



Sociedad Española
de Reumatología -
Colegio Mexicano
de Reumatología

Reumatología Clínica

www.reumatologiaclinica.org



Original

Frecuencia de ANCA positivos en una población con síntomas clínicos sugestivos de enfermedad autoinmune y la interferencia de ANA en su interpretación



Consuelo Romero-Sánchez^{a,b,c,d,*}, Mario Benavides-Solarte^a, Isabel Galindo-Ibáñez^e, Ana Isabel Ospina-Caicedo^a, Viviana Parra-Izquierdo^b, Lorena Chila-Moreno^e, Amanda Villa^c, María Consuelo Casas-Gómez^c, Ignacio Angarita^b, Wilson Bautista-Molano^{a,d}, Verónica Romero-Álvarez^a y Juan Manuel Bello-Gualtero^a

^a Servicio de Reumatología e Inmunología, Hospital Militar Central, Facultad de Medicina, Grupo de Inmunología Clínica Aplicada, Universidad Militar Nueva Granada, Bogotá, Colombia

^b Facultad de Medicina, Programa de Reumatología, Universidad de la Sabana, Chía, Colombia

^c Instituto de Referencia Andino, Bogotá, Colombia

^d Instituto UIBO, Universidad El Bosque, Bogotá, Colombia

^e Facultad de Ciencias Básicas, Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, Bogotá, Colombia

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 28 de marzo de 2018

Aceptado el 20 de septiembre de 2018

On-line el 28 de enero de 2019

Palabras clave:

Anticuerpos antinucleares

Anticuerpos anticitoplasma de neutrófilos

Vasculitis

R E S U M E N

Antecedentes: Los anticuerpos anticitoplasma del neutrófilo (ANCA) se asocian con vasculitis. Existen diferentes métodos para determinar su presencia. Se ha descrito la interferencia de anticuerpos antinucleares (ANA) en la diferenciación de los patrones P-ANCA y C-ANCA.

Objetivo: Determinar la frecuencia de ANCA en una población con manifestaciones de enfermedad autoinmune; y evaluar la interferencia de los ANA en su interpretación.

Materiales y métodos: Estudio de corte transversal retrospectivo, descriptivo no experimental incluyendo 3.330 datos con diagnóstico presuntivo de enfermedad autoinmune y solicitud de ANCA. Las determinaciones de ANCA y de ANA se realizaron mediante inmunofluorescencia indirecta, L-ANCA[®] y CytoBead[®] ANCA. Antiproteinasa 3 y antimieloperoxidasa fueron determinados mediante ELISA y CytoBead[®] ANCA. **Resultados:** Se encontraron ANCA positivos en el 10,21% y el 12,64% con ANCA positivos presentaban ANA positivos. La concordancia kappa para antiproteinasa 3 entre CytoBead[®] ANCA y ELISA fue del 100% ($K = 1$; $p < 0,05$), La concordancia entre antimieloperoxidasa por ELISA y CytoBead[®] ANCA fue alta ($K = 0,94$; $p < 0,05$). El 30% de aquellos con ANCA positivos tenía diagnóstico de algún tipo de vasculitis, el 20% cursaba con alguna enfermedad autoinmune.

Conclusiones: Los resultados indican una solicitud sobreestimada de este marcador como ayuda diagnóstica en consulta de atención primaria no direccionada. Para una adecuada evaluación de ANCA se debe implementar la técnica de inmunofluorescencia indirecta para tamizaje y confirmar con la determinación de antígenos específicos para antiproteinasa 3 y antimieloperoxidasa por cualquiera de los ensayos confirmatorios. La alta concordancia mostrada por CytoBeads[®] ANCA hace que planteemos el empleo de dicha alternativa para la determinación de ANCA y su confirmación. Dada la interferencia de los ANA, se recomienda solicitar la prueba ANA por inmunofluorescencia indirecta ante la presencia de resultados P-ANCA positivos, con el fin de minimizar «falsos positivos».

© 2018 Elsevier España, S.L.U. y

Sociedad Española de Reumatología y Colegio Mexicano de Reumatología. Todos los derechos reservados.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: romeromaria@unbosque.edu.co (C. Romero-Sánchez).

Keywords:

Antinuclear antibodies
 Antineutrophil cytoplasmic antibodies
 Vasculitis

Frequency of Positive ANCA Test in a Population With Clinical Symptoms Suggestive of Autoimmune Disease and the Interference of ANA in its Interpretation

A B S T R A C T

Background: Antibodies against neutrophil cytoplasm (ANCA) are associated with vasculitis. There are different methods to determine their presence. The interference of antinuclear antibodies (ANA) in the differentiation between P-ANCA and C-ANCA patterns has been described.

Objective: To determine the frequency of ANCA in a population with manifestations of autoimmune disease, and evaluate the interference of ANA in its interpretation.

Materials and methods: Retrospective, descriptive nonexperimental cross-sectional study, including 3,330 data. The presumptive diagnosis was autoimmune disease and a test for ANCA was requested. The ANCA and ANA determinations were made by indirect immunofluorescence, L-ANCA[®] and CytoBead[®] ANCA. Anti-proteinase 3 and anti-myeloperoxidase were detected by ELISA and CytoBead[®] ANCA.

Results: ANCAs were positive in 10.21% and 12.64% of those positive for ANCA were positive for ANA. The inter-rater agreement statistic (Kappa) for anti-PR3 between CytoBead ANCA and ELISA was 100% ($K = 1.00$; $P < .05$) and the agreement between anti-myeloperoxidase by ELISA and CytoBead[®] ANCA was high ($K = 0.94$; $P < .05$). 30% of those with ANCAs had a diagnosis of a type of vasculitis; 20% of them had an autoimmune disease.

