

USO DEL LABORATORIO REUMATOLÓGICO

Dra. Verónica Mezzano

El uso del laboratorio en enfermedades autoinmunes reumatológicas es indispensable por su papel tanto en la clasificación o apoyo diagnóstico de algunas enfermedades y en el pronóstico de otras. La utilidad de los resultados va a depender de muchos factores como sensibilidad y especificidad del ensayo y la probabilidad “pre-test” para determinados diagnósticos. Los resultados deben ser siempre analizados en el contexto clínico del paciente, ya que éstos constituyen un apoyo y no aseguran un diagnóstico. Su mal uso puede conducir a errores diagnósticos y terapéuticos por lo que deben pedir y evaluar con prudencia.

Estos exámenes consisten principalmente en la detección de autoanticuerpos séricos. También se tratará el análisis de líquido articular ya que es de gran utilidad en el estudio de las artritis.

El uso del laboratorio general (Hemograma, VHS, PCR, Perfil Bioquímico, exámenes de orina, etc.) será mencionado en los distintos capítulos.

Técnicas de Laboratorio

A modo de introducción es importante conocer las técnicas de laboratorio más comúnmente usadas:

1. Inmunofluorescencia indirecta (IFI)
2. ELISA
3. Aglutinación por látex
4. Nefelometría

A continuación se detallan algunas características de las técnicas.

Inmunofluorescencia Indirecta

Es un examen de sencillo y de alta sensibilidad para la detección principalmente de anticuerpos antinucleares (actualmente el “gold standard” para su búsqueda). Se usa también para la detección de anticuerpos anti-DNA, ANCA y otros.

Consiste en incubar suero del paciente en distintas diluciones, con células o tejidos sustrato (HEp-2, *Crithidia luciliae*, neutrófilos, etc.), montados en un portaobjeto. Los resultados son expresados como positivos o negativos a distintas diluciones 1/40, 1/80, 1/160 y así progresivamente mayores según el examen.

La gran desventaja de este método es que es operador dependiente y la confiabilidad de sus resultados está directamente relacionada a la experiencia del observador.

ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay)

Es una técnica simple que se basa en la unión antígeno-anticuerpo. Para la búsqueda de autoanticuerpos se incuba el suero del paciente en un pocillo en cuyas paredes se encuentra adherido el antígeno específico, luego se lava quedando en el pocillo sólo los anticuerpos que se han unido al antígeno. Se usa luego un segundo anticuerpo dirigido contra la porción Fc de la Ig (anti IgG, M, A o polivalentes) que se uniría al primer anticuerpo (el del paciente). Finalmente, mediante un sustrato colorimétrico (se activa mediante enzimas que se encuentran en el segundo anticuerpo) se determina la cantidad de anticuerpo presente (a mayor intensidad del color, mayor concentración sérica del autoanticuerpo).

Es de fácil procesamiento y generalmente automatizado lo que permite realizar un mayor número de exámenes, barato y menos operador dependiente.

Aglutinación por látex

Esta técnica se usa principalmente para la búsqueda de Factores Reumatoides (FR). Se utilizan partículas de látex recubiertas con IgG, las cuales se aglutinan en contacto con FR poliméricos. Se usan diluciones progresivamente mayores del suero del paciente, y se informa como positivo o negativo a la última dilución en la que se observa aglutinación. Es un examen sencillo y barato.

Nefelometría

Consiste en el análisis automatizado de la dispersión de la luz al chocar contra complejos antígeno-anticuerpo formados al incubar suero del paciente con el reactivo. A mayor concentración de complejos (mayor "turbidez" de la suspensión), mayor la dispersión.

A continuación se detallarán los exámenes de utilidad según enfermedades.

ARTRITIS REUMATOIDE

Factor Reumatoide

Los Factores Reumatoides (FR) se asocian principalmente a Artritis Reumatoide pero también se encuentran en otras enfermedades autoinmunes e infecciosas. Son inmunoglobulinas tipo IgM (se puede detectar por métodos tradicionales también de tipo IgA) dirigidas contra la porción Fc de las IgG.

