

Situación actual de las pruebas de autoanticuerpos en los laboratorios españoles de análisis clínicos y bioquímica clínica

MJ Llorente Alonso¹, J Jiménez Jiménez², C González Rodríguez³, JM González de Buitrago³, I Alarcón Torres⁴, M Alsina Donadeu⁵, JL Araquistain Alcaín⁶, JE Benedito Rodríguez⁷, ML Casas Losada⁸, P Guevara Ramírez⁹.
(Comisión de Bioquímica de las Enfermedades Inmunológicas).

Resumen

El objetivo del estudio es conocer las características de los laboratorios españoles de Análisis Clínicos y Bioquímica Clínica que realizan pruebas de autoanticuerpos (organización de esta área de trabajo del laboratorio, catálogo de pruebas, métodos habituales empleados para valorar los autoanticuerpos, y utilización de algoritmos diagnósticos). Para ello, se remitió un cuestionario a los socios de la Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular (SEQC), que nos permitió obtener esta información.

Han participado 57 laboratorios, la mayoría de ellos de Análisis Clínicos, y ubicados generalmente en hospitales públicos de tamaño medio (300 a 500 camas). La media del número de pruebas de autoanticuerpos/año es de 5.000-10.000, solicitadas fundamentalmente desde los centros de Atención Especializada (65%). El 50% de los laboratorios participantes realiza, al menos, las determinaciones de anticuerpos antinucleares, anticuerpos anti-dsDNA, cribado de antígenos extraíbles del núcleo, valoración de anticuerpos específicos nucleares, anticuerpos antimitocondriales, anticuerpos antimicrosomas de hígado y riñón, anticuerpos anti-músculo liso, anticuerpos anticélulas parietales, anticuerpos antitiroideos y anticuerpos anticardiolipina. Los métodos más utilizados para el análisis de autoanticuerpos son la inmunofluorescencia indirecta y las técnicas de enzimoanálisis del tipo de inmunoadsorción asociada a enzimas. Sólo 37 de estos laboratorios utilizan habitualmente estrategias para optimización de recursos.

Palabras clave: autoanticuerpos, metodología, inmunofluorescencia indirecta, prueba de inmunoadsorción asociada a enzimas.

Summary. Present situation of autoantibody testing in spanish clinical analysis and clinical biochemistry laboratories

The aim of this study is to elucidate the main characteristics of the laboratories of Clinical Analysis and Clinical Biochemistry in which autoantibody tests are carried out. We sent a questionnaire including questions about work center, employees, autoantibodies measured and routine methods, to members of the Spanish Society for Clinical Biochemistry and Molecular Pathology (SEQC). Answers from 57 laboratories were received, most of them from Clinical Analysis laboratories of medium sized National Health Hospitals (300-500 beds), testing 5.000-10.000 autoantibodies per year, mainly sent by Specialised Care. Fifty per cent of participant laboratories tested at least anti-nuclear antibodies, anti-ds-DNA antibodies, extractable nuclear antigens, ENA-specific antibodies, anti-mitochondrial antibodies, anti-liver and kidney microsomal antibodies, anti-smooth muscle antibodies, anti-parietal cells antibodies, anti-thyroid antibodies and anti-cardiolipin antibodies. The most frequent methods for autoantibody determination were indirect immunofluorescence and enzyme methods such as enzyme-linked immunosorbent assay.

Key words: autoantibodies, methodology, indirect immunofluorescence, enzyme-linked immunosorbent assay.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades autoinmunes (sistémicas o específicas de órgano), afectan en su conjunto a un 5% de la población a lo largo de su vida. La medición de autoanticuerpos constituye en la actualidad un área de trabajo fundamental en los laboratorios clínicos. La importancia de estas determinaciones radica tanto en su papel relevante en el diagnóstico, ya que algunos anticuerpos forman parte de los criterios diagnósticos de la

enfermedad, como en la contribución al pronóstico, y en el control evolutivo de las enfermedades autoinmunes (1,5).

Dada la incidencia esperada de enfermedades autoinmunes, la demanda de estas pruebas al laboratorio es muy elevada. (6) y algunos estudios han sugerido la sobreutilización de algunas pruebas como anticuerpos antinucleares y factor reumatoide (7,8). Las pruebas de autoanticuerpos deben ser utilizadas para confirmar los hallazgos de la historia clínica y la exploración física, y en algunos casos para el seguimiento de la actividad

¹Servicio de Análisis Clínicos. Hospital de Móstoles. Madrid.

²Servicio de Análisis Clínicos. Hospital Severo Ochoa. Madrid.

³Servicio de Bioquímica. Hospital Clínico de Salamanca. Salamanca.

⁴Servicio de Análisis Clínicos. Hospital Gral. de Gran Canaria Dr. Negrín. Las Palmas de Gran Canaria.

⁵Servicio de Análisis Clínicos. Mutua de Tarrasa. Barcelona.

⁶Servicio de Análisis Clínicos. Complejo Hospitalario Pontevedra (Hospital Provincial). Pontevedra.

⁷Servicio de Análisis Clínicos. Hospital General y Universitario Morales Meseguer. Murcia.

⁸Servicio de Análisis Clínicos. Hospital Fundación de Alcorcón. Madrid.

⁹Servicio de Análisis Clínicos. Hospital General de Segovia. Segovia.

Abreviaturas no estandarizadas

ANA (Anticuerpos antinucleares), DNA (Anticuerpos antidsDNA), ATA (Anticuerpos antitiroideos), CRIBADO ENA (Anticuerpos frente a antígenos extraíbles del núcleo), AMA (Anticuerpos antimitocondriales), ASMA (Anticuerpos anti-músculo liso), ENA ESPECÍFICOS (Anticuerpos frente a diferentes especificidades de ANA), ACP (Anticuerpos anticélulas parietales), ANTI LKM (Anticuerpos antimicrosoma hepático y renal), aCL (Anticuerpos anticardiolipina), ANCA (Anticuerpos anticitoplasma del neutrófilo), EMA (Anticuerpos antiendomisio), AGA (Anticuerpos antigliadina), ANTI M2 (Anticuerpos antiM2), ANTI MPO/PR3 (Anticuerpos antimieloperoxidasa / Proteína 3), ARA (Anticuerpos antireticulina), ICA (Anticuerpos anticélulas de los islotes pancreáticos).

de la enfermedad. Sin embargo, frecuentemente se solicitan de forma rutinaria, sin una sospecha clínica, lo que justifica su bajo valor predictivo, y que sus resultados no proporcionen la información necesaria para la toma de decisiones clínicas. Esto origina nuevas consultas médicas innecesarias, repetición de pruebas de laboratorio, y puede causar errores diagnósticos e incremento de costes.

Por otro lado, algunas pruebas inmunológicas están disponibles desde hace poco más de 10 años y algunos clínicos no conocen bien sus indicaciones, sensibilidad, especificidad, rentabilidad diagnóstica, coste y utilidad clínica. El conocimiento de las características operativas de las pruebas para cada enfermedad, junto a la valoración secuencial de algunas de ellas, ayudaría a los clínicos a tomar decisiones con criterios de coste-efectividad acerca de las pruebas inmunológicas. (9,10).