Conclusions: The results suggest an overestimated request for ANCAs as a diagnostic aid in primary care which was not addressed. For an adequate evaluation of ANCAs, the indirect immunofluorescence technique should be implemented for the control and confirmation with the determination of specific antigens for anti-proteinase 3 and anti-myeloperoxidase in any of the confirmatory assays. The high concordance shown by ANCA CytoBeads makes us consider the use of this alternative for the determination of ANCAs and the confirmation. Given the interference of ANAs, the ANA test by IFI in the presence of positive P-ANCA results is recommended in order to minimize “false positives”.

© 2018 Elsevier España, S.L.U. and Sociedad Española de Reumatología y Colegio Mexicano de Reumatología. All rights reserved.

Introducción

Los anticuerpos anticitoplasma del neutrófilo (ANCA) son anticuerpos dirigidos contra gránulos primarios de neutrófilos y monocitos¹. Hacia 1985, los ANCA fueron asociados con vasculitis como la granulomatosis con poliangeitis (GPA), anteriormente llamada granulomatosis de Wegener, entre otras incluyendo un número amplio de enfermedades inflamatorias e infecciosas²⁻⁴. La detección de ANCA se ha convertido en una prueba de ayuda diagnóstica establecida para evaluar vasculitis necrosante de pequeños vasos⁵.

Existen tradicionalmente 2 tipos de métodos para determinar la presencia de ANCA⁶. El método más utilizado es el ensayo por inmunofluorescencia indirecta (IFI) definiéndose 2 patrones principales: C-ANCA que presenta patrón citoplasmático y en la mayoría están dirigidos contra proteinasa 3 (PR3) y P-ANCA que presenta un patrón perinuclear y están dirigidos contra la mieloperoxidasa (MPO)⁷. Sin embargo, esta metodología presenta inconvenientes al diferenciar entre los patrones P-ANCA y C-ANCA cuando está junto a los anticuerpos antinucleares (ANA). Debido a esta interferencia se hace importante la determinación de ANA en conjunto con los ANCA⁸ y además de la presencia de ANCA dirigidos contra antígenos diferentes de la MPO o de la PR3.

El segundo método empleado para la determinación específica es el ensayo inmunoenzimático (ELISA) que identifica anticuerpos dirigidos a antígenos específicos como PR3 y MPO^{9,10}. La sensibilidad de la IFI está entre el 80-90% mientras que su especificidad es menor al 80% debido a la presencia de P-ANCA dirigidos a antígenos diferentes a la MPO⁶. Por esta razón, el consenso de ANCA sugiere utilizar como tamizaje la técnica de IFI y posteriormente realizar una prueba confirmatoria contra los antígenos específicos por medio de ELISA¹¹.

Recientemente surge otra prueba que utiliza la IFI para la determinación de ANCA llamada CytoBead[®] ANCA; esta prueba contiene

granulocitos humanos fijados en etanol y además integra micropartículas recubiertas con antígeno PR3 y MPO como sustrato, generando identificación específica de estos y convirtiéndose en una buena alternativa a considerar en la identificación de ANCA ya que posee sensibilidad y especificidad óptimas en una sola prueba¹²⁻¹⁴.

Por esta razón, el principal objetivo de este estudio fue determinar la frecuencia de ANCA positivos en una población con manifestaciones de enfermedad autoinmune; y evaluar la interferencia de los ANA en su interpretación.

Materiales y métodos

Estudio de corte transversal retrospectivo, descriptivo no experimental. Incluyo 3.330 datos recolectados de pacientes con diagnóstico presuntivo o sospecha de enfermedad autoinmune y solicitud de ANCA en un periodo de tiempo comprendido entre los años 2013 al 2015, remitidos al del Hospital Militar Central y al Instituto de Referencia Andino. Además, para comparar el rendimiento de 3 métodos se seleccionaron 44 muestras con solicitud previa de ANCA a las cuales se les determinó simultáneamente la presencia de ANCA y ANA por medio de metodologías diferentes usando los kits L-ANCA[®], CytoBead[®] ANCA y anti-PR3 y anti-MPO por ELISA. El proyecto fue aprobado por Comité de Investigaciones y Ética del Hospital Militar Central (código N 2014-080).

Métodos estadísticos

Las características demográficas, la edad, el género y las manifestaciones clínicas se analizaron por frecuencias mediante el paquete estadístico SPSS V18 para Windows, con un nivel de confianza del 95%, y mediante el programa STATA 11[®], se determinó la concordancia entre las técnicas por coeficiente kappa. Se determinó

la frecuencia de síntomas y signos y áreas clínicas que derivaron la solicitud. Posteriormente la positividad de ANCA se distribuyó según las manifestaciones clínicas de enfermedad autoinmune.

L-ANCA® (Ref. 10070-L-11, Immunoconcepts®)

Todas las muestras de suero se ajustaron a una dilución 1:20. La prueba de L-ANCA® contiene granulocitos y un contenido de linfocitos, que al momento de observar al microscopio indicará la presencia de ANA positivos en la muestra simultáneamente con los ANCA –en caso positivo¹⁵. Solo se reportó presencia de ANA sin identificación del patrón en caso positivo dado el sustrato celular utilizado.

CytoBead® ANCA (Ref. 8063.GA Generic Assays)

El kit de CytoBead® ANCA es un ensayo multiplex de IFI que contiene granulocitos humanos fijados en etanol y además micropartículas recubiertas con antígeno PR3 y MPO como sustrato los cuales permiten identificar la tinción de ANCA positivos diferenciando el C-ANCA del P-ANCA específicamente¹⁶.