El FR es uno de los criterios de clasificación de la Artritis Reumatoide (AR) del American College of Rheumatology de 1987 y se asocia a mal pronóstico (enfermedad articular agresiva y compromiso extra-articular).

La técnica más utilizada es generalmente la aglutinación por látex. También se pueden determinar mediante ELISA y nefelometría y otras. Se usan distintas

diluciones del suero y los valores se expresan según la técnica en estas mismas diluciones o en unidades.

Éste es un ensayo sensible pero no específico (especificidad de aproximadamente 80%) para AR, ya que se encuentra presente en muchas otras enfermedades, entre éstas: infecciones crónicas, enfermedades pulmonares inflamatorias o fibrosantes, neoplasias, etc. Por lo tanto, la interpretación de su resultado depende exclusivamente del criterio clínico.

Tabla 1. Frecuencia de FR en enfermedades reumáticas y otras

Enfermedad	Frecuencia aproximada (%)
Artritis Reumatoide	80
Síndrome de Sjögren	75 - 90
LES	15 - 35
EMTC	50 - 60
Esclerosis Sistémica	20
PM / DM	5 - 10
Críoglobulinemia mixta	90
Endocarditis bacteriana subaguda (EBSA)	40
Hepatitis infecciosas	25
Tuberculosis	15
Sarcoidosis	10
Artritis Idiopática Juvenil	10

*Frecuencia en adultos sanos: 5-7%; en mayores de 60 años puede llegar a 15%.

Adaptada y modificada de (4).

Utilidad del FR en AR:

1. Clasificación
2. Apoyo diagnóstico
3. Pronóstico

Anticuerpos Anti-Péptidos Citrulinados Cíclicos

Los anticuerpos anti-péptidos citrulinados cíclicos (anti-CCP) se han identificado como marcadores sensibles y altamente específicos, detectables en fases precoces de la AR y con capacidad pronóstica, siendo hoy en día un apoyo diagnóstico importante. Es especialmente útil en AR precoz y artritis indiferenciadas. Se ha asociado a enfermedad más agresiva.

Los ensayos comerciales detectan la presencia de anticuerpos mediante ELISA. Los CCP son péptidos sintéticos en los cuáles el sitio citrulinado esencial es expuesto en forma óptima para ser detectados por los anticuerpos del paciente.

La sensibilidad de este examen es similar o mejor (hasta 90% aproximadamente) al del FR y su especificidad es >95%.

En cuadros de artritis indiferenciadas su valor predictivo positivo para AR es de 93% y el negativo de 75%. Su hallazgo en sujetos "asintomáticos" podría reflejar un estado de enfermedad latente.

Utilidad de anti-CCP:

1. Diagnóstico (AR precoz y en AR sero negativa)
2. Pronóstico
3. ¿Seguimiento?

ENFERMEDADES DEL TEJIDO CONECTIVO

Se consideran enfermedades del tejido conectivo (ETC):

1. Lupus Eritematoso Sistémico (LES)
2. Síndrome de Sjögren (SS)
3. Esclerodermia (SScl)
4. Dermato / Polimiositis (DM / PM)
5. Enfermedad Mixta del Tejido Conectivo (EMTC)
6. Enfermedad Indiferenciada del Tejido Conectivo (EITC)

Anticuerpos Anti-Nucleares

Los anticuerpos antinucleares (ANA) son fundamentales en el diagnóstico y exclusión de enfermedades del tejido conectivo, ya que en éstas son positivos en un porcentaje alto. Pero, a la vez son inespecíficos ya que se pueden encontrar en enfermedades autoinmunes órgano-específicas, en enfermedades no autoinmunes como infecciones crónicas, enfermedades linfoproliferativas y también en población sana (especialmente en personas mayores, en mujeres y en familiares de primer grado de pacientes con enfermedades reumatológicas ANA positivas). Es por esto que su evaluación debe ser hecha dentro del contexto clínico del paciente y con una sospecha diagnóstica que justifique su petición.

