

Armonización de la determinación de ANCA por inmunofluorescencia indirecta: primera reunión argentina

► Orlando Gabriel Carballo^{1a,b,c}, Alejandra Ginaca^{1d}, Fernanda Beatriz Ingénito^{1b}, Patricia Carabajal^{2d}, Jeanette Balbaryski^{3e}, Marta Costa^{1f}, Antonio Cardinali^{4g}

¹ Bioquímico/a, Especialista en Bioquímica Clínica, Inmunología.

² Médica, Especialista en Alergia e Inmunología.

³ Licenciada en Ciencias Químicas.

⁴ Bioquímico, Doctor en Bioquímica Clínica.

^a Fundación Bioquímica Argentina. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

^b Laboratorio de Inmunología. Hospital Carlos G. Durand, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

^c Laboratorio Central. Hospital Italiano de Buenos Aires. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

^d Servicio de Inmunología. Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

^e División Inmunología. Hospital General de Niños Dr. Pedro de Elizalde. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

^f Laboratorio Central. Hospital Alemán. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

^g Laboratorio de Análisis Clínicos Cardinali & Pugliese. Junín, Provincia de Buenos Aires, Argentina.

Resumen

La determinación de anticuerpos anti-citoplasma de neutrófilos (ANCA) es utilizada en la clínica diaria como una herramienta diagnóstica en distintas formas de vasculitis de pequeños vasos (vasculitis asociadas a ANCA), incluyendo la granulomatosis con poliangeítis (antes: granulomatosis de Wegener), poliangeítis microscópica y granulomatosis eosinofílica con poliangeítis (antes: síndrome de Churg-Strauss), y como apoyo diagnóstico de colitis ulcerosa, colangitis esclerosante primaria y enfermedad de Crohn. Estos anticuerpos están dirigidos contra distintos epítomos antigénicos de diferentes proteínas presentes en el citoplasma del neutrófilo. La determinación de ANCA, habitualmente realizada por la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI), presenta cierto grado de complejidad en la definición de las imágenes de los diferentes patrones, variabilidad en la forma de trabajo y expresión de resultados. El 24 de octubre de 2018 en el marco del X Congreso Argentino de la Calidad en el Laboratorio Clínico y VIII Jornadas Latinoamericanas de la Calidad en el Laboratorio Clínico, en la Ciudad de Buenos Aires, se realizó una reunión de Armonización de la Determinación de ANCA por IFI con el objeto de presentar, discutir y consensuar los distintos aspectos que se presentan en esta técnica. Las propuestas iniciales fueron discutidas arribándose a recomendaciones generales para proporcionar estándares de trabajo e interpretación de imágenes con el objeto de disminuir la variabilidad de resultados entre los laboratorios clínico-inmunológicos.

Palabras clave: Anticuerpos anti-citoplasma de neutrófilos; Armonización; Inmunofluorescencia indirecta

Harmonization of the determination of ANCA by indirect immunofluorescence: first argentine meeting

Abstract

Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) tests are widely used in daily clinical practice as a useful tool for the diagnosis of pathologies such as granulomatosis with polyangiitis, microscopic polyangiitis, pauci-immune necrotizing segmental glomerulonephritis and eosinophilic granulomatosis with polyangiitis, ulcerative colitis, primary sclerosing cholangitis, Crohn's disease, etc. These antibodies are directed against different antigenic epitopes of various proteins which are present in the neutrophil cytoplasm. ANCA testing is usually carried out by using indirect immunofluorescence (IIF) method. The determination of ANCA presents some difficulties in the definition of the

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

Incorporada al Chemical Abstract Service.

Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957 (impresa)

ISSN 1851-6114 (en línea)

ISSN 1852-396X (CD-ROM)

images of the different patterns, work protocols and result reports uniformity. The “Harmonization Conference on the Determination of ANCA by IIF” was held within the framework of the X Argentine Congress on Quality in the Clinical Laboratory and VIII Latin American Conference on Quality in the Clinical Laboratory, in Buenos Aires, Argentina, on October 24, 2018, in order to present, discuss and agree on different aspects of this method. Some initial proposals were discussed, arriving at general recommendations to provide standards of work and an image interpretation, with the aim of reducing the variability of results among the clinical-immunological laboratories.

Keywords: *Anti-neutrophil cytoplasmic antibody; Harmonization; Indirect immunofluorescence*

Harmonização da determinação de ANCA por imunofluorescência indireta: primeira reunião argentina

Resumo

A determinação de anticorpos anti-citoplasma de neutrófilos (ANCA) é utilizada na prática clínica diária como um suporte diagnóstico para várias patologias, como granulomatose com poliangiite, poliangiite microscópica, glomerulonefrite segmentar necrotizante pauci-imune e granulomatose eosinofílica com poliangiite, poliarterite nodosa, colite ulcerosa, colangite esclerosante primária, doença de Crohn. Esses anticorpos são dirigidos contra diferentes epítomos antigênicos de diferentes proteínas presentes no citoplasma do neutrófilo. A determinação de ANCA, normalmente realizada pela técnica de imunofluorescência indireta IFI, apresenta certo grau de complexidade na definição das imagens dos diferentes padrões, variabilidade na forma de trabalho e expressão de resultados. Em 24 de outubro de 2018, no âmbito do X Congresso Argentino de la Calidad en el Laboratorio Clínico (X Congresso Argentino da Qualidade no Laboratório Clínico) e VIII Jornadas Latinoamericanas de la Calidad en el Laboratorio Clínico (VIII Jornadas Latino-americanas da Qualidade no Laboratório), na cidade de Buenos Aires, foi realizada uma Jornada de Harmonização da Determinação de ANCA pelo IFI a fim de apresentar, discutir e concordar sobre os diferentes aspectos que são apresentados nesta técnica. As propostas iniciais foram discutidas, chegando a recomendações gerais para fornecer padrões de trabalho e interpretação de imagens visando reduzir a variabilidade de resultados entre os laboratórios clínico-imunológicos.

Palavras-chave: *Anticorpos anti-citoplasma de neutrófilos; Harmonização; Imunofluorescência indireta*

Introducción

Los anticuerpos (Ac) anti-citoplasma de neutrófilos (ANCA) probaron ser biomarcadores muy útiles en diferentes patologías. Desde su descripción se pudo demostrar su utilidad diagnóstica en distintas formas de vasculitis de pequeños vasos (vasculitis asociadas a ANCA = VAA), incluyendo granulomatosis con poliangiitis (GPA), poliangiitis microscópica (PAM) y granulomatosis eosinofílica con poliangiitis (GPEA) (1) (2) (3).

Estos Ac también están asociados a otras patologías, con frecuencias variables, en particular en la colitis ulcerosa (CU: 60–87%), colangitis esclerosante primaria (CEP: 60–92%), hepatitis autoinmune (HAI: 50–96%) y, en menor medida, en enfermedad de Crohn (EC: 5–25%), como así también a otras condiciones clínicas (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10).

Los ANCA están dirigidos contra distintas proteínas presentes en los gránulos citoplasmáticos primarios y secundarios de los neutrófilos polimorfonucleares (PMN) y monocitos. Los antígenos descriptos asociados son: mieloperoxidasa (MPO), proteinasa 3 (PR3), lactoferrina (LF), proteína inmovilizadora de yodo (PII), catépsina G

(CG), catalasa, enolasa, y otros. Estos Ac son predominantemente de isotipo IgG (11) (12) (13) (14) (15).

Los ANCA son clásicamente estudiados por IFI, utilizando como sustrato neutrófilos humanos fijados con etanol y, de ser necesario, con formalina. El uso de etanol produce un artefacto que hace que algunas proteínas catiónicas se redistribuyan migrando a la periferia del núcleo cargado negativamente. Por lo tanto, mientras la MPO, en PMN fijados con etanol se carga positivamente, migra al núcleo y da un tinte periférico; la PR3 permanece en el citoplasma y da una coloración citoplasmática. La formalina mantiene los gránulos en su posición nativa, por lo que antígenos como la MPO dan tinción citoplasmática.

