintomatología inespecífica, cuadro

pseudogripal o síndrome constitucional. Con frecuencia existe oliguria. El hallazgo inmunológico de Anticuerpos anti-MBG, CIC o ANCA apoyan el diagnóstico que sólo se podrá establecer de forma definitiva mediante el estudio inmunohistológico. Estos marcadores inmunológicos orientan el diagnóstico de los distintos tipos de GNRP, pero no debemos olvidar que su sensibilidad y especificidad no es absoluta y que pueden coexistir en un mismo paciente. Un 30% de pacientes con enfermedad por Ac antiMBG, manifiestan positividad simultánea de ANCA, que parece contribuir a la lesión de la MBG. Han sido descritos solapamientos entre distintas formas de GNRP. (23)

2.5.5. FACTORES DE MAL PRONÓSTICO:

Insuficiencia renal avanzada en el momento del diagnóstico, (creatinina > de 6 mg/dl), oligoanuria, riñones disminuidos de tamaño en la ecografía, tipo de semiluna fibrosa, esclerosis glomerular en más del 25% de los glomérulos, extensa atrofia tubular y la marcada fibrosis intersticial. El valor de la extensión de las semilunas es más controvertido. El porcentaje de glomérulos con semilunas, tiene un valor pronóstico más limitado. La disrupción de la cápsula de Bowman, parece jugar un papel en la transformación fibrosa de las semilunas y por consiguiente en el pronóstico. También puede orientar el pronóstico el tipo de GN y la enfermedad sistémica subyacente. Los casos de positividad simultánea Ac antiMBG y ANCA, constituyen un subgrupo de peor pronóstico respecto a respuesta al tratamiento, recuperación de la función renal y mortalidad. (4,5,10)

2.6 METODOS DE DIAGNOSTICO

2.6.1 TÉCNICAS EMPLEADAS EN LA DETECCIÓN DE ANCA

Los métodos para la detección de ANCA han sido diversos desde que estos autoanticuerpos fueron descritos por primera vez en el año 1964. Estos métodos incluyen la Inmunofluorescencia Indirecta (IFI), el radioinmunoensayo (RIA), el ensayo inmunoenzimático (ELISA), Western blot, dot blot y la inmunoprecipitación.

La Inmunofluorescencia Indirecta fue la primera técnica empleada en la detección de ANCA. Originariamente su utilización se restringía a la detección de anticuerpos antinucleares (ANA), pero muy pronto se estandarizó la técnica para la observación de los patrones ANCA. Para su realización se aíslan los leucocitos polimorfonucleares de sangre mediante la técnica de gradiente de densidad, seguida de un bloqueo de las células con albúmina humana. Las células se han de fijar en etanol a 4°C, aunque hay laboratorios

que han empleado la formalina como fijador de polimorfonucleares. Si utilizamos etanol como método de fijación el resultado de la técnica nos presenta dos tipos de patrones de fluorescencia, el C-ANCA y el P-ANCA, que discrimina dos tipos de ANCA con especificidad por diferentes antígenos de los gránulos azurófilos de estas células. Durante la fijación en etanol, se rompe la membrana de los gránulos y las proteínas básicas (cargadas positivamente) son redistribuidas hacia el núcleo cargado negativamente. Sin embargo, la fijación en formalina evita la migración de las proteínas y no es posible distinguir ninguna diferencia entre un patrón C-ANCA y otro P-ANCA. En consecuencia, el desarrollo de un inmunoensayo que usa extractos de gránulos de leucocitos polimorfonucleares fue un gran adelanto en la mejora de la detección de los ANCA. Sin embargo, este ELISA detectaba ANCA tanto con especificidad para la PR3 como para otros antígenos presentes en estos gránulos como la MPO, la elastasa, etC. (1)

Lüdemann avanzó un paso más cuando construyó una columna de cromatografía de afinidad con anticuerpos ANCA de pacientes con GW para la separación de PR3 de leucocitos polimorfonucleares degranulados. A partir de este preparado de PR3 purificada pudo diseñar un nuevo ELISA más específico y más sensible y que detectaba exclusivamente ANCA con especificidad PR3. De igual modo, posteriormente, cuando se determinó que el antígeno del P-ANCA es sobre todo la MPO se ha utilizado este antígeno en la sensibilización de placas de ELISA y la detección de ANCA con especificidad MPO. En la actualidad, los ELISA se han convertido en técnicas muy útiles en la detección de ANCA.(1)

2.6.2 ANTICUERPOS ANTICITOPLASMA DE NEUTROFILO ANCA

Los ANCA son un grupo de autoanticuerpos fundamentalmente de tipo IgG que aparecen en pacientes con vasculitis sistémicas, fundamentalmente en las necrotizantes, en las que se consideran marcadores diagnósticos y signos para el seguimiento evolutivo. Tienen una prevalencia aproximada del 40% en las enfermedades reumáticas, fundamentalmente en las poliartritis con severa afectación vascular.

Los anticuerpos anticitoplasmáticos del neutrófilo son determinados por inmunofluorescencia Indirecta y muestran 3 patrones:

- (C-ANCA), citoplasmático
- (P-ANCA), perinuclear
- y atípico (X-ANCA).

Pueden ser de utilidad en el diagnóstico y evolución de la granulomatosis de Wegener y la poliarteritis microscópica, síndrome de Churg- Strauss, vasculitis sistémica y glomerulonefritis idiopática. El patrón atípico se ha encontrado en enfermedad inflamatoria intestinal, colitis ulcerativa, enfermedad de Crohn, colangitis esclerosante, LES, hepatitis autoinmune y lepra.

Los anticuerpos anticitoplasma de neutrófilo (ANCA) han sido descritos por Davies y colaboradores en 1982, y confirmados por Vander Woude en 1992, con una especificidad del 50 % en las fases iniciales y del 100% en la enfermedad generalizada, están involucradas en la patogénesis de diversas enfermedades caracterizadas por inflamación de las paredes vasculares con infiltración de neutrófilos y leucocitos mononucleares, en ellas se han incluido la granulomatosis de Wegener, la Poliangeitis Microscópica (PAM) y el síndrome de Churg-Strauss (CH-ST). (1,7,26)

En la actualidad, se han descrito como mínimo seis autoantígenos que servirían de diana. Todos ellos son proteínas presentes en las células del organismo humano que no generan respuestas inmunológicas en condiciones normales, pero que en ciertas condiciones podrían llegar a ser reconocidas como estructuras extrañas contra las que desarrollar una respuesta inmune. Se trata de enzimas azurófilas, algunos de ellos con una estructura homóloga y muy conservada. Se localizan en los gránulos azurófilos de los leucocitos polimorfonucleares, destacando las enzimas proteinasa-3 (PR-3) y mieloperoxidasa (MPO). (1)

La PR-3 también llamada p29 o mieloblastina, es una molécula de peso molecular aproximado de 29 kD. Posee una actividad enzimática hacia la elastina, la fibronectina y otras proteínas de la membrana basal como el colágeno de tipo IV y la laminina. También esta descrita su capacidad para procesar la interleukina-8 (IL-8), una citocina con capacidad quimioatrayente de leucocitos polimorfonucleares, a una forma quimiotácticamente más potente, y de romper la proteína hsp28.

La mieloperoxidasa es una proteína homodimérica con dos cadenas pesadas (58 kD) y dos ligeras (16 kD) con actividad peroxidasa.(1)

Diversos autores describieron estas proteínas como los antígenos diana de los ANCA en las dos principales vasculitis ANCA-asociadas que se conocen hasta ahora. Aquellas personas que sufren de GW poseen unos niveles elevados de ANCA anti-PR3. Por otro lado, los que sufren de PAM suelen presentar unos niveles séricos de ANCA anti-MPO anormalmente altos. Sin embargo, últimamente se han venido descubriendo la existencia

de ANCA con especificidad hacia otros antígenos presentes en el suero de enfermos con vasculitis. Estos antígenos son también enzimas azurófilas como la azurocidina, la catepsinaG, la elastasa o la proteína inductora de la permeabilidad bacteriana (BPI). Su presencia en el suero de estos pacientes todavía no está muy bien estudiada. (1)

La acción del ANCA sobre los leucocitos polimorfonucleares

Cuando se produce un fenómeno inflamatorio, como puede ser el asociado a una infección, los leucocitos polimorfonucleares (PMN) estimulados por linfoquinas de los macrófagos (IL-1, IL-6, IL-8, TNF) o productos bacterianos (LPS) se transforman en PMN activados. Como resultado de esta activación se produce una liberación extracelular de enzimas lisosómicos entre los que destacan la PR3 y la MPO. Estos enzimas antes de liberarse sufren un proceso de translocación desde los gránulos lisosomales hasta la superficie de la membrana celular. Si esto ocurre en presencia de ANCA se produce un proceso de amplificación de la activación leucocitaria comentada que se inicia con el reconocimiento del antígeno (PR3 o MPO) por parte del ANCA a través del fragmento Fab de este anticuerpo. Posteriormente el complejo antígeno-anticuerpo, que se forma en la superficie del neutrófilo, es internalizado y como consecuencia de ello se produce un gran proceso de estimulación por el cual se sintetizan y liberan gran cantidad de enzimas lisosómicos y de radicales libres oxígeno que tienen gran capacidad necrotizante y bactericida, y que iniciarán el daño endotelial. (1)

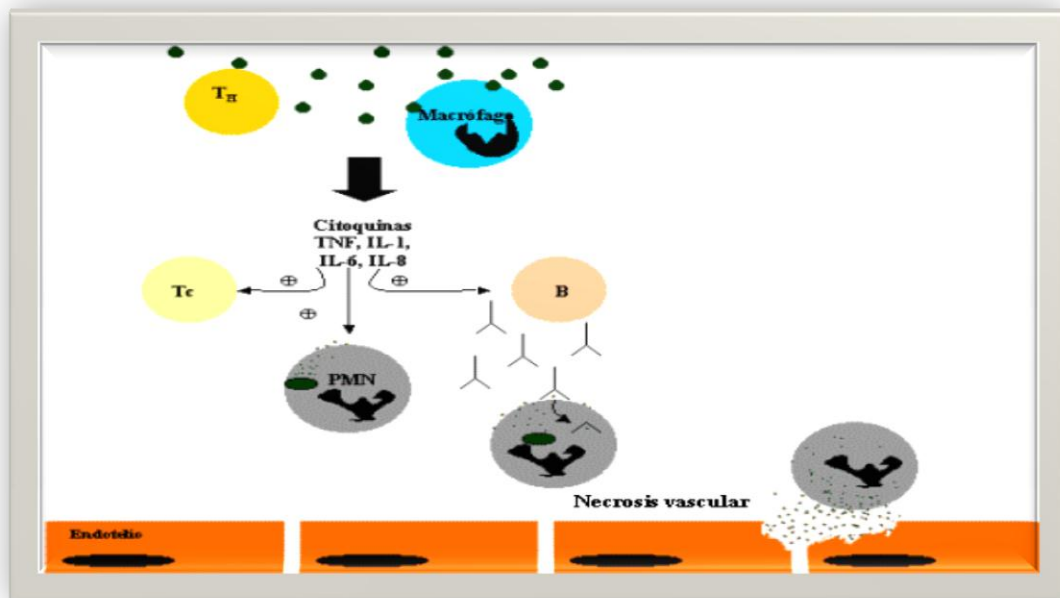


Figura N° 1 Mecanismo de acción de los ANCA sobre los leucocitos polimorfonucleares (1)

Activación endotelial. Acción del ANCA sobre el endotelio vascular

La célula endotelial no es un elemento pasivo sino una célula muy activa dentro del contexto del fenómeno inflamatorio propio de las vasculitis ANCA-asociadas. Su actividad radica en la liberación de citocinas capaces de atraer células implicadas en la respuesta inmune como macrófagos (vía MCP-1) o leucocitos polimorfonucleares (vía IL-8). Asimismo es capaz de responder a la presencia de citocinas séricas en el medio expresando moléculas de adhesión en su superficie celular, favoreciendo la infiltración leucocitaria. Finalmente parece posible que la célula endotelial pueda post-activarse en respuesta a la acción de los ANCA. Existen datos preliminares que demuestran que el ANCA con especificidad PR3 es capaz de inducir la sobreexpresión de moléculas de adhesión (E-selectina, ICAM-1, VCAM-1) en el ámbito de la célula endotelial. La diana que reconocen estos ANCA en la superficie endotelial, así como el mecanismo por el cual induce la expresión de estas moléculas de adhesión, es hasta ahora desconocido. Algunos autores postulan que el ANCA anti-PR3 reconoce la presencia de PR3 en la superficie de la célula, que en situaciones de previa activación por citocinas pasaría del citoplasma a la superficie de la célula ya fuese a la membrana o la matriz extracelular. En cambio, otros autores han negado la existencia de PR3 en la célula endotelial invalidando esta vía de reconocimiento. Estos autores postulan que la presencia de niveles séricos elevados de PR3 pueden llegar a favorecer la adhesión pasiva del antígeno circulante a la superficie del endotelio, llevando a la aparición de una diana no-propia del endotelio. Independientemente del mecanismo de interacción entre ANCA y célula endotelial parece claro que los ANCA anti-PR3 reconocen la célula endotelial *in vitro*. En definitiva, la implicación del endotelio en la patogenia de las vasculitis podría ser estar relacionada con:

- ❖ Expresión de citocinas pro-inflamatorias y quimioatrayentes de células implicadas en la respuesta inmune.
- ❖ Expresión en superficie de moléculas de adhesión en respuesta a la existencia de citocinas pro-inflamatorias en el torrente sanguíneo.
- ❖ Expresión en superficie de moléculas de adhesión en respuesta a la unión de los ANCA.

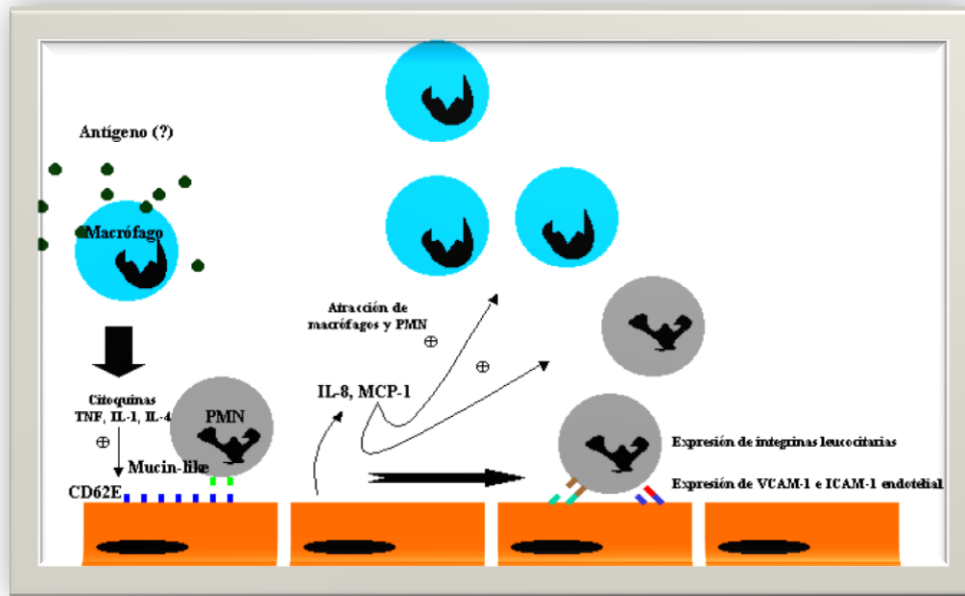


Figura N° 2 Acción de los ANCA en el endotelio vascular (1)

Estos estudios se han realizado mayoritariamente en suero de pacientes con GW y ANCA con especificidad PR3. Se desconoce si los ANCA con especificidad MPO u otros ANCA con especificidad contra otros antígenos del gránulo azurófilo del leucocito polimorfonuclear soportan esta capacidad de reconocimiento de antígenos de la superficie del endotelio y dónde se localizan estos antígenos (en la membrana o en la matriz extracelular). También se desconoce si los ANCA de pacientes inactivos o sin vasculitis mantienen esta capacidad de interacción con el endotelio.