Tiene relevancia el título en que son positivos, a mayor dilución más significativo es su hallazgo.

En personas sanas se describen valores de hasta:

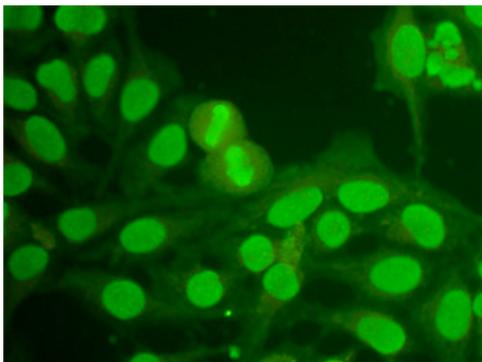
- >1 / 40: 20 a 30%
- >1 / 80: 10 a 12%
- >1 / 160: 5%
- >1 / 320: 3%

Se determinan generalmente mediante IFI en células HEp-2 (células epiteliales humanas de estirpe neoplásica), como sustrato estandarizado. Se pueden también determinar por ELISA.

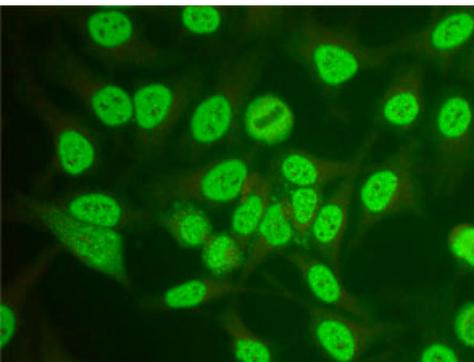
Se describen distintos patrones de fluorescencia, los cuáles se asocian a anticuerpos específicos contra ciertos antígenos y a determinadas enfermedades. Los principales son:

1. Homogéneo: se asocia principalmente a anticuerpos anti-DNA.
2. Moteado: se asocia a la presencia de anticuerpos anti-ENA (Ro, La, Sm, RNP, Scl-70).
3. Centrómero (ACA): Dentro de los ANA un subtipo importante y que se puede solicitar de manera independiente son los anticuerpos anti-centrómero. Reconocen hasta 5 proteínas centroméricas. Su principal característica es su presencia en Esclerodermia limitada, con una sensibilidad de aproximadamente 60% y especificidad de > 95%. Éstos rara vez coexisten con anticuerpos anti Scl-70 (Esclerodermia difusa).
4. Nucleolar: se asocia a Esclerodermia difusa.

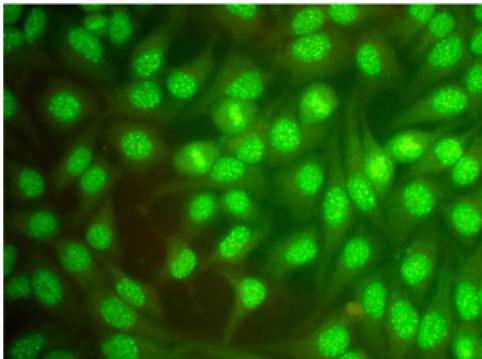
Patrón Homogéneo



Patrón Moteado



Patrón Centrómero



Patrón Nucleolar

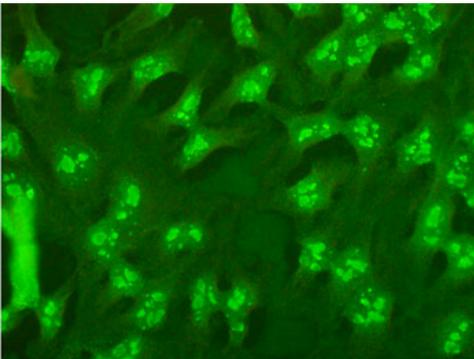


Tabla 2. Sensibilidad de ANA en enfermedades autoinmunes

Enfermedad	Sensibilidad
Reumatológicas	

LES	95 – 100%
Esclerodermia	60 – 80%
Síndrome de Sjögren	40 – 70%
PM/DM	40 – 70%
EMTC	100%
Lupus inducido por drogas	100%
Artritis Reumatoide	50%
No Reumatológicas	
Tiroiditis de Hashimoto	45%
Enfermedad de Graves	50%
Hepatitis Autoinmune	100%
Hipertensión Pulmonar Primaria	40%

Adaptada y modificada de (2).

