

Manejo Práctico de Pruebas Inmunológicas en Autoinmunidad

Morella Bouchard
IDIC-ULA
2015

Medicina Basada en Evidencias

- Sensibilidad
- Especificidad
- Valor Predictivo Positivo
- Valor Predictivo Negativo
- *Likelihood ratio* positivo o negativo
- Probabilidad pretest y posttest



- **SENSIBILIDAD**

Probabilidad que una persona enferma tenga un resultado positivo

- **ESPECIFICIDAD**

Probabilidad que una persona sana tenga un resultado negativo



VALOR PREDICTIVO POSITIVO

- Depende de la especificidad
- Probabilidad de padecer la enfermedad si se obtiene un resultado positivo

VALOR PREDICTIVO NEGATIVO

- Depende de la sensibilidad
 - Probabilidad que una persona con un resultado negativo no tenga la enfermedad
-
- 

TENTATIVE DIAGNOSIS

	SLE	SjS	SSc	MCTD	PM/DM	RA	APS	SVV
Autoantibody								
ANA IIF	1	1	1	1	1	1	1	—
dsDNA	2	2	3	2	3	3	2	—
Sm	2	2	3	2	3	—	2	—
U1 RNP	2	2	2	2	2	—	—	—
SSA/SSB	2	2	3	—	—	3	—	—
Rib P	2	—	3	3	—	—	—	—
Scl-70	—	—	2	3	3	—	—	—
RNA Pol I/III	—	—	2	3	3	—	—	—
Jo-1	—	—	—	3	2	—	—	—
aCL	2	3	3	3	3	3	1	3
β2GPI	3	—	—	—	—	—	1	—
IgM RF	3	3	—	3	—	1	—	—
CP	—	—	—	3	—	1	—	—
ANCA/IIF	—	—	—	—	—	—	—	1
PR3 cANCA	—	—	—	—	—	—	—	2
MPO pANCA	—	—	—	—	—	—	—	2

Code: 1=screening test
 2=follow-up test
 3=optional test depending on clinical picture
 — = not indicated

TENTATIVE DIAGNOSIS

	SLE	SjS	SSc	MCTD	PM/DM	RA	APS	SVV
Autoantibody								
ANA IIF	1	1	1	1	1	1	1	—
dsDNA	2	2	3	2	3	3	2	—
Sm	2	2	3	2	3	—	2	—
U1 RNP	2	2	2	2	2	—	—	—
SSA/SSB	2	2	3	—	—	3	—	—
Rib P	2	—	3	3	—	—	—	—
Scl-70	—	—	2	3	3	—	—	—
RNA Pol I/III	—	—	2	3	3	—	—	—
Jo-1	—	—	—	3	2	—	—	—
aCL	2	3	3	3	3	3	1	3
β2GPI	3	—	—	—	—	—	1	—
IgM RF	3	3	—	3	—	1	—	—
CP	—	—	—	3	—	1	—	—
ANCA/IIF	—	—	—	—	—	—	—	1
PR3 cANCA	—	—	—	—	—	—	—	2
MPO pANCA	—	—	—	—	—	—	—	2

Code: 1=screening test
 2=follow-up test
 3=optional test depending on clinical picture
 — = not indicated

Despistaje
VS
Confirmatorio

TENTATIVE DIAGNOSIS

	SLE	SjS	SSc	MCTD	PM/DM	RA	APS	SVV
Autoantibody								
ANA IIF	1	1	1	1	1	1	1	—
dsDNA	2	2	3	2	3	3	2	—
Sm	2	2	3	2	3	—	2	—
U1 RNP	2	2	2	2	2	—	—	—
SSA/SSB	2	2	3	—	—	3	—	—
Rib P	2	—	3	3	—	—	—	—
Scl-70	—	—	2	3	3	—	—	—
RNA Pol I/III	—	—	2	3	3	—	—	—
Jo-1	—	—	—	3	2	—	—	—
aCL	2	3	3	3	3	3	1	3
β2GPI	3	—	—	—	—	—	1	—
IgM RF	3	3	—	3	—	1	—	—
CP	—	—	—	3	—	1	—	—
ANCA/IIF	—	—	—	—	—	—	—	1
PR3 cANCA	—	—	—	—	—	—	—	2
MPO pANCA	—	—	—	—	—	—	—	2

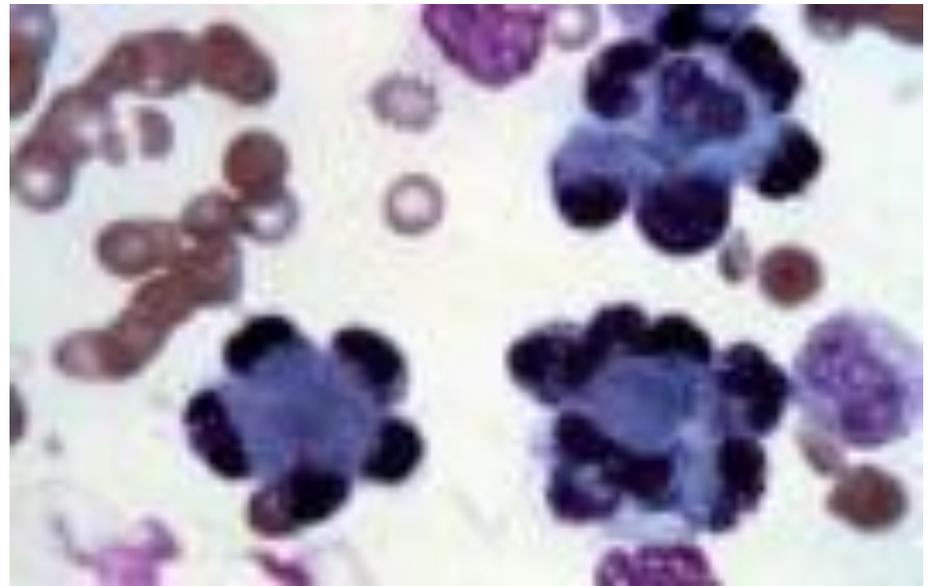
Code: 1=screening test
 2=follow-up test
 3=optional test depending on clinical picture
 — = not indicated

**Diagnóstico
 Pronóstico
 Seguimiento**

-
- ▶ ANA
 - ▶ Anti ENA
 - ▶ Anti DNA
 - ▶ ANCA
 - ▶ Anticardiolipinas (IgG, IgM)
 - ▶ Anti β 2 glicoproteína
 - ▶ FR
 - ▶ Anti proteínas citrulinadas ACPA



CÉLULAS LE

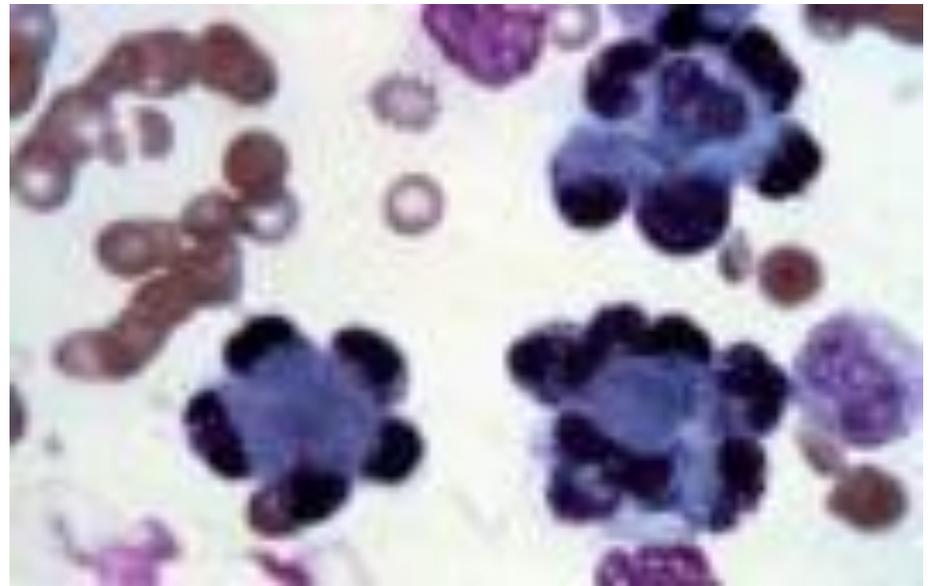


CÉLULAS LE

Se deben a la presencia de Ac opsonizantes contra el núcleo.