ELISA (®Anti PR3 y anti MPO, Ref 4058,4059 Generic Assay GmbH)

Se identificaron anticuerpos IgG contra PR3 y MPO en suero humano con valores positivos por encima de 10 UI/ml. Anti-PR3 y anti MPO-ANCA fueron detectados usando ELISA antígeno-específico comercialmente disponibles acuerdo las instrucciones del fabricante.

Resultados

Descripción de la muestra

Se analizaron retrospectivamente 3.330 datos de pacientes con solicitud de ANCA. De la totalidad de solicitudes, 1.065 (31,9%) correspondían a pacientes de género masculino y 2.265 (68%) de género femenino, con una edad promedio de 42,08 años \pm 20. Se evidenció positividad para ANCA en el 10,2% (340/3.330) de las solicitudes, de los cuales el 40% (136/340) presentaban patrón C-ANCA y el 60% (204/340) P-ANCA (tabla 1).

Junto con las solicitudes iniciales de ANCA, solo 67 de los 3.330 presentaban solicitud de anti-MPO y anti-PR3, de los cuales el 62,7% (42/67) presentaban ANCA positivos y el 11,9% (8/67) fue positivo únicamente para anti-PR3, el 16,4% (11/67) solo para anti-MPO y el 5,9% (4/67) presentó positividad mixta.

Se solicitaron ANA simultáneamente con los ANCA en 538 datos, de los cuales el 68,2% (367) fueron positivos para ANA únicamente, identificando patrón homogéneo en un 68% (170), granular el 24,7% (91), citoplasmático el 6,2% (23), nucleolar el 0,8% (3) y el 21,8% (80) resultados presentaron más de un patrón para ANA el cual se denominó «patrón mixto». Para los datos positivos, se determinó el título de dichos anticuerpos, encontrando que el más frecuente fue el título entre 1:80-1:160.

Se halló que el 12,6% de los datos recolectados de manera retrospectiva con ANCA positivos presentaban a su vez ANA positivos; de estos el 83,7% correspondía a patrón P-ANCA y el 16,27% con patrón C-ANCA. En los P-ANCA positivos el patrón de ANA predominante fue el homogéneo seguido por el patrón granular, en los C-ANCA el patrón de ANA predominante fue el citoplasmático seguido del granular.

Concordancia entre técnicas

Para comparar el rendimiento de los métodos, se seleccionaron 44 muestras con solicitud previa de ANCA a las cuales se les

Tabla 1
Variables demográficas y serológicas

| Variable | n= 3.330 |
|-------------------------------|--------------------|
| Edad media \pm DE | 42,08 \pm 20 |
| Sexo, n.º (%) | |
| Masculino | 1.065 (31,98) |
| Femenino | 2.265 (68,01) |
| ANCA, n.º (%) | |
| Positivo | 340 (10,21) |
| Negativo | 2.990 (89,78) |
| Positivo ANCA patrón, n.º (%) | |
| C-ANCA | 136 (40) |
| P-ANCA | 204 (60) |
| ANA, n.º (%) | |
| Positivo | 367 (11,02) |
| Negativo | 171 (5,13) |
| Sin solicitud médica | 2792 (83,84) |
| ANA patrón, n.º (%) | |
| Patrón homogéneo | 170 (46,32) |
| Patrón granular | 91 (24,79) |
| Patrón citoplasmático | 23 (6,26) |
| Patrón nucleolar | 3 (0,81) |
| Patrón mixto | 80 (21,79) |
| ANA título, n.º (%) | |
| 1:80-< 1:160 | 245 (66,75%) |
| 1:160-< 1:320 | 65 (17,7%) |
| 1:320-< 1:640 | 49 (13,35%) |
| 1:640-< 1:1280 | 8 (2,17%) |
| Anti-MPO, n.º (%) | |
| Solicitud médica | 67 (2,01) |
| No Solicitud | 3.263 (97,98) |
| Media \pm DE | 18,12 \pm 61,04 |
| Anti-PR3, n.º (%) | |
| Solicitud médica | 67 (2,01) |
| No Solicitud | 3.263 (97,98) |
| Media \pm DE | 30,25 \pm 109,24 |

determinó la presencia de ANCA y ANA por medio de metodologías diferentes usando los kits L-ANCA®, CytoBead® ANCA y anti-PR3 y anti-MPO por ELISA, previamente descritos. Este grupo tuvo una distribución de género femenino en el 77,3% y género masculino en el 22,8%, con edad promedio de 48,27 \pm 21,27 años. El 75% (33/44) presentaba resultados positivos para ANCA previos, los cuales correspondían a C-ANCA en un 36,4% y P-ANCA en un 63,6%. Adicionalmente, se evidenció un 61,3% (27/44) de positividad para ANA.

El 36,4% (16/44) fueron positivas para ANCA y ANA simultáneamente, de las cuales el 87,5% (14/16) presentaron patrón P-ANCA y el 12,5% (2/16) patrón C-ANCA. De las muestras P-ANCA positivas solo 7 fueron positivas para anti-MPO y 2 positivas para anti-PR3 y los 5 restantes fueron negativas para anti-MPO y anti-PR3.

Al implementar la técnica de L-ANCA® se observó positividad para ANCA en un 59,1% (26/44), de las cuales el 84,8% (23/26) correspondió al patrón P-ANCA y el 11,5% (3/26) al patrón C-ANCA; el 43,2% (19/44) resultaron positivos para ANA realizados por la metodología L-ANCA® y el 56,8% (25/44) negativos. El 61,5% (16/26) fueron positivas para ANCA y ANA a la vez, de las cuales 93,7% (15/16) presentaron patrón P-ANCA.