Utilidad de ANA en ETC:

1. Apoyo diagnóstico

Anticuerpos Anti-DNA

La denominación de anticuerpos anti-DNA, en la actualidad, se refiere casi exclusivamente a aquellos que se unen a DNA de doble hebra (dsDNA), ya que la determinación de los dirigidos contra de DNA de hebra simple (ssDNA) no tiene utilidad clínica.

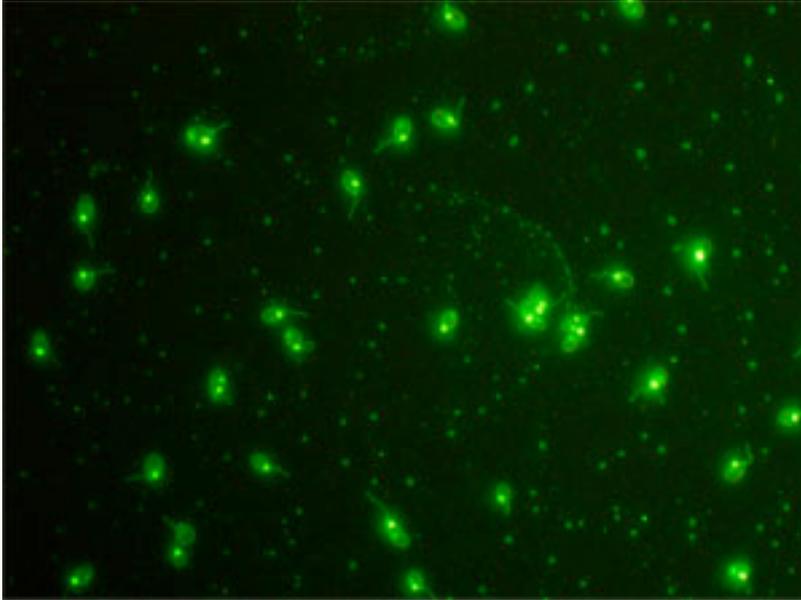
Se usan para el diagnóstico de LES con una alta especificidad (95%) pero con baja sensibilidad (30-70%).

Se pueden determinar por diversas técnicas, siendo las más usadas: IFI, método de Farr (RIA) y ELISA. Mediante IFI y técnica de Farr se detectan anticuerpos de alta afinidad, más específicos para el diagnóstico de LES. La detección por IFI se realiza en *Crithidia luciliae* (protozoos con kinetoplasto con dsDNA circular), como sustrato. El uso de RIA tiene la ventaja de ser un método cuantitativo que permite el seguimiento clínico del paciente ya que los valores se correlacionan con la actividad de la enfermedad. El uso de ELISA tiene la desventaja de tener un mayor número de falsos positivos.

Utilidad de anticuerpos anti- DNA en LES:

1. Determinación por IFI: diagnóstico
2. Determinación por Farr: seguimiento

Anticuerpos Anti-DNA por IFI



Anticuerpos Anti-ENA (anti Ro, La, Sm, RNP, Scl-70, Jo-1)

El término ENA se refiere a “antígenos nucleares extractables”: Ro (SS-A), La (SS-B), Sm, RNP, Scl-70, Jo-1. Estos antígenos se han identificado como blanco de algunos anticuerpos antinucleares. La búsqueda de anticuerpos específicos contra estos ENAs tiene utilidad en la práctica clínica dadas sus asociaciones con determinadas manifestaciones y enfermedades.

Su búsqueda se hace preferentemente mediante ELISA para cada uno de los diferentes antígenos. Este método es de gran sensibilidad y puede detectar concentraciones pequeñas de anticuerpos.