Imagen de los leucocitos fagocitando la cromatina (masa purpúrica)

Poco sensible y específica



ANA	Origen	Características
Naturales	No se conoce el estímulo antigénico que origina su síntesis En niños y adultos mayores pueden estar presentes a títulos relativamente altos	<ol style="list-style-type: none"> 1. Son producidos por linfocitos B CD5⁺ 2. Son de baja avidéz 3. Codificados por genes de línea germinal 4. Principalmente de isotipo IgM 5. Son polirreactivos 6. No se asocian a manifestaciones clínicas Funciones: <ol style="list-style-type: none"> 1. Primera línea de defensa contra patógenos 2. Depuración de moléculas propias dañadas 3. Participan en la red de regulación idiotipo-antiidiotipo.
Infecciosos	Producidos en respuesta a estímulos antigénicos externos (infecciones)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Son de alta avidéz 2. Isotipos IgG, IgA e IgM 3. No se asocian a manifestaciones clínicas de autoinmunidad 4. Reconocen componentes ubicuos (ADN, fosfolípidos, etc.) 5. Los títulos disminuyen cuando desaparece el estímulo antigénico
Autoinmunes	El estímulo que origina su síntesis es endógeno o exógeno Son de origen multifactorial (pérdida de tolerancia inmunológica, carga genética, interacción con el medio ambiente, otros)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Son de alta avidéz 2. Principalmente de isotipo G pero también pueden ser IgA y/o IgM 3. Se asocian a manifestaciones clínicas de autoinmunidad 4. Reconocen componentes ubicuos (ADN, fosfolípidos, etc.) 5. Los títulos fluctúan a lo largo del curso de la enfermedad

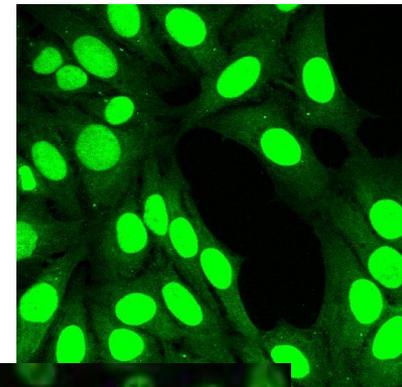
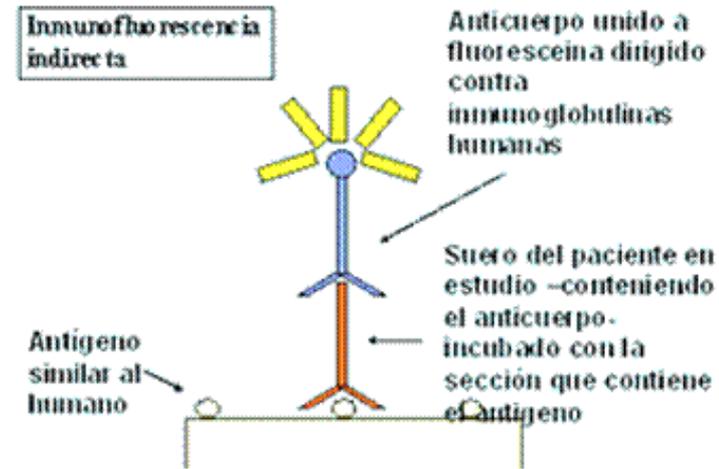


ANA

TÉCNICA

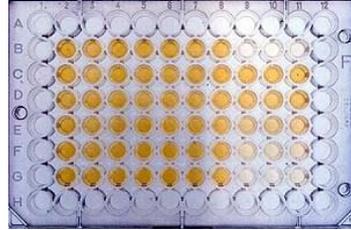
• Inmunofluorescencia Indirecta (IFI)

- Método ideal
- Alta sensibilidad y especificidad. Utiliza como sustrato hígado de ratón o células HEp-2
- Aporta información adicional
 - Títulos (1:80, 1:160, 1:320.....)
 - Patrones (homogéneo o difuso, periférico, moteado, nucleolar, citoplasmático)
- Desventaja: consume tiempo, costosa, requiere equipo especializado
- Falsos positivos: 13 a 33% Individuos sanos

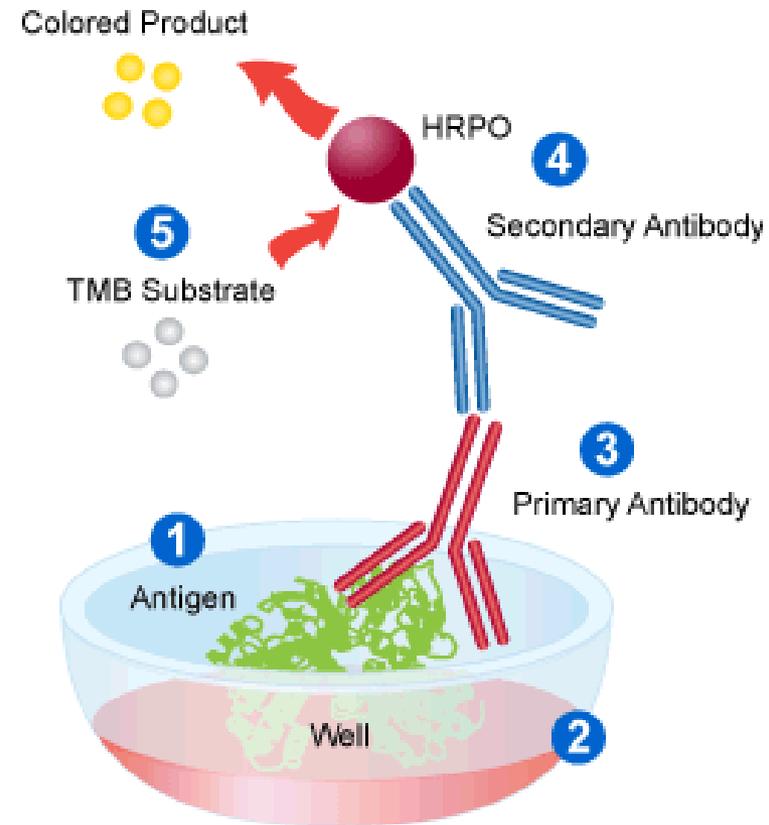


ANA

TÉCNICA •ELISA



- Rápido, bajo costo, automatizado
- Utiliza Ags purificados o recombinantes
- Sensibilidad y especificidad dependerá de la calidad del estuche comercial
- Falsos negativos (anti Ro, anti Scl 70)
- Puede ser cualitativo o cuantitativo



SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE ANA EN ETC

ENFERMEDAD	Sens (%)	Esp (%)
Pm/Dm	61	63
AR	41	56
Escleroderma	85	54
Raynaud sec	64	41
Sx Sjögren	48	52
LES	93	57



ANA

ANA +:

- Bajo VPP cuando la probabilidad pretest es baja o a bajos títulos
- 1:3 personas sanas a una dilución 1:40

J Clin Pathol 2000, 53:424-32

De pruebas de ANA solicitadas: 13% fueron +, de éstas sólo el 1% condujo a un Dx de enfermedad autoinmune

J Rheum 1999, 26:2578-84



Pattern on the Antinuclear Antibody–HEp-2 Test Is a Critical Parameter for Discriminating Antinuclear Antibody–Positive Healthy Individuals and Patients With Autoimmune Rheumatic Diseases

Henrique A. Mariz, Emília I. Sato, Silvia H. Barbosa, Silvia H. Rodrigues, Alessandra Dellavance, and Luis E. C. Andrade

918 individuos sanos entre 18 y 66 años

153 pacientes con enfermedades reumáticas autoinmunes ERA

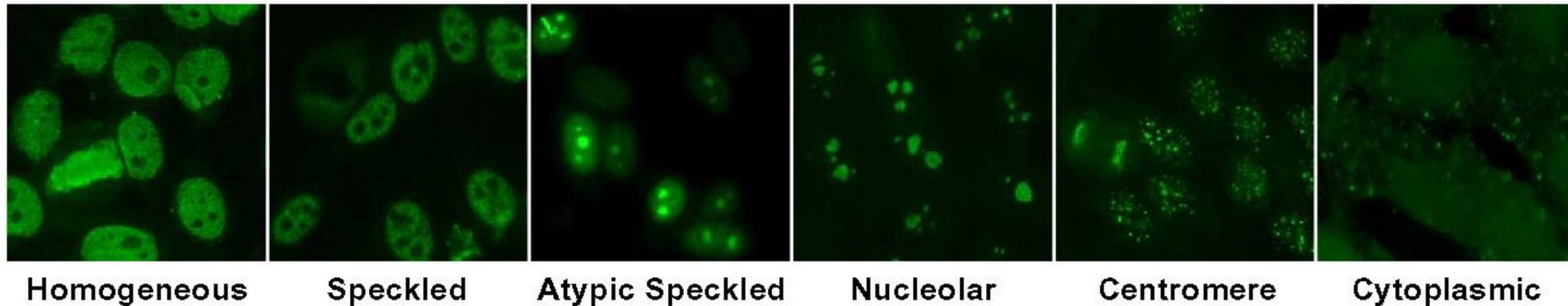
87 LES

45 Esclerosis sistémica

11 Sx Sjogren

10 Miopatia autoinmune





Henrique A. Mariz, Emília I. Sato, Silvia H. Barbosa, Silvia H. Rodrigues,
Alessandra Dellavance, and Luis E. C. Andrade

Resultados:

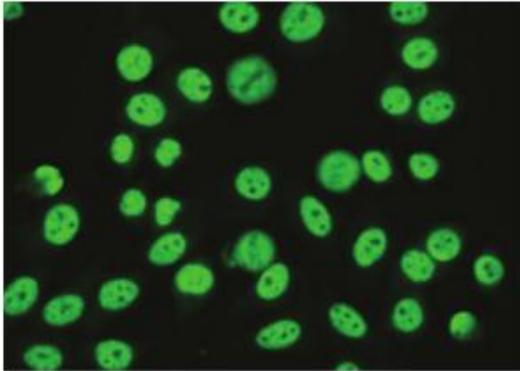
- ANA + 12,9% individuos sanos
 - Sanos ANA + 45,8% títulos bajos e intermedios, patrón moteado fino
 - Sanos ANA + 33,1% títulos altos, **patrón moteado fino denso**
 - Pacientes con ERA títulos intermedios y altos, patrones nucleolar 26%, homogéneo 7%, centromérico 8%, denso citoplasmático moteado fino 3%, nuclear moteado fino 42% a títulos altos
-