En los últimos años se han publicado diferentes guías clínicas o algoritmos diagnósticos, con criterios que ayudan a mejorar el uso de los métodos analíticos para la detección de autoanticuerpos, y el uso apropiado de algunas pruebas inmunológicas (6, 11-13).

La Comisión de Bioquímica de las Enfermedades Inmunológicas de la Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología

Molecular no disponía de ningún tipo de dato acerca de la situación del área de autoinmunidad en los laboratorios españoles. Por este motivo, nos planteamos realizar un primer estudio sobre el tema, con el objetivo de conocer cuáles son las características de esta área de trabajo en los laboratorios de Análisis Clínicos y Bioquímica Clínica. Para ello, se elaboró una encuesta dirigida a profesionales pertenecientes a esta Sociedad (14) siendo éste el primer estudio de estas características realizado en nuestro país.

MATERIAL Y MÉTODOS

En el año 2000 se elaboró un cuestionario, que se remitió por correo a los socios de la SEQC, lo que dada su implantación a nivel nacional nos permitió conseguir una mayor tasa de respuestas. En ese cuestionario se solicitó información acerca de distintas variables como: características del centro hospitalario, catálogo de pruebas de autoinmunidad, índices de actividad asistencial (como número de pruebas informadas/año), procedencia de la demanda analítica, método utilizado habitualmente en la determinación de los autoanticuerpos, dotación de personal en esta área del laboratorio y si se utilizó algún tipo de algoritmo diagnóstico (Ver anexo 1).

Anexo I. Algunas preguntas relevantes seleccionadas del cuestionario

Encuesta sobre análisis de autoanticuerpos en laboratorios españoles			
Número de pruebas de autoanticuerpos/año	<input type="text"/>		
Número de pruebas o porcentaje solicitado desde Atención Primaria	<input type="text"/>		
Número de pruebas o porcentaje solicitado desde Atención Especializada	<input type="text"/>		
Número de pruebas o porcentaje procedente de Hospitalización	<input type="text"/>		
Anticuerpos antinucleares			
Se analizan en el propio laboratorio	SI <input type="checkbox"/>	NO <input type="checkbox"/>	
En caso negativo ¿se remiten a Laboratorio?	Público <input type="checkbox"/>	Privado <input type="checkbox"/>	
En el análisis se aplican técnicas de:			
1. Inmunofluorescencia indirecta ()	4. Técnicas con radioisótopos ()		
2. Enzimoanálisis ()	5. Inmunoprecipitación ()		
3. Inmunoblotting ()	6. Otras ()		
Si aplica más de una técnica, realiza inicialmente 1() 2() 3() 4() 5() 6()			
Si realiza inmunofluorescencia indirecta utiliza como sustrato:			
Células Hep2 ()			
Tejido rata/ratón ()			
Anticuerpos anti-IgA e IgG			
Se analizan en el propio laboratorio	IgG <input type="checkbox"/>	IgA <input type="checkbox"/>	
En caso negativo	SI <input type="checkbox"/>	NO <input type="checkbox"/>	
¿se remiten a Laboratorio de referencia?	Público <input type="checkbox"/>	Privado <input type="checkbox"/>	
En el análisis se aplican técnicas de:			
1. Inmunofluorescencia Indirecta ()	4. Técnicas con radioisótopos ()		
2. Enzimoanálisis ()	5. Inmunoprecipitación ()		
3. Inmunoblotting ()	6. Otras ()		
Protocolos diagnósticos en autoinmunidad			
Realiza protocolos diagnósticos	SI <input type="checkbox"/>	NO <input type="checkbox"/>	
En caso afirmativo afectan a las siguientes pruebas			
Anticuerpos antinucleares, DNA, ENAs ()			
Anticuerpos anticitoplasma de los neutrófilos ()			
Anticuerpos en las enfermedades hepáticas autoinmunes ()			
Anticuerpos en la enfermedad celíaca ()			
Anticuerpos antifosfolípidos ()			

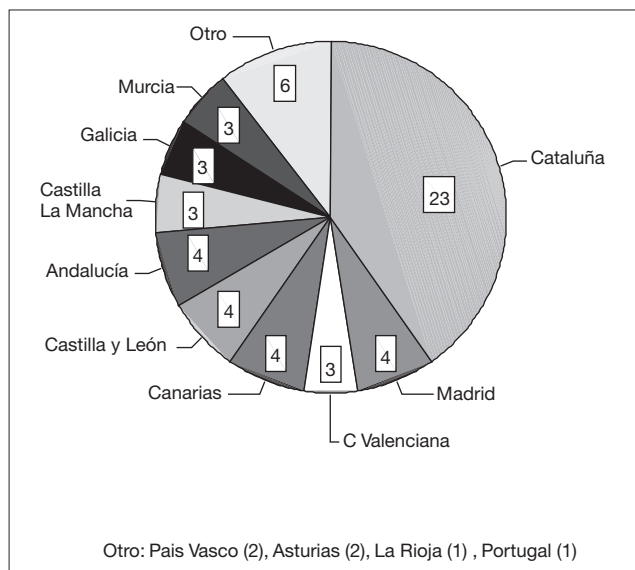


Figura 1 Procedencia de los centros participantes en la encuesta

Estudio Estadístico. Se realizó una depuración de la base de datos, con doble introducción de los mismos. Tras un análisis descriptivo y de la distribución de los datos (prueba de Kolmogorov-Smirnov) se utilizó, según correspondiera, pruebas paramétricas (media, desviación estándar, *t* de student) o no paramétricas (medianas, percentiles, U de ManWitney, Rho de Spearman) para las variables cuantitativas y un estudio de frecuencias para las variables categóricas. El análisis estadístico de los datos se realizó con el paquete estadístico SPSS versión 9.0.

Tabla I. Características generales de los centros participantes en la encuesta

Tabla Ia

Laboratorio Público	Laboratorio Privado	No contestan
n = 47/57 (82,5 %)	n = 4/57 (7%)	n = 6/57 (10,5%)

Tabla Ib

	n (%)	(Min-Máx)	Media	P25	Percentiles P50	P 75
Número de camas	44 (77)	(50-1600)	400	277	365	457
Número pruebas /año	55 (96)	(400-60.000)	9108	1.500	5.574	12.000

Tabla Ic

	n (%)	(Min-Máx)	Media	P25	Percentiles P50	P 75
* CAP	41 (72)	(0-64,5)	24,6	6	15	40
* CAE	35 (61)	(0-90)	60,0	50	65	76
* HOSPITAL	34 (60)	(0-100)	24,6	14	20	29
* ESP. HOSP	39 (68)	(34,5-100)	81,5	80	87	95

n = número de centros que responden * Procedencia de las pruebas en porcentaje: CAP= Centros de Atención Primaria; CAE= Centros de Atención Especializada; HOSPITAL= (Consultas Externas + Pacientes ingresados) ; ESP.HOPS: Especializada + Hospital

RESULTADOS

En la figura 1 se presenta el número de centros que respondieron al cuestionario (57 centros) con representación de casi todas las Comunidades Autónomas. La comunidad con mayor tasa de respuesta fue Cataluña con 23 centros participantes que representan el 40,4% del total. Este hecho se debió posiblemente a que el número de socios de la SEQC en dicha comunidad es mayor que en el resto del país. Las comunidades con menor representación fueron La Rioja, 1 laboratorio (1,8%) y Asturias y País Vasco, ambas con 2 centros, que representan el 3,5%. Un laboratorio de Portugal remitió también la información.