En el primer taller internacional sobre ANCA, publicado en 1989, se acordó, como procedimiento estándar para la detección de ANCA por IFI, la utilización de leucocitos humanos purificados y fijados con etanol como sustrato. Se utilizó la nomenclatura C-ANCA para el patrón citoplasmático y P-ANCA para el patrón perinuclear (16).

El primer antígeno descripto y asociado al patrón P-ANCA fue la MPO, luego el segundo antígeno fue

la elastasa de neutrófilos humanos (HNE). Al mismo tiempo se describió a la PR3, una serino proteasa de 29 kDa, como responsable del patrón C-ANCA. Todos ellos estaban localizados en los gránulos primarios azurófilos de los neutrófilos juntos con la CG, proteína bactericida aumentadora de la permeabilidad (BPI) y la azurocidina. Por otro lado, la lactoferrina que se encuentra en los gránulos secundarios específicos y la fosfatasa alcalina ubicada en los gránulos terciarios secretores, también están relacionadas a la imagen P-ANCA (17) (18) (19) (20) (21) (22).

En las primeras estandarizaciones de la determinación de ANCA por IFI se consideraba un resultado no concluyente cuando el suero del paciente contenía anticuerpos anti-nucleares (AAN), ya que éstos pueden enmascarar un patrón perinuclear (16).

El uso de formalina puede ayudar a definir si la positividad se debe a Ac dirigidos contra antígenos nucleares o contra los antígenos presentes en el citoplasma de los neutrófilos.

En el Consenso Internacional de 1999 y en el "Addendum" publicado en 2003 se plantean requerimientos mínimos y consideraciones óptimas para la realización de la determinación de ANCA por IFI. Se describen 4 patrones: C-ANCA (fluorescencia citoplasmática granular con acentuación central o interlobulillar), C-ANCA atípico (fluorescencia citoplasmática difusa), P-ANCA (fluorescencia perinuclear con o sin extensión nuclear) y ANCA atípico (toda otra fluorescencia específica de neutrófilos o monocitos distinta a las anteriores). Todos los patrones son observados en neutrófilos fijados con etanol; no se plantea el uso de neutrófilos fijados con formalina ni la determinación de AAN en HEp-2 (23) (24).

Numerosas variables dificultan la correcta interpretación y el aseguramiento de la calidad de la determinación de ANCA por IFI. Entre ellas se pueden mencionar: diferencias en la preparación de los sustratos, inconsistencias en la definición de los patrones, interpretación subjetiva de los resultados, accesibilidad de programas de control externo de la calidad, falta de controles primarios positivos, discrepancias en la nomenclatura utilizada por los distintos laboratorios y falta de estandarización del informe. Surge entonces la necesidad de realizar consensos que permitan armonizar esta determinación, fomentar la utilización de controles de calidad externos y, por último, la necesidad de organizar programas de evaluación externa de la calidad locales de fácil acceso y económicos.

Se realiza el presente consenso con el objetivo de armonizar la determinación de ANCA por IFI, con el propósito de minimizar las dificultades técnicas, lograr uniformidad en la forma de trabajo, llegar a un acuerdo en la nomenclatura e interpretación de las imágenes y estandarizar una correcta elaboración del informe.

Materiales y Métodos

Durante un año, los organizadores de este evento se reunieron periódicamente para delinear el contenido a tratar y para consensuar las recomendaciones a ser expuestas en la Primera Reunión Argentina de Armonización.

Se realizó una revisión sistemática de la literatura recopilando todos los datos disponibles referentes a metodologías de trabajo, nomenclatura y patrones de fluorescencia, obtenidos principalmente en base a consensos y recomendaciones de expertos.

Los temas abordados fueron los aspectos técnicos del ensayo, la definición de patrones de fluorescencia y el diseño del informe para lograr una correcta interpretación de los resultados. Respecto a los aspectos metodológicos, se puso énfasis en el adecuado reconocimiento de la morfología del neutrófilo, así como también en la necesidad de establecer un modo de trabajo basado en el uso de neutrófilos fijados con etanol y con formalina y de la utilización de la determinación de AAN por IFI en HEp-2 ante la observación de fluorescencia nuclear en neutrófilos fijados con etanol, para confirmar o descartar la posible interferencia de AAN.

Se discutió sobre la importancia de realizar la titulación del segundo Ac marcado con FITC (isotiocianato de fluoresceína) mediante el uso de un control primario o, en su defecto, un control secundario, teniendo en cuenta también la necesidad de establecer el tipo del segundo anticuerpo usado y el valor de corte de la determinación.

Un aspecto relevante dentro de los temas tratados, fue la definición de los patrones de fluorescencia y la nomenclatura usada para referirse a los mismos.

El último punto discutido se refirió a la correcta expresión e interpretación de los resultados, concluyendo con la propuesta de varios tipos de informe.

El día 24 de octubre de 2018 en el marco del X Congreso Argentino de la Calidad en el Laboratorio Clínico y VIII Jornadas Latinoamericanas de la Calidad en el Laboratorio Clínico, en la Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina, ante un auditorio de 39 profesionales de 33 laboratorios argentinos con experiencia y conocimiento en esta determinación, fueron presentadas las conclusiones y recomendaciones a las que se arribaron en las sucesivas reuniones. Se llevó a cabo la discusión de lo expuesto y el consenso logrado es el motivo del presente trabajo.

Inmunofluorescencia indirecta: consideraciones técnicas y recomendaciones

El neutrófilo tiene núcleo polilobulado y distintos tipos de gránulos citoplasmáticos que contienen enzimas o proteínas, que pueden ser o no específicos de neutró-

filos. Los gránulos primarios o inespecíficos contienen hidrolasas y peroxidasas, como MPO, PR3, CG, etc. Los secundarios, más numerosos, específicos de granulocitos, contienen laminina y lactoferrina (25).

Los gránulos terciarios, específicos de neutrófilos, contienen moléculas involucradas en el proceso de fagocitosis y adhesión. Los ANCA pueden estar dirigidos contra cualquiera de estos autoantígenos. Los antígenos MPO y PR3 son los más estudiados por estar involucrados en las vasculitis asociadas a ANCA. Hay otros antígenos con localización en los gránulos citoplasmáticos, como parte del citoesqueleto o asociados a la parte interna de la membrana nuclear como la proteína mieloides específica de 50 kDa. También algunas proteínas no histónicas cromosomales que se ubican adyacentes a la heterocromatina en la periferia nuclear (HMG1, HMG2, histona H1) son *targets* comunes en la enfermedad inflamatoria intestinal. La proteína de envoltura nuclear laminina B, así como la proteína BPI, serían autoantígenos de gran importancia en la colitis ulcerosa. Debido a la variabilidad y características de estos antígenos, la IFI es el método más adecuado para detectar los ANCA (18).

Los ANCA son detectados por IFI, una técnica económica y de fácil realización, pero que requiere de un operador experimentado para la correcta interpretación de los resultados. Por estas razones, en el consenso de 1999, donde se plantean aspectos técnicos basándose en el procedimiento que fue delineado por Alan Wiik en 1988, se recomendó como método de tamizaje (23).

Está bien documentado el pobre acuerdo que hay entre los diferentes laboratorios en el ensayo de ANCA. Las diferencias más importantes generalmente podrían deberse a la variabilidad en la metodología de preparación de los reactivos, incluyendo preparaciones celulares, fijaciones, soluciones amortiguadoras y conjugados. Diferentes sustratos varían en mostrar la granularidad del citoplasma y la acentuación interlobulillar. Otras causas que pueden influenciar en los resultados son el uso de distintos microscopios, diferentes protocolos de trabajo, la definición de los patrones y la experiencia de los observadores, por lo tanto, estas diferencias no pueden ser atribuidas a un único factor (26).