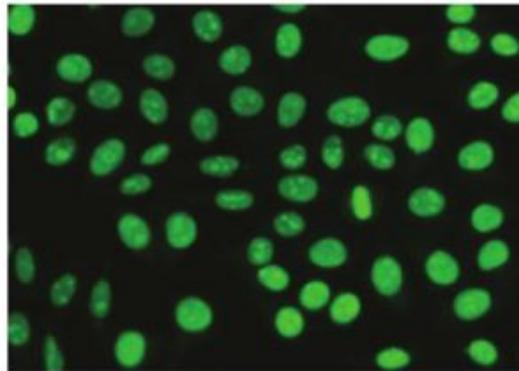
The Clinical Significance of the Dense Fine Speckled Immunofluorescence Pattern on HEp-2 Cells for the Diagnosis of Systemic Autoimmune Diseases

Michael Mahler¹ and Marvin J. Fritzler²

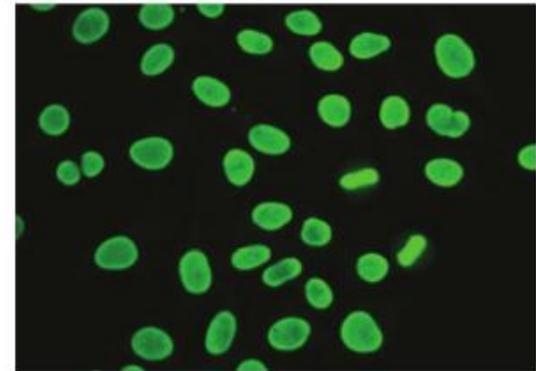
Patterns to be differentiated from dense fine speckle (DFS) pattern



Speckled pattern/RNP, SS-A, or SS-B

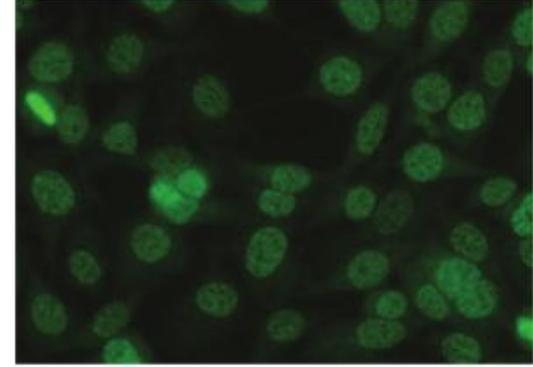
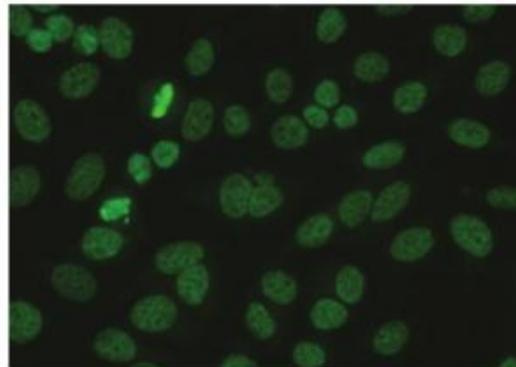
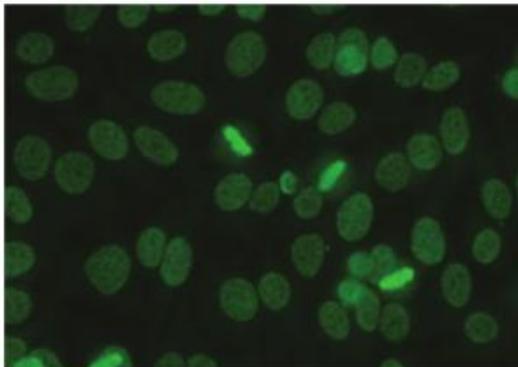


Homogenous + nucleolar pattern/Scl-70



Homogenous pattern/dsDNA

Dense fine speckle (DFS) pattern



The Clinical Significance of the Dense Fine Speckled Immunofluorescence Pattern on HEp-2 Cells for the Diagnosis of Systemic Autoimmune Diseases

Michael Mahler¹ and Marvin J. Fritzler²

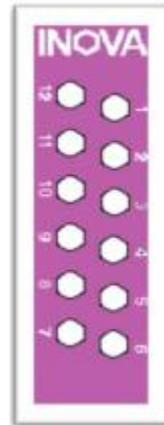
DFS70 solution



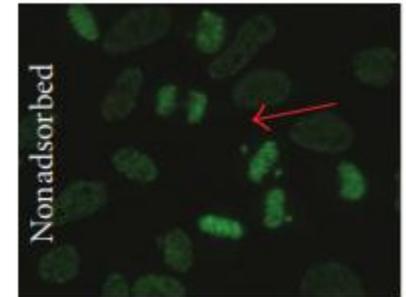
Dilute samples
in DFS70 solution



IFA slide



NOVA View instrument¹



- **Patrón moteado fino denso corresponde al LEDGF (anti DFS70)**
 - **Podría ser usado para excluir Dx de ERA**
-
- 

ESPECIFICIDADES DE LOS PATRONES DE ANA

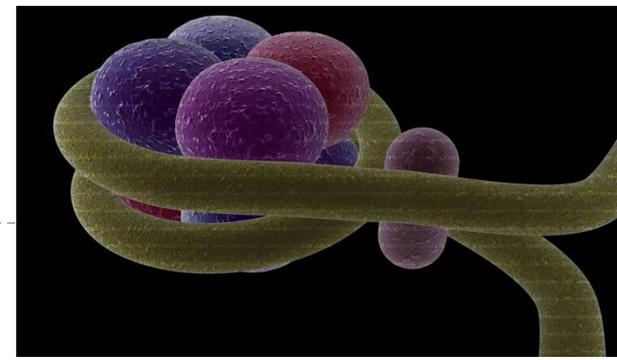
PATRÓN DE ANA	Ag asociado
Homogéneo	ADNdc, histonas, Topo-I
Moteado	Ku, Mi-2, RNA polimerasa II/III, Sm, SSA, SSB, Topo-I, U1-RNP
Moteado atípico	SSA, SSB
Nucleolar	RNA polimerasa I, PM/Scl
Centrómero	CENP-A, CENP-B, CENP-C
Citoplasmático	tRNA sintetasa: Jo-1, PL-7 y PL12, Rib P, SRP

ANA

RECOMENDACIÓN

- **Se solicita en personas con probabilidad pretest alta para LES**
- **Anti DNA y Anti ENA deben solicitarse sólo cuando el ANA es +**
- **No debe utilizarse para seguimiento**

Anti ENA



Macromoléculas acídicas extraídas de la fracción soluble salina de los núcleos celulares

No cumplen Topoisomerasa I (Scl70) o los aminoacil tRNA sintetasa

TÉCNICAS

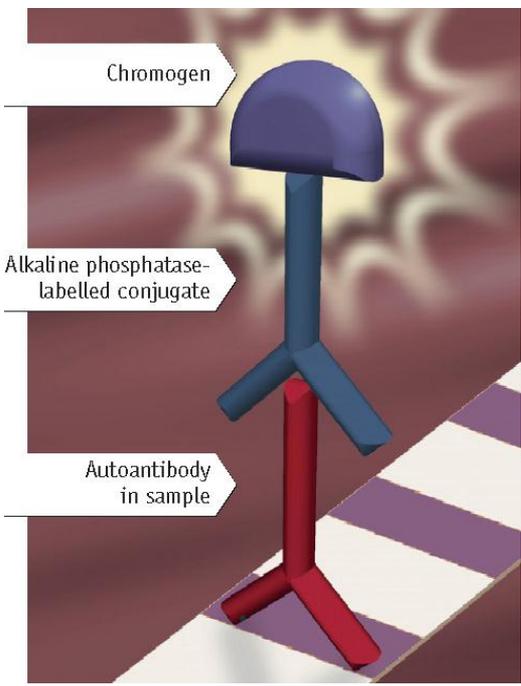
- Inmunodifusión
 - ELISA
 - Inmunoblot
-



Anti ENA

TÉCNICA

• *Western Blot*



Control line		
SmB	Recombinant
SmD	Peptide*
RNP-70k	Recombinant
RNP-A	Recombinant
RNP-C	Recombinant
SS-A/Ro52	Recombinant
SS-A/Ro60	Natural antigen
SS-B/La	Recombinant
Cenp-B	Recombinant
Topo-I/Scl-70	Recombinant
Jo-1/HRS	Recombinant
Ribosomal P	Peptide
Histones	Natural antigens

* Synthetically modified peptide

Anti Sm / Anti RNP

Ac contra ribonucleoproteínas nucleares pequeñas o proteínas involucradas en el *splicing* pre RNAm.