Las características generales de los centros hospitalarios participantes en la encuesta se presentan en la tabla I. La mayoría de los laboratorios pertenecieron a centros públicos (92,2%), siendo escasa la participación de centros privados (7,8%).

El número de camas de estos centros mostró una amplia variación, intervalo de 50-1600, siendo significativamente mayor el número de camas de los hospitales públicos (media =417) que de los privados (media=225). Los laboratorios ubicados en hospitales medios (300 a 500 camas) participaron con mayor frecuencia (55%), que los centros con mas de 600 camas, que lo hicieron de forma limitada (7%) (figura 2).

El número de pruebas solicitadas anualmente al laboratorio de autoinmunidad mostró grandes diferencias entre los laboratorios participantes, siendo el percentil 50 = 5574 (400-60.000) pruebas/año. El 33% de los centros (n=18) realizaban menos de 2.500 pruebas/año, mientras que un 35% de los laboratorios (n=19) analizaban más de 10.000 pruebas/año (figura 3). Los laboratorios públicos analizaban un número ligeramente menor de pruebas/año que los laboratorios privados

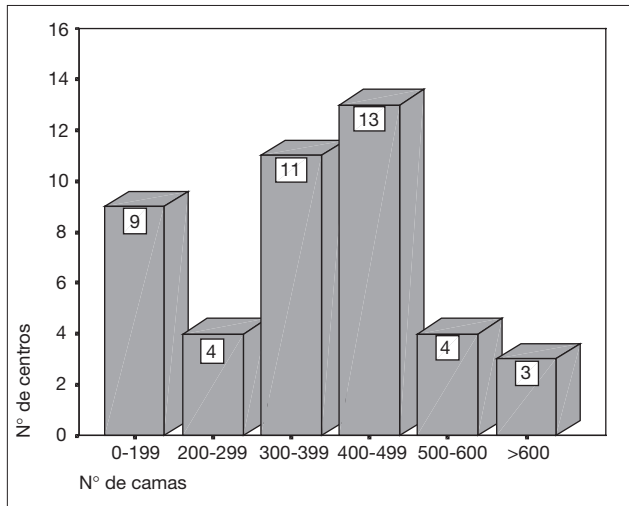


Figura 2 Distribución del número de camas en los hospitales participantes

(percentil 50= 5600 vs 6750). No fue posible analizar si estas diferencias son significativas, debido al escaso número de centros privados participantes, y a la baja tasa de respuesta de alguna de estas variables entre ellos. Se observó una correlación positiva significativa entre el número de pruebas/año y el número de camas del centro (Rho de Spearman = 0,504 $P < 0,01$).

La demanda asistencial procedía en un 65% de los Centros de Atención Especializada, en un 20% del Hospital (consultas externas del hospital y pacientes ingresados), y el 15% de los Centros de Atención Primaria (CAP) (tabla I). (Estos valores corresponden a la mediana de los centros analizados).

Los laboratorios de Cataluña representaron el 40,4% de los centros participantes. Al comparar sus características con las de los laboratorios de otras Comunidades Autónomas, no se observaron diferencias significativas en cuanto al número de camas de los hospitales participantes, ni en el número de pruebas analizadas anualmente.

En la encuesta participaron fundamentalmente laboratorios de Análisis Clínicos (77,2%) (figura 4), siendo la titulación académica del especialista responsable del área de autoinmu-

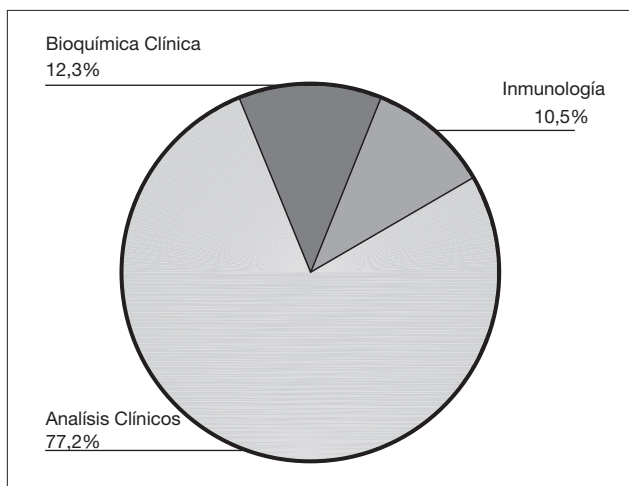


Figura 4 Tipo de laboratorio participante

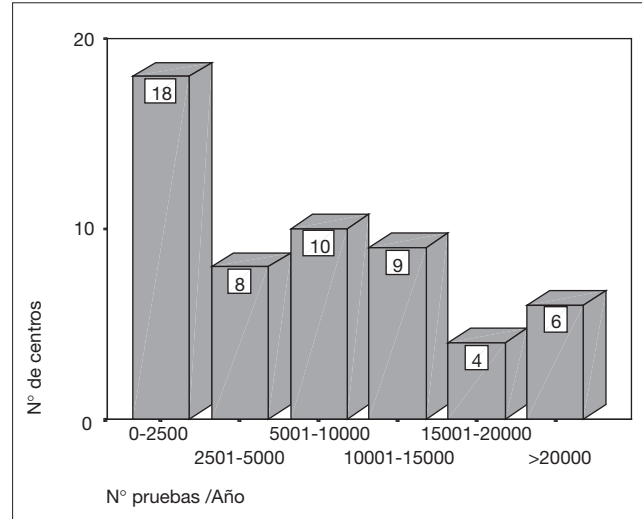


Figura 3 Distribución de los laboratorios participantes, según el número de pruebas/año en el área de autoinmunidad

nidad más frecuente, licenciados en Medicina (38,6%) o Farmacia (38,6%), y la especialidad clínica mayoritaria, entre ellos, la de Análisis Clínicos, 61,4%. (figuras 5 y 6).

Los recursos humanos de los que disponían las áreas de autoinmunidad, oscilaban en los distintos laboratorios entre 0,5-5 sanitarios (tabla II). En su mayoría la plantilla estaba constituida por un Facultativo (percentil 50 = 1) y un Técnico Especialista en Laboratorio (percentil 50=1). En el 28% de los laboratorios de autoinmunidad trabajan Ayudantes Técnicos Sanitarios o Diplomados Universitarios en Enfermería, y sólo en un 7% de ellos trabajan auxiliares de clínica. Se observó una correlación positiva entre la dotación de personal y el número de pruebas/año (Rho=0,522 $P < 0,001$).