Se evidenció que la frecuencia y distribución de los patrones de fluorescencia difieren entre las distintas marcas comerciales de improntas de neutrófilos. El menor acuerdo se encuentra cuando se trata de la presencia de un patrón atípico en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal (27).

Los esfuerzos para armonizar la determinación de ANCA comenzaron con el *workshop* de 1988 en Copenhague. Más tarde, en 1999, se realizó un consenso internacional donde se hicieron recomendaciones técnicas, entre otras. Si bien en el año 2003 se publicó el *Addendum*, que recomendaba el uso de controles de calidad externo e interno, no se realizó ningún otro consenso

internacional hasta el año 2017. En este último no se discutieron los delineamientos técnicos de la IFI, razón por la que esta armonización se basó en la técnica original, en el consenso de 1999 y en el *Addendum* de 2003 (23) (24) (28).

1. Consideraciones sobre la elección del sustrato

Un aspecto importante a considerar a la hora de elegir nuestro sistema de trabajo, es la calidad del sustrato. Las improntas pueden contener sólo neutrófilos o bien el paquete leucocitario completo (neutrófilos, eosinófilos, monocitos y linfocitos). Utilizar estas últimas ayudaría a definir la especificidad del Ac.

Es fundamental que los neutrófilos conserven su integridad durante la preparación de las improntas. Un factor a considerar es la activación y degranulación que puede producirse durante su obtención y aislamiento (por ej.: fagocitosis de componentes utilizados, como dextrán) lo que puede resultar en una alteración de la composición del citoplasma y la morfología celular, como por ejemplo, el aumento en el número de partículas antigénicas o exocitosis (16) (23) (29).

El agregado de proteínas inertes en el *buffer* de fosfatos durante la obtención y aislamiento de los neutrófilos evitaría su degranulación. En la técnica original se recomienda utilizar seroalbúmina humana en la solución de lavado, ya que la utilización de seroalbúmina bovina podría ocasionar la formación de inmunocomplejos en suero de pacientes con Ac contra dichas proteínas. Sin embargo, en el consenso de 1999 se aconsejó utilizar seroalbúmina bovina al 1% en el *buffer* de dilución del suero y en la solución de lavado (16) (23) (29).

Por otro lado, los neutrófilos expresan en su superficie receptores para el Fc de inmunoglobulinas y componentes del complemento, los que retienen su capacidad funcional aún luego de procedimientos de fijación con acetona o etanol, así se puede producir la formación de agregados de inmunoglobulinas que entorpecerían el ensayo (16).

El patrón de fluorescencia puede modificarse también según el método de preparación del sustrato (citocentrifugación, extendido o gota), lo que puede alterar los resultados obtenidos, hecho evidenciado por el Instituto de Patología Molecular de Viena en 1995 (29).

Hay que tener en cuenta también las modificaciones que ocurren durante los procesos de fijación. Cuando los neutrófilos son fijados con etanol 96-99%, 5 minutos a 4 °C, las membranas de los gránulos se rompen, las proteínas neutras mantienen su ubicación en el citoplasma (como PR3), mientras que las proteínas básicas, cargadas positivamente, son redistribuidas hacia el núcleo cargado negativamente, principalmente la MPO (30). Sin embargo, cuando los neutrófilos son fijados con formalina (0,25% formalina, 45% acetona, en *buffer* de fosfatos 2,2 mM), la MPO permanece en los gránulos

del citoplasma y da un patrón citoplasmático granular con acentuación interlobulillar (31). Lo mismo sucedería con la alfa-enolasa, la catalasa, la BPI, las proteínas cromosomales no histonas del grupo de alta movilidad, la actina, la catepsina G, la elastasa y la lactoferrina (23).

La formalina es un fijador que forma uniones intermoleculares de grupos amino libres produciendo una red de antígenos entrecruzados. Esto hace que la reactividad de los Ac con estas proteínas entrecruzadas esté comúnmente disminuida o ausente, ocasionando variabilidad en la intensidad de fluorescencia observada. Varios factores, como el antígeno involucrado, la proporción de fijadores y el tiempo de fijación, entre otros, pueden llevar a que la conversión de la imagen P-ANCA en etanol a C-ANCA en formalina sea incompleta: algunas muestras pueden retener la imagen P, otras mostrar solo algunas células con imagen C-ANCA o negativizarse (27) (32) (33).

También se observó que en neutrófilos fijados con formalina los AAN pueden retener la fluorescencia nuclear con menor intensidad o negativizarse. Sin embargo, no hay consenso en el uso de ambos fijadores para diferenciar entre Ac anti-AAN y diferentes imágenes de ANCA (24) (34).

2. Uso de controles

La forma óptima de trabajo según lo recomendado en el *Addendum* 2003 (24) es:

- Ensayar sueros controles con patrones P-ANCA y C-ANCA en cada nuevo lote de improntas (si fuera posible, ensayar todos los patrones para asegurarse que se pueden distinguir patrones típicos de atípicos).
- En cada ensayo se debe utilizar controles IgG ANCA positivo y negativo (si fuera posible, C-ANCA y P-ANCA).
- Utilizar un control cercano al corte positivo o positivo titulable.
- En cada portaobjetos debe demostrarse un ANCA negativo y un ANCA positivo.

La propuesta de mínima sería:

- Cada lote nuevo debe ser ensayado con un control P-ANCA y C-ANCA y un suero negativo.
- Cada vez que se realiza la determinación, se debe ensayar un control positivo (P-ANCA o C-ANCA) y un control negativo. Utilizar preferentemente sueros positivos de título conocido, ya que esto permite controlar la técnica completa incluyendo las diluciones de las muestras. Se recomienda participar en programas de control externo de la calidad; de no tener esta opción, se recomienda utilizar controles externos alternativos.

3. Conjugado fluorescente

La sensibilidad, la especificidad y el buen desempeño de la determinación de IFI depende, en gran medida, de la elección del conjugado (anti-inmunoglobulina humana conjugada con FITC).

Recomendaciones a tener en cuenta en la elección del conjugado fluorescente

- Relación fluoresceína/proteína (F/P)
Se recomienda que la relación se encuentre entre 2,5 y 4,0; si la relación F/P fuera menor disminuiría mucho la fluorescencia específica y se obtendrían resultados falsamente negativos y si fuera mayor aumentaría la fluorescencia inespecífica y se dificultaría la observación (35).
- Relación Ac específico/proteína (Ac esp/P)
Esta relación debe ser mayor o igual a 0,1, si fuera menor de 0,1 la especificidad se vería disminuida (35).
- Concentración del Ac específico
La concentración final en la dilución de trabajo del Ac específico debe estar entre 30 y 60 µg/mL (36).
- Dilución de trabajo del conjugado
Cada laboratorio deberá establecer la dilución óptima de trabajo mediante una titulación del conjugado. La misma debe realizarse sobre improntas de neutrófilos fijados con etanol. Preferentemente debe hacerse para cada lote de sustrato (23) (24). Cuando se utilizan conjugados comerciales pre-diluidos o listos para usar, debe tenerse en cuenta que las condiciones de trabajo del laboratorio pueden no ser iguales a las del fabricante. Por lo tanto, es necesario que el laboratorio evalúe la dilución de trabajo recomendada por el fabricante mediante una verificación. La dilución óptima de trabajo debe establecerse siempre que se cambie el sustrato (tipo, marca o lote), el sistema óptico de lectura (microscopio o lámpara) o cuando los controles de calidad externos o internos no dieran los resultados esperados.