Tabla 3. Asociaciones clínicas de los anticuerpos anti-ENA

--	--

Anti-ENA	Enfermedad o Manifestación Clínica
Ro	Síndrome de Sjögren Primario (SS) Fotosensibilidad Lupus cutáneo subagudo Lupus neonatal Bloqueo AV completo (BAVC) neonatal
La	SS BAVC neonatal
Sm	LES
RNP	EMTC Raynaud
Scl-70	Esclerodermia difusa Fibrosis pulmonar
Jo-1	Dermato/Polimiositis

Utilidad de la determinación de ENAs en ETC:

1. Diagnóstico
2. Ro y La específicamente: evaluar riesgo neonatal y conducta terapéutica y seguimiento en mujeres con ETC embarazadas Ro y/o La positivas.

Sistema del Complemento

El sistema del complemento está compuesto numerosas proteínas plasmáticas. Éstas constituyen una pieza fundamental en la respuesta inflamatoria. Los niveles de sus componentes se pueden determinar mediante análisis funcionales o antigénicos. Se busca, en general, encontrar deficiencias de sus componentes, las que pueden ser adquiridas (por consumo) o heredadas (predisponen al desarrollo de algunas enfermedades autoinmunes o producen inmunodeficiencias).

Los componentes que se analizan de rutina son **C3 y C4** y esta determinación se realiza mediante nefelometría. Niveles elevados se pueden encontrar en enfermedades inflamatorias e infecciosas ya que estas proteínas se comportan como reactantes de fase aguda. Niveles bajos se pueden observar en enfermedades por complejos inmunes activas como LES y crioglobulinemias,

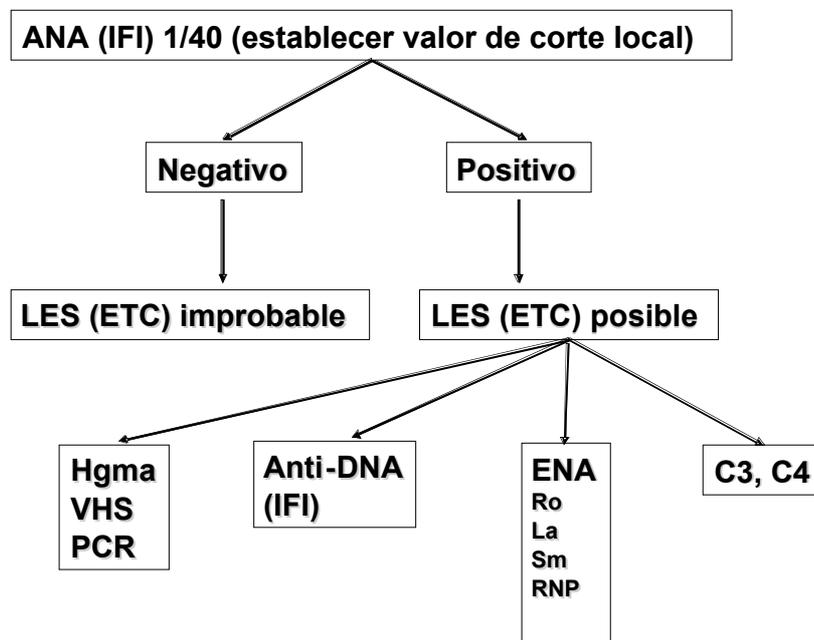
donde los componentes se consumen. Por este motivo la determinación de C3 y C4 permite seguir y en algunos casos estimar la actividad de la enfermedad.

Se realiza también la determinación cuantitativa y funcional del **Inhibidor de C1**. Su deficiencia se asocia a angioedema hereditario.

Utilidad:

1. Diagnóstico
2. Seguimiento de pacientes con LES, evaluación de actividad.

Figura 1. Algoritmo simplificado para el uso del laboratorio en ETC



VASCULITIS

Las vasculitis son diversas y su clasificación ha sido motivo de controversia. En este sentido existen algunos exámenes que nos permiten agruparlas con un fin diagnóstico y terapéutico aunque sólo algunas cuentan con marcadores serológicos.