En la tabla III se representa la frecuencia de los laboratorios que determinaban los distintos autoanticuerpos, o en su defecto el laboratorio externo donde se remitían dichas pruebas. En el 95% de los laboratorios consultados se realizaba la medición de los anticuerpos antinucleares, los anticuerpos antids-DNA se determinaban en el 78,2% y los anticuerpos antitiroideos en el 77% de ellos. Los anticuerpos frente a antígenos extrañales del núcleo se realizaban en el 75,6% y los anticuerpos frente a diferentes especificidades de anticuerpos antinucleares los determinaban el 63,5% de los centros encuestados.

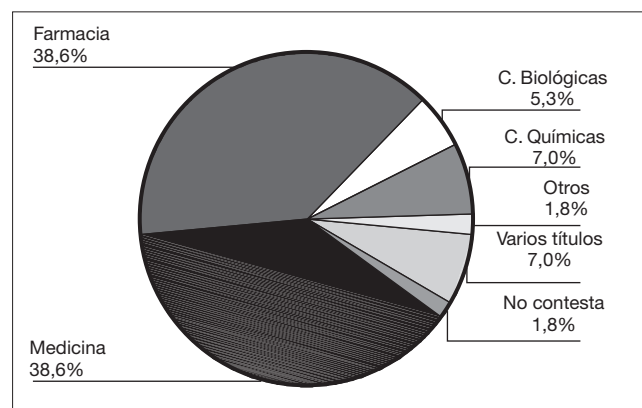


Figura 5 Título académico del facultativo responsable del área de autoinmunidad

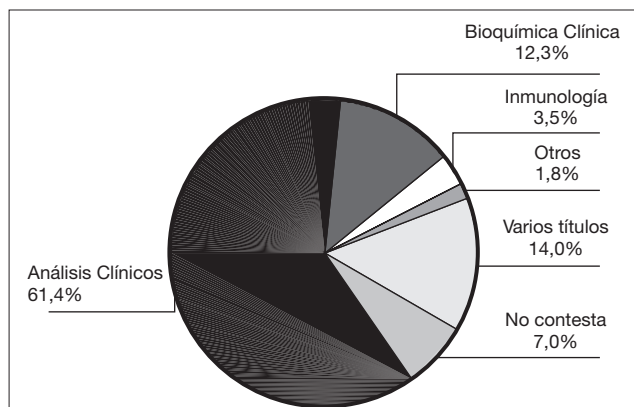


Figura 6 Especialidad clínica del facultativo responsable

Tabla II. Recursos humanos implicados en los estudios de autoinmunidad

Personal	Respuestas (%)	Mediana (P 50)	(Min-Máx)
FACULTATIVOS	38 (67)	1	0-3
TEL	24 (42)	1	0-2
ATS/DUE	16 (28)	0,5	0-3
AUXILIARES	4 (7)	0	0-1
PS	36 (63)	1	0-3
PT	38 (67)	2	0,4-5

TEL: Técnico Especialista de Laboratorio; ATS: Ayudante Técnico Sanitario; PS: Personal Sanitario; PT: Personal total (Incluido Facultativos)

Los anticuerpos antimitocondriales, anticuerpos antimusculo liso y anticuerpos anticélulas parietales se determinaban en el 71,4%, 67,3% y 62,0% respectivamente y en menor propor-

Tabla III. Tipo de laboratorios donde se realizan pruebas de autoinmunidad

Autoanticuerpo	Realizados en el propio centro (%)	Laboratorios externos*	
		Público (%)	Privado (%)
ANA	94,6	—	100
DNA	78,2	61,5	38,5
ATA	77,0	77	23
CRIBADO ENA	75,6	71	29
AMA	71,4	50	50
ASMA	67,3	47,0	53,0
ENA ESPECIFICOS	63,5	59,0	41,0
A CP	62,0	42,0	58,0
ANTI LKM	57,4	43,0	57,0
aCL	50,0	43,0	57,0
ANCA	40,7	55,2	44,8
EMA	40,0	47,0	53,0
AGA	39,0	48,0	52,0
ANTI M2	31,0	52,0	48,0
ANTI MPO/PR3	27,3	57,1	42,9
ARA	30,0	47,0	53,0
ICA	13,0	46,0	54,0

* Laboratorio externo donde se remiten las pruebas no realizadas en el propio centro.

ANA (Anticuerpos antinucleares), DNA (Anticuerpos antidsDNA), ATA (Anticuerpos antitiroideos), CRIBADO ENA (Anticuerpos frente a antígenos extraíbles del núcleo), AMA (Anticuerpos antimitocondriales), ASMA (Anticuerpos antimusculo liso), ENA ESPECIFICOS (Anticuerpos frente a diferentes especificidades de ANA), ACP (Anticuerpos anticélulas parietales), ANTI LKM (Anticuerpos antimicrosoma hepático y renal), aCL (Anticuerpos anticardiolipina), ANCA (Anticuerpos anticito-plasma del neutrófilo), EMA (Anticuerpos antiendomiso), AGA (Anticuerpos antigliadina), ANTI M2 (Anticuerpos antiM2), ANTI MPO/PR3 (Anticuerpos antimieloperoxidasa / Proteinasa 3), ARA (Anticuerpos antireticulina), ICA (Anticuerpos anticélulas de los islotes pancreáticos).

ción se determinaban los anticuerpos antimicrosoma hepático y renal (57,4%), mientras que sólo la mitad de los centros realizaban la determinación de anticuerpos anticardiolipina.

Menos de la mitad de los laboratorios participantes (40,7%) realizaban los anticuerpos contra el citoplasma de los neutrófilos, mientras que la determinación de los anticuerpos contra las proteínas específicas, mieloperoxidasa y proteinasa 3 tan sólo la realizaban en el 27,3% de ellos.

Los anticuerpos contra endomiso se determinaban en el 40% de laboratorios, los anticuerpos contra la gliadina en el 39% y los anticuerpos contra la reticulina en un 30% de ellos, mientras que los anticuerpos contra los islotes del páncreas sólo se valoraban en el 13% de los laboratorios encuestados.

Igualmente se solicitó información acerca del laboratorio externo donde se remitían las pruebas que no se realizaban en el propio laboratorio. Estas fueron enviadas en porcentajes similares a centros públicos y privados para su medición (tabla III).

En cuanto al método empleado habitualmente en la determinación de autoanticuerpos (tabla IV), se observó que la inmunofluorescencia indirecta, fue el método más utilizado por los laboratorios para el análisis de anticuerpos antinucleares (62,3%), anticuerpos antidsDNA (56,5%), anticuerpos contra el citoplasma de los neutrófilos (57%), anticuerpos antimitocondriales (86%), anticuerpos antimusculo hepático y renal (85%) y anticuerpos contra endomiso (88,5%). Los anticuerpos antimusculo liso, anticuerpos anticélulas parietales, anticuerpos contra la reticulina y anticuerpos contra los islotes del páncreas se determinaban en todos los laboratorios sólo por inmunofluorescencia indirecta (100%).