El método recomendado de titulación es la titulación en damero o tablero de ajedrez, para la cual el laboratorio debe contar con un suero positivo de título conocido o, en su defecto, con un suero control que provenga de un programa de evaluación externa de la calidad que tenga un 80% de consenso en el resultado, tomando en cuenta el grupo par (por ej.: la misma marca comercial). También se debe contar con un suero negativo. La determinación se realiza enfrentando diluciones seriadas del conjugado (por ejemplo 1:50, 1:100, 1:200, 1:400 y 1:800) con diluciones seriadas de los controles positivo y negativo de modo de cubrir un rango por encima y por debajo del título asignado al control positivo. Si el título del control positivo fuera 1:160, se podrían obtener los resultados que muestra la Tabla I.

Tabla 1. Titulación en damero del conjugado fluorescente

Conjugado	1:50		1:100		1:200		1:400		1:800	
Control primario	c(+)	c(-)	c(+)	c(-)	c(+)	c(-)	c(+)	c(-)	c(+)	c(-)
1:20	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-
1:40	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
1:80	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-
1:160	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-
1:320	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1:640	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Se tomará para el ejemplo el título del control primario como positivo 1:160. c(+): control positivo; c(-): control negativo.

Se define como “título en la meseta” a la mayor dilución del suero conocido que arroje un resultado positivo en al menos tres diluciones diferentes y consecutivas del conjugado, antes de que el título decaiga abruptamente. En el ejemplo, el título en la meseta sería 1:160. La dilución 1:400 (la mayor dilución del conjugado en la meseta o *plateau*) sería el “punto final de meseta o *plateau*”. Se tomará como dilución de trabajo del conjugado un cuarto de la dilución del punto final de la meseta (1:100 en el ejemplo). Se debe corroborar también que no se produzca una coloración inespecífica; para ello, el *buffer* de trabajo debe ensayarse ante cada dilución del conjugado (36).

4. Isotipo o especificidad isotípica del conjugado

Hay disponibles tanto conjugados polivalentes (IgG, IgA e IgM) como conjugados anti-IgG específicos [anti-cadena gamma y anti-cadena liviana, anti-cadena gamma solamente o anti-F(ab')₂]. La técnica original recomienda como conjugado IgG de conejo anti-cadena gamma (16).

Si bien hay estudios que sugieren una asociación entre el isotipo ANCA-IgM y la manifestación hemorrágica alveolar en las vasculitis asociadas a ANCA (VAA), no se ha establecido la frecuencia o la relevancia clínica, ni una relación absoluta (37) (38).

Los ANCA de isotipo IgA (ANCA-IgA) también podrían estar presentes en pacientes con granulomatosis con poliangeítis con manifestaciones de las vías aéreas superiores (39).

Dado que en la literatura no hay acuerdo de la utilidad ni de la relevancia clínica de los ANCA-IgA y ANCA-IgM y que el consenso internacional no recomienda utilizar conjugados polivalentes por considerar que los conjugados anti-IgM/IgA podrían dar falsos positivos (24), se recomienda utilizar IgG anti-cadena pesada gamma con buena purificación o anti IgG molécula entera, la que puede dar mayor inespecificidad.

5. Dilución de trabajo: valor de referencia

La dilución de corte del ensayo dependerá de las condiciones generales de trabajo (conjugado, micros-

copio, fuente de luz, etc.). Según la bibliografía utilizada, las recomendaciones de dilución de la muestra pueden ser 1:20 o 1:40 (16) (23). Algunos fabricantes proponen una dilución 1:10. Se recomienda que cada laboratorio calcule su valor de corte según sus condiciones de trabajo.

6. Uso de azul de Evans

Se recomienda el uso de azul de Evans como contraincolorante y se debe tener en cuenta la concentración utilizada ya que, en exceso, puede enmascarar resultados positivos débiles (16) (23).

7. Microscopio (epi-iluminación)

Existe una variedad de fuentes de luz y filtros disponibles. Las lámparas pueden ser halógenas, halógenas de alta presión, de mercurio de distintas potencias (50 o 100 w), o sistema de LED (del inglés: *light-emitting diode*).

La intensidad de la lámpara de fluorescencia debe ser la adecuada. Existen estándares fluorescentes que permiten controlar el comportamiento del microscopio. Estos son portaobjetos comerciales que contienen microesferas fluorescentes con distintas intensidades. La magnificación recomendada para la observación de los preparados es de 400X (la filtración de luz primaria de banda ancha induce un aumento en la autofluorescencia de los PMN y los eosinófilos) (16).

8. Titulación de la muestra

Según la bibliografía, la utilidad del uso de la titulación de los ANCA para predecir la actividad de la enfermedad y que conlleve a una terapia, es controversial. Los títulos tendrían una leve correlación con la severidad de la enfermedad. La relación entre los niveles de ANCA y la recaída dependería de los protocolos de tratamientos seguidos. El riesgo de recaída tras un aumento de ANCA es sustancial, pero no es de un 100%. Las recaídas pueden darse sin el mencionado aumento (34).

Según el Consenso Internacional (1999), la titulación de la muestra no sería necesaria y la intensidad de

fluorescencia puede informarse como negativa, positiva débil y positiva fuerte, basándose solamente en la dilución de tamizado (23).

Sin embargo, la titulación podría ser útil en los siguientes casos:

- Si existe concomitantemente un Ac anticitoplasmático u otra fluorescencia citoplasmática como: anticuerpos anti-ribosomal-P o anti-Jo-1.
- Si una muestra previa del mismo paciente fue positiva por IFI y se desea comparar la variación de título de Ac.
- Si el suero es ANCA positivo por IFI y negativo para los Ac específicos por enzoinmunoensayo (ELISA).

Se propone no titular e informar observando la intensidad de fluorescencia, asignándole un valor de acuerdo a una escala de 1 a 4 cruces cuando es positiva.

Patrones de ANCA por inmunofluorescencia indirecta

Desde el primer reporte de hallazgo de los ANCA ha pasado mucho tiempo. Hasta allí, la identificación de la imagen de ANCA impresionaba como algo sencillo: solo consistía en observar fluorescencia en el citoplasma de los neutrófilos. Ante este hallazgo, Davis *et al.* confirmaron dicha fluorescencia en distintos sustratos, correspondientes a diferentes muestras sanguíneas de diferentes sistemas ABO, interpretándose que no se trataba de falsos resultados de fluorescencia. Años más tarde, la utilización de etanol como fijador proporcionó la

posibilidad de ver, al menos, una imagen diferente de fluorescencia, que se ubicaba en la periferia del núcleo de los neutrófilos y no en el citoplasma como se había descrito anteriormente (40) (41). Luego fueron definidos patrones atípicos, llamados A-ANCA o X-ANCA, donde pueden coexistir diferentes imágenes de fluorescencia.

En la práctica diaria del laboratorio clínico existen dificultades en la definición de imágenes con respecto a los diferentes patrones de ANCA (42) (43) (44) (45). En los consensos internacionales se definieron las imágenes C-ANCA, C-ANCA atípica, P-ANCA y ANCA atípica (23). Dada la dificultad de diferenciar los patrones P-ANCA y A-ANCA y éstos de la presencia de AAN, diversos autores han evaluado el comportamiento de la IFI para ANCA utilizando distintos sustratos. Analizaron diversas marcas comerciales de improntas y métodos desarrollados, comparando el uso de improntas fijadas con etanol solamente o asociadas con neutrófilos fijados con formalina y línea celular HEP-2. Tanto los estudios realizados en pacientes con VAA (32) (46) (48) como en enfermedades inflamatorias intestinales (27) mostraron una mejor *performance* de la IFI y un mejor acuerdo entre ensayos cuando se combinaba el uso de improntas fijadas en etanol con improntas fijadas en formalina para ANCA y detección de AAN con HEP-2. Todas estas dificultades motivaron la realización de la presente armonización, con el objeto de discutir diferentes variables en relación a las imágenes observadas, tratando de simplificar las definiciones. Lo concluido se describe en la Tabla II. La Tabla III muestra diferentes imágenes y sus interpretaciones.