Para CytoBead® ANCA el 38,6% (17/44) de las muestras resultaron positivas para ANCA y el 61,4% (27/44) resultaron negativas. A su vez, el 35,3% (6/17) de las muestras positivas para ANCA fueron positivas para anti-PR3, el 41,2% (7/17) para anti-MPO y el 23,5% (4/17) presentaron positividad mixta.

Finalmente a las 44 muestras con resultados previos de ANCA se les cuantificó por medio de ELISA la concentración de anti-PR3 y anti-MPO, obteniendo un promedio de 43,8 U/ml para anti-PR3 y 24,7 U/ml para anti-MPO. Se identificaron 18 muestras positivas, de

Tabla 2
Concordancia entre resultados de anti-PR3 por ELISA y CytoBead®

| | | PR3 CytoBead® ANCA | | |
|-------|----------|--------------------|----------|-------|
| | | Positivo | Negativo | Total |
| PR3 | Positivo | 10 | 0 | 10 |
| ELISA | Negativo | 0 | 34 | 34 |
| | Total | 10 | 34 | 44 |

Índice kappa: $K = 1$, $p < 0,05$.

Tabla 3
Concordancia entre resultados de anti-MPO por ELISA y CytoBead®

| | | MPO CytoBead® ANCA | | |
|-------|----------|--------------------|----------|-------|
| | | Positivo | Negativo | Total |
| MPO | Positivo | 11 | 1 | 12 |
| ELISA | Negativo | 0 | 32 | 32 |
| | Total | 11 | 33 | 44 |

Índice kappa: $K = 0,94$; $p < 0,05$.

Tabla 4
Distribución de patologías con ANCA positivos por IFI

| Entidad | ANCA positivos n = 20/241 | Enfermedades por grupo más frecuentes (n) |
|---|---------------------------|--|
| Vasculitis, 30% | 6/20 | Poliangitis con granulomatosis (3) Eosinofilia granulomatosa (2) Poliangitis microscópica (1) |
| Enfermedad autoinmune, 20% | 4/20 | Síndrome Sjogren (1), púrpura trombocitopénica idiopática (1), artritis reumatoide (2) |
| Alguna enfermedad reumática no autoinmune, 5% | 1/20 | Crioglobulinemia (1) |
| Otro tipo de enfermedad, 45% | 9/20 | Endocarditis (2), linfoma (1), infección por el VIH (3), sarcoidosis (1), infección por virus de hepatitis C (1), intoxicación por cocaína (1) |

las cuales el 13,6% (6/44) fueron positivas anti-PR3, el 18,2% (8/44) fueron positivas para MPO y el 9,1% (4/44) presentó positividad mixta, con un punto de corte de 10 U/ml.

El rendimiento de los diferentes métodos se evaluó mediante un análisis de correlación con la obtención del índice kappa para todos los casos en donde se realizó la medición de ANCA al menos por 2 de las técnicas evaluadas.

La concordancia en la medición de anti-PR3 entre la técnica de CytoBead® ANCA y ELISA fue del 100% ($K = 1$, $p < 0,05$) de los cuales 10 resultados fueron positivos y 34 negativos para ambas técnicas, sin resultados discrepantes (tabla 2).

Al comparar la medición de anti-MPO por ELISA frente a CytoBead ANCA, se observó discrepancia en un solo resultado que fue negativo por CytoBead ANCA y positivo por ELISA cuyo valor es de 10,1 teniendo como referencia un punto de corte de 10 U/ml, no obstante la concordancia fue alta ($K = 0,94$ $p < 0,05$) (tabla 3).

En la evaluación entre CytoBead® ANCA y L-ANCA® se observó discrepancia en 2 aspectos: primero, 14 datos que fueron positivos para L-ANCA® resultaron negativos para CytoBead® ANCA; segundo, 5 datos negativos para L-ANCA® resultaron positivos para CytoBead® ANCA, obteniendo así una concordancia muy baja ($K = 0,17$; $p > 0,05$).

Al comparar los resultados obtenidos por CytoBead® ANCA con los resultados de ANCA previos (tomados retrospectivamente) se observó que de los 27 resultados negativos por CytoBead® ANCA, 17 de estos presentaban ANCA previos positivos y 6 de estos presentaban a la vez ANA previos positivos; a los 11 restantes no se les realizó técnicamente ANAS previamente ($p = 0,02$). Asimismo, de los 18 resultados negativos por L-ANCA®, 16 presentaban ANCA previos positivos y 7 de estos evidenciaban simultáneamente ANA previos positivos ($p = 0,07$). Al examinar los resultados obtenidos por CytoBead® ANCA, L-ANCA® y ANCA previos se observó solo 11 resultados son positivos para las 3 pruebas.

Por último, se revisaron las historias clínicas de 241 solicitudes de las 3.330 con las manifestaciones clínicas más frecuentes por las cuales solicitaron ANCA y se categorizaron en 4 grupos: el primero presentaba algún tipo de vasculitis, el segundo alguna enfermedad autoinmune, el tercero alguna enfermedad reumática no autoinmune y el cuarto otro tipo de enfermedad (tabla 4).

Se encontró positividad para ANCA en el 8,3% (20/241), para los cuales se identificó el patrón de P-ANCA en el 90% (18/20) y C-ANCA en el 10% (2/20). Del total de solicitudes con historia clínica, se hallaron ANA positivos en un 35% (85/241) con patrón homogéneo en un 54,1%, granular en un 34,1%, citoplasmático en un 10,6% y nucleolar en un 1,18%. En los datos positivos para ANCA se identificó la presencia simultánea de ANA en el 25% (5/20), con patrón moteado en el 40%, homogéneo en el 40% y citoplasmático en el 20%.