En resumen parece que el ANCA puede actuar amplificando la estimulación leucocitaria producida por un desencadenante no caracterizado. Algunas observaciones permiten sugerir que estos mismos anticuerpos serían capaces de activar la célula endotelial para la expresión de moléculas de adhesión ligandos de otras que expresaría el leucocito polimorfonuclear. (3)

2.6.3 EXAMENES GENERALES BASICOS DE LABORATORIO

Se caracteriza por una azoemia de gravedad variable. También existe siempre una hematuria, con frecuencia macroscópica, y cilindros de hematíes, siendo habitual el sedimento telescópico (cilindros leucocitarios, granulados, céreos y anchos). La anemia, en ocasiones grave, es un hallazgo constante y la leucocitosis es frecuente.

Se debe sospechar una GNRP pauciinmune ante los pacientes con títulos de ANCA significativos. La granulomatosis de Wegener se asocia con C-ANCA en el 90% de los casos, mientras que la GN necrotizante idiopática se asocia con P-ANCA en el 80% de los casos. En la poliarteritis microscópica se observa una distribución relativamente igual de P-ANCA y C-ANCA.

La GNRP por complejos inmunes se debe sospechar ante un paciente con títulos elevados de anticuerpos frente a estreptococos, complejos inmunes circulantes o crioglobulinemia. La hipocomplementemia es frecuente en este tipo de GNRP, siendo poco habitual en la producida por anticuerpos anti-MBG. Resulta útil una serología positiva para anticuerpos anti-MBG circulantes, ya que los anticuerpos tienden a desaparecer en 3 a 6 meses. (12)

Hemograma completo

En el hemograma, podemos encontrar anemia, la cual puede ser macrocítica como en la anemia hemolítica que se presenta en pacientes con LES o producida por drogas inductoras de remisión (sales de oro); hipocrómica microcítica, sugiriendo deficiencia de hierro que usualmente se asocia a pérdida crónica de sangre por el tubo digestivo (uso de AINES); o bien normocítica - normocrómica, la cual se presenta en todas las enfermedades de curso crónico. El recuento de leucocitos y plaquetas, pueden hallarse aumentados, normales o disminuidos; la leucocitosis es frecuente y de variada intensidad, cifras superiores a 18000 x mm³ se encuentra en enfermedades tales como la vasculitis necrotizante, la artritis reumatoidea juvenil, la enfermedad de Still del adulto y en la artritis séptica.(24)

Es importante resaltar que de estas enfermedades solamente la artritis séptica es de etiología infecciosa. Leucocitosis moderada (hasta 12000 x mm³) se puede observar en pacientes con espondiloartropatías seronegativas, en la AR; y en pacientes que reciben corticoesteroides, ya que estos provoca neutrofilia por redistribución del tráfico celular. La leucopenia se presenta frecuentemente en poliartritis inflamatorias como el (LES), la enfermedad mixta del tejido conectivo (EMTC), y en el síndrome de Sjögren (SS). (10)

Examen parcial y citoquímico de orina

Los problemas glomerulares que se manifiestan con la presencia de sedimento urinario activo (leucocituria, cilindruria o proteinuria) que pueden verse en pacientes con LES o vasculitis e incluso con el uso de los medicamentos modificadores del curso de la Artritis como sales de oro o D-penicillamina. Debe observarse con detenimiento la presencia de

elevación del pH, este se ha asociado a problemas tubulares como acidosis tubular renal en el SS, o al uso prolongado de AINES.

Las alteraciones en el examen de orina deben investigarse apropiadamente con pruebas complementarias como creatinina sérica, depuración de creatinina y albúmina en orina de 24 horas; la depuración de creatinina puede disminuir progresivamente aún manteniendo niveles normales de creatinina sérica. Eventualmente es necesario estudios de imágenes o biopsia renal ya que usualmente el compromiso renal ensombrece los pronósticos. (14)

Exámenes inmunológicos

Anticuerpos antinucleares (ANA)

En el interior de una célula hay diferentes componentes nucleares (DNA, antígenos nucleares extractables (ENA), histonas, RNA) y citoplásmicos (RNA de transferencia) contra los cuales se pueden existir autoanticuerpos inducidos por cualquiera de los mecanismos inmunológicos postulados (mimetismo molecular, respuesta dirigida por antígenos, formación de inmunocomplejos e incluso penetración celular). (14)

La prueba de ANA se encarga de detectar si en el suero del paciente con una enfermedad reumática existen anticuerpos en contra de uno de estos autoantígenos celulares. Para demostrar que hay una reacción antígeno -anticuerpo se requieren dos componentes: El suero del paciente (anticuerpo) y un substrato rico en antígenos nucleares (antígeno) cuya fuente se consigue comercialmente en las diferentes pruebas que detectan los ANA.

Los ANA deben considerarse una prueba tamiz o de "screening" en todo paciente que se sospeche una enfermedad reumática inflamatoria; su positividad nos obliga a investigar específicamente el sistema responsable.

Patrones en la inmunofluorescencia

Cuando se utilizan células Hep 2 como substrato hay que tener en cuenta los diferentes tipos de tinción que se presentan en la inmunofluorescencia, ya que pueden indicar diferentes anticuerpos y por ende diferentes enfermedades. (10,14)

Los 4 patrones de tinción encontrados son:

- Homógeno: presente principalmente en LES, o en el LES inducido por drogas
- Periférico: se encuentra en LES; Hepatitis crónica activa

- Moteado grueso: Enfermedad Mixta del tejido Conectivo
- Moteado fino ; Síndrome de Sjögren; escleroderma
- Nucleolar: presente en la esclerodermia , o en la artritis reumatoidea
- Centromerico.

De acuerdo a los resultados de la prueba de ANA inicial y a la enfermedad que clínicamente se sospecha se deben solicitar los diferentes autoanticuerpos teniendo en cuenta las diversas asociaciones clínicas. Es así como en el LES se puede hallar Anti - DNA en 70% y Anti - sm en el 20% de los casos; en la EMTC el Anti - U1RNP es positivo para el 95%; en el SS el Anti - Ro ó SS - A es positivo en el 60%, mientras que el Anti- La ó SS -B lo es sólo en un 40% y en la esclerodermia el Anti- Scl -70 se encuentra positivo en el 70% de los casos.

Cuadro N°2 Relación de autoanticuerpos con enfermedades Autoinmunes (14)

AUTOANTICUERPO	ENFERMEDAD
Anti – DNA	LES, cutáneo y renal.
Anti – Sm	LES
Anti – RNP	EMTC. Síndrome de Sjögren, LES seronegativo
Anti -SS-A o Ro Anti -SS-B o La	LES neonatal.
Anti -SCL 70 (topoisomerasa 1)	Esclerodermia.
Anti –Centromero	CREST
Anti –Cadiolipina	LES, Síndrome antifosfolípido.
ANCA	Granulomatosis de Wegener
Factor reumatoideo	Artritis reumatoidea
Anti - Jo-1	Dermatopolimiositis

Otras pruebas inmunológicas

Complemento

Su principal utilización clínica es para establecer el pronóstico de los pacientes con LES,

ya que cuando se encuentran títulos elevados de Anti -DNA y bajos de C3 hay una gran incidencia de afección renal grave en los pacientes afectados. En algunos pacientes con LES y vasculitis necrotizante, y en general en las enfermedades por inmunocomplejos puede estar indicado realizar un seguimiento de la actividad de la enfermedad mediante la prueba del complemento, pero es claro que no hay indicación para considerarla una prueba de rutina dentro del mal llamado "panel" de pruebas reumáticas.(32)

Antígeno de histocompatibilidad (HLA)

La inmunogenética de las enfermedades reumáticas es un área de gran interés para el desarrollo de la reumatología. Sin embargo las pruebas de HLA sólo deben considerarse dentro del área de la investigación, con la excepción de algunos casos de espondiloartropatías seronegativas, en especial, la espondilitis anquilosante o el síndrome de Reiter, donde existe una clara asociación con el HLA - B 27. Se han reportado formas "frustradas" de la enfermedad que se presentan como tarsitis anquilosante, insuficiencia aortica o uveitis que pueden diagnosticarse con el HLA. (32)

Anticuerpos antifosfolipidos

El Síndrome Antifosfolípido se caracteriza por presencia de trombosis venosas y arteriales de repetición, trombocitopenia, anemia hemolítica, pérdidas fetales repetidas e incluso mielitis transversal. Este síndrome requiere la confirmación serológica de los anticuerpos anticardiolipina (aCL); estos se detectan de 3 formas. (9,12)

Mediante una reacción falsa positiva para sífilis (20%) ya que esta prueba tiene como sustrato a la cardiolipina.

La presencia del anticoagulante lúpico, que se establece por la aparición de un TPT prolongado que no corrige a la administración de plasma; y

Los anticuerpos anticardiolipina (hasta 50% en los pacientes con LES) que se determinan por ELISA. La prueba más sensible es ELISA, sin embargo la más específica para el diagnóstico es el anticoagulante lúpico.

3. ANTECEDENTES

En los últimos años se ha llevado a cabo una activa investigación sobre la capacidad de los ANCA de producir lesión vascular. La primera evidencia experimental fue aportada por Falk y Jeanette en 1990 quienes demostraron la capacidad que tienen los ANCA en la modulación de la conducta biológica de los neutrófilos respecto a la translocación de la proteinasa-3 (PR3) y la Mieloperoxidasa (MPO) desde los gránulos a la membrana de los neutrófilos por el factor de necrosis tumoral, además de la participación de otras citocinas como la interleucina 8 (IL-8), durante la respuesta fisiológica de los neutrófilos a la inflamación. (15) Este fenómeno también ocurre en pacientes con enfermedad de Wegener y en pacientes con sepsis y otras infecciones graves. (1) Cuando un individuo produce ANCA, la unión de éstos a la MPO o PR3 asociadas a membrana, estimula y amplifica la producción de radicales superóxido y la degranulación de los neutrófilos. También se incrementa la producción de óxido nítrico, la actividad quimiotáctica y la adhesión de los neutrófilos al endotelio vascular. Al parecer, tanto el reconocimiento específico de la MPO o la PR3 asociados a membrana como la unión de los ANCA a los receptores Fc de los neutrófilos participan en su efecto coestimulador. (1,2)

Los Anticuerpos anticitoplasma de neutrófilos (ANCA) como herramienta importante en el diagnóstico de las vasculitis fue estudiado en pacientes con diversas enfermedades asociadas con fenómenos inflamatorios vasculares, autoanticuerpos e infecciones. En el mismo se determinó la presencia de ANCA específicos para la PR3 (c-ANCA) y la MPO (p-ANCA) en pacientes con vasculitis no precisadas y en pacientes con diferentes enfermedades asociadas con procesos inflamatorios, fenómenos autoinmune e infecciones, mediante el método de inmunofluorescencia indirecta. (IFI). Se detectó la presencia de cANCA en 12 casos con vasculitis, y p-ANCA en 8 pacientes con enfermedades autoinmunes y en 14 con anemia drepanocítica. sugiriendo la posibilidad de cierto grado de participación de estos autoanticuerpos en el daño del endotelio vascular que se observa en estas enfermedades, debido a la activación de los neutrófilos. (18)

El mecanismo de acción de los ANCA, en algunas entidades clínicas como la anemia drepanocítica en crisis vasooclusiva, es diversa y con frecuencia confusa, el análisis clínico de pacientes con casos de vasculitis de mediano y pequeño vaso en adultos desde fases precoces en todos los enfermos con vasculitis puede explicarse por la reacción cruzada entre antígenos extrínsecos y antígenos de neutrófilos por un

mecanismo de mimetismo molecular; una disregulación de la red idiotipo-antiidiotipo; una activación policlonal de las células B por medio del virus de Epstein Barr, o una activación de las células T por lipopolisacáridos bacterianos. (18)

Además la presencia y ausencia de otros datos de laboratorio y anatomopatológicos son considerados claves en el diagnóstico diferencial de estas entidades. También, en esta categoría se incluyen la presencia de depósitos por inmunocomplejos IgA o granulomas en las muestras de biopsia, las crioglobulinas séricas o en vasos, y la asociación de asma y eosinofilia. La presencia de crioglobulinas en sangre identificó a dos pacientes con una "Crioglobulinemia mixta esencial", los cuales asociaban una infección crónica por hepatitis C. La presencia de granulomas necrotizantes se puede observar en la GW , pero no se observa en las otras entidades . La afectación del aparato respiratorio es frecuente en las vasculitis con ANCA positivos, pero es rara en aquellas con patogenia relacionada con inmunocomplejos. (18)

Algunos autores señalan que el patrón de inmunofluorescencia citoplasmático c-ANCA no debe considerarse como absoluta para un diagnóstico de Granulomatosis de Wegener, ya que la presencia de c-ANCA se ha detectado en pacientes con abscesos hepáticos producidos por ameba y en individuos portadores de VIH sintomáticos. La presencia de c-ANCA en infecciones es rara y siempre hay que tener presente la posibilidad de una vasculitis concomitante. (12,29,31)

Así mismo se ha planteado que los p-ANCA no son específicos para una enfermedad en particular, sino se pueden encontrar en diferentes grupos de enfermedades, como por ejemplo: enfermedades inflamatorias intestinales estudiados principalmente en tejidos murinos y células HELP-2, artritis reumatoide, enfermedades del colágeno vascular e infecciones. (12) Un hallazgo importante es el que se realizó en pacientes con colitis ulcerosa (CU) (28) donde se encontró la presencia de anticuerpos p-ANCA patrón perinuclear atípico y se propuso precisar las formas de presentación del autoanticuerpo por inmunofluorescencia, en patrón y título, en relación al diagnóstico y la actividad de esta enfermedad. Se consideraron dos definiciones de actividad de la CU: en sentido estricto cuando hubo manifestaciones clínicas simultáneas con el estudio de ANCA, y en sentido amplio cuando la actividad clínica e histológica se registró dentro de los 60 días anteriores o posteriores a la determinación del autoanticuerpo, independientemente del patrón que tuviera, mostró asociación con la actividad de la CU, resultando la sensibilidad

67%, la especificidad 95%, Los otros autoanticuerpos investigados resultaron no asociados significativamente a la CU, activa o no. (28)

La participación de la inmunidad celular en la patogenia de las vasculitis también fue estudiada observando la relación entre los niveles séricos de IL-2R y la actividad clínica en un grupo de pacientes con vasculitis de pequeño vaso ANCA positivas y ANCA negativos en controles sanos con los niveles de IL-2R demostrando ser superiores en pacientes en fase activa que en aquellos enfermos en remisión o en personas sanas. La diferencia de los niveles séricos del sIL-2R entre las fases activa y de remisión sugiere que los niveles de este receptor soluble reflejan la actividad clínica de estos pacientes. Los niveles séricos del receptor en enfermos en remisión clínica son superiores a los encontrados en sujetos sanos sugiriendo un cierto grado de actividad inmunológica residual. (3)

Los métodos de detección de ANCA por Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) fueron establecidos por el Consenso Internacional (37) y es en base a ellos que se realizó estudios y variaciones del método en su determinación, dirigido a probar la utilidad clínica sobre extensiones de células lavadas de sangre periférica, con el objetivo de determinar la reactividad de estos autoanticuerpos en pacientes con vasculitis de pequeños vasos asociadas a ANCA (VPVA), en vasculitis de pequeños vasos no asociadas a ANCA (VPVNoA), en vasculitis secundarias a enfermedades reumáticas y en individuos sanos. (24). La sensibilidad y la especificidad de las extensiones de células periféricas lavadas para detectar ANCA fue del 96 % en ambas, lo que se reflejó en el alto coeficiente de concordancia Kappa entre los 2 métodos ($k = 0,9$; $p < 0,0001$).