Los métodos de inmunoadsorción asociada a enzimas (ELISA) son los más frecuentemente utilizados en los anticuerpos frente a antígenos extraíbles del núcleo (61%), anticuerpos antimieloperoxidasa/proteinasa 3 (67%), anticuerpos frente a diferentes especificidades de anticuerpos antinuclea-

res (51,4%), anticuerpos anti-M2 (58%), anticuerpos antitiroideos (82,5%), anticuerpos contra la gliadina (65,2%) y en el 100% de los laboratorios para valoración de anticuerpos anticardiolipina.

La información obtenida no permitió conocer si el 3,8% de los laboratorios que afirmaban determinar los anticuerpos contra endomisio mediante ELISA se referían a que utilizaban en realidad anticuerpos frente a la transglutaminasa tisular, aunque sería lógico pensarlo así, ya que no existía en el cuestionario una variable específica para este autoanticuerpo, de reciente implantación en algunos laboratorios.

Según el tipo de autoanticuerpos analizado, el 10-40% de los laboratorios utilizaban de forma secuencial diferentes métodos para su análisis, ya sea como pruebas de cribado o de confirmación. La inmunofluorescencia indirecta y los métodos ELISA fueron utilizados conjuntamente para la medición de los anticuerpos antinucleares por el 26,4% de los laboratorios, para los anticuerpos antidsDNA (30,4%), los anticuerpos contra el citoplasma de los neutrófilos (39,3%) y anticuerpos antimieloperoxidasa/proteinasa 3 (19%).

Respecto a la terminología de los anticuerpos contra el citoplasma de los neutrófilos, se recomendaba informar como anticuerpos contra el citoplasma de los neutrófilos aquellos anticuerpos determinados por inmunofluorescencia indirecta, y como los anticuerpos antimieloperoxidasa/proteinasa 3 para los anticuerpos contra el citoplasma de los neutrófilos con especificidad frente a las proteínas específicas determinadas por ELISA (12). Por ello, sorprendió la respuesta del 3,6% de los laboratorios, que utilizaban ELISA para la valoración de anticuerpos contra el citoplasma de los neutrófilos y del 14,3% de ellos que valoraban los anticuerpos antimieloperoxidasa/proteinasa 3 por inmunofluorescencia indirecta.

La combinación de los métodos de ELISA e *immunoblotting* fue la elegida por el 12% de los laboratorios para los anticuerpos frente a antígenos extraíbles del núcleo, y por el 16,2% para la medición de anticuerpos anticuerpos frente a diferentes especificidades de anticuerpos antinucleares. Un 24,1% de los laboratorios utilizaban otras combinaciones de diferentes métodos en los anticuerpos frente a antígenos extraíbles del núcleo y un 20,9% en la valoración de anticuerpos frente a diferentes especificidades de anticuerpos antinucleares (tabla IV).

Otras metodologías como la contrainmunolectroforesis, la inmunoprecipitación o RIA fueron utilizadas, ya sea como método único o en combinación con otros, por un menor porcentaje de laboratorios.

Cuando se utilizaba de forma secuencial más de un método en el estudio de autoanticuerpos, la técnica de ELISA se realizaba previamente a la de inmunofluorescencia indirecta para el análisis de anticuerpos antinucleares en el 87,5% de los laboratorios, en el 71,4% en el estudio de anticuerpos antidsDNA, y el 55,6 % realizaba una técnica de escrutinio mediante ELISA previa a la valoración de cada uno de los anticuerpos anticuerpos frente a diferentes especificidades de anticuerpos antinucleares. Sin embargo, un 22% de los laboratorios realizaba previamente a la determinación de cada uno de los anticuerpos frente a antígenos extraíbles del núcleo por ELISA, un cribado de los mismos mediante la determinación de anticuerpos antinucleares por inmunofluorescencia indirecta.

El método utilizado en primer lugar para valoración de los anticuerpos contra el citoplasma de los neutrófilos (100%) y de los anticuerpos antimicrosoma hepático y renal (100%) fue la inmunofluorescencia indirecta. Respecto a la determinación

del subtipo M2 de los anticuerpos antimitocondriales, el 75% de los laboratorios contestó de forma llamativa que lo determinaban mediante inmunofluorescencia indirecta, y tan sólo una cuarta parte de ellos confirmaba o analizaba el resultado por ELISA (tabla V).

En la valoración de anticuerpos por inmunofluorescencia indirecta se utilizaban diversos sustratos. La determinación de los anticuerpos antinucleares se realizaba mayoritariamente sobre líneas de células Hep-2, (91,3%) y los sustratos de rata/ratón no se utilizaban ya de manera habitual, sino acompañando a las células Hep-2. El esófago de mono fue el sustrato más utilizado por los laboratorios (78,6%) para la determinación de los anticuerpos contra endomisio, y el páncreas de mono (71,4%) para los anticuerpos contra los islotes del páncreas. El uso del cordón umbilical para anticuerpos contra endomisio y de páncreas humano para anticuerpos contra los islotes del páncreas fue minoritario (tabla VI).

Respecto al fijador utilizado en la determinación de los anticuerpos contra el citoplasma de los neutrófilos por inmunofluorescencia indirecta, el 12% de los laboratorios encuestados utilizaba únicamente las preparaciones de neutrófilos fijadas en etanol, mientras que los restantes laboratorios empleaban diferentes combinaciones de fijación de los neutrófilos, siendo la combinación más frecuente la de etanol-formalina (53%), seguida de la combinación de etanol-formalina-metanol (29%) y tan sólo el 6% utilizaba preparaciones de neutrófilos fijados en etanol y metanol (tabla VII).

Cuando se valoraron autoanticuerpos como anticuerpos anticardiolipina y anticuerpos contra la gliadina, en los que se determinaba más de un isotipo, la combinación que se estudiaba con más frecuencia para los anticuerpos anticardiolipina fue IgG/IgM (66,7%), mientras que el 27,8 % analizaba los tres isotipos conjuntamente y tan sólo un 3% determinaba sólo el isotipo IgG. Es curiosa la combinación que se realizaba en un 2,8% de laboratorios que incluía los isotipos IgG/IgA y no determinaban el isotipo IgM. Respecto a los anticuerpos contra la gliadina, la combinación IgG/IgA se analizaba en el 85% de los laboratorios, un 11% realizaba únicamente la determinación del isotipo IgA, y el 7,5% el isotipo IgG (tabla VIII).

A la pregunta de si se utilizaba algún tipo de algoritmo o estrategia para el diagnóstico, el 65,3% de los laboratorios participantes contestó afirmativamente, pero sólo el 44% de ellos utilizaba estos protocolos en el propio centro. De ellos, el 40% utilizaba al menos un algoritmo, que generalmente se refería al estudio de las enfermedades del tejido conectivo, y que incluía anticuerpos antinucleares, o anticuerpos antidsDNA, o anticuerpos frente a antígenos extraíbles del núcleo. Aproximadamente el 20% de los laboratorios utilizaba más de un protocolo, referidos al estudio de la enfermedad hepática autoinmune, (que incluía los anticuerpos antimusculo liso, anticuerpos antimitocondriales y anticuerpos antimicrosoma hepático y renal), vasculitis (estudios de anticuerpos anticitoplasmáticos y sus proteínas específicas), enfermedad celíaca (que incluía anticuerpos contra endomisio, anticuerpos contra la gliadina, anticuerpos contra la reticulina, transglutaminasa tisular) y síndrome antifosfolípido que incluía anticuerpos anticardiolipina y otros antifosfolípidos (tabla IX).