Al realizar retrospectivamente la correlación clínica de los pacientes con ANCA positivos se encontró que el 30% (6/20) tenía diagnóstico de algún tipo de vasculitis, el 20% (4/20) cursaba con alguna enfermedad autoinmune, el 5% (1/20) presentaba enfermedad reumática no autoinmune y el 45% (9/20) presentó otro tipo de enfermedad en la evaluación primaria según la historia clínica.

Discusión

La incidencia anual de vasculitis en el mundo es aproximadamente de 10-20 casos por millón de habitantes con una mortalidad que alcanza el 80%^{17,18}. Las vasculitis del tipo GPA asociada a la presencia de ANCA no presenta una distribución geográfica homogénea y la prevalencia reportada de ANCA en GPA varía entre 50-95%¹⁴. En población japonesa y afroamericana es menos frecuente la incidencia de GPA pero hay mayor frecuencia de MPA^{19,20}, en el norte de Europa en cambio es más frecuente GPA y con pocos casos documentados de MPA^{17,18}. En Colombia, se identificaron casos de otros subtipos de vasculitis y la GPA¹⁹. Se cree

que el bajo porcentaje de casos reportados con diagnóstico de GPA puede estar relacionado con la pobre derivación de estos pacientes a los servicios de reumatología, y la falta de registros de estos casos por los médicos tratantes y por el Ministerio de Protección Social²¹.

En el presente estudio los resultados demostraron ANCA positivos en 340 datos obtenidos, de los cuales 136 tenían patrón C-ANCA y 204 P-ANCA; sin embargo, los ANA y los anticuerpos dirigidos contra otros gránulos citoplasmáticos como antígenos (lactoferrina, lisozima, azurodicina, elastasa, cathepsina G, enzima creciente bactericida/permeabilidad) muestran patrones ANCA atípicos, presentando estos cierta dificultad técnica para ser diferenciados los cuales pueden confundirse con el patrón P-ANCA^{9,22,23}. En nuestros datos el 12,6% de pacientes con ANAS presentaron simultáneamente ANCA positivos con un patrón homogéneo a títulos bajos en su mayoría. A pesar de ser uno de los patrones más frecuentes en enfermedades autoinmunes, este grupo de pacientes no presentaban diagnóstico de lupus eritematoso sistémico²⁴⁻²⁶.

En nuestro estudio se evidenció en los resultados tomados de manera retrospectiva el predominio del patrón P-ANCA en los datos positivos para ANA y ANCA lo cual se ha descrito en la literatura como posibles falsos positivos para ANCA por IFI debido a una interferencia en el proceso de unión al sustrato que ocurre por un reacondicionamiento de proteínas del núcleo cuando las muestras son fijadas en etanol, generando una coloración difusa; otra interferencia descrita ha sido en resultados con anticuerpos anti-ADN positivos simultáneamente evidenciando una necesidad de expertos en la correcta lectura e interpretación del patrón de ANA y ANCA^{12,15}.

En el estudio publicado por Martínez Tellez et al., se buscó determinar la positividad y la correlación clínica de los ANCA, teniendo en cuenta la interferencia de los ANA; se encontró que la probabilidad de encontrar ANCA es mayor en los pacientes con ANA positivos⁸. El patrón P-ANCA atípico es hallado en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal, predominantemente en colitis ulcerativa²³. En combinación con anticuerpos anti-*Saccharomyces cerevisiae*, P-ANCA son de ayuda en la diferenciación de colitis ulcerativa y enfermedad de Crohn, siendo el anticuerpo anti-*Saccharomyces cerevisiae* más típico de enfermedad de Crohn y P-ANCA de colitis ulcerativa²³; sin embargo, el antígeno reconocido no es dirigido contra la MPO.

Por otro lado, al analizar los datos de las 2 nuevas técnicas frente a resultados de ANCA previos realizados de manera tradicional se observó que el 36,5% presentaban ANA positivos, y solo un porcentaje bajo de estos revelaron anti-MPO positivo. Lo anterior puede indicar nuevamente la interferencia de los ANA en la lectura del patrón ANCA por IFI.

Como prueba confirmatoria tradicional para la técnica de IFI para ANCA se utiliza ELISA indirecto, cuantitativo y dirigido a las proteínas PR3 y MPO. Recientemente el kit «*CytoBead*[®] ANCA» ofrece un novedoso test que combina células (granulocitos fijados en etanol) y micropartículas sintéticas (recubiertas con antígenos PR3 y MPO) en un mismo pocillo, para el tamizaje y la confirmación de anticuerpos. Nuestros resultados encontraron que por esta técnica el 38,6% de las muestras resultaron positivas y al compararlas la confirmación de PR3 con la confirmación por ELISA no se encontraron resultados discrepantes considerando que esta es una muy buena alternativa de detección simultánea de ANCA por método IFI sin necesidad de prueba confirmatoria por ELISA, permitiendo la detección y confirmación de autoanticuerpos en tiempos más cortos, mejor reproducibilidad y mayor rentabilidad en muestras de mayor tamaño. Lo anterior concuerda con el estudio realizado por Sowa et al., quienes evalúan la eficacia de esta nueva técnica *CytoBead*[®] ANCA comparando con las pruebas clásicas para ANCA por IFI, PR3 y MPO por ELISA, encontrando una excelente correlación para ANCA PR3 y MPO al igual que para P-ANCA y C-ANCA

entre los métodos clásicos y el múltiple con *CytoBeads*[®] ANCA^{12,27}. Esto se ajusta a lo mostrado por el consenso de manejo e interpretación de los ANCA, quienes proponen realizar IFI como tamizaje y una prueba confirmatoria por su alta especificidad¹⁵.