Los ANCA se encontraron en el 79 % de los pacientes con VPVA y en el 19 % de los pacientes con enfermedades reumáticas, mientras que aquellos con VPVnoA y los Individuos sanos no presentaron ANCA.

En conclusión, el método de IFI sobre extensiones de células periféricas lavadas ha demostrado elevada sensibilidad y especificidad para detectar ANCA, lo que permite aplicarlo en la clínica médica con un importante valor diagnóstico para el estudio de las vasculitis sistémicas primarias y secundarias, aunque se pudo advertir la presencia en otras enfermedades sistémicas inflamatorias. El método no permitió distinguir los 2 patrones de fluorescencia clásicamente descritos de ANCA como son el citoplasmático (C-ANCA) y el perinuclear (P-ANCA), atribuido esta limitación a factores técnicos.

Este método presenta ventajas adicionales en cuanto a la preparación y calidad del sustrato respecto a otras variantes de IFI, como la posibilidad de observar al neutrófilo de mayor tamaño en comparación con las laminas comerciales, además, las extensiones contienen también linfocitos, lo que permite demostrar la presencia simultánea de anticuerpos antinucleares, en caso de que la fluorescencia nuclear ilumine tanto los neutrófilos como los linfocitos.

Para eliminar las dudas sobre los falsos negativos y positivos por el método IFI el Consenso Internacional recomienda probar las muestras discordantes con una tecnología de mayor sensibilidad para identificar las distintas especificidades de los ANCA, como es el ensayo inmunoenzimático, Hagen y colaboradores (22) evaluaron el valor diagnóstico de la determinación de ANCA por IFI, y por anti-PR3 y el anti-MPO ELISA realizada en diversas localizaciones, en pacientes con vasculitis idiopática de pequeños vasos, donde participaron 14 centros en la estandarización de los análisis de ANCA, en el que incorporaron un número total de 169 pacientes diagnosticados recientemente y 189 pacientes con historia de vasculitis sistémica idiopática. Los resultados fueron comparados con controles positivos a la enfermedad y con controles sanos. La prueba de IFI fue realizada según la metodología estándar establecida. De este estudio se concluye que el valor de la prueba de IFI para la detección de ANCA se puede aumentar en mayor proporción cuando se realizan simultáneamente con la prueba inmunoenzimática ELISA. (22)

Las variaciones encontradas respecto a los resultados de ANCA entre diferentes laboratorios se deben tanto a la falta de métodos estandarizados, como a la falta de consenso en los criterios de definición clínica de estas entidades. Además, la sensibilidad depende también del grado de extensión de la gravedad, y de la actividad de la enfermedad. No obstante, la introducción de métodos para la detección de los ANCA que puedan enriquecer el diagnóstico no invasivo de entidades clínicas tan complejas como las vasculitis, debe considerarse como un desarrollo positivo dirigido al objetivo final de perfeccionar la atención clínica de los pacientes afectados. (23)

En el entendido de que los ANCA se utilizan como marcadores de diagnóstico para la vasculitis sistémicas la especificidad y la sensibilidad de la detección de ANCA diferencia de centro a centro debido en gran parte a las variaciones en la metodología, por ello se

realizó un estudio donde comparan 8 kits comerciales y un método interno (HM) de ELISA obteniendo en cada uno especificidad y sensibilidad en la detección de ANCA anti-PR3 (7 kits) y anti MPO (8 kits). (31)

Los sueros controles provinieron a partir de 5 pacientes con LES, 28 con granulomatosis de Wegener 22 con poliangeitis microscópica, 5 con Glomerulonefritis rápidamente progresiva idiopática, y 5 controles sanos fueron examinados por el método IFI y ELISA. Los sueros de controles de pacientes sanos y de pacientes con LES y WG fueron demostrados como negativos para anti- Pr3 por los 7 kits En 25 sueros de ANCA-positivo de pacientes del WG, la positividad de Pr3-anca se extendió a partir de la 44% hasta el 84%. Una concordancia absoluta entre los 7 kits fue observada en el 56% de las muestras de ANCA-positivos. Los niveles de anticuerpos anti-PR3 en 5 de los 7 kits correlacionaron con los títulos de c-ANCA en IFI. (31)

En 20 sueros de p-ANCA-positivo, correspondieron del 25% hasta el 75%. El 35 % de sueros de MPO-ANCA-positivo fueron confirmados por análisis del ELISA, del inmunoblot y de la inhibición. El índice de concordancia era solamente el 30% entre sueros de p-ANCA-positivos en los 8 kits anti-MPO. No se observó ninguna correlación significativa entre los títulos de p-ANCA IFI y los niveles de anti – MPO ELISA. El método interno demostró que el 65% de sueros de ANCA-positivo correspondían a anti- PR3, y el 45% de sueros de p-ANCA-positivo eran positivo de anti - MPO.

Estos resultados indican que las sensibilidad y la especificidad para la detección de ANCA diferencian perceptiblemente entre los kits comerciales probados y subrayan la necesidad de establecer los estándares internacionales uniformes para los procedimientos de ANCA ELISA para permitir una interpretación y una comparación más confiables de datos.

4.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La afección renal es una característica frecuente y grave de las enfermedades autoinmunes principalmente del Lupus Eritematoso Sistémico, explicado en el sentido de que los neutrofilos están íntimamente asociados a la destrucción glomerular y al daño vascular, la presentación inusual o prolongada de ANCA en el sistema inmune, en el contexto de infecciones, o una predisposición genética específica también puede conducir a la producción de estos auto-anticuerpos en un proceso no caracterizado por lo que se realizan pruebas que evalúen la función renal.

Tomando en cuenta que en los últimos años la frecuencia de enfermedades autoinmunes se ha incrementado progresivamente, la forma de presentación clínica constituye una emergencia médica de alta morbi-mortalidad mas aún si el diagnóstico no se efectúa rápidamente con la consecuente demora en el tratamiento.

Hasta ahora, las técnicas más utilizadas para la determinación de los ANCA son el ensayo Inmunoenzimatico (ELISA), y el análisis por Inmunofluorescencia Indirecta (IFI), siendo una técnica cualitativa, sensible no muy específica, donde los resultados obtenidos están sujetos a factores del operador presentando errores por el factor subjetivo involucrado en su lectura, además, mediante este método sólo se puede llegar a obtener resultados semicuantitativos.

La disponibilidad de métodos estandarizados para la determinación de ANCA se reconoce hoy en día como una necesidad, pues a pesar de contar con ellos a través de las líneas comerciales, éstas representan un alto costo económico para los pacientes que los requieren, ya que además de la prueba el medico tratante solicita otras pruebas bioquímicas para el seguimiento del paciente.

5.- JUSTIFICACIÓN

En nuestro país son pocos los laboratorios clínicos que cuentan con métodos y medios para determinar ANCA, de ahí y considerando las características que presenta el Instituto SELADIS de apoyo a la población de escasos recursos económicos es que se propone estandarizar y validar técnicas que permitan disminuir los costos para el paciente, estas pruebas incluyen la estandarización de un ensayo inmunoenzimático (ELISA), para ANCA total, la evaluación de la prueba de inmunofluorescencia Indirecta (IFI) en muestras de pacientes que acudieron al Hospital de Clínicas de la Ciudad de La Paz.

El objetivo de determinar ANCA total a través de la estandarización del ensayo ELISA se debe a las características que presenta como pruebas alternativa, específica y sensible, proporciona datos cuantitativos, de modo que disminuye probabilidades de error en el método y ventajas respecto al método IFI.

Además nuestro interés es desarrollar métodos y producir reactivos primarios, que hagan posible la accesibilidad a la determinación de ANCA con fines asistenciales e investigativos, considerando que hasta el momento, la investigación se ha dirigido al efecto del ANCA en la estimulación del leucocito polimorfonuclear PMN.

6. PREGUNTA DE LA INVESTIGACIÓN

- ❖ Podrá determinarse ANCA en pacientes con enfermedades autoinmunes
- ❖ Será validado las técnicas estandarizadas para la determinación de ANCA

7.- OBJETIVOS

a). OBJETIVO GENERAL

- ❖ Determinar Anticuerpos anti-citoplasma de Neutrofilo (ANCA) en pacientes con enfermedades autoinmunes que acudieron al Hospital de Clínicas de la Ciudad de La Paz en la gestión 2002- 2003

b) OBJETIVOS ESPECIFICOS

- ❖ Estandarizar un ensayo inmunoenzimático (ELISA) para detección de anticuerpos anticitoplasma de neutrófilo (ANCA).
- ❖ Estandarizar un ensayo de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) para detección de anticuerpos anticitoplasma de neutrófilo (ANCA).
- ❖ Comparar los datos obtenidos de la prueba del ensayo inmunoenzimático (ELISA) y la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) estandarizados con los resultados de los kits comerciales.
- ❖ Evaluar la utilidad clínica del ensayo inmunoenzimático (ELISA) y la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) en pacientes con ANCA asociados a enfermedades autoinmunes de diversa etiología.

8.- DISEÑO DE LA INVESTIGACION

a). TIPO DE ESTUDIO: El presente trabajo de investigación corresponde a un estudio de test diagnóstico con un gold estándar de referencia correspondiente al Kit comercial Binding Site para la determinación de ANCA por el método de Inmunofluorescencia Indirecta y ELISA para la determinación de anti-MPO y anti-PR3, además de la Historia clínica de cada paciente tanto para la estandarización del método ELISA como para el método IFI.

b). POBLACION: La población con la que se trabajó fue con pacientes que acudieron al Hospital General de la Ciudad de la Paz durante el periodo de 2002 – 2003.

c). TAMAÑO MUESTRAL: Se calculó el tamaño muestral de acuerdo al programa Epi Info 60 con el cual se obtuvo un total de 99 pacientes, con una relación será 1:4, es decir, 1 paciente enfermo y 4 pacientes no enfermos. El muestreo fue no aleatorio de caso consecutivo. Para los controles aparentemente sanos se trabajó con 43 personas.

d). CRITERIOS DE INCLUSION GRUPO ENFERMO

- Pacientes con Lupus Eritematoso Sistémico
- Pacientes con Vasculitis
- Pacientes con Glomerulonefritis
- Pacientes con Artritis Reumatoide
- Pacientes de ambos sexos
- Pacientes comprendidos entre 25 – 55 años

e). CRITERIOS DE EXCLUSION GRUPO ENFERMO

- Pacientes diabéticos
- Pacientes mayores a 60 años
- Pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal.

f). CRITERIOS DE INCLUSION GRUPO NO ENFERMOS

- Pacientes comprendidos entre 25 -a 40 años
- Pacientes aparentemente sanos
- Pacientes de ambos sexos

g). CRITERIOS DE EXCLUSION GRUPO CONTROL

- Pacientes con alguna enfermedad autoinmune
- Pacientes con enfermedades renales
- Pacientes mayores a 60 años

h). MATERIALES

Materiales

- Policubetas de polivinilo
- Portaobjetos
- Tubos de centrifuga cónicos de 15 ml con tapa rosca
- Cajas koplín
- Tubos de hemólisis
- Pipetas 1,2,5 ml
- Pipetas pasteur

Reactivos

- PBS 0.15 M pH 7.4
- PBS 0.01M pH 7.4
- Dextran-Dextrosa
- Buffer carbonatos - Citrato
- Sustrato OPD
- Albumina serica bovina
- Solución Ácido Clorhídrico 1N
- Solucion Ficoll-Hipaque $d = 1.119$,
- Conjugado anti-gamaglobulina humana - peroxidasa
- Conjugado antigamaglobulina humana fluoresceinado
- Metanol
- EDTA 0.2 M pH 7.2
- Glicerina tamponada
- Tween

Equipos

- Microscopio de Inmunofluorescencia
- Microscopio Óptico

- Lector de ELISA
- Estufa a 37 °C
- Centrifugadora

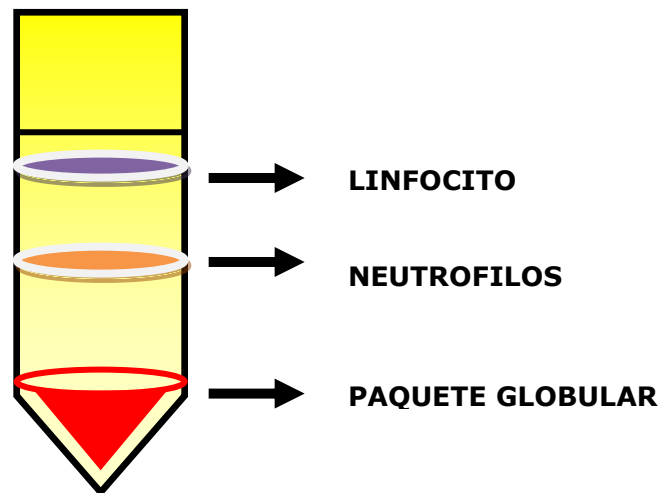
i.) METODOS

8.1. AISLAMIENTO DE POLIMORFONUCLEARES (PMN) EN GRADIENTE DE DOBLE DENSIDAD

MUESTRA BIOLÓGICA: Sangre total para sustrato (Neutrófilos), Suero de pacientes en estudio

PROCEDIMIENTO

Se mezclaron 5 ml de sangre total (obtenido por punción venosa) con 0.5 ml de EDTA 0.1 M pH 7.2, luego fue diluido 1:2 con PBS. En un tubo cónico se colocó 3 ml de Ficoll-Hipaque de $d = 1.119$, luego se añadió cuidadosamente otra solución de Ficoll-Hipaque de $d = 1.077$, luego se colocó 6 ml de sangre total diluida. Se centrifugó a 1500 r.p.m. por 20 minutos, separándose la capa de células en dos fases, una correspondiente a linfocitos y la otra fase a Neutrófilos como se presenta en el esquema:



A continuación se separó la capa de células correspondientes a neutrófilos para luego lavarlas con PBS y realizar el ajuste de la población celular. El rendimiento se determinó en una cámara de Neubauer, el porcentaje de pureza con tinción Giemsa.

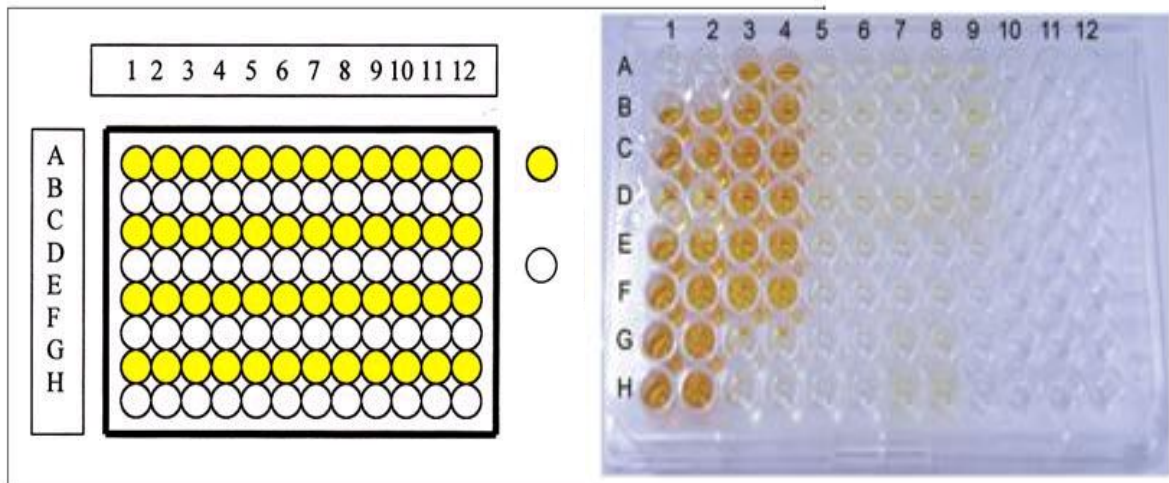
8.2 ESTANDARIZACION DEL ENSAYO INMUNOENZIMATICO ELISA

MÉTODO: Ensayo inmunoenzimático ELISA Indirecto no competitivo

FUNDAMENTO: La técnica utiliza un antígeno que es adsorbido sobre un soporte inerte, en el cual se colocan las muestras (sueros) que contienen los anticuerpos que se desean identificar y se incuban a temperatura ambiente, de manera que se forme el complejo antígeno-anticuerpo, éste complejo es reconocido por el conjugado ligado a la enzima, y es revelado por el substrato. La intensidad de color es directamente proporcional a la concentración de anticuerpos específicos presentes en la muestra.