Los anticuerpos **anti-citoplasma de neutrófilos o ANCA** son marcadores que caracterizan a las siguientes vasculitis sistémicas:

1. **Granulomatosis de Wegener (WG)** asociado generalmente a c-ANCA
2. **Micropoliangeítis (MPA)** asociado generalmente a p-ANCA

Sin embargo, también pueden estar presentes en otras vasculitis como el Síndrome de Churg-Strauss, vasculitis renal aislada, vasculitis inducida por drogas y en otras enfermedades inflamatorias como ETC, enfermedades inflamatorias intestinales y hepatitis autoinmune (en estas últimas, habitualmente p-ANCA).

El método tradicional de determinación de la presencia de estos anticuerpos y el más sensible, es mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI). Ésta se realiza en placas con neutrófilos fijados con etanol. Al haber unión del anticuerpo al neutrófilo se pueden distinguir 2 tipos de patrones según la distribución de la fluorescencia intracelular:

- **p-ANCA o patrón perinuclear**
- **c-ANCA o patrón citoplasmático**

Otro método de detección de ANCA es mediante ELISA, más específico. Con esta técnica se realiza la búsqueda de anticuerpos contra 2 antígenos. Éstos se localizan en los gránulos azurofílicos de los neutrófilos y en los lisosomas positivos para peroxidasa de los monocitos:

- **Anti-PR3 o anti-proteinasa 3** que es el que generalmente produce un patrón citoplasmático mediante IFI
- **Anti-MPO o anti-mieloperoxidasa** que se asocia al patrón perinuclear

Se considera necesario al obtener un resultado positivo mediante IFI el confirmarlo mediante ELISA.

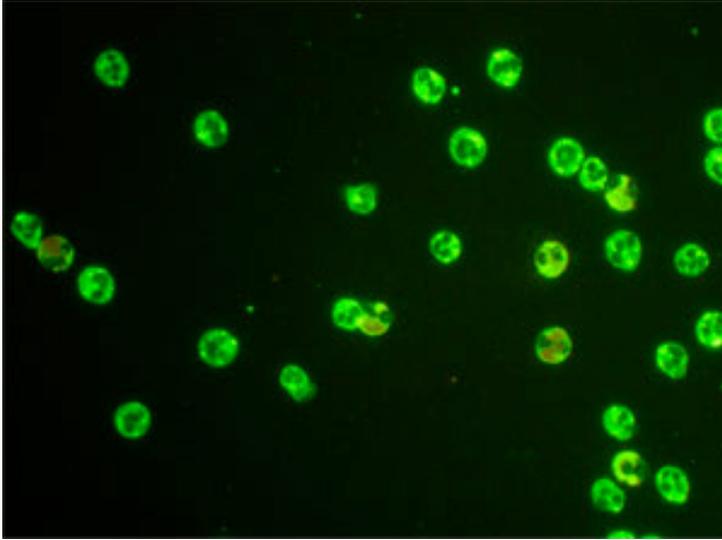
Como todo resultado por ELISA esta determinación es cuantitativa. Sirve en seguimiento de la actividad de la enfermedad. También se puede usar la IFI para la evaluación de actividad, ya que se puede negativizar en algunos pacientes en remisión.

Se considera que el encontrar tanto ANCA por IFI y ELISA aumento su valor predictivo positivo: VPP IFI: 45%, VPP ELISA: 83%, VPP IFI más ELISA: 88%.