Tabla II. Armonización: patrones de ANCA por IFI

Imagen	Fijación con etanol	Fijación con formol	HEP-2 / linfocito
C-ANCA	Fluorescencia granular con acentuación central o interlobulillar	Citoplasma granular con acentuación interlobulillar	Negativo
P-ANCA	Fluorescencia perinuclear	Citoplasma granular con acentuación interlobulillar	Negativo
P-ANCA + AAN	Fluorescencia nuclear	Citoplasma granular con acentuación interlobulillar	Positivo
A-ANCA	Incluye todos los patrones de reactividad específica para neutrófilos que no son ni P-ANCA ni C-ANCA.		
A-ANCA	Fluorescencia perinuclear combinada con fluorescencia citoplasmática	Citoplasma positivo uniforme	Negativo
A-ANCA	Fluorescencia citoplasmática uniformemente distribuida (sin acentuación interlobulillar)	citoplasma positivo uniforme	Negativo
A-ANCA	Fluorescencia perinuclear	Citoplasma negativo	Negativo
C-ANCA: No reactivo P-ANCA: No reactivo A-ANCA: No define	Fluorescencia nuclear	Negativo	Positivo

Tabla III. Interpretación de patrones de ANCA

Imagen	Paciente 1	Paciente 2	Paciente 3	Paciente 4	Paciente 5
ANCA etanol	Figura 1	Figura 2	Figura 3	Figura 4	Figura 5
ANCA formalina	No necesaria	Figura 6	Figura 7	Figura 7	Figura 7
HEp-2	No necesaria	Figura 8	Figura 9	Figura 8	Figura 8
Informe	C-ANCA	P-ANCA	C-ANCA negativo P-ANCA negativo A-ANCA no define AAN positivo	A-ANCA	A-ANCA

ANCA etanol: neutrófilos humanos fijados con etanol. ANCA formalina: neutrófilos humanos fijados con formalina. HEp-2: células de cultivo HEp-2. C-ANCA: patrón ANCA citoplasmático. P-ANCA: patrón ANCA perinuclear. AAN: anticuerpos anti-nucleocitoplasmáticos. A-ANCA: patrón ANCA atípico.

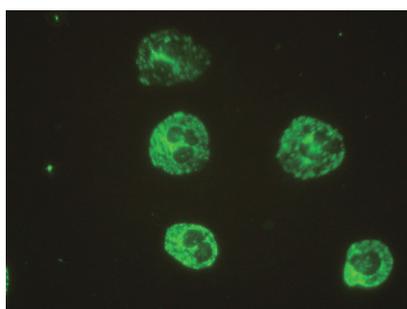


Figura 1: Patrón C-ANCA: tinción citoplasmática granular con acentuación interlobulillar.

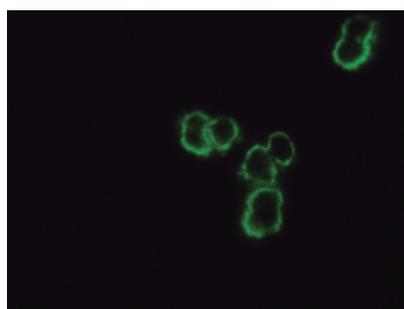


Figura 2: Patrón P-ANCA: tinción perinuclear.

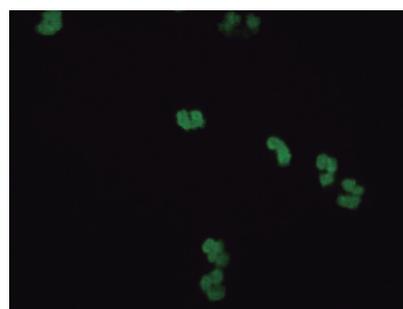


Figura 3: Patrón P-ANCA: tinción nuclear.

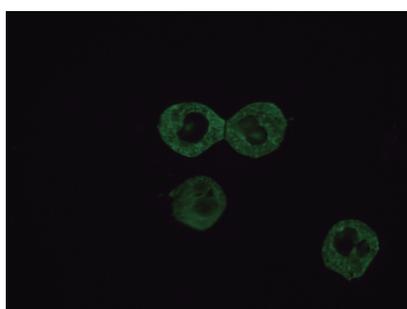


Figura 4: Patrón citoplasmático atípico: tinción citoplasmática granular muy fina a homogénea sin acentuación perinuclear.

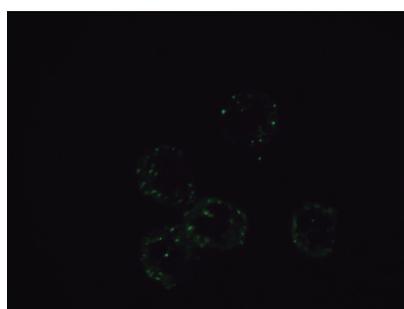


Figura 5: Patrón citoplasmático atípico: gránulos citoplasmáticos aislados.

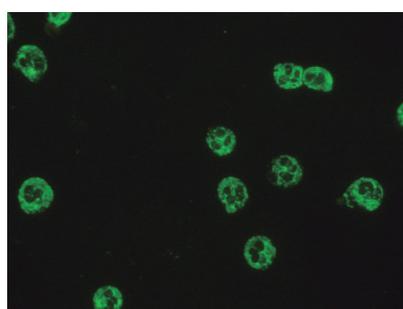


Figura 6: Tinción C-ANCA citoplasmática granular con acentuación interlobulillar.

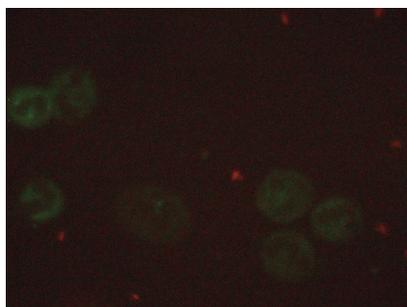


Figura 7: ANCA negativo.

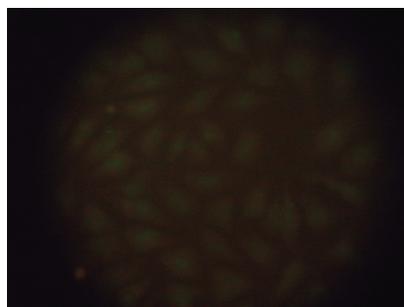


Figura 8: AAN negativo.

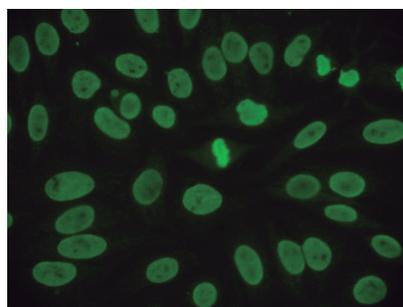


Figura 9: AAN positivo, patrón nuclear homogéneo (AC-1).

Muchos patrones que podrían definirse como atípicos, siguiendo la Tabla II, no son antígenos relacionados a ANCA, entre ellos los aloantígenos (NB1 es el aloantígeno más difundido), como así también algunos Ac citoplasmáticos, en títulos altos, encontrados en sustratos específicos (por ej.: anti-músculo liso, anti-mitochondrial, anti-ribosomas, anti-Golgi) (23) (40).