8.2.1. FIJACIÓN DE CELULAS EN FASE SÓLIDA

La técnica descrita para la fijación de células (Neutrófilos) en placas multipozo de poliestireno fue modificada para este estudio. (17) La fijación de las células a las placas fue probada en diferentes concentraciones, hasta determinar la concentración óptima para la prueba.



Una vez ajustada la población celular se colocó a cada pozo de microtitulación 50 ul. Luego se centrifugó las placas conteniendo las células a 400 r.p.m. por 10 minutos. Cuidadosamente se añadió a cada pocillo 200 ul de solución de Glutaraldehído 0.25 % preparado recientemente en PBS a 4°C y se dejó 10 minutos en reposo. Pasado este tiempo se removió la solución de glutaraldehído por inversión de la placa sobre papel absorbente y se lavó con PBS 3 veces decantando en papel absorbente después de cada lavado. Se dejó toda la noche a 4 °C con el tampón del último lavado.

8.2.2. PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO INMUNOENZIMATICO ELISA

Se retiró el tampón de lavado de la placa de microtitulación en papel absorbente y se colocó 100 ul de solución de PBS-Albúmina 1% en cada pocillo, e incubamos 30 minutos a 37 °C. Luego del tiempo de incubación se colocaron en cada pozo 100 ul de controles positivos, negativos y las muestras, diluidas (1/100, 1/300), Se incubó 30 minutos a 37 °C. Después de cada incubación se lavó con PBS Tween 3 veces. Se colocó el conjugado en dilución 1/20000 e incubó 30 minutos a 37 °C. La reacción fue revelada con el sustrajo OPD dejando reaccionar 5 a 10 minutos a temperatura ambiente. Se paró la reacción añadiendo 100 ul de H₂SO₄ 1 N en cada uno de los pocillos y se llevó al lector de ELISA para su correspondiente lectura a 493 nm de longitud de onda de filtro primario, y 600 nm de filtro diferencial.

8.3 ESTANDARIZACION DEL ENSAYO DE INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA

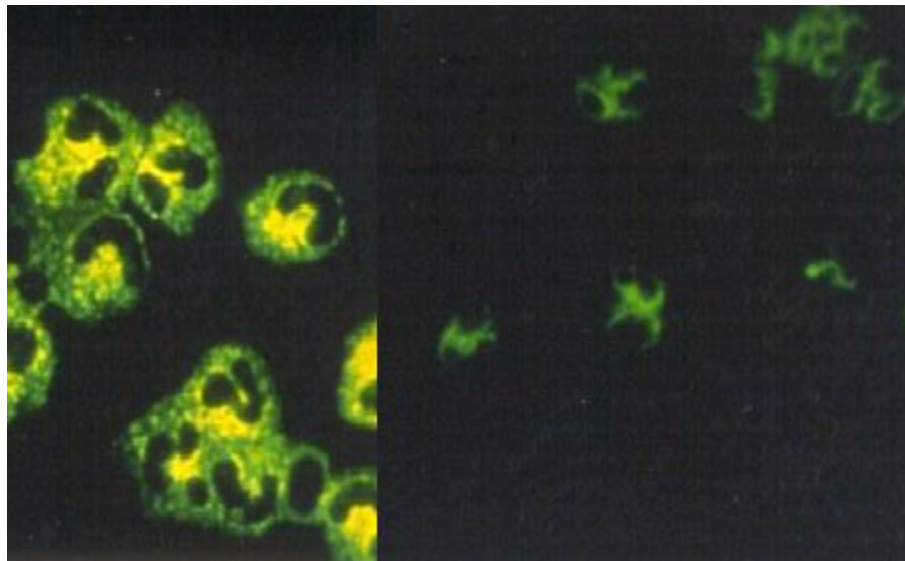
MÉTODO: Inmunofluorescencia Indirecta

FUNDAMENTO: La técnica se basa en la identificación de la formación del complejo antígeno-anticuerpo mediante marcador fluorescente, sustancias acopladas al anticuerpo sin perder capacidad ni actividad. En este método, una muestra sérica se pone en contacto con una preparación de leucocitos polimorfonucleares previamente fijados con etanol o formalina. Después de varios lavados y una incubación con un anticuerpo secundario fluoresceinado, se observa la preparación bajo un microscopio óptico de fluorescencia.

8.3.1. PREPARACIÓN DE SUSTRATO (PLACAS CON PMN)

Se prepararon citocentrifugados colocando 20 a 30 ul de suspensión de células ajustadas en portaobjetos. Las células fueron incubadas a 37 °C en cámara húmeda por el lapso de 30 minutos. Los citocentrifugados de PMN, fueron fijados con etanol, metanol por 10 minutos. Se dejaron secar las placas, posteriormente fueron hidratadas en PBS 0.01M por 10 minutos. Luego de escurrir cada placa se agregó 30 ul de los controles positivos, negativos, y las muestras previamente diluidas 1/20,1/40. Incubándose 30 minutos a temperatura ambiente en cámara húmeda. Las placas se lavaron con PBS agitando suavemente por 10 minutos. El exceso de PBS fue secado y se colocó 30 ul del *Conjugado antigamaglobulina humana fluoresceinado* en una dilución de 1/400,

incubándose 30 minutos a temperatura ambiente protegido de la luz. Pasado este tiempo se enjuagaron las placas y se lavo nuevamente de la forma indicada añadiendo a esta el colorante de contraste Azul de Evans. Las placas fueron secadas rápidamente y se colocó la solución de montaje para su lectura en el microscopio de inmunofluorescencia.



9. RESULTADOS

La población estudiada fue de 142 de los cuales 99 pacientes acudieron al hospital de Clínicas de la Ciudad de La Paz durante el periodo de 2002 - 2003, y paralelamente a ellos se estudió a 43 pacientes aparentemente sanos como controles normales.

De ellos el 58 % correspondieron a varones y 42 % a mujeres, comprendidos entre 17 y 55 años (Grafico N° 1)

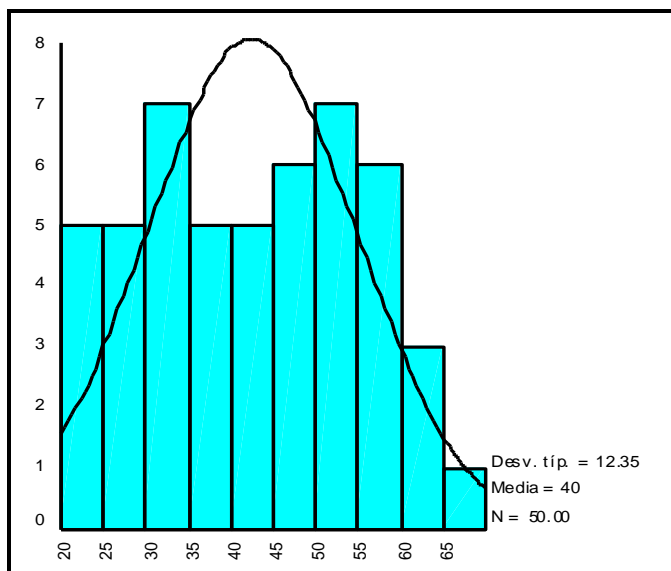


Grafico N° 1 . Distribución de frecuencias de acuerdo a la edad

Los pacientes fueron clasificados de acuerdo al diagnostico en : Vasculitis en 2%, Glomérulonefritis 20 %, Vasculitis asociado a otras enfermedades 8%, Glomerulonefritis asociados a LES 6 %, Vasculitis y Glomerulonefritis 2 % y Otras enfermedades entre ellas la mas importante Lupus Eritematoso Sistémico (LES) 62%. (Grafico N° 2)

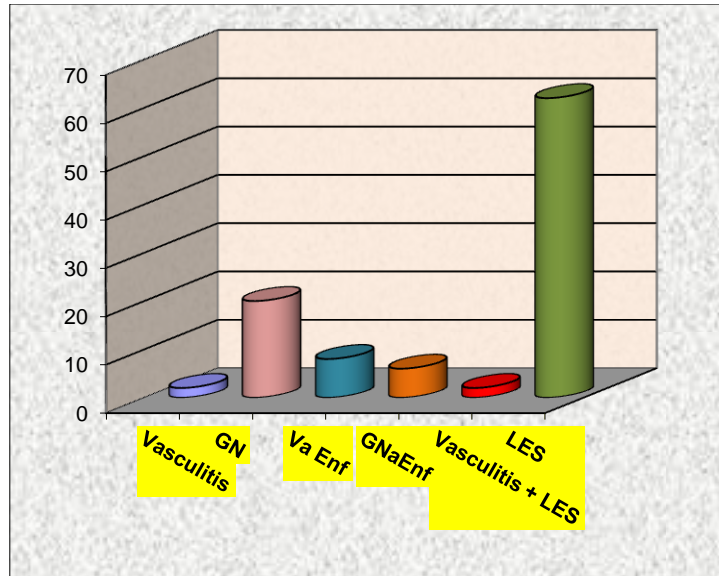


Grafico N° 2 Distribución de frecuencias de acuerdo al Diagnóstico

Los pacientes fueron clasificados de acuerdo al Lugar de Nacimiento : 70% de ellos provenientes del Departamento de La Paz, 18% de Provincias del Departamento de La Paz, 4% provenientes de Otros Departamentos, 8% provenientes de otro país.

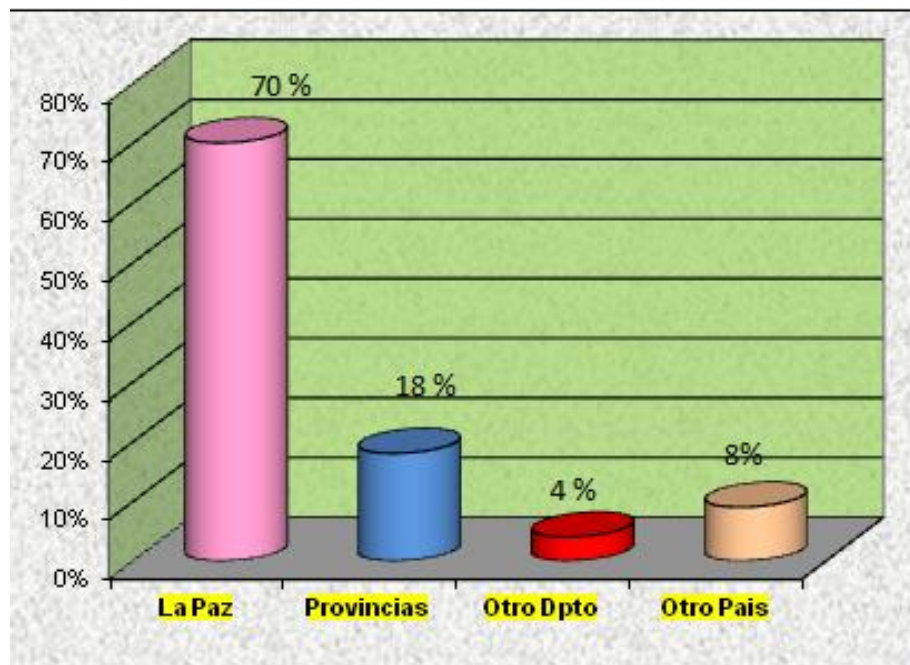


Grafico N° 3. Distribución de frecuencias de acuerdo al Lugar de Nacimiento

Los pacientes fueron clasificados de acuerdo al Domicilio: 64 % de ellos tienen su domicilio en la Ciudad de La Paz, 24 % en la Ciudad de El Alto, y 12 % con Domicilio en Transito.

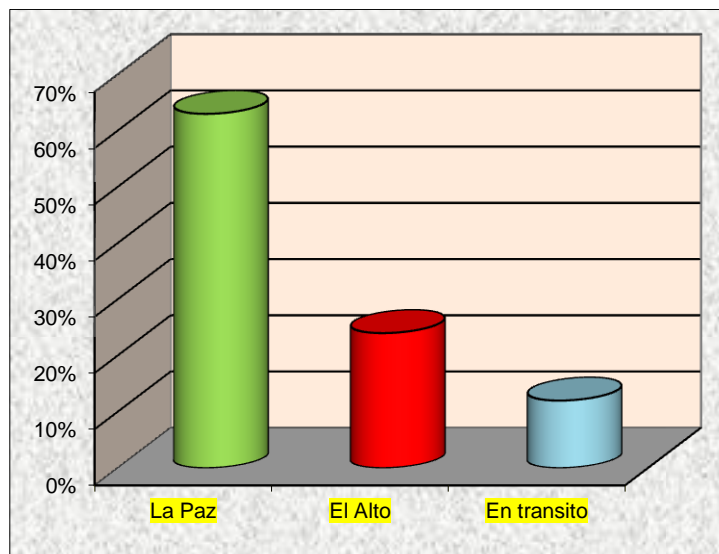


Gráfico N° 4 Distribución de Frecuencias de acuerdo al Domicilio actual

9.1 ESTANDARIZACION DE LA PRUEBA INMUNOENZIMATICA ELISA

9.1.1 AISLAMIENTO DE POLIMORFONUCLEARES

La obtención de la población celular polimorfonucleares (PMN) adecuada a partir de sangre total por el método de gradiente de doble densidad fueron: $3,4 \times 10^4$ cel / ml, obteniéndose así una pureza del 97 % y viabilidad del 95 %. (Tabla N° 1, Gráfico N°5)

TABLA N° 1 Concentración óptima de PMN para el ensayo ELISA

Población celular	Promedio de D.O en Controles Positivos	Promedio de D.O Controles Negativos
3.4×10^6 cel/ml	1.123	0.894
3.4×10^5 cel/ml	0.747	0.591
3.4×10^4 cel/ml	0.632	0.273
3.4×10^3 cel/ml	0.330	0.248