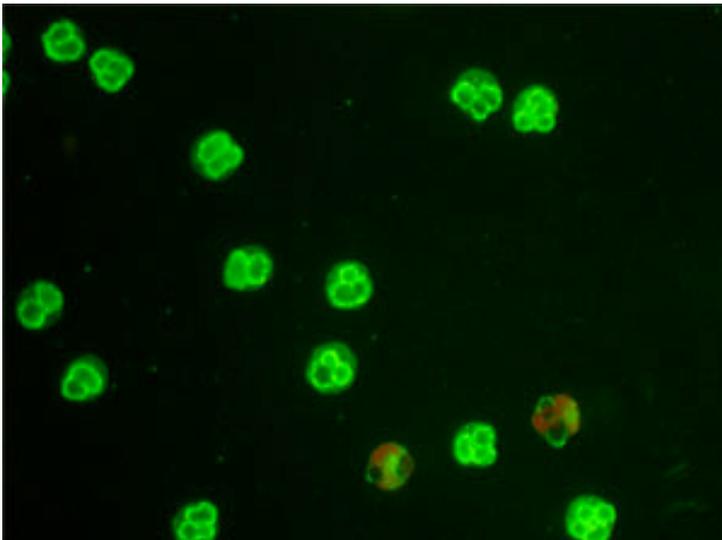
Tabla 4. Frecuencia de ANCA en distintas enfermedades

Enfermedad	Frecuencia p-ANCA (%)	Frecuencia c-ANCA (%)
Granulomatosis de Wegener	5-10	90
Poliangeítis Microscópica	50-70	50
Vasculitis de Churg-Strauss	70-85	10
Poliarteritis Nodosa	Se ha reportado	5-10
GN idiopática	50-85	
LES	Se ha reportado	Raro
Síndrome de Goodpasture	10-30	

ANCA Patrón Citoplasmático



ANCA Patrón Perinuclear



SÍNDROME ANTIFOSFOLÍPIDOS

Los exámenes de laboratorio en el Síndrome Anti-Fosfolípidos (SAF) son un pilar del diagnóstico ya que en los Criterios de Clasificación su presencia es indispensable junto con las manifestaciones clínicas. Los anticuerpos antifosfolípidos son anticuerpos dirigidos contra proteínas que se unen a fosfolípidos con carga aniónica.

Para un diagnóstico definitivo de SAF se deben detectar en al menos 2 oportunidades separadas por al menos 12 semanas y máximo 5 años antes de las manifestaciones clínicas. Estos anticuerpos pueden ser uno o más de los siguientes:

- 1. Anticuerpos Anti-Cardiolipinas (ACL)**
- 2. Anticoagulante Lúpico (LAC)**
- 3. Anticuerpos Anti-₂ GPI**

La presencia de estos anticuerpos pueden dar VDRL falsos positivos.

Los anticuerpos anti-cardiolipinas y los anti-₂ GPI se determinan mediante ELISA, rutinariamente para isotipos IgG e IgM (también se pueden determinar IgA). Los resultados se expresan en unidades GPL (para anti-cardiolipinas tipo IgG) o MPL (anti-cardiolipinas tipo IgM). Los anticuerpos anti-₂ GPI se expresan en unidades tradicionales. Se consideran valores significativos clínicamente aquellos moderados (> 40 GPL o MPL) o altos (>percentil 99 para la población).

El anticoagulante lúpico se detecta mediante ensayos de coagulación donde el más usado es el de veneno de serpiente de Russell (DRVV). La presencia de este “anticoagulante” se puede sospechar por un TTPK prolongado que no se corrige con la adición de plasma de un pool normal. Se expresa el resultado como razón entre el control normal y el paciente, que sugiere o no la presencia de un inhibidor tipo lúpico.

Se pueden encontrar anticuerpos antifosfolípidos “falsos positivos” en infecciones virales y otras y ocasionalmente asociadas a drogas. Esto se ve con ACL y LAC pero no así con anticuerpos anti-₂ GPI. Por este motivo es fundamental repetir la determinación después de al menos 12 semanas de una primera muestra positiva.

Estos anticuerpos también se pueden observar con distintas frecuencias en enfermedades autoinmunes distintas del LES (en los que se encuentran en aproximadamente un 30%).

ANÁLISIS DE LÍQUIDO ARTICULAR - ARTRITIS POR CRISTALES

El análisis del líquido articular o sinovial es un examen sencillo y barato y una herramienta fundamental en el estudio de las artritis ya que es un apoyo en el diagnóstico de las artritis inflamatorias e indispensable en el diagnóstico de las artritis por cristales y artritis séptica. El estudio y manejo de artritis séptica está descrito en otro capítulo de este manual.