DISCUSIÓN

Los laboratorios participantes en este cuestionario han sido Servicios de Análisis Clínicos o Bioquímica Clínica, que rea-

Tabla IV. Metodología utilizada en el estudio de autoanticuerpos**Tabla IVa**

ANTICUERPO	n (%)	IFI (%)	ELISA (%)	IFI + ELISA (%)	OTROS (%)
ANA	53 (93)	62,3	7,5	26,4	3,8*
DNA	46 (81)	56,5	8,7	30,4	4,4**
ANCA	28 (49)	57,0	3,6	39,3	ND
ANTI MPO/PR3	21 (37)	14,3	66,7	19,0	ND

OTROS* = ((IFI) Inmunofluorescencia + (ELISA) Inmunoadsorción asociada a enzimas + (IB) Inmunoblotting) o (IFI + IB); OTROS** = RIA o (IFI + ELISA + IB); ND= No datos, ANA (Anticuerpos antinucleares), DNA (Anticuerpos antiDNA), ANCA (Anticuerpos anticitoplasma del neutrófilo), ANTI MPO/PR3 (Anticuerpos antimieloperoxidasa / Proteínasa 3)

Tabla IVb

ANTICUERPO	n (%)	IFI (%)	ELISA (%)	IB (%)	ELISA+ IB (%)	OTROS (%)
CRIBADO ENA	33 (58)	3	60,6	3	12	24,1
ENA ESPECIFICOS	37 (65)	ND	51,4	13,5	16,2	20,9

OTROS: IP (Inmunoprecipitación), CIE (Contrainmunolectroforesis), (IFI + ELISA), (IFI, ELISA, IB), (IB + IP). ND= No datos. CRIBADO ENA (Anticuerpos frente a antígenos extraíbles del núcleo), ENA ESPECIFICOS (Anticuerpos frente a diferentes especificidades de ANA)

Tabla IVc

ANTICUERPO	n (%)	IFI (%)	ELISA (%)	IFI + ELISA (%)	OTROS (%)
AMA	42 (74)	86	7	4,8	2,4
ANTI M2	19 (33)	15,8	58	10,5	15,9
ANTI LKM	33 (58)	85	ND	3	12,1
ASMA	39 (68)	100	ND	ND	ND
ACP	35 (61)	100	ND	ND	ND
ARA	36 (63)	100	ND	ND	ND

OTROS: Uno de los siguientes (IFI + IB), o IP; ND= No datos. AMA (Anticuerpos antimitocondriales), ANTI M2 (Anticuerpos antiM2), ANTI LKM (Anticuerpos antimicrosoma hepático y renal), ASMA (Anticuerpos antimusculo liso), ACP (Anticuerpos anticélulas parietales), ARA (Anticuerpos antireticulina).

Tabla IVd

ANTICUERPO	n (%)	IFI (%)	ELISA (%)	RIA (%)	OTRAS (%)	IFI + ELISA (%)
ATA	40 (70)	2,5	82,5	7,5	7,5	ND
aCL	27 (47)	ND	100	ND	ND	ND
EMA	26 (46)	88,5	3,8	ND	ND	7,7 *
AGA	23 (40)	21,7	65,2	ND	4,3	8,7
ICA	9 (16)	100	ND	ND	ND	ND

n= número de centros que responden; ND = no datos. ATA (Anticuerpos antitiroideos), aCL (Anticuerpos anticardiolipina), EMA (Anticuerpos antiendomiso), AGA (Anticuerpos antigliadina), ICA (Anticuerpos anticélulas de los islotes pancreáticos).

lizan pruebas de autoinmunidad y son socios de la SEQC. Los resultados representarían, por tanto, a este grupo de laboratorios. No disponemos de datos para estimar la participación en este cuestionario. No obstante, tomando como referencia los 45 laboratorios inscritos en el año 2001, en el Programa Externo de Control de Calidad de Autoinmunidad de la SEQC, podríamos deducir que la tasa de respuesta ha sido elevada.

Los centros participantes se han caracterizado por ser hospitales con un número de camas medio (500), de carácter público y con una cartera de procedimientos diagnósticos muy similar en el 50% de ellos.

Aunque la demanda de pruebas procede lógicamente en su mayoría de los Centros de Atención Especializada y de la Hospitalización, el 15% de las pruebas solicitadas procede de los Centros de Atención Primaria, y en algunos casos este porcentaje representa más del 50% del total. Con el objetivo de optimizar recursos se han propuesto incluir en los protocolos de atención primaria, recomendaciones sobre la utilización de pruebas diagnósticas, como los autoanticuerpos, de forma limitada para algunos de ellos (15).

Los métodos de inmunofluorescencia indirecta y de ELISA son los más ampliamente utilizados por los laboratorios participantes en la valoración de autoanticuerpos. Sin embargo, los

Tabla V. Técnica utilizada en primer lugar para la determinación de anticuerpos, cuando se usa más de un método

TÉCNICA	n (%)	ELISA (%)	IFI (%)	IP (%)
ANA	16 (28)	87,5	12,5	ND
DNA	14 (25)	71,4	28,6	ND
ANCA	7 (12)	ND	100	ND
CRIBADO ENA	9 (16)	55,6	22,2	22,2
ANTI- M2	4 (7)	25	75	ND
ANTI- LKM	4 (7)	ND	100	ND

n = número de laboratorios de que contestan; ND = no datos; IP: Inmunoprecipitación. ANA (Anticuerpos antinucleares), DNA (Anticuerpos antidsDNA), ANCA (Anticuerpos anticitoplasma del neutrófilo), CRIBADO ENA (Anticuerpos frente a antígenos extraíbles del núcleo), ANTI M2 (Anticuerpos antiM2), ANTI LKM (Anticuerpos antimicrosoma hepático y renal).

Tabla VI. Sustratos utilizados en las técnicas de inmunofluorescencia indirecta

ANTICUERPO	n (%)	Substrato 1 (%)	Substrato 2 (%)	Substrato 3 (%)
ANA	42 (74)	91,3	ND	8,7
EMA	14 (25)	78,6	21,4	ND
ICA	7 (12)	28,6	71,4	ND

n= número de laboratorios que contesta; ND = no datos; ANA (Anticuerpos antinucleares) – IFI: 1. - Hep-2, 2. - Rata/Ratón, 3. - Ambos. EMA (Anticuerpos antiendomisio) IFI: 1. - Esófago mono, 2. - Cordón umbilical, ICA (Anticuerpos anticélulas de los islotes pancreáticos) : 1. - Páncreas humano, 2. - Páncreas de mono.