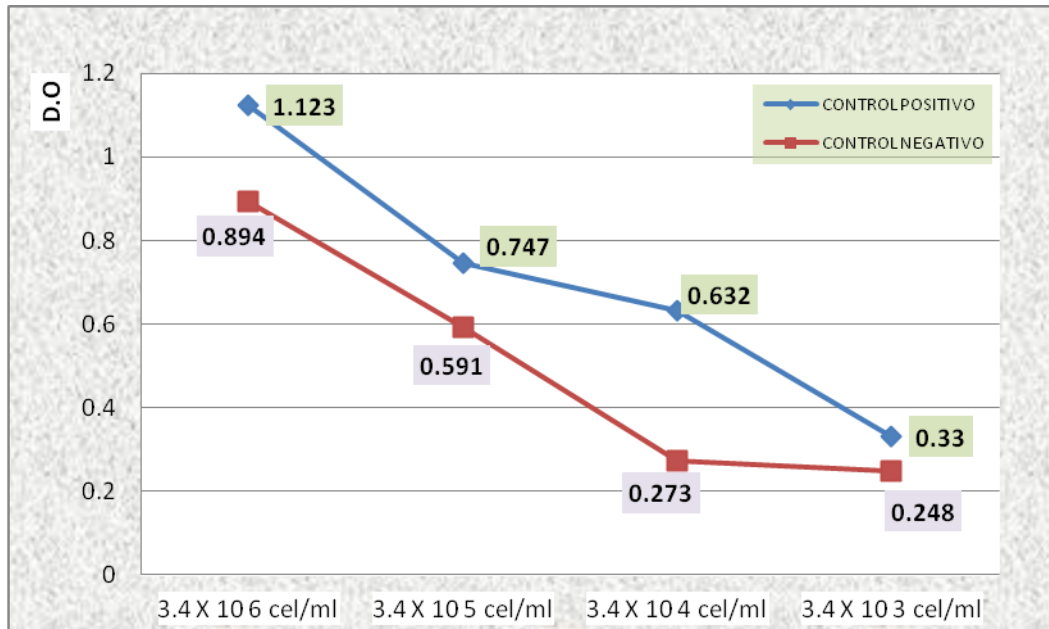


Grafico N° 5 Concentración óptima de PMN para el ELISA estandarizado

9.1.2. ENSAYO INMUNOENZIMATICO ELISA

La Densidad Óptica (D.O) de las muestras de pacientes positivos, negativos y controles aparentemente sanos son expuestos en el cuadro de dispersión donde se evidencia una diferencia de D.O entre los grupos. (Grafico N° 6)

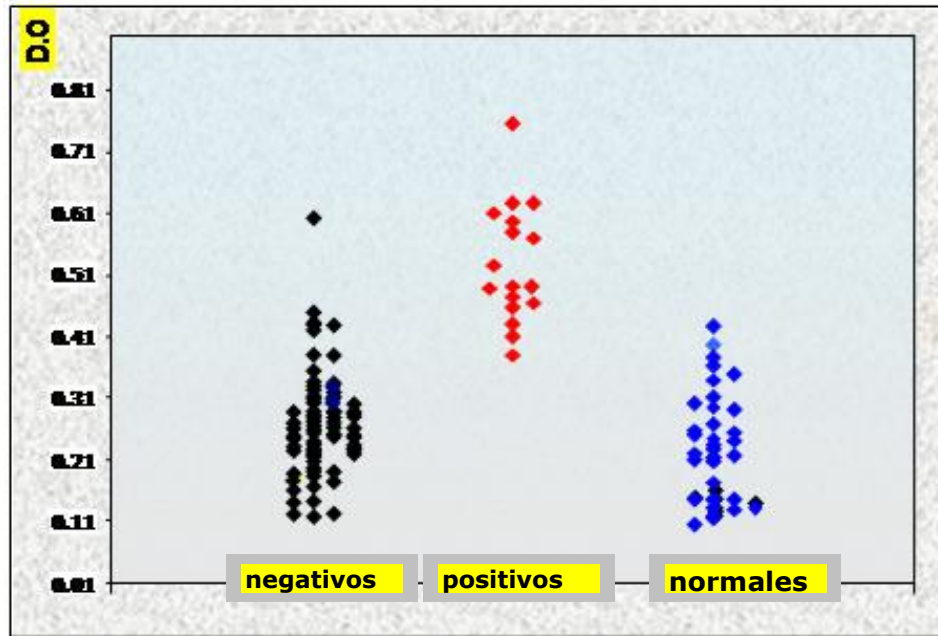


Grafico N° 6 Cuadro de dispersión de Densidad Óptica de Pacientes Positivos, Negativos y controles normales

Se obtuvo el promedio y DS de las absorvancias de cada grupo clasificado, donde se obtuvieron para el grupo de pacientes positivos $x = 0.529$ de densidad óptica con una DS ± 0.134 , para el grupo de pacientes negativos $x = 0.265$ y DS ± 0.0817 , y para el grupo de pacientes aparentemente sanos $x = 0.219$ y DS ± 0.0896

TABLA N° 2 Promedio y DS de Densidad Óptica de muestras procesadas de pacientes positivos, negativos y controles normales

Pacientes	Promedio densidad óptica	Desviación estándar	Rango
Positivos	0.529	0.111	0.496 – 0.622
Negativos	0.265	0.083	0.182 – 0.348
Controles Normales	0.219	0.086	0.133 – 0.305

La distribución que presenta las D.O. de cada grupo de estudio: Positivo, Negativo, Control Normal se ve representado en el siguiente cuadro de diagrama de cajas, donde se evidencia un punto outlier o valor extremo que se encuentra por debajo del valor máximo

del grupo de Pacientes Negativos, y otro en el grupo de pacientes Negativos que se encuentra por debajo del valor mínimo. (Grafico N° 7)

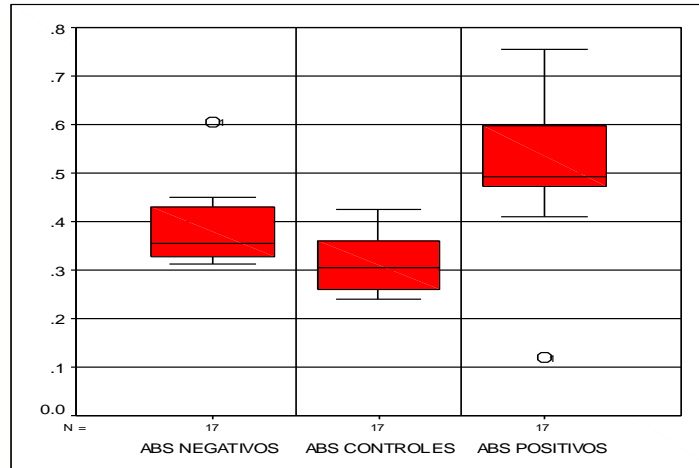


Grafico N° 7. Diagrama de cajas para la Densidad óptica de muestras de controles positivos , negativos y aparentemente sanos

9.1.3. EVALUACIÓN DE LA PRUEBA INMUNOENZIMATICA ELISA

9.1.3.1 DETERMINACION DEL PUNTO DE CORTE

El punto de corte "cutoff", fue determinado mediante el análisis de las características del operador-receptor (ROC), utilizando el Software SPSS 11.5 obteniéndose así a 0.358 de Densidad optica como punto de corte , y un punto máximo de 0.392 . (Grafico N°8)

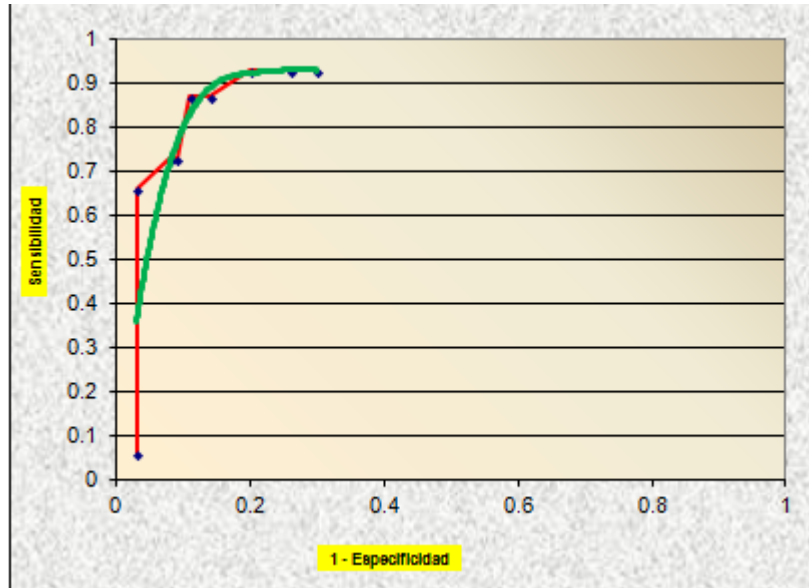


Gráfico N° 8 Curva ROC para la determinación del punto de corte de la prueba estandarizada ELISA

9.1.3.2. DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DIAGNÓSTICA DE LA PRUEBA ESTANDARIZADA ELISA

La sensibilidad y especificidad diagnóstica fueron estimadas insertando el punto de corte a los resultados de Ensayo Inmunoenzimático (ELISA) estandarizado de los sueros positivos y negativos de referencia, para lo cual se utilizó la tabla de 2 x 2, así como las fórmulas para hallar la sensibilidad y especificidad diagnóstica. Se determinó el intervalo de confianza al 95% para los valores de sensibilidad y especificidad diagnóstica.

La S (sensibilidad) y E (especificidad) fueron: $S = 87\%$, $E = 91\%$, Valor predictivo Positivo VP (+) = 81% , Valor predictivo Negativo VP (-) = 94% , Likelihood ratio LR(+) = $9,7$, Likelihood ratio LR (-) = 0.14 ,

De acuerdo al valor de corte obtenido en la estandarización del ensayo inmunoenzimático para la determinación de anticuerpos anticitoplasma de neutrofilo total se obtuvo los siguientes resultados: 71% de pacientes negativos, 29% de pacientes positivos a la prueba.

9.1.3.3 PRUEBA INMUNOENZIMATICA DE REFERENCIA (KIT COMERCIAL BINDING SITE)

La determinación de anticuerpos anti-MPO y anti Pr3 por el Kit comercial (Binding Site) como prueba de referencia presentaron los siguientes resultados: 78 % de pacientes negativos y 22 % de pacientes positivos.

La S (sensibilidad) y E (especificidad) fueron: S = 90 % , E = 92 % , Valor predictivo Positivo VP (+) = 90 % , Valor predictivo Negativo VP (-) = 91% , Likelihood ratio LR(+) = 11.5 , Likelihood ratio LR (-) = 0.11 (Tabla N°3)

TABLA N° 3 Resumen Parámetros estadísticos de la prueba ELISA estandarizada y la prueba de referencia (Kit Binding Site) para la detección de ANCA

Parámetro	Prueba estandarizada ELISA	Prueba de referencia (Kit Binding Site)
Sensibilidad	87 %	90 %
Especificidad	91 %	92 %
Valor Predictivo Positivo	81 %	90 %
Valor Predictivo Negativo	94 %	91 %
Likelihood ratio Positivo	9,7	11.5
Likelihood ratio Negativo	0,14	0.11

9.2 ESTANDARIZACION DE LA PRUEBA DE INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA

9.2.1 AISLAMIENTO DE POLIMORFONUCLEARES

La obtención de la población celular polimorfonucleares (PMN) adecuada para la prueba de Inmunofluorescencia Indirecta a partir de sangre total por el método de gradiente de doble densidad fueron: $3,7 \times 10^6$ cel /ml, obteniéndose así una pureza del 95 % y viabilidad del 94 %

9.2.2 TITULACION DEL CONJUGADO FLUORESC EINADO

Se ensayaron diferentes diluciones del conjugado fluoresceinado (anti-Ig humana FITC DAKO) con la población celular de PMN en sus diferentes concentraciones, y diluciones de las muestras control es y muestras de pacientes aparentemente normales, llegando a obtener la dilución adecuada 1/400.

El patrón de fluorescencia observado en el control positivo fue evidente en las primeras dos diluciones (1/200, 1/400), sin embargo en la dilución 1/800 la reacción fue tenue. El comportamiento del control negativo y el control normal fue similar, por que la reacción fue positiva en la dilución 1/200 casi como el control positivo, en cambio en las diluciones 1/400, 1/800 la reacción fue negativa. (Tabla N°4).

TABLA N° 4 Titulación del Conjugado anti Ig humana FITC sobre PMN

	CONJUGADO ANTI IG HUMANA FITC		
	Dil 1 /200	Dil 1/400	Dil 1/800
Control Positivo	+	+	+/-
Control Negativo	+	-	-
Control Normal	+	-	-

9.2.3. DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DIAGNÓSTICA DE LA PRUEBA ESTANDARIZADA IFI

Del total de la población estudiada mediante la prueba de Inmunofluorescencia Indirecta estandarizada se obtuvieron los siguientes resultados: 72 % de pacientes **No reactivos** y 28 % de pacientes **Reactivos** .

Se obtuvo Sensibilidad = 76%, Especificidad = 93%, Valor predictivo (+) = 65 %, Valor predictivo negativo (-) = 88%, Likelihood ratio (+) = 10.85 . Likelihood ratio (-) = 0.25. Tabla N°5

9.2.4 PRUEBA DE INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA DE REFERENCIA (KIT COMERCIAL BINDING SITE)

La determinación de ANCA por Inmunofluorescencia Indirecta realizada por el Kit comercial (Binding Site) como prueba de referencia presentaron los siguientes resultados: % de pacientes negativos y % de pacientes positivos.

La S (sensibilidad) y E (especificidad) fueron: S = 70 % , E = 93 %, Valor predictivo Positivo VP (+) = 86 % , Valor predictivo Negativo VP (-) = 83%, Likelihood ratio LR(+) = 10 , Likelihood ratio LR (-) = 0.3. Tabla N°5

TABLA N° 5 Resumen Parámetros estadísticos de la prueba IFI estandarizadas para la detección de ANCA total

Parámetro	Prueba estandarizada IFI	Prueba de referencia IFI (Kit Binding Site)
Sensibilidad	76 %	70 %
Especificidad	93 %	93 %
Valor Predictivo Positivo	65%	86%
Valor Predictivo Negativo	88%	83%
Likelihood ratio Positivo	10.85	10
Likelihood ratio Negativo	0.25	0.3

9.2.5 CORRELACION DE LA PRUEBA IFI ESTANDARIZADO Y LA PRUEBA DE REFERENCIA IFI KIT COMERCIAL (BiNDING SITE)

La estandarización del método IFI fue analizado con el índice de concordancia kappa obteniendo 0.675 interpretado como **buena concordancia**

TABLA N° 6 Correlación de la Prueba IFI estandarizada y la Prueba IFI de referencia (Binding Site)

		Valor	Error típ. asint.(a)	Sig. aproximada
Medida de acuerdo	Kappa	.675	.125	.000
N de casos válidos		99		

9.2.6 DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DIAGNÓSTICA DE LAS PRUEBAS ESTANDARIZADAS IFI Y ELISA

Se evaluaron ambas pruebas estandarizadas simultáneamente obteniéndose: los siguientes parámetros: Sensibilidad 88 %, Especificidad 91 % Valor predictivo Positivo VP (+) = 68 % , Valor predictivo Negativo VP (-) = 91 %, Likelihood ratio LR(+) = 9.8 , Likelihood ratio LR (-) = 0.1. Tabla N°7

TABLA N° 7 Resumen Parámetros estadísticos de las pruebas estandarizadas IFI y ELISA para la detección de ANCA total

Parámetro	Prueba Estandarizada IFI y ELISA ANCA total
Sensibilidad	88 %
Especificidad	91 %
Valor Predictivo Positivo	68 %
Valor Predictivo Negativo	91 %
Likelihood ratio Positivo	9.8
Likelihood ratio Negativo	0.1

9.3 CORRELACIONES

Los datos obtenidos de la prueba estandarizada de inmunofluorescencia indirecta IFI y el ensayo inmunoenzimático ELISA fueron analizados por el programa SPSS 11.5 obteniéndose el coeficiente de correlación con otros parámetros bioquímicos medidos y obtenidos de la Historia Clínica de cada uno de los pacientes entre ellos, Hematocrito, Determinación de Creatinina, Cuantificación de la fracción C3 y C4 del Complemento, Prueba del ASTO, Determinación de ANCA por un Kit comercial, Determinación de anticuerpos anti-PR3, anti-MPO, Anticuerpos antinucleares ANA, Anti-DNA, Factor reumatoide.