Los Ac AAN, cuando están presentes, dificultan la interpretación de los ANCA, especialmente el patrón nuclear homogéneo, que es el patrón que aparece con mayor frecuencia. La interferencia de la imagen de AAN no dependería del título de Ac. Específicamente los Ac anti-ADN nativo se mimetizan muy bien con la imagen P-ANCA, ya que el ADN nativo, en células maduras, como es el caso de los neutrófilos utilizados como sustrato, se ubica en la periferia del núcleo. Es muy importante para garantizar el resultado y no desviar la orientación clínica, usar células HEp-2 para certificar la presencia o ausencia de AAN. También hay que tener en cuenta que muchas imágenes de P-ANCA irradian fluorescencia sobre los núcleos de los neutrófilos, lo que hace difícil visualizar una eventual fluorescencia nuclear específica. Por lo tanto, es importante incorporar como sistemática de trabajo, la realización de AAN a toda muestra positiva sobre neutrófilos y además realizar la IFI utilizando neutrófilos fijados con formalina, lo que facilitará la interpretación de las imágenes (49). La Tabla II orienta a la hora de definir resultados, especialmente los A-ANCA y también cuando se observa fluorescencia nuclear.

Tipos de informe ¿Cómo informar para una correcta interpretación de los patrones?

Todo informe bioquímico constituye un medio de comunicación en el cual se reúnen datos relevantes y se convierten en una herramienta médica fundamental que contribuye tanto al diagnóstico, seguimiento y tratamiento, como al descarte de distintas patologías. Es un documento dirigido a un profesional calificado. Debe comenzar con la identificación inequívoca del paciente. El informe no debe ser sólo la simple transcripción de resultados, sino que implica una responsabilidad bioquímica tan relevante como la realización de la determinación analítica. Un correcto informe hace a la calidad del ensayo, ya que un informe mal confeccionado descalifica todo el proceso por más correcto que éste fuera realizado.

El informe debe estar bien identificado, debe ser breve y preciso y su información, indubitable (Fig. 10).

El informe debe tener en cuenta los siguientes ítems

1. Identificación del laboratorio
2. Identificación del paciente
3. Nombre de la determinación
4. Método y sustrato, conjugado
5. Dilución de corte
6. Resultado:

- a) Valor de referencia
- b) Patrón
- c) Título

7. Observaciones

Es importante hacer algunas consideraciones:

- Nombre de la determinación. Internacionalmente no hay discrepancias en lo que respecta a ANCA, sigla aceptada para denominar los Ac anticito plasma de neutrófilo.
- Respecto al método, se refiere exclusivamente a la IFI, utilizando como sustrato neutrófilos humanos y como conjugado anti-gamma globulina humana IgG marcada con FITC.
- La dilución de corte debería ser determinada por cada laboratorio a través de curvas ROC y puede expresarse como dilución, por ejemplo 1/20 o bien como proporciones 1:20 de acuerdo a cómo se proceda para realizar la misma.
- Dentro del resultado son varios los puntos a tratar:
 - a) Es necesario hacer alusión al valor de referencia, que debe ser negativo en la dilución de corte usada.
 - b) El informe de los patrones en el caso de ANCA presenta consideraciones especiales, ya que, a diferencia de otros autoanticuerpos determinados por IFI, la definición de los mismos requiere la utilización de un sustrato con diferente fijación y el descarte de interferencia, como la presencia de AAN. Por lo tanto, al informar cada patrón por separado se avala que se han realizado los distintos procedimientos que llevan a la definición de los mismos. Con respecto a la nomenclatura empleada, al acrónimo aceptado internacionalmente se antecede la inicial del patrón separado por un guión. Así será C-ANCA para el patrón citoplasmático; P-ANCA para el perinuclear y A-ANCA para el atípico.
 - c) Para informar el título, el mismo puede ser expresado como intensidad de fluorescencia en el valor de corte y se traduce como cruces:
 - ++++ positivo alto
 - +++ positivo medio alto
 - ++ positivo medio bajo
 - + positivo bajo
 Otra manera sería realizar diluciones al medio a partir de la dilución de corte y determinar la última dilución con positividad (por ejemplo 1/160 o bien 1:160).
- El último ítem sería el referente a las observaciones en las cuales se puede realizar interpretaciones para mejorar la evaluación del informe, aclaraciones sobre algunos procesos realizados, sugerencias que permitan completar el diagnóstico, etc. Un ejemplo de una observación sería aclarar la presencia de AAN como interferencia.

PROPUESTA DE INFORME					
<ul style="list-style-type: none"> • ANTICUERPOS ANTI CITOPLASMA DE NEUTRÓFILO (ANCA) • MÉTODO: Inmunofluorescencia indirecta • SUSTRATO: Neutrófilos humanos • CONJUGADO : Antigammaglobulina humana IgG-FITC 					
Valor de corte :	<table border="1" style="font-size: small;"> <tr> <td>1/20</td> <td>Volumen final</td> </tr> <tr> <td>1:20</td> <td>Proporciones</td> </tr> </table>	1/20	Volumen final	1:20	Proporciones
1/20	Volumen final				
1:20	Proporciones				
RESULTADOS	VALOR REFERENCIA: Negativo				
C-ANCA: Positivo-Negativo P-ANCA: Positivo-Negativo A-ANCA: Positivo-Negativo					
TÍTULO:	<table style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 50%; vertical-align: top;"> ++++ positivo alto +++ positivo medio alto ++ positivo medio bajo + bajo </td> <td style="width: 50%; vertical-align: top; text-align: center;"> 1/20, 1/40, 1/80..... 1:20, 1:40, 1:80 </td> </tr> </table>	++++ positivo alto +++ positivo medio alto ++ positivo medio bajo + bajo	1/20, 1/40, 1/80..... 1:20, 1:40, 1:80		
++++ positivo alto +++ positivo medio alto ++ positivo medio bajo + bajo	1/20, 1/40, 1/80..... 1:20, 1:40, 1:80				
OBSERVACIONES	Sugerencias, aclaraciones, interpretación extra				

Figura 10. Propuesta de informe de ANCA.

Discusión y Conclusiones

La determinación de ANCA por IFI sigue siendo un método muy utilizado en el laboratorio clínico en nuestro medio. No solo por su utilidad en las VAA sino también en otras patologías.

Estos Ac han constituido una importante herramienta en el diagnóstico de VAA por varias décadas. Actualmente, los consensos internacionales enfatizan realizar como metodología de tamizaje, inmunoensayos antígeno-específicos de alta calidad con la consideración de que exista una alta probabilidad *pre-test* para la enfermedad (28). Sin embargo, muchos laboratorios realizan ANCA solo por IFI y aproximadamente el 10% de los pacientes con vasculitis sistémicas son positivos solo por IFI (23).

En otras patologías, como enfermedades inflamatorias intestinales y hepatopatías autoinmunes, la detección de ANCA por IFI es de valiosa utilidad, fundamentalmente cuando no se describe un Ac específico asociado al diagnóstico diferencial u otras técnicas diagnósticas no resultan contundentes.

Por otro lado, la mayoría de los laboratorios reciben solicitudes para ANCA con pocos o ningún dato clínico ni diagnóstico. Además, son escasas las solicitudes de Ac específicos a-PR3 y a-MPO.

No fue objetivo, ni de la reunión de armonización ni de esta publicación, discutir la utilización de la determinación de ANCA para el diagnóstico de las VAA, ni para el diagnóstico de ninguna otra patología asociada, sino ponderar los detalles técnicos y unificar la interpreta-

ción de los patrones y el informe en la determinación de ANCA por IFI. Se considera que la identificación de los pasos críticos en la técnica, permite establecer métodos de estandarización y abonar la implementación de controles de calidad.

Como resultado de esta reunión de armonización se acordó definir tres patrones de fluorescencia: C-ANCA, P-ANCA, A-ANCA y no se recomienda utilizar términos como C-ANCA atípico o P-ANCA atípico por considerarlos confusos, ya que pueden llevar a errores en la identificación del posible Ac específico presente y, por lo tanto, en el diagnóstico.

Se recomienda la utilización de neutrófilos fijados con etanol y, de ser necesario, con formalina y la determinación de Ac anti-nucleocitoplasmáticos utilizando células de cultivo HEp-2 como sustrato, con el objeto de poder definir correctamente el posible Ac involucrado. Uno de los principales errores al no utilizar estos sustratos adicionales es el de categorizar como P-ANCA un paciente con AAN positivo.