A diferencia de los resultados de *CytoBead*[®] ANCA al comparar los datos de la técnica L-ANCA[®] con los ANCA previos se observó discrepancia en los resultados generando una baja correlación entre las 3 técnicas. Según estos resultados se puede inferir que la técnica de *CytoBeads*[®] ANCA tiene mejor rendimiento frente a L-ANCA[®]; a pesar de que estos últimos incluyen la valoración de los ANA simultáneamente, los resultados no fueron satisfactorios. Dentro de las observaciones de la casa matriz se sugiere que la presencia de ANA puede interferir con la interpretación de ANCA. El teñido en el citoplasma o en la superficie del linfocito no indicaron claramente la interferencia por ANA, la tinción observada no fue lo suficientemente nítida en algunos casos. Por lo tanto, si una interferencia por ANA estuvo presente, el ANCA por inmunofluorescencia no pudo ser interpretado; es así que la evaluación de la tinción de los de los linfocitos no indicó siempre la presencia de ANA, además de no detectar resultados similares de ANCA en algunos pacientes sobre los neutrófilos observados por los otros métodos¹⁶.

En la actualidad los ANCA tienen utilidad en el diagnóstico y clasificación de vasculitis, sin embargo, su utilidad depende de la prevalencia en la población estudio y la presentación clínica⁵. En condiciones reumatológicas no asociadas a vasculitis es posible documentar positividad para ANCA, como en nuestro estudio, en el cual encontramos positividad para ANCA en el 6,6% de datos relacionados con enfermedad reumática no autoinmune concordando con la presencia de ANCA descritas en diferentes enfermedades como la colangitis esclerosante primaria, hepatitis autoinmune tipo 1, síndrome de Felty y la enfermedad inflamatoria intestinal. En esta última se documenta positividad hasta en el 50-70% de los pacientes con colitis ulcerativa y en el 10-30% de los individuos con enfermedad de Crohn e hipertiroidismo. Sin embargo, su utilidad en estos escenarios no está claramente establecida²⁶⁻³⁴.

La falta de concordancia entre los datos clínicos y la pertinencia de solicitud de ANCA en nuestro medio, podría mostrar la dificultad que existe en los distintos niveles de atención para diferenciar las características clínicas de vasculitis con otras enfermedades no asociadas a vasculitis. Es así como en nuestro estudio se obtuvieron datos clínicos de 241 pacientes, de los cuales el 33% tenía sospecha inicial de vasculitis, detectándose positividad para ANCA en menos del 10% de los casos lo que indica una sobreestimación por parte de los profesionales de la salud en la solicitud de dicha ayuda diagnóstica.

Varios estudios han demostrado el valor diagnóstico de los ANCA para vasculitis siempre y cuando se utilice la metodología correcta asociada a los hallazgos clínicos relevantes. Por lo anterior se debe siempre confirmar el resultado de ANCA por ELISA y determinar si el paciente tiene ANA y ANCA positivos para descartar el efecto de la tinción del núcleo que genera falsos positivos en los ANCA y así realizar un diagnóstico asertivo³⁵⁻³⁷.

Dado que la detección precisa para PR3-ANCA y MPO-ANCA tiene importantes implicaciones clínicas y patogénicas, la solicitud no direccionada en los diferentes niveles de atención clínica y los inmunoanálisis confiables para PR3-ANCA y MPO-ANCA se han generalizado cada día más. Los resultados de este estudio apoyarían la propuesta hecha por el último consenso internacional para pruebas de ANCA en granulomatosis y poliangeitis mediante la cual sugieren que la determinación por los métodos específicos de alta calidad es el método primario de tamizaje preferido como apoyo para el diagnóstico de vasculitis asociada a ANCA. Esto sin la necesidad de usar como apoyo la IFI sobre neutrófilos en primera línea; sin embargo, es necesario tener mayor evidencia y estudios adicionales para respaldar esta recomendación^{38,39}.

Conclusiones

Los ANCA en la actualidad tienen utilidad como ayuda en el diagnóstico y clasificación de vasculitis; sin embargo, su valor depende del contexto clínico. Dado que el objetivo fue determinar la frecuencia de ANCA en una población con manifestaciones de enfermedad autoinmune, los resultados indican una solicitud sobreestimada de este marcador como ayuda diagnóstica en consulta de atención primaria no direccionada.

En segunda instancia, al evaluar la interferencia de los ANA en la interpretación de los ANCA, para una adecuada evaluación de ANCA se debe implementar en los laboratorios la técnica de IFI como tamizaje y confirmar con la determinación de antígenos específicos para anti-PR3 y anti-MPO por cualquiera de los ensayos confirmatorios disponibles comercialmente.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos

Este estudio fue soportado por el Hospital Militar Central e Instituto de Referencia Andino (HMC 2014-080), apoyado por Biolore Ltda y Química Internacional Ltda.