9.3.1 CORRELACIONES DE LA PRUEBA ELISA ESTANDARIZADA CON DIVERSOS PARÁMETROS LABORATORIALES

Con la finalidad de encontrar relación entre las pruebas estandarizadas con otros parámetros laboratoriales observados se procedió a analizarlos con parámetros estadísticos como el coeficiente de correlación de Pearson, Spearman. ($p < 0.01$ y 0.05) Se obtuvo un coeficiente de correlación de $r = 0,446$ correlacionando con la Determinación de Hematocrito (Grafico N° 9), $r = 0,524$ con la determinación de Creatinina (Grafico N° 10), $r = 0,348$ con Proteinuria (Grafico N° 11), $r = - 0,370$ con la Cuantificación de la fracción C3 del Complemento, (Grafico N° 12), $r = 0,588$ con la determinación de anticuerpos anti-MPO (Grafico N° 13), $r = 0,533$ con la determinación de anticuerpos anti PR3 (Grafico N° 14),

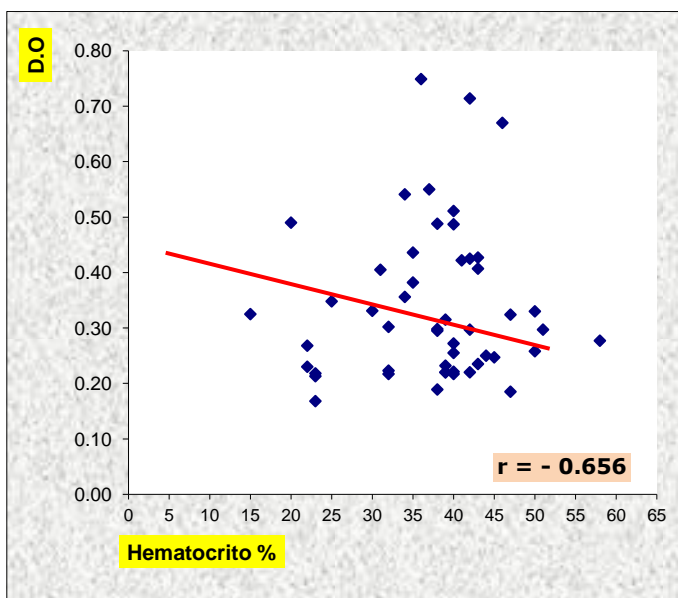


Grafico N° 9 Correlación entre la D.O de la Prueba estandarizada ELISA y el Hematocrito de cada paciente

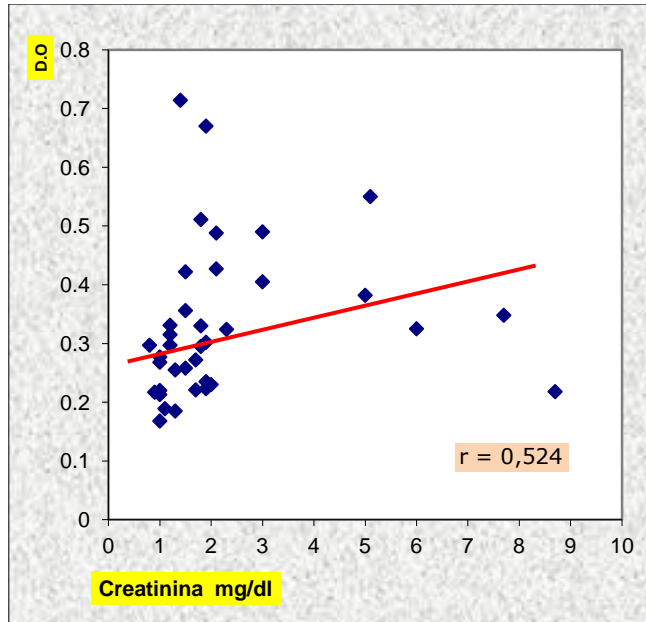


Grafico N° 10 Correlación entre la D.O de la Prueba estandarizada ELISA y la determinación de Creatinina en cada paciente

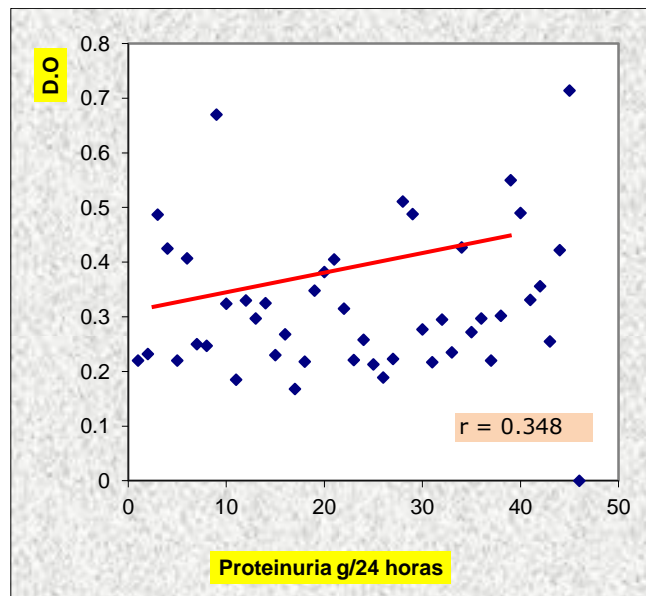


Grafico N° 11 Correlación entre la D.O de la Prueba estandarizada ELISA y la determinación de Proteinuria en cada paciente

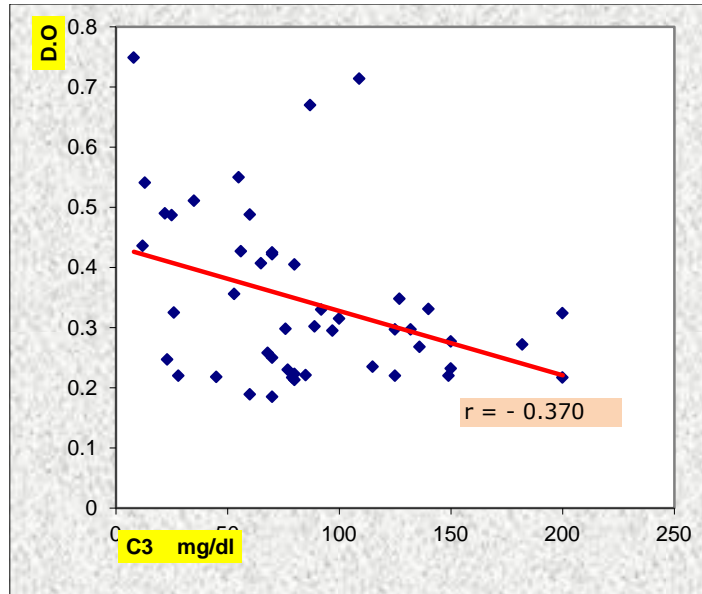


Grafico N° 12 Correlación entre la D.O de la Prueba estandarizada ELISA y la Cuantificación de la fracción C3 del complemento en cada paciente

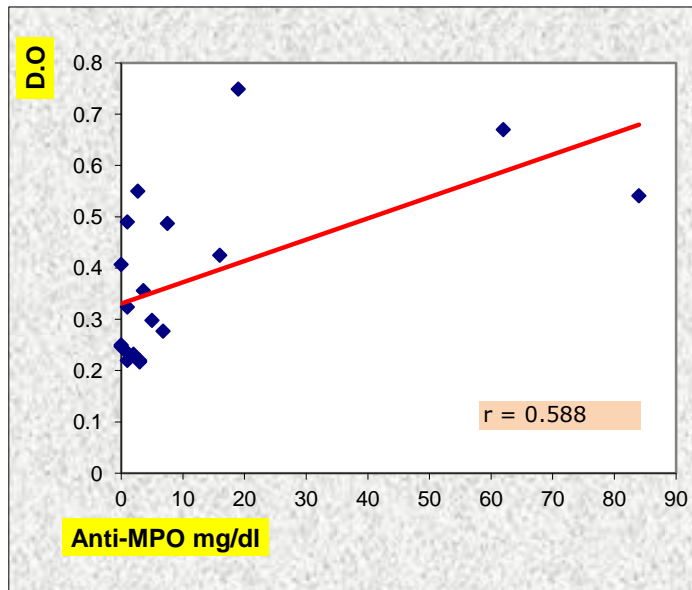


Grafico N° 13 Correlación entre la D.O de la Prueba estandarizada ELISA y la Prueba Anti – MPO ELISA en cada paciente

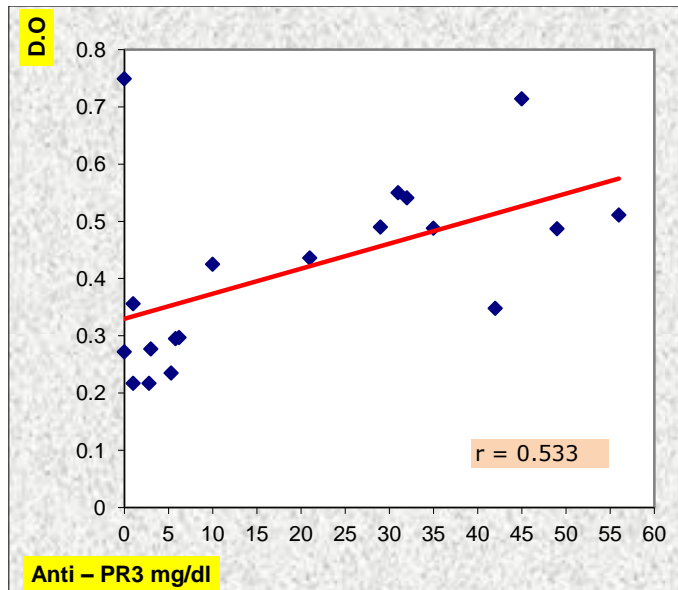


Grafico N° 14 Correlación entre la D.O de la Prueba estandarizada ELISA y la determinación de Anti - PR3 en cada paciente

9.3.2 CORRELACIONES PRUEBA INMUNOFLORESCENCIA INDIRECTA ESTANDARIZADA CON DIVERSOS PARÁMETROS LABORATORIALES

El coeficiente de correlación con los diferentes parámetros laboratoriales estudiados fueron: $r = 0.749$ con el Hematocrito, $r = 0.750$ con la Determinación de Creatinina, $r = 0.372$ con Proteinuria, $r = - 0.650$, con la Cuantificación de la Fracción C3 del Complemento, $r = 0.580$ con la Prueba ANCA IFI por un Kit comercial, $r^2 = 0.866$ con la Determinación de Anti - MPO, $r = 0.758$ con la Determinación de Anti - PR3, $r = 0.581$ con la Prueba estandarizada ELISA. Tabla N° 8

TABLA N° 8 Índice de correlación de las pruebas estandarizadas IFI y ELISA con los diferentes parámetros bioquímicos medidos en cada paciente

Parámetros Bioquímicos	INDICE DE CORRELACION "r"		
	Prueba Estandarizada IFI	Prueba Estandarizada ELISA	INTERPRETACION
❖ Hematocrito	- 0.749	- 0.656	Muy Buena
❖ Creatinina	0.750	0.524	Muy Buena
❖ Cuantificación C3 complemento	-0.650	- 0.370	Buena
❖ Proteinuria	0.372	0.348	Moderada
❖ ANCA IFI (Kit Binding Site)	0.580	0.678	Muy Buena
❖ Anti –PR3	0.866	0.588	Muy Buena
❖ Anti – MPO	0.758	0.533	Muy Buena
❖ ANCA IFI estandarizado	-	0.501	Muy Buena
❖ ANCA EIA estandarizado	0.581	-	Muy Buena

10. DISCUSIÓN.

Resulta notable el incremento experimentado en los años recientes en el número de investigaciones básicas, clínicas y epidemiológicas en el campo de los anticuerpos anticitoplasma de neutrofilo ANCA, particularmente en relación con una variedad de enfermedades autoinmunes, su determinación permite colaborar con el diagnóstico temprano de graves patologías ligadas a estos autoanticuerpos.

Tomando en cuenta las recomendaciones que da el Consenso Internacional sobre los métodos y referencia de los ANCA donde exige que todas las muestras de suero de pacientes con sospecha de presencia de ANCA sean analizadas por una técnica de Inmunofluorescencia Indirecta estandarizada (20,41), se desarrolló la prueba que describimos por el método estándar de IFI para ANCA en base a la desarrollada en 1985 por Davis, (1) con las características que tienen estas técnica como el empleo de Anticuerpos que están marcados con un fluorocromos (fluoresceína, rodamina etc.) “conjugados”, para poner de manifiesto la presencia del complejo Ag-Ac, sobre citocentrífugados de Neutrofilos aislados. El concepto básico que justifica la función primaria de la Inmunofluorescencia indirecta para detectar ANCA, es que el Sustrato “ neutrofilos ” (PMN) intactos provea todos los epítopes para la reacción antígeno y anticuerpo, en nuestro estudio, utilizamos PMN fijados al vidrio como “sustrato ” (98% pureza y 95 % de viabilidad) demostrando ser una metodología eficiente con sensibilidad 76% y especificidad 93%, porque permite el análisis de un numero considerable de muestras en corto periodo, con ventajas adicionales referidas a la preparación del sustrato respecto a otras variantes de IFI, además el costo reducido de la prueba para los pacientes que la requieren (38), resultando ser económico en países como el nuestro. (19,22) .

Al comparar el porcentaje de muestras positivas en relación al porcentaje de positivos obtenidos por el Kit comercial de referencia observamos que es menor, lo cual podemos explicar por factores que influyen en la preparación del sustrato, métodos de aislamiento donde uno de los pasos fundamentales es el lavado de las células aisladas, evitando ser activadas y degranuladas y no producir falsos negativos, tal como se demostró en estudios similares de estandarización de técnica por IFI propuestos por Elena Kokuina y col (23). al estudiar ANCA en extensiones de células lavadas de sangre periférica, donde obtiene una relación de 25/23 muestras positivas comparado con un método de referencia

IHI, donde explica que se debe a la rápida preparación de sustrato prescindiendo del aislamiento de neutrofilos y evitando así la degranulación de las células además con ventajas adicionales como la observación de células de mayor tamaño, y la diferencia de fluorescencia en las diferentes formas de leucocitos.

El método IFI estandarizado en nuestro estudio no permitió detectar los patrones de fluorescencia clásicamente descritos de ANCA citoplasmático y el perinuclear, coincidiendo con los encontrados por Elena Kokuina y col (24) donde se asume a factores técnicos:

Uno de ellos es la característica que presenta el conjugado (DAKO FITC –conjugated Anti-human IgA, IgG, IgM, Kappa, Lambda) utilizado en nuestro estudio dirigido frente a las inmunoglobulinas humanas polivalentes con una elevada proporción FITC / proteínas (F/P = 2.5), mientras que la metodología estándar recomienda la utilización de antisueros conjugados específicos para IgG con una proporción de F/P < 2.3, tal como presenta el Kit comercial conjugado FITC anti Human IgG (H+ L) y con el cual se pueden diferenciar claramente los patrones. Pues los antisueros poliespecíficos que detectan ANCA, de clase IgA, IgM así como una elevada proporción de fluorocromo/proteína pueden interferir con la disminución de los patrones de fluorescencia.

Los resultados del método IFI estandarizado fueron casi similares a los resultados del Kit comercial (Binding Site), reflejado este en el índice de concordancia Kappa entre los dos métodos ($k = 0.675$ $p < 0.04$), demostrando así ser aceptables y significativos. Es importante notar que además del análisis estadístico realizado a la prueba estandarizada, también se realizó a la prueba de referencia Kit comercial Bindig Site donde se obtuvo valores por debajo de lo referido en las instrucciones del Kit referente a la sensibilidad y especificidad diagnóstica.

Para eliminar las dudas sobre los falsos negativos y positivos de nuestro método de IFI fueron testados por otro método de mayor sensibilidad y especificidad como el Inmunoenzimático ELISA.