•Anti Sm

- ✓ Consta de 6 subunidades. Se determinan SmB y SmD
- ✓ **Muy útil para confirmar Dx LES**

•Anti RNP

- ✓ UIRN consta de 3 subunidades: 70kda, A, C
- ✓ **A altos títulos, muy útil para EMTC**

▶ **POCO VALOR PRONÓSTICO Y SEGUIMIENTO**

Anti centrómero/ Anti Scl70

•Anti centrómero

- ✓ Identificadas CENP-A, **CENP-B**, CENP-C, CENP- D
- ✓ **Muy útil para Dx CREST:** CREST vs sanos S 50% E 100%
- ✓ Útil para compromiso cutáneo limitado y menor probabilidad de fibrosis pulmonar

•Anti Scl70

- ✓ Ags contra la enzima DNA topoisomerasa
- ✓ **Muy útil en Dx de Esclerosis Sistémica**
- ✓ Útil para compromiso cutáneo difuso y fibrosis pulmonar

▶ **NO SON ÚTILES PARA SEGUIMIENTO**

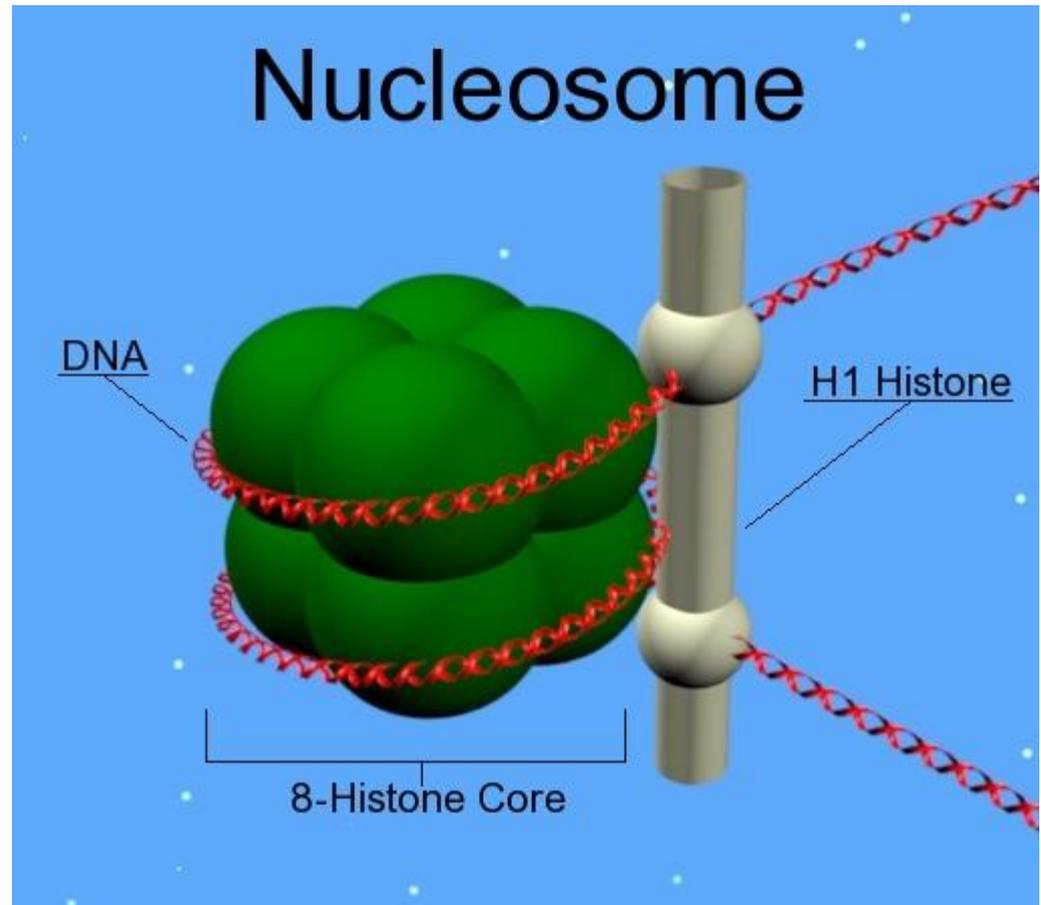
Anti histona

- Acs dirigidos contra el componente proteico de nucleosomas
- Identificadas proteína H1, H2A, H2B, H3 y H4
- Lupus inducido por drogas
- LES



Anti nucleosoma

- ▶ Anti cromatina
- ▶ Determinantes ag conformacionales ADN+histonas
- ▶ Nucleosomas en cuerpos apoptóticos
- ▶ Alta sensibilidad y especificidad
- ▶ Correlación con NL o actividad LES



Anti nucleosoma

- Útil en diagnóstico de LES, pronóstico y seguimiento Nefritis lúpica
- S 61% E 98% para LES
- No es mejor que anti ADN
- Importante en pac anti Sm y anti ADN negativo



Ac presentes en miositis

- **Poco sensibles**

- **Ac Antisintetasa (aminoacil tRNA sintetasa)**

Incluyen : anti Jo1, PL-7, PL-12, EJ, OJ

Anti Jo1 presente 30% miositis inflamatorias

Sx antisintetasa

- **Anti SRP**

4% miositis, asoc a severidad

- **Anti Mi-2**

Dermatomiositis, signo V

- **Anti PM/ScI**

50% superposición polimiositis/escleroderma



Anti DNA

- **Puede estar dirigido contra**

- ADN nativo o de doble cadena (LES)

- Desnaturalizado o de cadena simple (inespecífico, LES, otras ETC)

TÉCNICAS

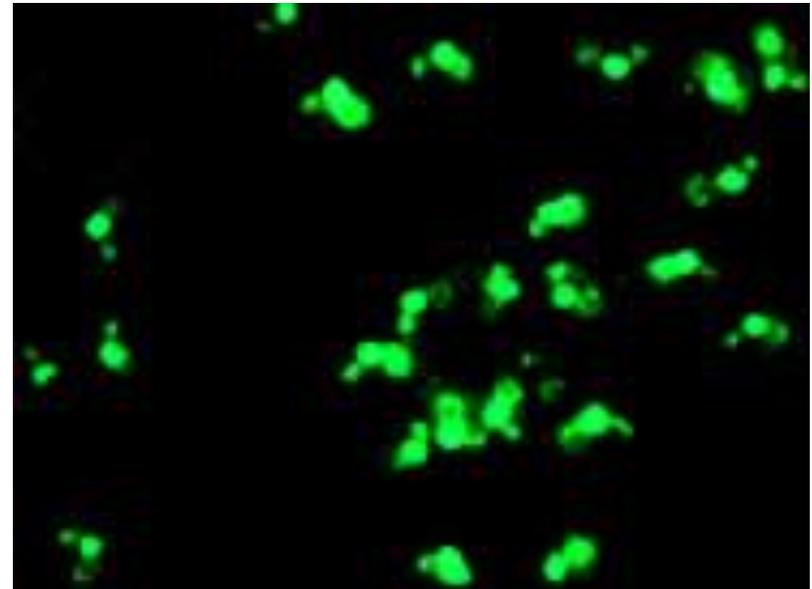
- Ensayos de inmunoprecipitación Farr

- IFI

- Sustrato *Crithidia luciliae*

- ELISA

- Cualitativo o cuantitativo



Clin Rheumatol (2013) 32:601–608

An evaluation of autoimmune antibody testing patterns in a Canadian health region and an evaluation of a laboratory algorithm aimed at reducing unnecessary testing

Ada Man • Kam Shojania • Carmen Phoon • Jason Pal •
Monika Hudoba de Badyn • David Pi • Diane Lacaille

Objetivo: Evaluar el patrón de indicación de pruebas (ANA, Anti ENA, Anti dsDNA) en la región y a partir de allí desarrollar un algoritmo de laboratorio que permita reducir las pruebas innecesarias

Datos: ANA por IFI
Anti ENA y Anti dsDNA por ELISA
Datos recolectados de Enero 2007 a Diciembre 2009

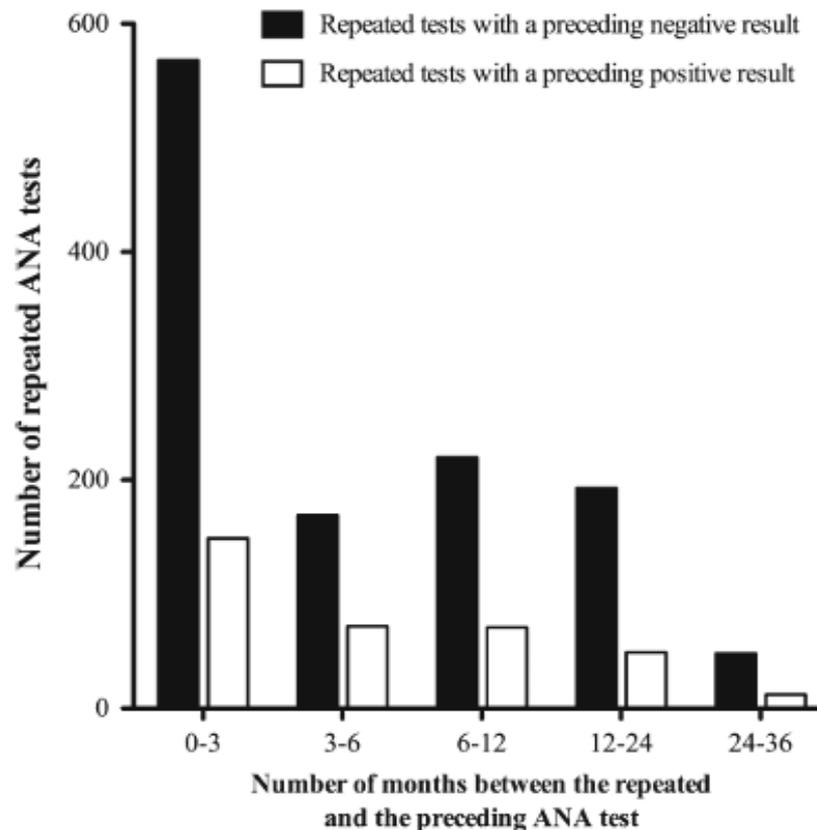
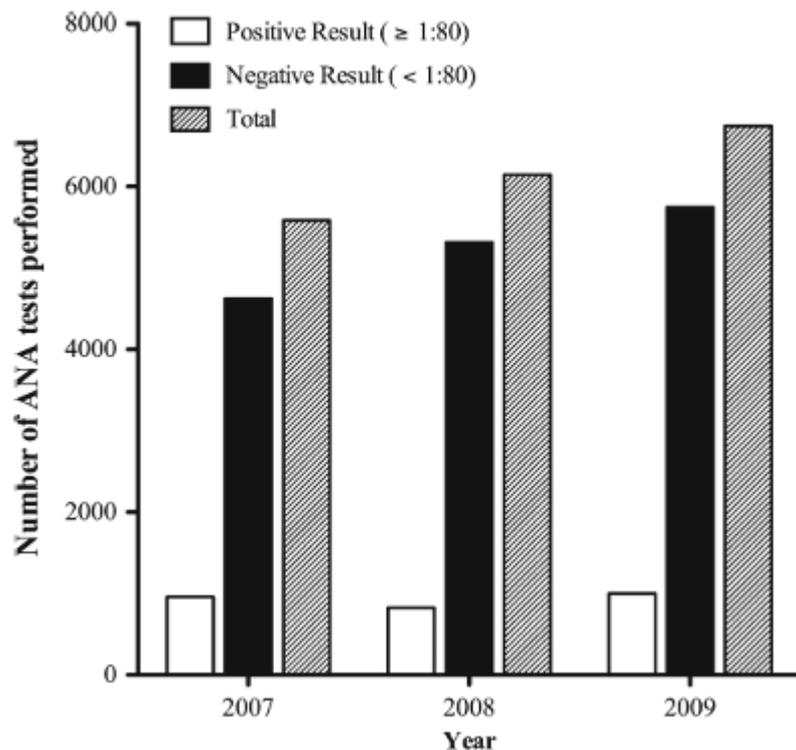
Resultados: Se realizaron 18.475 ANA, 10.656 ENA and 5.170 anti dsDNA en los 3 años
Indicado por Reumatólogos
ANA 6%
Anti ds DNA 16%
Anti ENA 20%