Cada laboratorio debe realizar la verificación del valor de corte, la titulación del Ac anti-IgG marcado con FITC y, en caso de utilizar anti-IgG (FITC) lista para usar, debe verificar su título con un control primario o, en su defecto, secundario.

El informe debe ser muy explícito y claro y se deben tener en cuenta: método, técnica, sustrato, conjugado y resultado, considerando el patrón y el título. Como recomendación adicional se puede incluir en el informe una frase que describa la forma de trabajo, por ejemplo la determinación se realizó sobre neutrófilos humanos

fijados con etanol y, adicionalmente, sobre neutrófilos fijados con formalina y HEp-2 para definir correctamente el patrón.

Muchos años pasaron desde la primera descripción de los ANCA por IFI, sin embargo, su correcta interpretación sigue siendo un desafío. Es fundamental establecer pautas para minimizar las dificultades técnicas y lograr mayor uniformidad en los resultados de los distintos laboratorios. En este sentido, resulta muy importante continuar con reuniones de armonización, no sólo para afianzar los acuerdos en las condiciones de trabajo, la interpretación de las imágenes y el informe, sino también para lograr la validación de las propuestas.

El próximo desafío para optimizar el *test* de ANCA será el desarrollo de materiales de referencia y la implementación de controles de calidad externos a nivel local y de fácil acceso para los laboratorios clínicos.

Agradecimientos

Los autores agradecen la discusión y el aporte de los siguientes profesionales durante la realización de la Jornada de Armonización: Arietti, Alba Soledad; Artana, Cristina; Baeza, Natalia; Barzon, Silvia; Bobone, Nora; Boero, María Josefina; Borgarelli, Claudia; Britos, Cecilia; Caba, Natalia; Carrizo, Carolina; Cassinerio, Adriana; D'Agostino, Liliana; Darepresentasao, Silvia; De Matteis, Karina; Dominguez, Laura; Eidenson, Luciana; Etchevez, Patricia; Girard Bosch, María Cecilia; Gonzalez, Sandra; Grovas, Patricia; Lanfrancioni, Marcela; Mitsui, Mami; Mota, Estela; Musari, Cecilia; Natoli, Veronica; Nuñez, Guillermo; Pino, Maria; Portu, Ana; Ramos, Graciela; Reyes, María Cecilia; Roquel, Liliana; Rotondo, Sabrina; Roy, Adriana; Testardini, Pamela; Strada Agodino, María Laura; Vergini, Verónica; Vitores, Valeria; Yamamoto, Leticia; Zaccagnino, Liliana.

Fuentes de financiación

No se ha recibido ningún tipo de financiación para el desarrollo de este consenso.

Conflictos de intereses

Los autores declaran no tener conflictos de intereses respecto del presente trabajo.

Correspondencia

ORLANDO GABRIEL CARBALLO
Estados Unidos 3826
1228 CIUDAD AUTÓNOMA DE BUENOS AIRES, Argentina.
Correo electrónico: ogcarballo@gmail.com

Referencias bibliográficas

1. Woude FJ, Rasmussen N, Lobatto S, Wiik A, Permin H, van Es LA, *et al.* Autoantibodies against neutrophils and monocytes: tools for diagnosis and marker of disease activity in Wegener's granulomatosis. *Lancet* 1985; 1: 425-9.
2. Falk RJ, Jennette JC. Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies with specificity for myeloperoxidase in patients with systemic vasculitis and idiopathic necrotizing and crescentic glomerulonephritis. *N Engl J Med* 1988; 318: 1651-7.
3. 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 Jan; 65 (1): 1-11.
4. Duerr RH, Targan SR, Landers CJ, LaRusso NF, Lindsay KL, Wiesner RH, *et al.* Neutrophil cytoplasmic antibodies: a link between primary sclerosing cholangitis and ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1991; 100: 1385-91.
5. Oudkerk-Pool M, Ellerbroek PM, Ridwan BU, Goldschmeding R, Evon Blomberg BM, Penia AS, *et al.* Serum antineutrophil cytoplasmic autoantibodies in inflammatory bowel disease are mainly associated with ulcerative colitis. A correlation study between perinuclear antineutrophil cytoplasmic autoantibodies and clinical parameters, medical and surgical treatment. *Gut* 1993; 34: 46-60.
6. Mulder AHL, Horst G, Haagsma EB, Kleibeuker JH, Kallenberg CGM. Antineutrophil cytoplasmic antibodies in autoimmune liver diseases. *Hepatology* 1993; 17: 411-7.
7. Hardarson S, LaBrecque DR, Mitros FA, Neil GA, Goeken JA. Antineutrophil cytoplasmic antibody in inflammatory bowel and hepatobiliary diseases. *Am J Clin Pathol* 1993; 99: 277-81.
8. Targan S, Landers C, Vidrich A, Czaja AL. High-titer anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in type 1 autoimmune hepatitis. *Gastroenterology* 1995; 108: 1159-66.
9. Bansi DS, Fleming KA, Chapman RW. Antineutrophil cytoplasmic antibodies in autoimmune hepatitis. *Gastroenterology* 1995; 109: 2049-55.
10. Zauli D, Ghetti S, Grassi A, Descovich C, Cassani F, Ballardini G, *et al.* Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in type 1 and 2 autoimmune hepatitis. *Hepatology* 1997; 25: 1105-7.
11. Walmsley RS, Zhao MH, Hamilton MI, Brownlee A, Chapman P, Pounder RE, *et al.* Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies against bactericidal/permeability-increasing protein in inflammatory bowel disease. *Gut* 1997; 40: 105-9.
12. Roozendaal C, Zhao MH, Horst G, Lockwood CM, Kleibeuker JH, Limburg PC, *et al.* Catalase and alpha-enolase: two novel granulocyte autoantigens in inflammatory bowel disease (IBD). *Clin Exp Immunol* 1998; 112: 10-6.
13. Orth T, Kellner R, Diekmann O, Faust J, Meyer Zum Büschenfelde KH, Mayet WJ. Identification and characterization of autoantibodies against catalase and α -enolase in patients with primary sclerosing cholangitis. *Clin Exp Immunol* 1998; 112: 507-15.
14. Halbwachs-Mecarelli L, Nusbaum P, Noël LH, Reumaux D, Erlinger S, Grünfeld JP, *et al.* Antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) directed against cathepsin G in