A Sara Pineda-Barragán S. y Laura M. Rey por la ejecución técnicas de los autoanticuerpos y a Adela Castro-Gutiérrez por el aporte en la recolección de los datos

Bibliografía

- Davies DJ, Moran JE, Niall JF, Ryan GB. Segmental necrotizing glomerulonephritis with antineutrophil antibody: Possible arbovirus aetiology? *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1982;285:606.
- Van der Woude FJ, Rasmussen N, Lobatto S, Wiik A, Permin H, van Es LA, et al. Autoantibodies against neutrophils and monocytes: Tool for diagnosis and marker of disease activity in Wegener's granulomatosis. *Lancet*. 1985;1:425–9, [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(85\)91147-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(85)91147-X).
- Jennette JC, Falk RJ, Bacon PA, Basu N, Cid MC, Ferrario F, et al. 2012 revised International Chapel Hill Consensus Conference Nomenclature of Vasculitides. *Arthritis Rheum*. 2013;65:1–11, <http://dx.doi.org/10.1002/art.37715>.
- Bosch X, Guilbert A, Font J. Antineutrophil cytoplasmic antibodies. *Lancet*. 2006;368:404–18, [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)69114-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(06)69114-9).
- Csernok E, Moosig F. Current and emerging techniques for ANCA detection in vasculitis. *Nat Rev Rheumatol*. 2014;10:494–501, <http://dx.doi.org/10.1038/nrrheum.2014.78>.
- Jennette JC, Wilkman AS, Falk RJ. Diagnostic predictive value of ANCA serology. *Kidney Int*. 1998;53:796–8, <http://dx.doi.org/10.1046/j.1523-1755.1998.00800.x>.
- Savige J, Davies D, Falk RJ, Jennette JC, Wiik A. Antineutrophil cytoplasmic antibodies and associated diseases: a review of the clinical and laboratory features. *Kidney Int*. 2000;57:846–62, <http://dx.doi.org/10.1046/j.1523-1755.2000.057003846.x>.
- Martinez Tellez G, Torres Rives B, Rangel Velazquez S, Sanchez Rodriguez V, Ramos Rios MA, Fuentes Smith LE. Antineutrophil cytoplasm antibody: Positivity and clinical correlation. *Reumatol Clin*. 2015;11:17–21, <http://dx.doi.org/10.1016/j.reuma.2014.02.010>.
- Radice A, Bianchi L, Sinico RA. Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies: Methodological aspects and clinical significance in systemic vasculitis. *Autoimmun Rev*. 2013;12:487–95, <http://dx.doi.org/10.1016/j.autrev.2012.08.008>.
- Stone JH, Talar M, Stebbing J, Uhlfelder ML, Rose NR, Carson KA, et al. Test characteristics of immunofluorescence and ELISA tests in 856 consecutive patients with possible ANCA-associated conditions. *Arthritis Care Res*. 2000;13:424–34.
- Hagen EC, Andrassy K, Csernok E, Daha MR, Gaskin G, Gross WL, et al. Development and standardization of solid phase assays for the detection of anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA). A report on the second phase of an international cooperative study on the standardization of ANCA assays. *J Immunol Methods*. 1996;196:1–15, [http://dx.doi.org/10.1016/0022-1759\(96\)00111-1](http://dx.doi.org/10.1016/0022-1759(96)00111-1).
- Sowa M, Hiemann R, Schierack P, Reinhold D, Conrad K, Roggenbuck D. Next-generation autoantibody testing by combination of screening and confirmation—the CytoBead(R) Technology. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2017;53:87–104, <http://dx.doi.org/10.1007/s12016-016-8574-3>.
- Sowa M, Großmann K, Scholz J, Röber N, Rödiger S, Schierack P, et al. The Cyto-Bead assay – a novel approach of multiparametric autoantibody analysis in the diagnostics of systemic autoimmune diseases. *J Lab Med*. 2015;38:309–17, <http://dx.doi.org/10.1515/labmed-2015-0036>.
- Specks U. Controversies in ANCA testing. *Cleve Clin J Med*. 2012;79 Suppl 3:S7–11, <http://dx.doi.org/10.3949/ccjm.79.s3.02>.
- Savige J, Gillis D, Benson E, Davies D, Esnault V, Falk RJ, et al. International Consensus Statement on Testing and Reporting of Antineutrophil Cytoplasmic Antibodies (ANCA). *Am J Clin Pathol*. 1999;111:507–13, <http://dx.doi.org/10.1093/ajcp/111.4.507>.
- Sowa M, Grossmann K, Knutter I, Hiemann R, Rober N, Anderer U, et al. Simultaneous automated screening and confirmatory testing for vasculitis-specific ANCA. *PLoS One*. 2014;9:e107743, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0107743>.
- Andrade RE, Cantillo JdJ. El lado renal de la poliangeítis microscópica. A propósito de dos nuevos casos en Colombia. *Acta Médica Colombiana*. 2008;33:84–9.
- Milliet A, Pederzoli-Ribeil M, Guillevin L, Witko-Sarsat V, Mouthon L. Antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitides: Is it time to split up the group? *Ann Rheum Dis*. 2013;72:1273–9, <http://dx.doi.org/10.1136/annrheumdis-2013-203255>.
- Fujimoto S, Watts RA, Kobayashi S, Suzuki K, Jayne DR, Scott DG, et al. Comparison of the epidemiology of anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis between Japan and the U.K. *Rheumatology (Oxford)*. 2011;50:1916–20. DOI: 10.1093/rheumatology/ker205.