Clin Rheumatol (2013) 32:601–608

An evaluation of autoimmune antibody testing patterns in a Canadian health region and an evaluation of a laboratory algorithm aimed at reducing unnecessary testing

Ada Man • Kam Shojania • Carmen Phoon • Jason Pal •
Monika Hudoba de Badyn • David Pi • Diane Lacaille



Clin Rheumatol (2013) 32:601–608

An evaluation of autoimmune antibody testing patterns in a Canadian health region and an evaluation of a laboratory algorithm aimed at reducing unnecessary testing

Ada Man • Kam Shojania • Carmen Phoon • Jason Pal •
Monika Hudoba de Badyn • David Pi • Diane Lacaille

Table 1 Proportion of total ENA and anti-dsDNA tests that were ordered simultaneously with ANA in the inpatient and outpatient settings by ordering physician type, at the Vancouver Coastal Health Laboratory from January 1, 2007, to December 31, 2009

	Rheumatologist		Non-rheumatologist	
	Inpatient	Outpatient	Inpatient	Outpatient
ENA	47 %	34 %	62 %	40 %
Anti-dsDNA	39 %	38 %	77 %	74 %



Clin Rheumatol (2013) 32:601–608

An evaluation of autoimmune antibody testing patterns in a Canadian health region and an evaluation of a laboratory algorithm aimed at reducing unnecessary testing

Ada Man • Kam Shojania • Carmen Phoon • Jason Pal •
Monika Hudoba de Badyn • David Pi • Diane Lacaille

Table 2 Laboratory algorithm

-
1. ANA tests repeated within 1 year will be cancelled, and the prior result will be reported.
 2. If ANA is ordered simultaneously with ENA and/or anti-dsDNA, ANA will be processed first. The ENA and/or anti-dsDNA will only be processed if the ANA is $\geq 1:80$.
 3. If the ANA ordered simultaneously with ENA and/or anti-dsDNA is a repeat test within 1 year, rules 1 and 2 will apply.
 4. If ENA and/or anti-dsDNA are ordered on their own (i.e. not simultaneously with ANA), then they will be processed.^a
 5. Physicians may make special requests to the laboratory to negate any of the above rules.
-

ANA antinuclear antibody, *ENA* extractable nuclear antigen antibody, *Anti-dsDNA* anti-double-stranded DNA antibody

^aThis is to facilitate orders where the physician is directly looking for anti-Ro/SSA or anti-Jo-1, or if ANA was already performed elsewhere in the past, and presumably was positive. Also, anti-dsDNA is sometimes repeated to follow disease activity.

Triple IFA

Tamizaje de anticuerpos sobre 3 tejidos
(Hígado, riñón y estómago de rata)

Fluorescencia sobre los diferentes tejidos de acuerdo a la unión específica de los anticuerpos

	Hígado	Riñón (túbulos)		Estómago		
	hepatocitos	proximal	distal	Células parietales	Células pépticas	Músculo
ANA	+	+	+	+	+	+
AMA (M2)	+	++	+++	+++	+	
ASMA						+++
PCA				+++		
LKM	+++	+++				
Ribosomas	++	++	++		++	

ANA: Anticuerpos (AC) anti-nucleares ; AMA: AC anti-mitocondriales; ASMA: AC anti-músculo liso; PCA: AC anti-células parietales; LKM: AC anti-hígado-riñón-microsomas



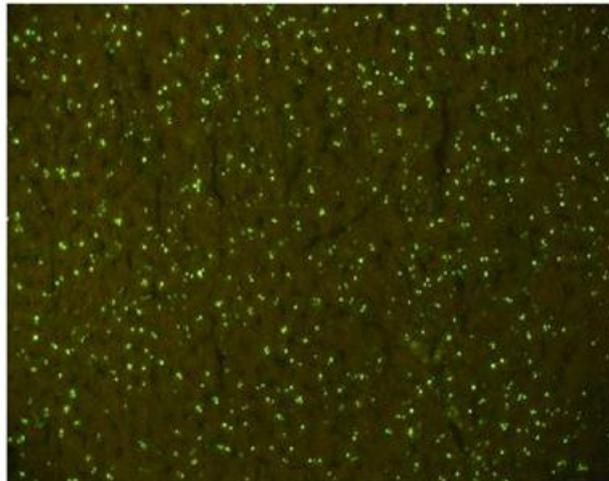
Triple IFA

Tamizaje de anticuerpos sobre 3 tejidos
(Hígado, riñón y estómago de rata)

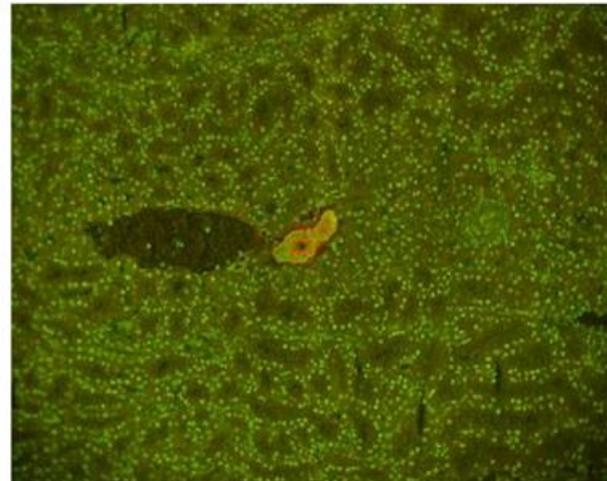
Fluorescencia sobre los diferentes tejidos de acuerdo a la unión específica de los anticuerpos

	Hígado	Riñón (túbulos)		Estómago		
	hepatocitos	proximal	distal	Células parietales	Células pépticas	Músculo
ANA	+	+	+	+	+	+

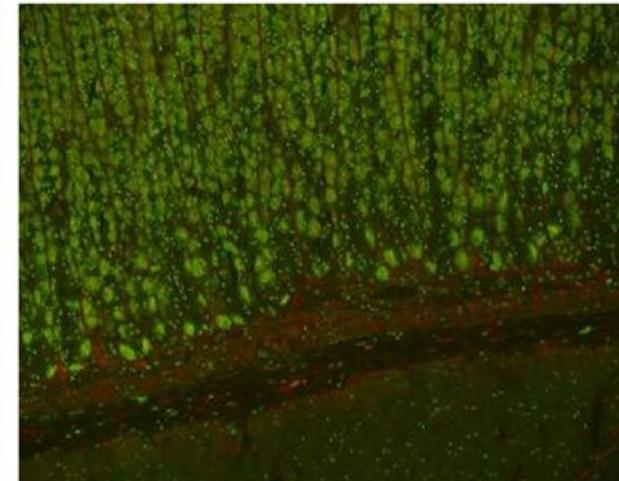
ANA:



ANA nucleolar en tejido hepático



ANA homogéneo en tejido renal



ANA nucleolar en mucosa gástrica
(fluorescencia de células parietales)

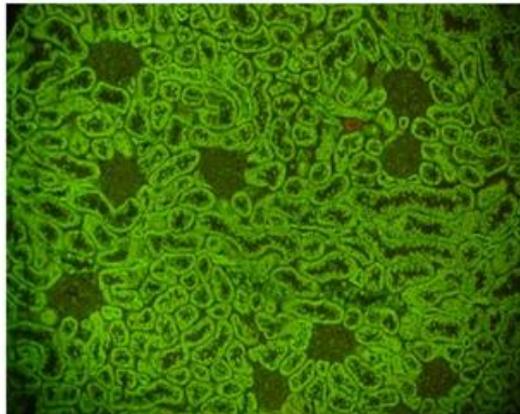
Triple IFA

Tamizaje de anticuerpos sobre 3 tejidos
(Hígado, riñón y estómago de rata)