Tabla VII. Fijador utilizado para la determinación de anticuerpos anticitoplasma del neutrófilo

n (%)	ETANOL (%)	ETANOL y FORMALINA (%)	ETANOL, FORMALINA y METANOL (%)	ETANOL y METANOL (%)
17 (30)	2/17 (11,8)	9/17 (53,0)	5/17 (29,4)	1/17 (5,9)

n = número de laboratorios que contesta.

Tabla VIII. Isotipo analizado en determinados anticuerpos

ANTICUERPO	n (%)	IgG (%)	IgA (%)	IgG e IgA (%)	IgG e IgM (%)	IgG, IgA, IgM (%)
aCL	36 (63)	2,8	ND	2,8	66,7	27,8
AGA	39 (68)	7,5	11,1	85	ND	ND

n = número de laboratorios que contesta; ND = no datos, aCL (Anticuerpos anticardiolipina), AGA (Anticuerpos antigliadina)

métodos de ELISA no han desplazado la determinación de anticuerpos antinucleares, y anticuerpos antidsDNA por inmunofluorescencia indirecta, que sigue siendo la técnica mayoritariamente utilizada por los laboratorios participantes. En los centros que utilizaban ambos métodos (ELISA e inmunofluorescencia indirecta), se realizaba previamente una valoración para el cribado de autoanticuerpos por ELISA y cuando así se requería, se realizaba la confirmación de resultados por inmunofluorescencia indirecta, u otras metodologías.

Es importante reseñar que la valoración del subtipo M2 de los anticuerpos antimitocondriales, debe realizarse por otra técnica complementaria, y no por inmunofluorescencia indirecta, como señalaron el 75% de los participantes. Sin embargo, sólo una cuarta parte de los laboratorios analiza-

ba el resultado por ELISA. Estos resultados podrían explicarse, si los laboratorios que utilizaban la inmunofluorescencia indirecta, se referían a esta técnica para informar de la presencia de un patrón citoplasmático compatible con el subtipo M2.

Algunos laboratorios utilizaban, en la determinación de anticuerpos contra el citoplasma de los neutrófilos, sustratos de neutrófilos fijados con etanol. Si se utilizan únicamente estos portas, no es posible confirmar el patrón perinuclear (p-ANCA), al no poder evidenciar el paso de patrón perinuclear a citoplasmático sobre neutrófilos fijados en formol. En este caso, deberían determinarse los anticuerpos frente a las proteínas específicas, anticuerpos antimieloperoxidasa/proteinasa 3 por ELISA (12).

Tabla IX. Laboratorios que utilizan algoritmos en el estudio de autoanticuerpos**Tabla IXa**

	n (%)	SÍ (%)	NO (%)	NO CONTESTAN
Utilizan algoritmos	49 (86)	32 (65,3)	17 (34,7)	8 (14,0)

Tabla IXb

n* (%)	Número de Protocolos	n (%)	Pruebas
25 (44%)	1	10 (40)	ANA / DNA / ENA
	2	5 (20)	Varios **
	3	5 (20)	Varios **
	> 3	5 (20)	Varios **

n = número de laboratorios que contesta; n* = número de laboratorios que realizan protocolos de trabajo en el mismo centro; **Varios: (Vasculitis / autoanticuerpos en enfermedad hepática autoinmunitaria / marcadores de enfermedad celiaca / marcadores de síndrome antifosfolípido).

ANA (Anticuerpos antinucleares), DNA (Anticuerpos antiDNA), ENA (Anticuerpos frente a antígenos extraíbles del núcleo).

Una posible justificación a que un 7,5% de los participantes haya valorado únicamente el isotipo IgG de anticuerpos contra la gliadina, sería que estos laboratorios utilizaran como marcadores de enfermedad celiaca anticuerpos isotipo IgA frente a transglutaminasa tisular o anticuerpos contra endomisio. Sólo en los pacientes con déficit de IgA se realizaría la valoración de anticuerpos frente a gliadina, que en este caso deben ser isotipo IgG.

Las pruebas que no se realizaban en el propio laboratorio eran enviadas en una proporción considerable, aproximadamente el 50%, a laboratorios externos de carácter privado en lugar de remitirlos a su centro público de referencia o al centro público más próximo. No conocemos si este desvío está motivado por problemas de costes, geográficos (al no existir un laboratorio de referencia público cercano), o por falta de canales adecuados para su envío a dichos centros públicos.

Aunque la utilización de algoritmos por los laboratorios contribuye a conseguir una adecuada relación coste-efectividad de las pruebas y una mayor colaboración entre el clínico y el laboratorio (16), sólo 32 de los 57 centros participantes en este estudio utilizaban en su trabajo habitual al menos un algoritmo diagnóstico, mientras que 17 centros no utilizaban ningún tipo de protocolo de trabajo y sólo 15 laboratorios utilizaban dos o más (tabla IX).

La alta rentabilidad diagnóstica de la determinación de algunos autoanticuerpos, en la actualidad es imprescindible para el manejo clínico del paciente, y el incremento constante de la demanda de pruebas inmunológicas, nos obliga a introducir estrategias para su racionalización, procurando el uso apropiado de estas pruebas (17). La utilización de las guías clínicas actualmente disponibles (11-13) permite poner en marcha recomendaciones, que proporcionan respuestas apropiadas a las situaciones clínicas habituales, de forma suficiente y eficiente, permitiendo excepciones cuando se justifiquen por la clínica.

Los datos del cuestionario analizados en este estudio sin duda han variado en estos años. Los avances en inmunquímica, las recientes expectativas abiertas con la semiautomatización de la inmunofluorescencia indirecta, la mejora de la calidad de los métodos de ELISA y la posibilidad de automatización de los mismos son algunas de las variables que afec-

tarán a la organización de los laboratorios de autoinmunidad en el futuro.

CONCLUSIONES

Nuestro objetivo era conocer la situación actual de los laboratorios de autoinmunidad, y comunicar estos resultados a los profesionales interesados en el tema, iniciando con ello una cultura de colaboración entre los centros que realizan el estudio de autoanticuerpos.

En este primer estudio que realiza esta Comisión, hemos podido observar que el cuestionario tenía ciertas limitaciones. Por ello, nos proponemos seguir analizando la evolución de los laboratorios clínicos en esta área de trabajo, y conocer aspectos más específicos que nos permitan valorar el uso apropiado de estas pruebas en nuestro medio.

Desde esta Comisión nos proponemos animar a profesionales del laboratorio y a los clínicos a utilizar estrategias o protocolos de trabajo y a participar en las modificaciones de los mismos que la evolución técnica o científica aconseje.