Así mismo para la estandarización del ELISA total se toma en cuenta las características que tiene este método, las técnicas inmunoenzimáticas se basan en el marcaje de Anticuerpos y Antígenos con enzimas, para la posterior detección de su interacción. El uso de enzimas como marcadores capaces de proveer una potente señal (mediante su

actividad catalítica), presenta una serie de ventajas en comparación a métodos que usan radioisótopos como marcadores (equipamiento, vida media de los reactivos, entrenamiento del operador, habilitación apropiada). Los límites de detección pueden llegar a ser tan bajos como los logrados con radioisótopos, y la automatización de la técnica ha permitido la aplicación masiva para la determinación de diferentes sustancias.

La estandarización y validación de la prueba ELISA para ANCA total fue realizada con la tentativa de obtener una prueba altamente sensible y específica de aplicación práctica .

Los resultados que presentamos avalan la calidad analítica de los métodos desarrollados que emplean reactivos propios, ya que el análisis estadístico realizado permite concluir que la sensibilidad y la especificidad del sistema desarrollado son aceptables y significativos, (sensibilidad 87 % y especificidad 91%) esta evidencia es demostrada en la en el Grafico N° 6 donde se muestra la dispersión de datos con diferencias claras en cuanto a la densidad óptica de los grupos clasificados (positivo, negativo y control normal) y comparados con los resultados de la prueba de referencia Kit comercial (Binding Site), en ambos sistemas los controles empleados mostraron una buena aproximación.

Los parámetros que nos permiten valorar la capacidad del ensayo estandarizado para identificar y/o diferenciar a pacientes enfermos y no enfermos son la sensibilidad y especificidad diagnóstica. Para el efecto, las muestras positivas de referencia procedieron de pacientes que solicitaron la prueba de Determinación de ANCA por Inmunofluorescencia Indirecta, y ELISA anti-MPO. Anti-PR3 mediante un Kit comercial (Binding Site), además cada uno de ellos fue evaluado con su historia clínica confirmando así el estado de enfermedad , mientras que los sueros negativos de referencia procedieron de un grupo de personas aparentemente sanas.

El análisis realizado con la curva ROC, representa la relación entre la fracción verdaderamente positiva (FVP) y la fracción de falsos positivos (FFP) de las muestras de referencia, señalando el punto de corte (11), estimado que reduce los datos generados por el procesamiento de las muestras de referencia en dos categorías: positivas o negativas, según el resultado de la absorbancia desarrollada por cada muestra transformada en términos de porcentaje positivos (PP). La inserción del punto corte (abs. 0.358) a los resultados de ELISA de los sueros de referencia, categorizó a 17 de 15 sueros positivos de referencia como verdaderos positivos y 2 como falsos negativos

(sensibilidad diagnóstica = 87 %). Esto indica que la prueba estandarizada tiene la capacidad de identificar con precisión el 87 % de pacientes enfermos asociados con ANCA, la diferencia (23 %) quedan erróneamente clasificados como sanos . Por otro lado, 33 de 35 sueros negativos de referencia fueron categorizados como verdaderos negativos y 2 como falso positivo (especificidad diagnóstica = 91%). Todo esto, es una característica intrínseca de la prueba estandarizada de identificar correctamente al 98.6% de pacientes enfermos, y al 1.4% de pacientes no enfermos los cataloga equivocadamente como enfermos.

La utilidad diagnóstica que tienen ambas pruebas aumentan la sensibilidad y especificidad diagnóstica en nuestro estudio porque juntas presentan una sensibilidad de 88 % y una especificidad de 91 % valores mayores a los encontrados cuando se los analiza por separado, lo mismo recomienda Wang G, Csernof, y col (41) cuando estudiaron 8 kits comerciales por IFI y ELISA ellos compararon y los correlacionan con las enfermedades específicas y características autoanticuerpos, llegando a la conclusión de que la sensibilidad y la especificidad aumenta cuando las dos técnicas son evaluadas juntas.

La evaluación analítica constituye una ayuda eficaz en los pacientes con enfermedades reumáticas sistémicas. No existe un conjunto de "pruebas reumáticas" que permitan realizar un diagnóstico definitivo de una enfermedad, sino que este debe basarse en la historia clínica y la exploración física. La analítica es útil para corroborar o excluir un diagnóstico, facilitar el seguimiento de una enfermedad, determinar la afectación de otros órganos o para valorar la eficacia de un tratamiento.

En nuestro estudio la valoración clínica realizada en cada paciente fue importante principalmente al momento de evidenciar la asociación a las características típicas de las enfermedades autoinmunes como en el LES, el patrón clínico no fue único porque presentaron signos y síntomas constitucionales como la fiebre pérdida de peso malestar general y letargia, también se encontraron poliartralgias como manifestación frecuente en diferentes articulaciones en pacientes con diagnóstico de artritis reumatoidea y fiebre reumática, lesiones cutáneas, erupciones eritematosas en diferentes áreas del cuerpo, parches de púrpura , urticaria, edema, como frecuentes lesiones vasculíticas, 2 de nuestros pacientes presentaron una notable vasculitis leucocitoclástica por el antecedente de ingestión de fármacos ingeridos para el tratamiento de enfermedades asociadas y el

compromiso con otros órganos, la evolución en uno de los pacientes fue desfavorable con alta por defunción debido a un paro cardiorrespiratorio.

En nuestra población de estudio se observó a 25 pacientes que dieron reactividad positiva a la determinación de ANCA por los dos métodos estandarizados, los cuales presentaron antecedentes patológicos como posibles factores determinantes en la etiología de la vasculitis, entre estas las enfermedades infecciosas la más frecuente fue la Infección Urinaria, tuberculosis, sífilis, salmonelosis, Infecciones respiratorias agudas y Neumonías, y solo en un paciente se observó la presencia de candidiasis y parasitosis.

En la investigación de los pacientes con sospecha de Vasculitis, y Glomerulonefritis y ANCA positivos por los dos métodos estandarizados en nuestro estudio resulta importante establecer la extensión que tiene la lesión de los órganos vitales, en particular los riñones y pulmones, todos los pacientes estudiados ingresaron al Servicio de Nefrología presentando daño a nivel renal debido a la enfermedad que manifestaba, la principal causa era el LES confirmada con pruebas específicas de laboratorio como el AntiDNA, ANA, y ANCA simultáneamente.

Del total de nuestros pacientes, solo se presentó un paciente con síndrome de Goodspature, con signos característicos de esta enfermedad como la hemorragia pulmonar, glomerulonefritis con insuficiencia renal progresiva; proteinuria con anemia severa por los episodios de hemorragia, al mismo se le realizó la determinación de ANCA IFI y ELISA por el Kit comercial dando patrón perinuclear dirigido a la mieloperoxidasa con 49 IU/ml y por los métodos estandarizados IFI positivo, ELISA abs 0.487 por encima del cutoff 0.358. El cuadro de evolución que desarrolló fue favorable, la afección renal fue controlada y verificada con la determinación de los niveles de creatinina en suero dando resultados óptimos desde de 4,8 a 1,8mg/dl, a su vez la ecografía renal indicó lo mismo, no se le realizó nuevamente la determinación de ANCA

Un paciente presentó Glomerulonefritis Rápidamente Progresiva con una evolución desfavorable porque murió a causa de Insuficiencia Renal y el compromiso vascular y glomerular, el cuadro clínico que presentó coincidió con la clasificación que describe Savage COS y col (35) donde el cuadro que presentan a menudo es irreversible, esta Insuficiencia renal se asocia al desarrollo de lesiones glomeruloinflamatorias con predominio de proliferación extracapilar.

Una de las enfermedades con las que se asocian los ANCA es por ejemplo la enfermedad de Behçet, uno de los paciente de nuestro estudio presentó esta enfermedad con una evolución favorable como proceso de un curso benigno autolimitado determinado por el control que se realizó con la determinación de ANCA por el kit comercial y por los métodos estandarizados. Tal heterogeneidad sugiere que el desarrollo de inflamación y lesión vascular sea probablemente un proceso multifactorial en el que concurren distintos mecanismos patogénicos.

En nuestro estudio la afección renal fue una característica frecuente y grave en alguno de los casos quienes llegaron a morir por causa de insuficiencia renal, para ello las pruebas de la función renal evaluadas en cada paciente de nuestro estudio fue la determinación de creatinina, proteinuria, las que presentaron buena correlación positiva con los datos obtenidos de las pruebas estandarizadas ELISA e IFI ANCA, explicado en el sentido de que los neutrofilos están íntimamente asociados a la destrucción glomerular, lo que ha sido demostrado por la significancia en la reducción del daño renal que se observa cuando se produce una depleción de los neutrofilos en modelos experimentales de glomerulonefritis, (1)

Otro dato importante en estas afecciones es la anemia normocítica normocrómica como dato hematológico, debido a la supresión de la medula ósea, en este caso el índice de correlación negativa ($r = -0.749$ IFI, -0.656 ELISA) es interpretado como muy buena por que los pacientes presentaron niveles de Hematocrito por debajo del valor de referencia y 2 pacientes desarrollaron anemia hemolítica confirmada con la prueba de Coombs.

Dentro de las pruebas inmunológicas complementarias que se realizaron a los pacientes de nuestro estudio fue la determinación de la fracción c3 del complemento, por el daño producido a los tejidos blanco, como mecanismo efector importante de la respuesta inmune como un conjunto de proteínas plasmáticas que interactúan entre si y participan en el proceso inflamatorio, eliminando inmunocomplejos y microorganismos, es así que los valores de la determinación de la fracción c3 del complemento en los pacientes con afección renal presentaron valores por debajo del rango de referencia y estadísticamente una buena correlación negativa con las pruebas estandarizadas IFI Y ELISA para ANCA total ($r = -0.650$ IFI y $r = -0.370$ ELISA).

11. CONCLUSIONES

- ❖ Se logró estandarizar un ensayo inmunoenzimático ELISA para detección de anticuerpos anticitoplasma de neutrófilo total ANCA obteniendo un punto de corte de 0.358 de Absorbancia para la designación respectiva de pacientes enfermos y sanos, con una sensibilidad de 86% y especificidad de 91%.
- ❖ Se logró estandarizar un ensayo de Inmunofluorescencia Indirecta IFI para detección de anticuerpos anticitoplasma de neutrófilo ANCA en base a las recomendaciones del Consenso Internacional para la detección de estos autoanticuerpos, obteniendo una sensibilidad de 76% y especificidad de 93%
- ❖ La comparación los resultados de la prueba del ensayo inmunoenzimático ELISA y la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta IFI estandarizados con los resultados del Kit comercial (Binding Site), fue satisfactoria obteniendo parámetros de correlación e índices de concordancia buena.
- ❖ El ensayo inmunoenzimático ELISA y la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta IFI estandarizados para la detección de ANCA total demostraron tener buena utilidad clínica en pacientes con Vasculitis y Glomerulonefritis asociados a enfermedades autoinmunes principalmente LES
- ❖ Las pruebas estandarizadas evaluadas en forma conjunta presentan valores estadísticos mas altos que los encontrados en forma separada.
- ❖ La Sensibilidad y Especificidad de la prueba IFI estandarizado es mayor a la prueba de referencia utilizada para el estudio Kit Comercial Binding Site.
- ❖ Los valores de Sensibilidad y Especificidad diagnostica del Kit comercial *Binding Site* tanto del método IFI como el ELISA son mayores a los encontrados en el estudio
- ❖ De acuerdo al análisis de costos los métodos IFI y ELISA estandarizados presentan costos mas bajos en comparación de los métodos de referencia

RECOMENDACIONES

Es necesario subrayar que el valor clínico de un método para detectar ANCA depende no solo de sus características operacionales como sensibilidad y especificidad, sino también de la situación clínica a la cual se aplica, por lo que solo el uso prudente del estudio de los ANCA en el marco de procesos clínicos propios de las vasculitis y glomerulonefritis podrá conducir al diagnóstico acertado.

La optimización continuada del método para la detección de ANCA conjuntamente con diseños adecuados de su aplicación clínica es lo que permitirá esclarecer la utilidad clínica de los ANCA.

BIBLIOGRAFIA

1. Arranz. O, Ara J., Rodríguez , E. et al **“Anticuerpos Anticitoplasma de Neutrofilo”** Servicio de Nefrología. Hospital Clinico IDIBAPS. Barcelona.España. Disponible en URL: <http://www.geocities.com/oarranzali/ifima.htm>.
2. Arranz. O. **“Glomerulonefritis Rápidamente Progresiva”** Rev. Nefrología Buenos Aires Argentina. 2001 12 (4) .
3. Arranz, J. Ara, A. Saurina, R. Rodríguez,E. Mirapeix, A. Darnell. **Relación entre los niveles séricos de IL-2R y la actividad clínica en un grupo de pacientes con vasculitis de pequeño vaso ANCA positivas** Servicio de Nefrología. Hosp. Clínic.IDIBAPS. Barcelona. Disponible en URL:<http://wwwgeocities.com/oarranzali>.
4. Baraona R.F, Downey P. **“Insuficiencia Renal Aguda”** Temas de Medicina Interna. Univ. Católica de Chile. Noviembre 2001.
5. Ballarin .J, Agraz. J, Calero. F, Llobet. JM, Mora. J, Garra. N, **“Glomerulonefritis extracapilares. Clasificación”** Servicio de Nefrología. Fundación Purguest. Unidad de Reumatología. Hospital San Pablo. Barcelona España. 2000.
6. Brisson. CM, Blanzaco D, D’Alessandro M. Pedro ME. Giuni MC, Kiryan M. et al **“Anticuerpos anticitoplasma de Neutrofilo ANCA. Prevalencia en Población sana de Santa Fé Argentina”** Departamento de Bioquímica Clínica y cuantitativa. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas Universidad Nacional del Litoral. Santa Fe Argentina.1998
7. Cardinalli.A, Gabriel M, Pizzimenti C, **“ Diagnostico Inmunológico de las Vasculitis inmunes asociadas a ANCA .** Tesis de Doctorado. Laboratorio de Inmunología Clínica. Universidad de Buenos Aires Argentina. 2000
8. Cinta Cid Maria X. **Conferencia clínico patológica Mecanismos patogénicos de las vasculitis sistémicas. Nuevos conceptos** Med Clin (Barc) 1998; 110: 587-596
9. Coscara R. **Enfermedades autoinmunes Sistémicas.** Disponible en URL: [http://www ECA-SIWE](http://www.ECA-SIWE). Enfermedades autoinmunes sistémicas. Web master 2000;12-23.
10. Fernández MS, **“ Auto anticuerpos mas frecuentes en enfermedades el tejido conectivo”** Rev.Sociedad de Medicina Interna de Buenos Aires. Disponible en URL: <http://.www.medspein.com>

11. Fernández P. Diaz P. **Metodología de la Investigación. Pruebas Diagnósticas.** Unidad de Epidemiología y Bioestadística. Complejo Hospitalario Universitario España. Disponible en URL: <http://www.fisterra.com/material/investig/pruebas.htm>
12. Falck. JC, Small V, " **Vasculitis**" **Resumen de las Clases de Vasculitis.** Journal Medicinell 1997, 337:15,12
13. Falk RJ Jennette JC, **Disease associations and pathogenic role of antineutrophil cytoplasmic autoantibodies in vasculitis** Curr Opin Rheumatol. 1992 Feb;4(1):9-15.
14. Freggiore.L. **"El Laboratorio en Reumatología"**. Artículo Científico. Disponible en URL: http://orbita.starmedia.com/~forobioq/art_reuma.html
15. Garcia H. **Receptores estrogenicos: Valoración de Procedimientos Inmunohistoquimicos e Histoquímicos Enzimaticos para su detección.** Tesis de Grado para optar a la Licenciatura en Bioquímica y Farmacia . 1998. SELADIS. La Paz Bolivia.
16. Garcia de Olarte Diana. **Aislamiento de Polimorfonucleares de Sangre periférica.** Versión disponible en: URL <http://www.laqid.lsuhs.edu/Metodos/971-027.htm>
17. Gonzales Quijada, M. Sevil Puras, A. R. Valledor, R. Loma **En el Análisis clínico de 91 casos de vasculitis de mediano y pequeño vaso en adultos.** Rev Cub. Hem.Inm. 2002;16(2)
18. Guerreiro. A, Villaescusa, R, Morera L, Arce Ada, . Merlín L, Ramos, et al. **"Anticuerpos Anticitoplasma de Neutrofilo en Pacientes con enfermedades renales"** Rev. Cub. Hematología, Inmunología, Hemoterapia 1997;13 (2):116-9.
19. Guerreiro A. Villaescusa, R, Morera L, Arce Ada, . Merlín. " **ANCA: Una herramienta importante en el diagnostico de Vasculitis**" Rev. Cub. Hematología, Inmunología, Hemoterapia 2002;18 (3)
20. Hagen EC , Daha MR, Hermans J, Andrassy K, Csernok E, Gaskin G et al. **Value of diagnosis of the analyses estandarizados for the antibodies citoplásmicos of the against-anti-neutrophil in vasculitis systemic idiopathic. Project of EC/BCR for the standardization of the analysis of ANCA** Departamento de la nefrología, hospital Leiden.. Riñón Interno. 1998 Mar;53(3) 743-53. PMID: 9507222 [PubMed – puesto en un índice para MEDLINE FJ.