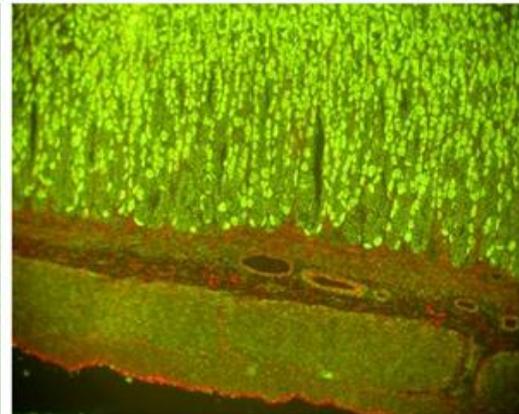
Fluorescencia sobre los diferentes tejidos de acuerdo a la unión específica de los anticuerpos

	Hígado	Riñón (túbulos)		Estómago		
	hepatocitos	proximal	distal	Células parietales	Células pépticas	Músculo
ANA	+	+	+	+	+	+
AMA (M2)	+	++	++++	++++	+	

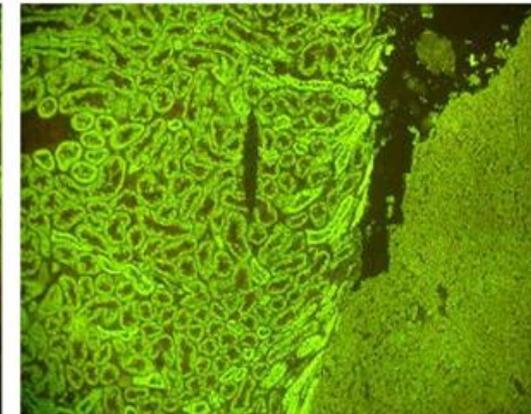
AMA:



AMA en túbulos renales



AMA en mucosa gástrica

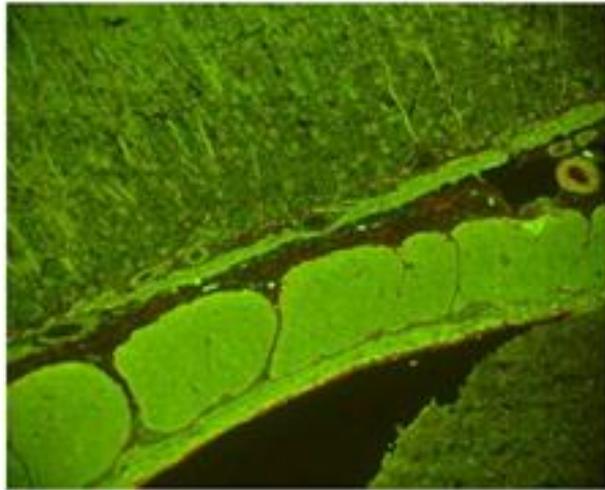


AMA en riñón e hígado

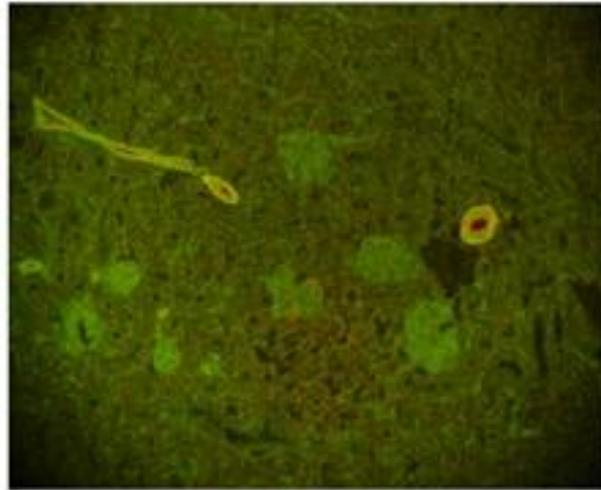
ASMA
PCA
LKM
Ribosomas

ANA: Anticuerpo
músculo liso; PC

ASMA:

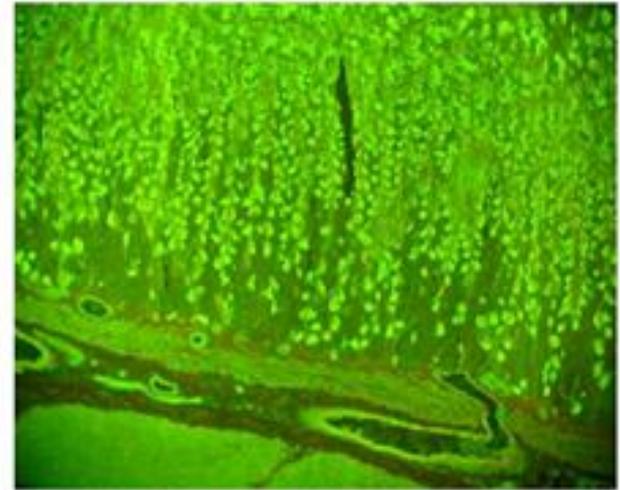


ASMA en músculo gástrico



ASMA en glomérulos + músculo liso de vasos sanguíneos (riñón)

PCA:



PCA en mucosa gástrica

ASMA						+++
PCA				+++		
LKM	+++	+++				
Ribosomas	++	++	++		++	

ANA: Anticuerpos (AC) anti-nucleares ; AMA: AC anti-mitocondriales; ASMA: AC anti-músculo liso; PCA: AC anti-células parietales; LKM: AC anti-hígado-riñón-microsomas



Table 1. Revised International Autoimmune Hepatitis Group Scoring System for the Diagnosis of Autoimmune Hepatitis (AIH)

Clinical feature	Score
Female gender	+2
ALP:AST ratio	
• <1.5	+2
• 1.5–3.0	0
• >3.0	-2
Serum globulin or IgG above normal	
• >2.0	+3
• 1.5–2.0	+2
• 1.0–1.5	+1
• <1.0	0
ANA, SMA, LKM1	
• >1:80	+3
• 1:80	+2
• 1:40	+1
• <1:40	0
Illicit drug use history	
• Positive	-4
• Negative	+1
Average alcohol intake daily	
• <25 g/day	+2
• >60 g/day	-2
Histologic findings	
• Interface hepatitis	+3
• Lymphoplasmacytic infiltrate	+1
• Rosette formation	+1
• None of the above	-5
• Biliary changes	-3
• Other changes	+2
Other autoimmune disease	+2
AMA positivity	-4
Hepatitis viral markers	
• Positive	-3
• Negative	+3
Aggregate score without treatment	
• Definite AIH	>15
• Probable AIH	10–15

Autoinmunidad hepática

- Importantes para Dx y clasificación
- Importante títulos, niños títulos más bajos
- No utilizar en seguimiento

	AIH I (and "AIH III")	AIH II
AMA-M2		
Anti-Sp100		
Anti-gp210		
Anti-LKM-1		+
Anti-LC-1		+
Anti- SLA	+ "AIH III"	
ANA and/or ASMA (F-actin)	+	
Atypical pANCA	+	+

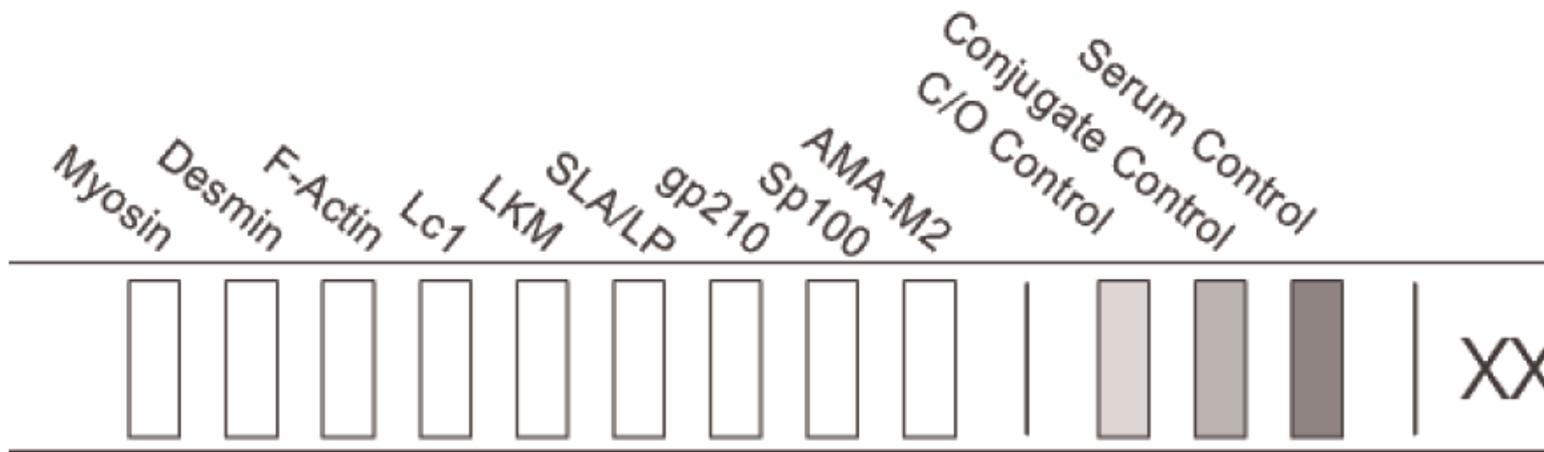
- Anti ASGPR se relaciona con actividad, mayor severidad, menor respuesta a tratamiento
- Anti SLA mayor severidad

- AMA no asociados a severidad
- Complejo del poro nuclear; gp210 poro nuclear y sp100 cuerpo nuclear, asociados a mayor severidad