AGRADECIMIENTOS

Balague Center, Hospitalet de Llobregat (Barcelona)(Dra. Gardón Rebes); Cap Dr. Robert, Badalona (Dra. Aluma); Cap Just Oliveres. Laboratori Clínic, Hospitalet de Llobregat (Dra. Fernández Gómez); Centro Médico Estraunza, Bilbao (Dr. Larrea Omes); Fundació Puigvert, Barcelona (Dr. Oliver); Hospital Arnau de Vilanova, Lleida (Dra. Pérez Remon); Hospital Central de Asturias (Dra. Fernández Coto); Hospital Clínico Universitario, Valencia (Dra. Mery Rams); Hospital Cristal Pinor (Dra. Bugueiro de Frutos); Hospital de la Candelaria, Tenerife (Dra. Almeida González); Hospital de Móstoles, Madrid (Dra. Llórente Alonso); Hospital de Sant Pau y Santa Tecla, Tarragona (Dr. Sabate); Hospital de Terrassa, Barcelona (Dra. Alegre); Hospital de Valls, Tarragona (Dra. Martínez Verdura); Hospital General Básico, Málaga (Dra. Molina Mendoza); Hospital General de Elda, Alicante (Dra. Valero Adon); Hospital General de Granollers, Barcelona (Dra. Villa Blasco); Hospital General de Manresa, Barcelona (Dr. Trapé); Hospital General de Soria (Dra. Muñoz González); Hospital General y Universitario de Alicante (Dra. Espasa y Dra. Chinchilla);

Hospital Infanta Elena, Huelva (Dr. De la Iglesia Sal), Hospital Insular de Gran Canaria (Dra. Lamas); Hospital Joan XXIII, Tarragona (Dra. Pastor Barelles); Hospital La Mancha-Centro, Ciudad Real (Dra. Ruiz Martín); Hospital Morales Messeguer, Murcia (Dra. Arcas García); Hospital Mútua de Terrassa, Barcelona (Dra. Alsina Donadeu); Hospital Nuestra Sra. de Sonsoles, Ávila (Dra. Carretero Casimiro); Hospital de Gran Canaria Dr Negrín, Las Palmas de Gran Canaria (Dra. Alarcón Torres); Hospital Nuestra Sra. del Prado, Toledo (Dra. Gómez Chacón); Hospital Príncipe de Asturias, Alcalá de Henares (Madrid) (Dra. Palafox Gamir); Hospital Provincial, Pontevedra (Dra. González García); Hospital Rafael Méndez, Murcia (Dr. García Villanova); Hospital Río Ortega, Valladolid (Dra. Mazán Ramos); Hospital San Agustín, Avilés (Asturias) (Dr. Venta Olava); Hospital San Millán-San Pedro, Logroño (Dr. Iguaz Pascual); Hospital Severo Ochoa, Leganes (Madrid) (Dra. Jiménez Jiménez); Hospital Sousa Martins, Portugal (Dr. Manuel Tavares); Hospital Teresa Herrera, La Coruña (Dra. Sánchez Mozo); Hospital Txagorritzu, Alava (Dra. Preciado San Miguel); Hospital Universitari Sant Joan, Tarragona (Dr. Simó); Hospital Universitario de Getafe (Madrid) (Dr. Bergón Jiménez); Hospital Universitario de Salamanca (Dra. González); Hospital Universitari Josep Trueta, Girona (Dra. Cabrero Oliván); Hospital Materno-Infantil, Las Palmas de Gran Canaria (Dra. Quintana Martín); Hospital Virgen de la Salud, Toledo (Dra. Serrano de la Cruz); Laboratori Clínic Intercomarcal, Vilafranca (Barcelona) (Dra. Simón Palmada); Laboratorio Dras Zaragoza S.L.; Centro Médico Delfos, Barcelona (Dr. Zaragoza Montpel); Mútua de Terrassa, Barcelona (Dr. Nadal Riutort); Unilabs Centro Médico Sant Jordi, Barcelona (Dra. Solé Ribas)

Correspondencia:
M. I. Alarcón Torres
Servicio de Análisis Clínicos
Hospital Gral. de Gran Canaria
Dr. Negrín
C/ Barranco de la Ballena s/n
35020 Las Palmas de Gran Canaria
correo electrónico:
ialator@gobiernodecanarias.org

BIBLIOGRAFIA

- Miles J, Charles P, Riches P. A review of methods available for the identification of both organ-specific and non-organ-specific autoantibodies. *Ann Clin Biochem* 1998; 35:19-47.
- Viñas O. Enfermedades Autoinmunes Sistémicas. En: Font J, Cervera R, Ingelmo M. eds. *Papel del Laboratorio de Inmunología: Laboratorios Menarini S.A. Barcelona: MRA SL* 1998. p. 25-78.
- Peter JB, Shoenfeld Y. *Autoantibodies*. New York: Elsevier; 1996.
- Lahita RG, Chiorazzi N, Reeves WH. *Textbook of the autoimmune diseases*. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2000.
- Bombardieri S, Caponi L, Arenal WP. A unified list of acronymus for the rheumatology literature. *Arthritis and Rheumatism* 1998; 41:1901-5.
- Guidelines and Protocols Advisory Committee: British Columbia Medical Association. www.health.gov.bc.ca/msp/.
- Lane SK, Gravel JW. Clinical Utility of Common Serum Rheumatologic test. *Am Fam Physician* 2002; 65:1073-80.
- Suarez ME, Gonzalez L, Gamez-Nava JL, Belseck E, Kendall CJ, Davis P. Utilization and predictive value of laboratory test in patients referred to rheumatologists by primary care physicians. *J Rheumatol* 1998; 25:1980-5.
- Grob PJ, Joller-Jemelka HI, Scheitlin T, Dubs RW. Cost-benefit relationship of serologic studies in autoimmune disease. *Ther Umsch* 1993; 50:77-87.
- Calabrese LH. Diagnosis of systemic lupus erythematosus. The value of immunologic tests. *Postgrad Med* 1984; 75:103-5, 108-12.
- Kavanaugh A, Tomar R, Reveille J, Solomon DH, Homburguer HA. Guidelines for clinical use of antinuclear antibody test and tests for specific autoantibodies to nuclear antigens. *American College of Pathologists. Arch Pathol Lab Med* 2000; 124:71-81.
- Savige J, Gillis D, Benson E, Davies D, Esnault V, Falk R et al. International consensus statement on testing and reporting of antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA). *Am J Clin Pathol* 1999; 111: 507-13.
- Tozzoli R, Bizzaro N, Tonutti E, Villalta D, Bassetti D, Manoni F et al. Guidelines for the laboratory use of autoantibody tests in the diagnosis and monitoring of autoimmune rheumatic diseases. *Am J Clin Pathol* 2002; 117: 316-24.
- Dot D, Galan A, Guillen E, Huguet J, Marin JL, Noguera A. Encuesta sobre el estado de los laboratorios de urgencias en España. *Química Clínica* 2000; 19:204-13.
- Santaló Lluch M. y cols. *Protocolos analíticos en atención primaria*. Institut Català de la Salut. Comité de Publicaciones de la Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular. 1998.
- Plebani M. The clinical importance of laboratory reasoning. *Clin Chim Acta* 1999; 280:35-45.
- Rodríguez J, Comisión de Hormonas de la Sociedad Española de Química Clínica y Patología Molecular. Uso de las pruebas de función tiroidea en los laboratorios clínicos de la red sanitaria pública de Cataluña. *Química Clínica* 2002; 21:254-261