En las artritis por cristales más frecuentes: Gota (cristales de urato monosódico) y Condrocálcinosis (cristales de pirofosfato de calcio) el análisis del líquido sinovial es diagnóstico.

En la evaluación del líquido sinovial hay tres etapas:

1. Evaluación de características físicas: color, transparencia o turbidez y viscosidad.
 - a. Color: incoloro, amarillo, hemático / rojizo, purulento, blanco / quiloso, gris, etc.

Incoloro: líquido sinovial normal, hidrartrosis
Amarillos: líquidos inflamatorios y no inflamatorios (distintas intensidades)
Purulentos: artritis séptica
Hemáticos: hemofilias, trauma, sinovitis villonodular
 - b. Turbidez: se considera turbio si no permite leer a través, a mayor celularidad mayor turbidez.
 - c. Viscosidad: se describe viscosidad normal si la filancia es mayor a 3 cm al dejar caer una gota del líquido desde una jeringa. El líquido sinovial normal es viscoso; esta propiedad se pierde en los líquidos inflamatorios.

2. Evaluación microscópica:

- a. Análisis al fresco: permite la búsqueda de cristales y de células con inclusiones (gránulos citoplasmáticos grandes observables en AR, artritis por cristales y artritis séptica).
- b. Mediante el uso de luz polarizada se facilita la búsqueda de cristales birrefringentes. La luz polarizada se obtiene al agregar a la óptica tradicional lentes especiales (polarizador y analizador). La birrefringencia consiste en el brillo de los cristales en un fondo oscuro; los cristales tienen colores característicos según la orientación de su eje mayor en relación al polarizador cuando son observados en un fondo color magenta.

Birrefringencia negativa: el cristal es amarillo cuando el eje largo se encuentra paralelo al polarizador del microscopio y azul cuando es perpendicular.

Birrefringencia positiva: amarillo al estar perpendicular y azul al estar paralelo (eje largo del cristal).

Cristales de urato monosódico:

Forma: agujas, generalmente largas, que pueden atravesar los leucocitos

Birrefringencia: negativa intensa

Cristales de pirofosfato de calcio:

Forma: pequeños, pleomórficos aunque generalmente romboidales

Birrefringencia: débilmente positiva

Se describe también la ubicación de los cristales: intra o extracelulares. En general, durante una crisis debieran observarse cristales intracelulares.

- c. Recuento celular de leucocitos. Se expresa en leucocitos por microlitro. Se debe realizar también un recuento diferencial de mononucleares y polimorfonucleares.

El recuento permite diferenciar líquidos “inflamatorios” de aquellos “no inflamatorios”. Se consideran líquidos inflamatorios aquellos con un recuento celular mayor a 2000 leucocitos por microlitro.

< 200:	“normal”
< 2000:	artrosis, lesiones de ligamentos o cartílagos, trauma, artropatías neuropáticas, artropatías asociadas a enfermedades endocrinológicas y otras
> 2000:	considerar AR, ETC, espondiloartropatías, artritis por cristales, vasculitis, etc.
> 50000:	descartar infección siempre, también se puede ver en artritis por cristales

3. Gram y cultivo: necesario para el estudio bacteriológico en artritis séptica. Se deben solicitar los exámenes correspondientes según la sospecha clínica (TBC, artritis gonocócica, etc.).

El análisis químico del líquido sinovial, por ejemplo la determinación de glucosa o proteínas no es de utilidad clínica y por lo tanto no se realiza de rutina.

REFERENCIAS

1. UpToDate 14.3, 2006.
2. Rheumatology 3rd Edition, 2003.
3. Kelley's Textbook of Rheumatology, 7th Edition.
4. Manual of Rheumatology and Outpatient Orthopedic Disorders. Diagnosis and Therapy 4th Edition.
5. Arch Pathol Lab Med Jan 2000 Vol 124; Arthur Kavanaugh et al.
6. Atlas of Synovial Fluid Analysis and Cristal Identification, 1991. R. Schumacher, Jr. and A. Reginato.