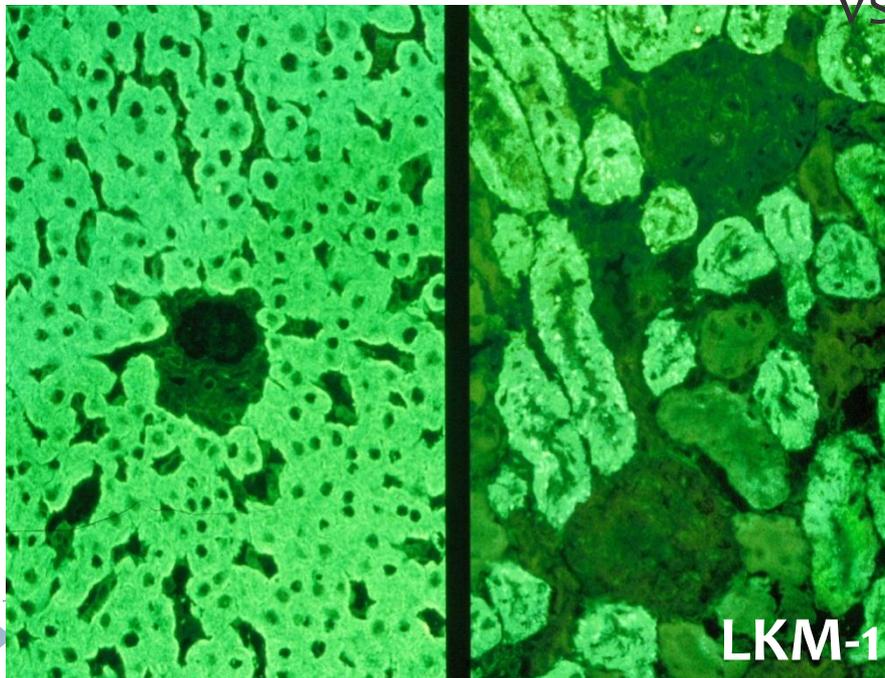
	PBC
AMA-M2	+
Anti-Sp100	+
Anti-gp210	+
Anti-LKM-1	
Anti-LC-1	+
Anti- SLA	
ANA and/or ASMA	
Atypical pANCA	



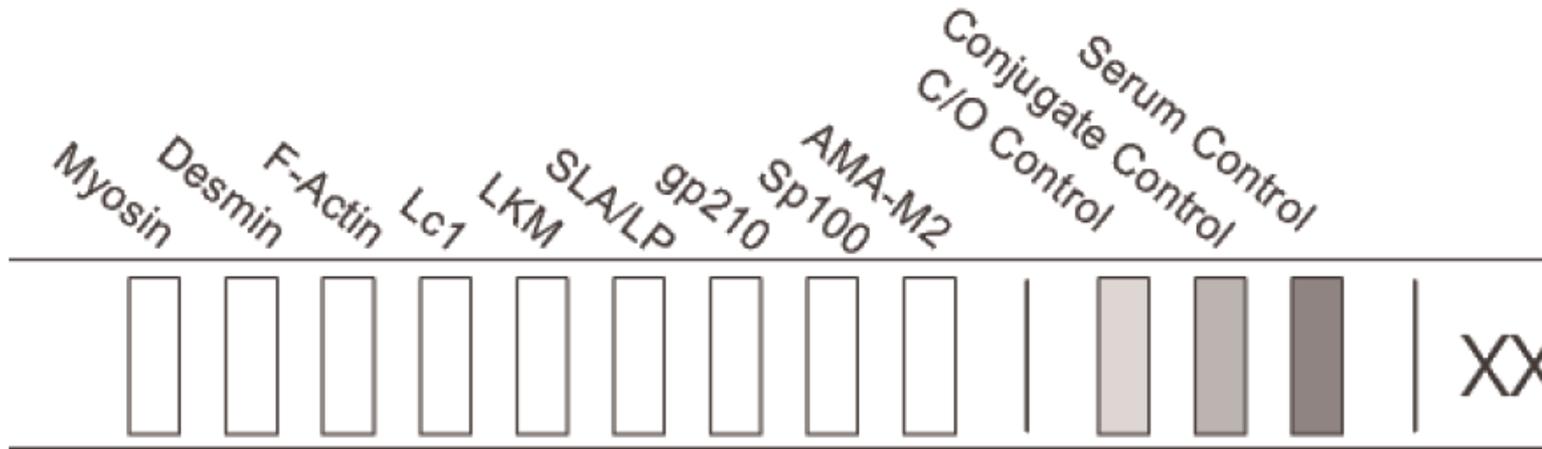
Autoinmunidad hepática



VS

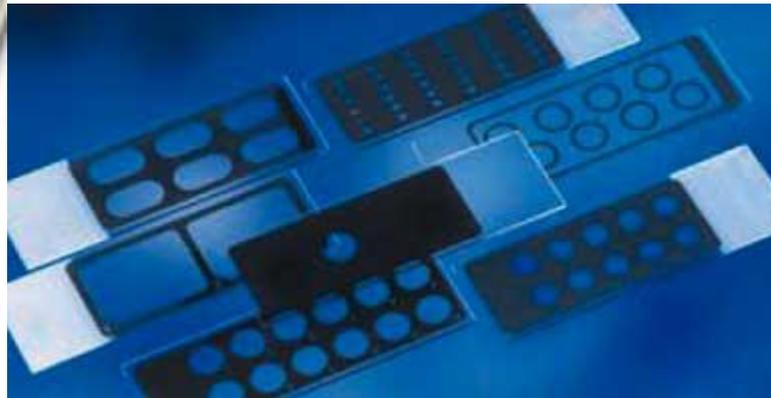


Autoinmunidad hepática



VS

Tejido de hígado, riñón, estómago de ratón



▶ SMA, ANA, anti-LKM1, AMA, anti-LC1

Conclusión

- **ELISA y Blot complementan, pero no sustituyen IFI**



ANCA

Ac contra Ags en los gránulos primarios de neutrófilos y lisosomas de monocitos

TÉCNICA

- ▶ IFI

Patrón citoplasmático ANCA c

Perinuclear ANCA p

No específico

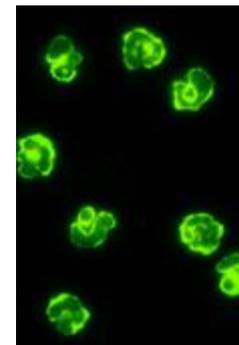
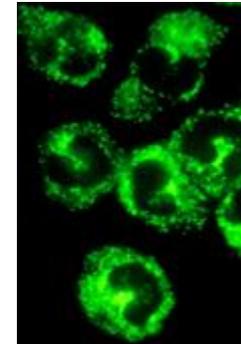
- ▶ ELISA

Citoplasmático

Proteínasa 3

Perinuclear

Mieloperoxidasa



ANCA

DIAGNÓSTICO

- ▶ ANCA-c: Granulomatosis de Wegener (90%)
Poliarteritis nodosa
- ▶ ANCA-p: Poliarteritis nodosa, Churg Strauss, colitis ulcerativa, Enfermedad de Crohn, Glomerulonefritis necrosantes rápidamente progresivas

SEGUIMIENTO

- ▶ En relación con actividad de Granulomatosis de Wegener

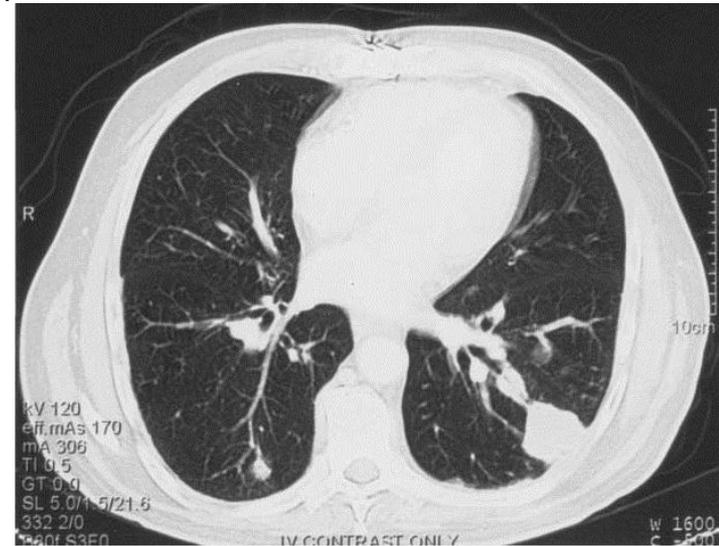


Figure 2. Multifocal cavitary nodules in Wegener's granulomatosis.