- ulcerative colitis, Crohn's disease and primary sclerosing cholangitis. *Clin Exp Immunol* 1992; 90: 79-94.
15. Peen E, Almer S, Bodemar G, Ryden BO, Sjölin C, Tejle K, *et al.* Antilactoferrin antibodies and other types of ANCA in ulcerative colitis, primary sclerosing cholangitis and Crohn's disease. *Gut* 1993; 34: 56-62.
 16. Wiik A. Deliniation of a standard procedure for indirect immunofluorescence detection of ANCA. *APMIS* 1989; 97 (Suppl. 6): 12-3.
 17. Goldschmeding R, van der Schoot CE, Cohen Tervaert JW, Mason DY, von dem Borne AE, Kallenberg CG. Autoantibodies against myeloid lysosomal enzymes: a novel class of autoantibodies associated with vasculitic syndromes. *Kidney Int* 1988; 34: 558-9.
 18. Goldschmeding R, van der Schoot CE, ten Bokkel Huinink D, Hack CE, van den Ende ME, Kallenberg CG, *et al.* Wegener's granulomatosis autoantibodies identify a novel diisopropylfluorophosphate-binding protein in the lysosomes of normal human neutrophils. *J Clin Invest* 1989; 84 (5): 1577-87.
 19. Niles JL, McCluskey RT, Ahmad MF, Arnaout MA. Wegener's granulomatosis autoantigen is a novel neutrophil serine proteinase. *Blood* 1989; 74 (6): 1888-93.
 20. Lüdemann J, Utecht B, Gross WL. Anti-neutrophil cytoplasm antibodies in Wegener's granulomatosis recognize an elastinolytic enzyme. *J Exp Med* 1990; 171 (1): 357-62.
 21. Jennette JC, Hoidal JR, Falk RJ. Specificity of anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies for proteinase 3. *Blood* 1990; 75 (11): 2263-4.
 22. Jenne DE, Tschopp J, Lüdemann J, Utecht B, Gross WL. Wegener's autoantigen decoded. *Nature* 1990; 346 (6284): 520.
 23. 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 (4): 507-13.
 24. Savige J, Dimech W, Fritzler M, Goeken J, Chris Hagen E, Jennette JC, *et al.* Addendum to the International Consensus Statement on testing and reporting of antineutrophil cytoplasmic antibodies. Quality control guidelines, comments, and recommendations for testing in other autoimmune diseases. *Am J Clin Pathol* 2003; 120 (3): 312-8.
 25. Miyauchi J, Watanabe Y. Immunocytochemical localization of lactoferrin in human neutrophils. An ultrastructural and morphometrical study [published correction appears in *Cell Tissue Res* 1987 Nov; 250 (2): 479]. *Cell Tissue Res* 1987; 247 (2): 249-58.
 26. Pollock W, Clarke K, Gallagher K, Hall J, Luckhurst E, McEvoy R, *et al.* Immunofluorescent patterns produced by antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) vary depending on neutrophil substrate and conjugate. *J Clin Pathol* 2002; 55: 680-3.
 27. Papp M, Altorjay I, Lakos G, Tumpek J, Sipka S, Tamas Dinya, *et al.* Evaluation of the combined application of ethanol-fixed and formaldehyde-fixed neutrophil substrates for identifying atypical perinuclear antineutrophil cytoplasmic antibodies in inflammatory bowel disease. *Clin Vaccine Immunol* 2009; 16 (4): 464-70.
 28. Bossuyt X, Cohen Tervaert JW, Arimura Y, Blockmans D, Flores-Suárez LF, *et al.* Revised 2017 international consensus on testing of ANCAs in granulomatosis with polyangiitis and microscopic polyangiitis. *Nat Rev Rheumatol* 2017; 13 (11): 683-92.
 29. Kain R, Matsui K, Exner M, Binder S, Schaffner G, Sommer EM, *et al.* A novel class of autoantigens of anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in necrotizing and crescentic glomerulonephritis: the lysosomal membrane glycoprotein h-lamp-2 in neutrophil granulocytes and a related membrane protein in glomerular endothelial cells. *J Exp Med* 1995; 181: 585-97.
 30. Baslund B, Wiik A. Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies (ANCA) and vasculitis. *Clin Rev Allergy* 1994; 12 (3): 297-304.
 31. Cohen Tervaert JW, Damoiseaux J. Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies: how are they detected and what is their use for diagnosis, classification and follow-up? *Clin Rev Allergy Immunol* 2012; 43 (3): 211-9.
 32. Chowdhury SM, Broomhead V, Spickett GP, Wilkinson R. Pitfalls of formalin fixation for determination of antineutrophil cytoplasmic antibodies. *J Clin Pathol* 1999; 52 (6): 475-7.
 33. Wiik A. Neutrophil-specific autoantibodies in chronic inflammatory bowel diseases. *Autoimmun Rev* 2002; 1 (1-2): 67-72.
 34. Cohen Tervaert JW, Damoiseaux J. Fifty years of anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) testing: do we need to revise the international consensus statement on testing and reporting on ANCA? *APMIS Suppl* 2009 Jun; (127): 55-9.
 35. Rose NR, Bigazzi PE. *Methods in immunodiagnosis*. (2^o ed) New York, Chicester, Brisbane, Toronto: John Wiley and Sons; 1980.
 36. Carballo G, Ingenito F, Ginaca AA, Carabajal P, Costa M, Balbaryski J. Primer Consenso Argentino para la Estandarización de la Determinación de Anticuerpos Anti-Nucleares por Inmunofluorescencia Indirecta-HEp-2. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 2012; 46 (1): 3-13.
 37. Esnault VL, Soleimani B, Keogan MT, Brownlee AA, Jayne DR, Lockwood CM. Association of IgM with IgG ANCA in patients presenting with pulmonary hemorrhage. *Kidney Int* 1992; 41 (5): 1304-10.
 38. Clain JM, Hummel AM, Stone JH, Fervenza FC, Hoffman GS, Kallenberg CGM, *et al.* Immunoglobulin (Ig)M antibodies to proteinase 3 in granulomatosis with polyangiitis and microscopic polyangiitis. *Clin Exp Immunol* 2017; 188 (1): 174-81.
 39. Kelley JM, Monach PA, Ji C, Zhou Y, Wu J, Tanaka S, *et al.* IgA and IgG antineutrophil cytoplasmic antibody engagement of Fc receptor genetic variants influences granulomatosis with polyangiitis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011; 108 (51): 20736-41.
 40. Davies DJ, Moran JE, Niall JF, Ryan GB. Segmental necrotising glomerulonephritis with antineutrophil an-

- tibody: possible arbovirus aetiology? *Br Med J* 1982; 285: 606.
41. Falk RJ, Jennette JC. Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies with specificity for myeloperoxidase in patients with systemic vasculitis and idiopathic necrotizing and crescentic glomerulonephritis. *N Engl J Med* 1988; 318 (25): 1651-7.
 42. Chevallier A, Noel LH, Renier G, Gardembas-Pain M, Subra JF, Nusbaum P, *et al.* Determination of anti-neutrophil cytoplasm antibodies (ANCA) specificity by immunofluorescence on chronic myelocytic leukemia cells. *J Immunol Methods* 1992; 147 (1): 101-9.
 43. Hagen EC, Andrassy K, Chernok E, Daha MR, Gaskin G, Gross W, *et al.* The value of indirect immunofluorescence and solid phase techniques for ANCA detection. A report on the first phase of an international cooperative study on the standardization of ANCA assays. EEC/BCR Group for ANCA Assay Standardization. *J Immunol Methods* 1993; 159 (1-2): 1-16.
 44. Ulmer M, Rautmann A, Gross WL. Immunodiagnostic aspects of autoantibodies against myeloperoxidase. *Clin Nephrol* 1992; 37 (4): 161-8.
 45. Stroncek DF, Egging MS, Eiber GA, Clay ME. Neutrophil alloantibodies react with cytoplasmic antigens: a possible cause of false-positive indirect immunofluorescence assays for antibodies to neutrophil cytoplasmic antigens. *Am J Kidney Dis* 1993; 21 (4): 368-73.
 46. Cernok E, Holle J. Twenty-eight years with antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA): how to test for ANCA – evidence-based immunology? *Autoimmun Highlights* 2010; 1: 39-43.
 47. Cernok E, Moosig F. Current and emerging techniques for ANCA detection in vasculitis. *Nat Rev Rheumatol* 2014 Aug; 10 (8): 494-501.
 48. Damoiseaux J, Csernok E, Rasmussen N, Moosig F, van Paassen P, Baslund B, *et al.* Detection of antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCAs): a multicentre European Vasculitis Study Group (EUVAS) evaluation of the value of indirect immunofluorescence (IIF) versus antigen-specific immunoassays. *Ann Rheum Dis* 2017 Apr; 76 (4): 647-53.
 49. Cardinalli A, Ginaca A, Espada G, Pizzimente MC, Rivas ME, Leggiere L, *et al.* Utilidad clínica de los anticuerpos anticitoplasma de neutrófilos en lupus eritematoso sistémico juvenil. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 2013; 47 (1): 143-53.

Recibido: 20 de octubre de 2020

Aceptado: 29 de marzo de 2021