21. Hagen EC, MR. de Daha, Hermans J, Andrassy K, Csernok E, Gaskin G. **Characterization of antibodies monoclonal to the proteinase 3 (PR3) as the candidate's tools for traz of the epitope of the autoantibodies human anti-PR3** Department of the Nefrología, hospital Leiden. Rev Riñón Interno. 1999 Mar;39 (3):125-36. PMID: 7681736 [PubMed - puesto en un índice para MEDLINE
22. Kyndt X, Roumax D, Bridoux F, y col “ **Serial Measurements of Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies in Patients with systemic vasculitis**” The Americans Journal of Medicine. 106; 527-533 Ref 28 de Mayo de 1999. Disponible en URL: <http://siicsclud.com.main/siiconsu.htm>
23. Kokuina E. Sánchez M. Arias A. Guerreiro A. “**Anticuerpos Anticitoplasma de Neutrofilo en la Clasificación de las Vasculitis Sistémicas** Hospital Clínico Quirúrgico “Hermanos Ameijeiras” . Rev. Cubana. Med. 2003;42 (6).
24. Larguía A.,” **Insuficiencia Renal ¿Qué debe saber el clínico?** 8vo congreso Internacional de Medicina Interna. Hospital de Clínicas Buenos Aires Argentina. Rev. Medicina 2000.60. (1) 85-93
25. Linares J.,Villa M.,Mora L.M.,”**Anticuerpos anticitoplasma de neutrofilo ANCA en pacientes con Nefropatía diabética**” Rev. Cub. de Hematología, Inmunología y Hematoterapia1998. 14; 87-90,
26. Mirapeix E.,” **Anticuerpos Anticitoplasma de Neutrofilo. Su contribución en la patogenia de las vasculitis**” Rev Medicina Clínica. 6 de junio Barcelona España 1998. 110. 20 778-780.
27. Moscardi F. Laniro J.L, Maxit J “**Anticuerpos Anticitoplasma de Neutrofilo ANCA en ancianos**”.. Buenos Aires Argentina. Rev Med 1997:57:1.36-40
28. Moscardi F.,. **ANCA (anticuerpos contra el citoplasma del neutrófilo) por inmunofluorescencia en la colitis ulcerosa** Rev. Hosp. Privado de Comunidad Córdoba Argentina. 2002 Agosto 5;2.
29. Pfeifer J, Robinz. L, “**Anticuerpos anticitoplasmicos contra-neutrofilo. Potencial de Diagnostico Actual**” Rev. Boletín de Noticias de la Medicina del Laboratorio 1996. Enero. 4 (1).
30. Pollock W, Dunster K, Rolland JM, Koh H, Savige J. **A comparison of commercial ELISAs and I intern for the antibodies citoplásmicos of the antineutrophil it directed against the proteinase 3 and myeloperoxidase.** Pathology Of Gribbles, Yarra of the south, Australia. 1999 Feb;31(1):38

31. Rodriguez. A., Mangas. C., Guillén P., Benitez. E, Martín L. **"Significado y Antígenos Diana de los anticuerpos frente al citoplasma de los neutrofilos ANCA en la enfermedad Inflamatoria Intestinal"** Servicio del Departamento, Digestivo, Inmunología, Medicina Interna y Preventiva: Puerta del Mar Cadiz. Noviembre 1997.
32. Roit.I., Brostoff.J., Male. D., **Immunología**. 5ªed. Ed Harcourt. 1998. Barcelona España.
33. Rose.N., **El Laboratorio en Inmunología Clínica**" 2ªed. ED Medica Panamericana. Buenos Aires Argentina.1984 1215p.
34. Sánchez L., Carvajal R., **"Guía de Trabajos prácticos de Inmunología"** Universidad Mayor de San Andrés, Facultad de Ciencias farmacéuticas y Bioquímicas. Carrera de Bioquímica La Paz Bolivia. 1998-1999
35. Savage COS. Harper L.A Ch.D. **"Vasculitis Sistémica Primaria"**. Rev Cub Med 1998;37(2):100-111
36. Savige J. Gillis D. Benson E, Davies D, Esnault V, Falk RJ, et al. **International Consensus Statements on testing and Reporting of ANCA**. Am Journal Clinic Patology 1999 Abril, 111 (4) 507-13 . Publicado (Pub Med) 2000:113 (3)455 – 6.
37. Schimt W, Vander Woude FJ, **Clinical Aplication of antineutrophil citoplasmatic antibody testing**. Current Opinión Rheumatology.2004 1; 16 (1);9-17
38. SELADIS. **Diseño del Sistema y Calculo de Costos para el Instituto de Servicios de Laboratorio de Diagnostico e Investigación en Salud**. Informe Trabajo Dirigido. 2004. La Paz Bolivia.
39. Torrico D. **"Determinación de Anticuerpos Anticitoplasma de Neutrofilo por Inmunofluorescencia Indirecta IFI "**. Tesis para optar al grado de Especialidad en Diagnostico en Salud Mención Hematología. Universidad Mayor de San Andrés. Instituto SELADIS 2000. La Paz Bolivia.
40. Villamizar J, Sandoval P. **"Avances en el Diagnóstico de la Granulomatosis de Wegener"**. Revisión de tema. Univ de Caldas. Disponible en [URL: Granulomatosis de Wegener otorrino28100-avances.htm](http://URL:Granulomatosis de Wegener otorrino28100-avances.htm).
41. Wang G, Csernok E, Groot K, . **Comparison of eight commercial kits for the quantification of the antibodies citoplásmicos of the antineutrophil (ANCA)**. Department of the reumatología, university of Lubeck, bad Lubeck/Rheumaklinik

Bramstedt gmbH, Germany. Métodos De J Immunol. 1997 Oct 27;208(2):203-11.
PMID: 9433475 [PubMed - puesto en un índice para MEDLINE]

42. Yuste Ara. J.,” **Poliarteritis Nodosa Clinica**” Universidad de Navarra.
Departamento de Medicina Interna. Última revisión 19 de Septiembre de 2002.

ANEXOS

ANEXO N° 1

PREPARACIÓN DE REACTIVOS

SOLUCION EDTA 0.1 M PH 7.5

- ❖ EDTA 0.744 g
- ❖ Agua destilada 20 ml

Disolver el EDTA en agua destilada y ajustar el pH con HCl 0.5 N

BUFFER PBS 0.15 m pH 7.2

- ❖ ClNa 4.38 g
- ❖ NaH₂PO₄ 2.15 g
- ❖ Na₂HPO₄ 8.09 g

Disolver cada reactivo por separado, mezclar y ajustar el pH a 7,2, aforar a 1 litro

BUFFER PBS 0.015 m pH 7.2

A partir de PBS 0.15 M se realiza una dilución 1 / 10

BUFFER CITRATO – FOSFATO

- ❖ Solución A Na₂HPO₄ 2.44g
- ❖ Solución B Acido cítrico 0.1 M

Mezclar 51.5 ml de la solución A con 48.5 ml de la Solución B para un volumen final de 100 ml.

BUFFER PBS – ALBÚMINA 1 %

- ❖ Albúmina 10 mg
- ❖ PBS 0.15 M 10 ml

Disolver la albúmina en PBS. 0.15 M pH 7.2

SOLUCION GLUTARALDEHIDO 0.25 %

A partir de Glutaraldehido al 25 % se prepara una dilución 1/10 para el volumen requerido

SOLUCION “SUSTRATO OPD”

- ❖ Orto-fenildifosfato OPD 25 mg
- ❖ Buffer Citrato Fosfato 10 ml

Disolver el OPD en el Buffer Citrato – Fosfato y luego añadir 14 ul de H₂O₂

SOLUCION FICOLL – HIPAQUE

Disolver 35 g de Ficoll en 35.3 ml de Agua destilada

Preparación de Hipaque

Diluir 142.35 ml de Hipaque al 70 % con 294.1 ml de agua destilada
Mezclar el Ficoll e Hipaque, medir y ajustar la densidad de la solución

- ❖ Para Ajustar la densidad de la solución :

- Pesar el pignometro vacio

A

- Pesar el pignometro con agua destilada

B

- Pesar el pignometro con la solucion de Ficoll-Hipaque

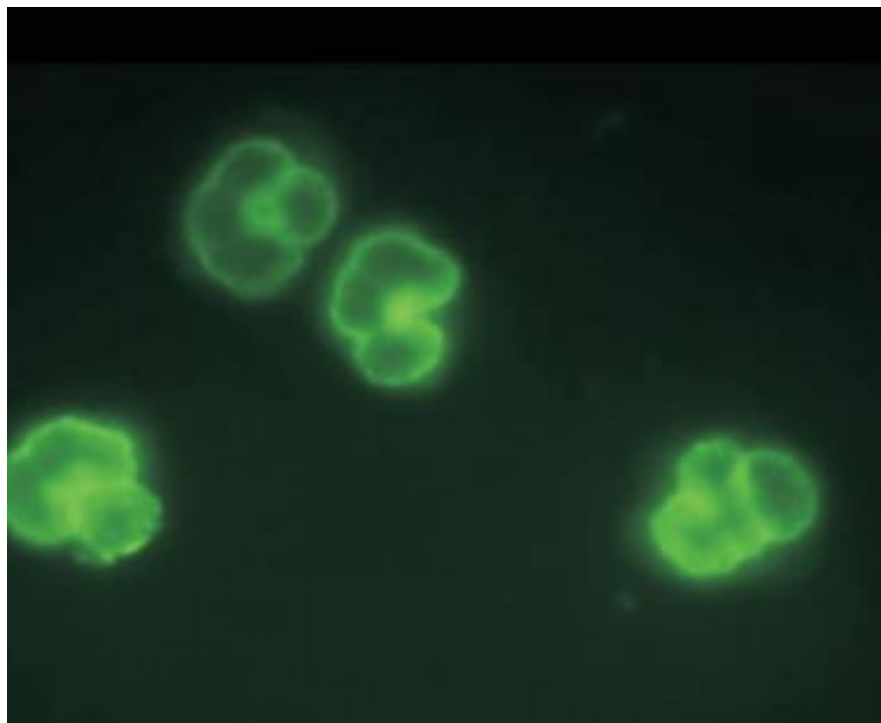
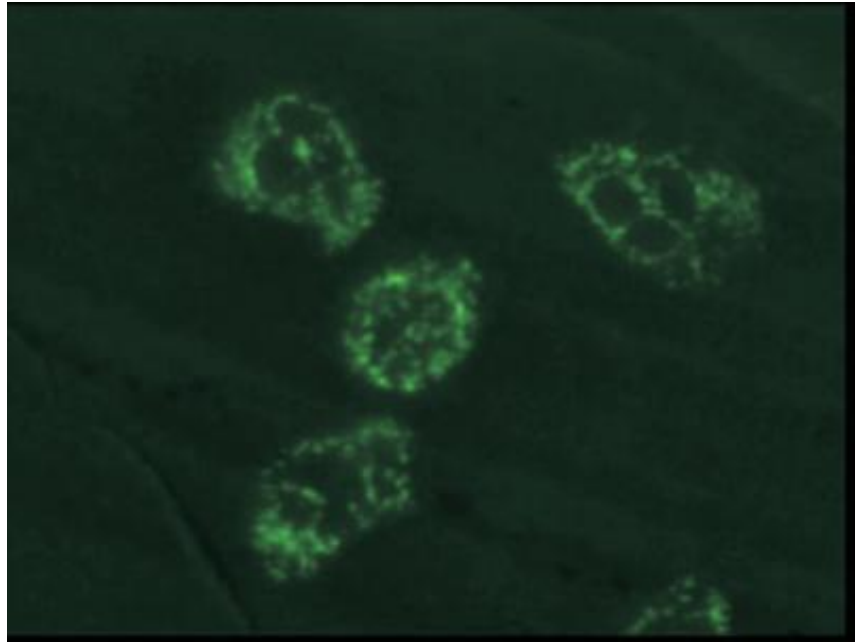
C

Aplicar la siguiente formula:

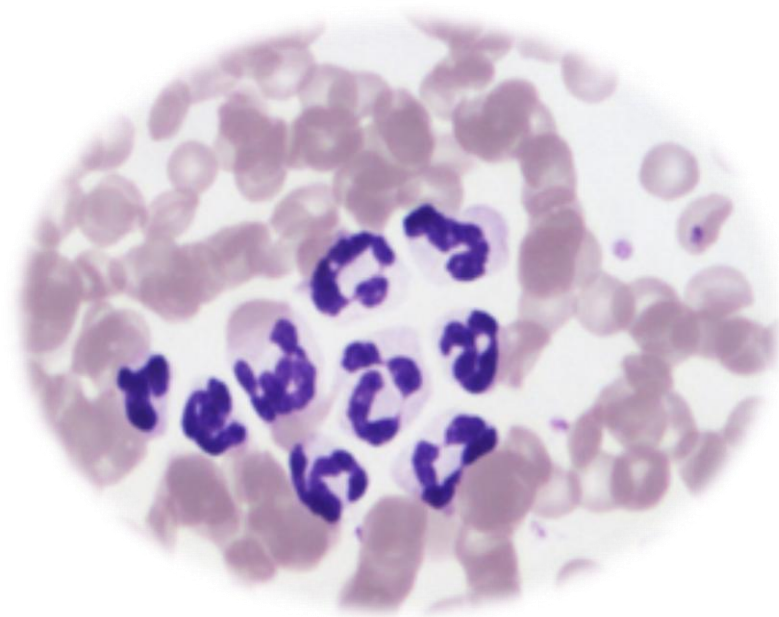
$$D = \frac{C - A}{B - A}$$

Anexo N° 2

Patrones de Fluorescencia CONTROLES POSITIVOS



AISLAMIENTO DE POLIMORFONUCLEARES



PRUEBA: ELISA



ANEXO N° 4

FORMULARIO : RECOLECCION DE DATOS

<hr/>		CODIGO
HISTORIA CLINICA		
NOMBRE Y APELLIDO		
EDAD.....		
SEXO.....		
LUGAR DE NACIMIENTO.....		
DIRECCIÓN.....		
DIRECCIÓN.....		
HOSPITAL.....		
UNIDAD.....SALACAMA		
DIAGNOSTICO MEDICO LABORATORIO		EXAMENES DE
HEMOGRAMA: HTO:..... HB.....		
GLÓBULOS BLANCOS		
RECUESTO DIFERENCIAL		
TRATAMIENTO	UREA	CREATININA
DEPURACIÓN DE CREATININA		
PROTEINURIA		
..... C4		C3
ASTO	ANA	
ANCA	FACTOR REUMATORIDEO.....	
ANTECEDENTES PATOLÓGICOS		PCR
.....		