- Cao Y, Schmitz JL, Yang J, Hogan SL, Bunch D, Hu Y, et al. DRB1*15 allele is a risk factor for PR3-ANCA disease in African Americans. *J Am Soc Nephrol*. 2011;22:1161–7, <http://dx.doi.org/10.1681/ASN.2010101058>.
- Ochoa C, Ramírez F, Quintana G, Toro C, Cañas C, Osio LF, et al. Epidemiology of primary vasculitis in Colombia and its relation with reported for latin america. *Rev Colomb Reumatol*. 2009;16:248–63, [http://dx.doi.org/10.1016/S0121-8123\(09\)70103-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0121-8123(09)70103-3).
- Kawakami T, Ishizu A, Arimura Y, Soma Y. Serum anti-lysosomal-associated membrane protein-2 antibody levels in cutaneous polyarteritis nodosa. *Acta Derm Venereol*. 2013;93:70–3, <http://dx.doi.org/10.2340/00015555-1418>.
- Schulte-Pelkum J, Radice A, Norman GL, Lomicronpez Hoyos M, Lakos G, Buchner C, et al. Novel clinical and diagnostic aspects of antineutrophil cytoplasmic antibodies. *J Immunol Res*. 2014;185416, <http://dx.doi.org/10.1155/2014/185416>.
- Scholz J, Grossmann K, Knutter I, Hiemann R, Sowa M, Rober N, et al. Second generation analysis of antinuclear antibody (ANA) by combination of screening and confirmatory testing. *Clin Chem Lab Med*. 2015;53:1991–2002, <http://dx.doi.org/10.1515/cclm-2015-0083>.
- Wainstein E. Laboratorio en reumatología. *Rev Med Cínicas Condes*. 2012;23:371–6, [http://dx.doi.org/10.1016/S0716-8640\(12\)70327-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0716-8640(12)70327-9).
- Tsiveriotis K, Tsirogianni A, Papi E, Soufleros K, Papasteriades C. Antineutrophil cytoplasmic antibodies testing in a large cohort of unselected greek patients. *Autoimmune Dis*. 2011;2011:626495, <http://dx.doi.org/10.4061/2011/626495>.
- Slot MC, Links TP, Stegeman CA, Tervaert JW. Occurrence of antineutrophil cytoplasmic antibodies and associated vasculitis in patients with hyperthyroidism treated with antithyroid drugs: A long-term followup study. *Arthritis Rheum*. 2005;53:108–13, <http://dx.doi.org/10.1002/art.20927>.
- Hoffman GS, Specks U. Antineutrophil cytoplasmic antibodies. *Arthritis Rheum*. 1998;41:1521–37, [http://dx.doi.org/10.1002/1529-0131\(199809\)41:9<1521::AID-ART2>3.0.CO;2-A](http://dx.doi.org/10.1002/1529-0131(199809)41:9<1521::AID-ART2>3.0.CO;2-A).
- Guillevin L, Durand-Gasselin B, Cevallos R, Gayraud M, Lhote F, Callard P, et al. Microscopic polyangiitis: Clinical and laboratory findings in eighty-five patients. *Arthritis Rheum*. 1999;42:421–30, [http://dx.doi.org/10.1002/1529-0131\(199904\)42:3<421::AID-ANR5>3.0.CO;2-6](http://dx.doi.org/10.1002/1529-0131(199904)42:3<421::AID-ANR5>3.0.CO;2-6).
- Sinico RA, di Toma L, Maggiore U, Tosoni C, Bottero P, Sabadini E, et al. Renal involvement in Churg-Strauss syndrome. *Am J Kidney Dis*. 2006;47:770–9, <http://dx.doi.org/10.1053/j.ajkd.2006.01.026>.
- Kain R, Exner M, Brandes R, Ziebermayr R, Cunningham D, Alderson CA, et al. Molecular mimicry in pauci-immune focal necrotizing glomerulonephritis. *Nat Med*. 2008;14:1088–96, <http://dx.doi.org/10.1038/nm.1874>.
- Hellmark T, Niles JL, Collins AB, McCluskey RT, Brunmark C. Comparison of anti-GBM antibodies in sera with or without ANCA. *J Am Soc Nephrol*. 1997;8:376–85.
- Levy JB, Hammad T, Coulthart A, Dougan T, Pusey CD. Clinical features and outcome of patients with both ANCA and anti-GBM antibodies. *Kidney Int*. 2004;66:1535–40, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1523-1755.2004.00917.x>.
- Yang G, Tang Z, Chen Y, Zeng C, Chen H, Liu Z, et al. Antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) in Chinese patients with systemic vasculitis and idiopathic necrotizing and crescentic glomerulonephritis. *N Engl J Med*. 1988;318:1651–7, <http://dx.doi.org/10.1056/NEJM19880623182504>.
- Csernok E, Holle J, Hellmich B, Willem J, Tervaert C, Kallenberg CG, et al. Evaluation of capture ELISA for detection of antineutrophil cytoplasmic antibodies directed against proteinase 3 in Wegener's granulomatosis: First results from a multicentre study. *Rheumatology (Oxford)*. 2004;43:174–80, <http://dx.doi.org/10.1093/rheumatology/keh028>.
- McLaren JS, Stimson RH, McRorie ER, Coia JE, Luqmani RA. The diagnostic value of anti-neutrophil cytoplasmic antibody testing in a routine clinical setting. *QJM*. 2001;94:615–21, <http://dx.doi.org/10.1093/qjmed/94.11.615>.

38. Bossuyt X, Cohen Tervaert JW, Arimura Y, Blockmans D, Flores-Suárez LF, Guillevin L, et al. Position paper: Revised 2017 international consensus on testing of ANCA in granulomatosis with polyangiitis and microscopic polyangiitis. *Nat Rev Rheumatol.* 2017;13:683-92, <http://dx.doi.org/10.1038/nrrheum.2017.140>.
39. Damoiseaux J, Csernok E, Rasmussen N, Moosig F, van Paassen P, Baslund B, et al., Detection of antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA): A multicentre European Vasculitis Study Group (EUVAS) evaluation of the value of indirect immunofluorescence (IIF) versus antigen-specific immunoassays. *Ann Rheum Dis.* 2017;76:647–53, <http://dx.doi.org/10.1136/annrheumdis-2016-209507>.