Ac Antifosfolípidos

▶ Anticardiolipina

IgM

IgG

▶ Anti β 2 glicoproteína I

IgM

IgG

▶ Anticoagulante lúpico

The Antiphospholipid Antibodies Subcommittee of the International Society of Thrombosis and Hemostasis

- dilute Russell's viper venom time (dRVVT) Prueba de veneno de víbora de Russell
 - activated partial thromboplastin time (aPTT)
-



Clinical criteria

Vascular thrombosis: One or more clinical episodes of arterial, venous, or small vessel thrombosis in any tissue or organ confirmed by objectively validated criteria (imaging or Doppler studies or histopathology), with the exception of superficial venous thrombosis

Pregnancy morbidity:

- (a) One or more unexplained deaths of a morphologically normal fetus at or beyond the 10th week of gestation, with normal fetal morphology documented by ultrasound or by direct examination of the fetus, or
- (b) One or more premature births of a morphologically normal neonate at or before the 34th week of gestation because of severe preeclampsia or eclampsia or severe placental insufficiency, or
- (c) Three or more unexplained consecutive spontaneous abortions before the 10th week of gestation, with maternal anatomic or hormonal abnormalities and paternal and maternal chromosomal causes excluded

Laboratory criteria

- 1. Lupus anticoagulant present in plasma, on two or more occasions, at least 12 weeks apart, detected according to the guidelines of the International Society on Thrombosis and Hemostasis (Subcommittee on Lupus Anticoagulants / Antiphospholipid Antibodies)
 - 2. aCL of IgG and/or IgM isotype in serum plasma, present in medium or high titer on two or more occasions, at least 12 weeks apart, measured by a standardized ELISA.
 - 3. Anti- β 2GPI of IgG and/or IgM isotype in serum or plasma (titer >99th percentile) on two or more occasions, at least 12 weeks apart, measured by a standardized ELISA according to recommended procedures
-

Ac Antifosfolípidos

TÉCNICA

- ▶ ELISA

- ▶ Anticardiolipina

- IgM

- IgG

- ▶ Anti β 2 glicoproteína

- IgM

- IgG



Ac Antifosfolípidos

- ▶ El riesgo de trombosis de trombosis se incrementa con la presencia simultánea de los Ac

27,6% un sólo tipo

38,8% 2 tipos

66,7% 3 tipos

Thromb Res 2003, 111:29-32



Antifosfolípidos

- ▶ Anticoagulante lúpico más específico
 - ▶ Anticardiolipinas son más sensibles
 - ▶ La especificidad de las Anticardiolipinas se incrementa con los títulos elevados y el isotipo IgG
 - ▶ Anti β_2 glicoproteína más específica
- 2-10% pac con Sx antifosfolípido tienen sólo Anti β_2 glicoproteína



Antifosfolípidos

Perfil de alto riesgo

- ▶ Anticoagulante lúpico positivo
- ▶ Altos títulos y el isotipo IgG de anticl y anti β_2 gpi
- ▶ Las tres pruebas positivas
- ▶ Persistencia de las pruebas positivas



Antifosfolípidos

Table 1. Classification of patients with antiphospholipid syndrome according to different combinations of antiphospholipid antibody positivity

Category	Laboratory criteria
I	Presence of >1 criterion (any combination)
IIa	Presence of lupus anticoagulant alone
IIb	Presence of anticardiolipin antibody alone
IIc	Presence of anti- β_2 -glycoprotein I antibody alone

Valor diagnóstico y pronóstico

Antifosfolípidos

Síndrome antifosfolípido con antifosfolípidos negativos

- IgA aCL y anti β 2GPI
- Anti fosfatidilserina/antiprotrombina

ELISA vs Line Dot

Anti-Phospholipid Dot interpretation template / Interpretationsschablone	
	Positive control
	Cardiolipin
	Phosphatidic acid
	Phosphatidylcholine
	Phosphatidylethanolamine
	Phosphatidylglycerol
	Phosphatidylinositol
	Phosphatidylserine
	Annexin V
	β 2-GP I
	Prothrombin



Ac Antifosfolípidos

DIAGNÓSTICO

- ▶ Sx Antifosfolípido Primario

 - Títulos medios o altos

 - Más de 2 oportunidades con mínimo 12 semanas de diferencia

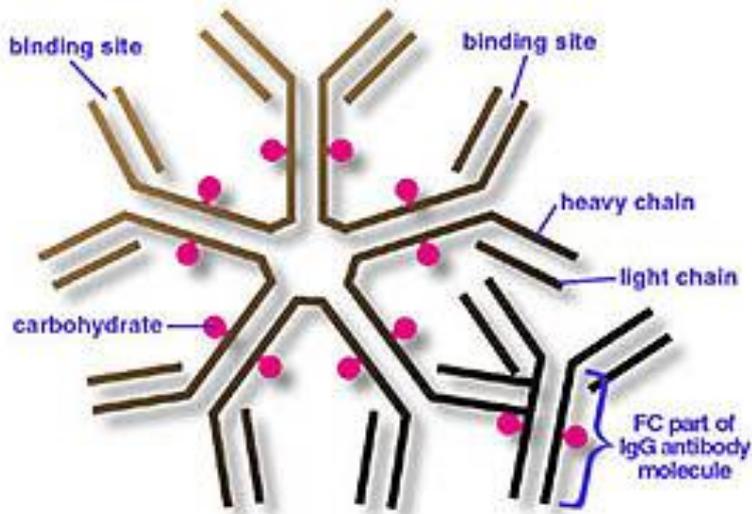
- ▶ Sx Antifosfolípido Secundario

 - LES (16-60%)

 - Infecciones

FR

Usual Rheumatoid Factor



Igs dirigidas contra epítopes en la Fc de la IgG

Pueden ser:

- ▶ Baja afinidad IgM (T independientes)
- ▶ Alta afinidad IgG, IgA, IgE (T dependientes)

FR

TÉCNICAS

- ▶ Aglutinación (Waler Rose)
- ▶ Nefelometría
- ▶ ELISA recombinante

IgM

Títulos



FR

IgM FR puede ser positiva en:

- ▶ Personas con infecciones
- ▶ Personas sanas 5-10% (20% >65 años)
- ▶ Pacientes con otras enfermedades autoinmunes o procesos inflamatorios

Suero de 418 pacientes con diversas enfermedades reumáticas determinaron diferentes isotipos

	S	E	
IgM	91	76	AR vs otras
IgA	80	80	
IgG	55	95	



Probabilidad post-test de acuerdo al pre-test y los resultados de FR para AR

(sensibilidad 80% y especificidad de 95%)

Probabilidad Pretest %	Probabilidad posttest FR positivo %	Probabilidad posttest FR negativo %
1	16	0,2
15	74	4
25	84	7
50	94	17
75	98	39
90	99	65

Enfermedades Reumáticas asociadas a FR positivo

Enfermedad	Frecuencia %
AR	50-90
LES	15-35
Sx Sjögren	75-95
Esclerosis Sistémica	20-30
Polimiositis/dermatomiositis	5-10
Crioglobulinemia	40-100
EMTC	50-60



FR

RECOMENDACIONES

- ▶ Indicar cuando exista una probabilidad pretest elevada para AR, crioglobulinemia, Sjögren, EMTC
- ▶ Títulos altos eleva la especificidad y el VPP
- ▶ Se puede utilizar para el seguimiento:

Existe correlación entre títulos elevados y actividad de la enfermedad

Puede desaparecer en remisión

Títulos elevados se asocian a artritis erosiva y manifestaciones extraarticulares



Anti CCP / ACPA

La introducción de los ACPA (*anti-citrullinated protein antibodies*) como prueba diagnóstica en AR ha significado un cambio en el paradigma de la Reumatología



Table 5. The 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis (traditional format)*

Criterion	Definition
1. Morning stiffness	Morning stiffness in and around the joints, lasting at least 1 hour before maximal improvement
2. Arthritis of 3 or more joint areas	At least 3 joint areas simultaneously have had soft tissue swelling or fluid (not bony overgrowth alone) observed by a physician. The 14 possible areas are right or left PIP, MCP, wrist, elbow, knee, ankle, and MTP joints
3. Arthritis of hand joints	At least 1 area swollen (as defined above) in a wrist, MCP, or PIP joint
4. Symmetric arthritis	Simultaneous involvement of the same joint areas (as defined in 2) on both sides of the body (bilateral involvement of PIPs, MCPs, or MTPs is acceptable without absolute symmetry)
5. Rheumatoid nodules	Subcutaneous nodules, over bony prominences, or extensor surfaces, or in juxtaarticular regions, observed by a physician
6. Serum rheumatoid factor	Demonstration of abnormal amounts of serum rheumatoid factor by any method for which the result has been positive in <5% of normal control subjects
7. Radiographic changes	Radiographic changes typical of rheumatoid arthritis on posteroanterior hand and wrist radiographs, which must include erosions or unequivocal bony decalcification localized in or most marked adjacent to the involved joints (osteoarthritis changes alone do not qualify)

* For classification purposes, a patient shall be said to have rheumatoid arthritis if he/she has satisfied at least 4 of these 7 criteria. Criteria 1 through 4 must have been present for at least 6 weeks. Patients with 2 clinical diagnoses are not excluded. Designation as classic, definite, or probable rheumatoid arthritis is *not* to be made. See Table 3 for definitions of abbreviations.

ARTHRITIS & RHEUMATISM

Vol. 62, No. 9, September 2010, pp 2569–2581

2010 Rheumatoid Arthritis Classification Criteria

An American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism
Collaborative Initiative

Daniel Aletaha,¹ Tuhina Neogi,² Alan J. Silman,³ Julia Funovits,¹ David T. Felson,²
Clifton O. Bingham, III,⁴ Neal S. Birnbaum,⁵ Gerd R. Burmester,⁶ Vivian P. Bykerk,⁷
Marc D. Cohen,⁸ Bernard Combe,⁹ Karen H. Costenbader,¹⁰ Maxime Dougados,¹¹
Paul Emery,¹² Gianfranco Ferraccioli,¹³ Johanna M. W. Hazes,¹⁴ Kathryn Hobbs,¹⁵
Tom W. J. Huizinga,¹⁶ Arthur Kavanaugh,¹⁷ Jonathan Kay,¹⁸ Tore K. Kvien,¹⁹ Timothy Laing,²⁰
Philip Mease,²¹ Henri A. Ménard,²² Larry W. Moreland,²³ Raymond L. Naden,²⁴
Theodore Pincus,²⁵ Josef S. Smolen,¹ Ewa Stanislawska-Biernat,²⁶ Deborah Symmons,²⁷
Paul P. Tak,²⁸ Katherine S. Upchurch,¹⁸ Jiří Vencovský,²⁹
Frederick Wolfe,³⁰ and Gillian Hawker³¹



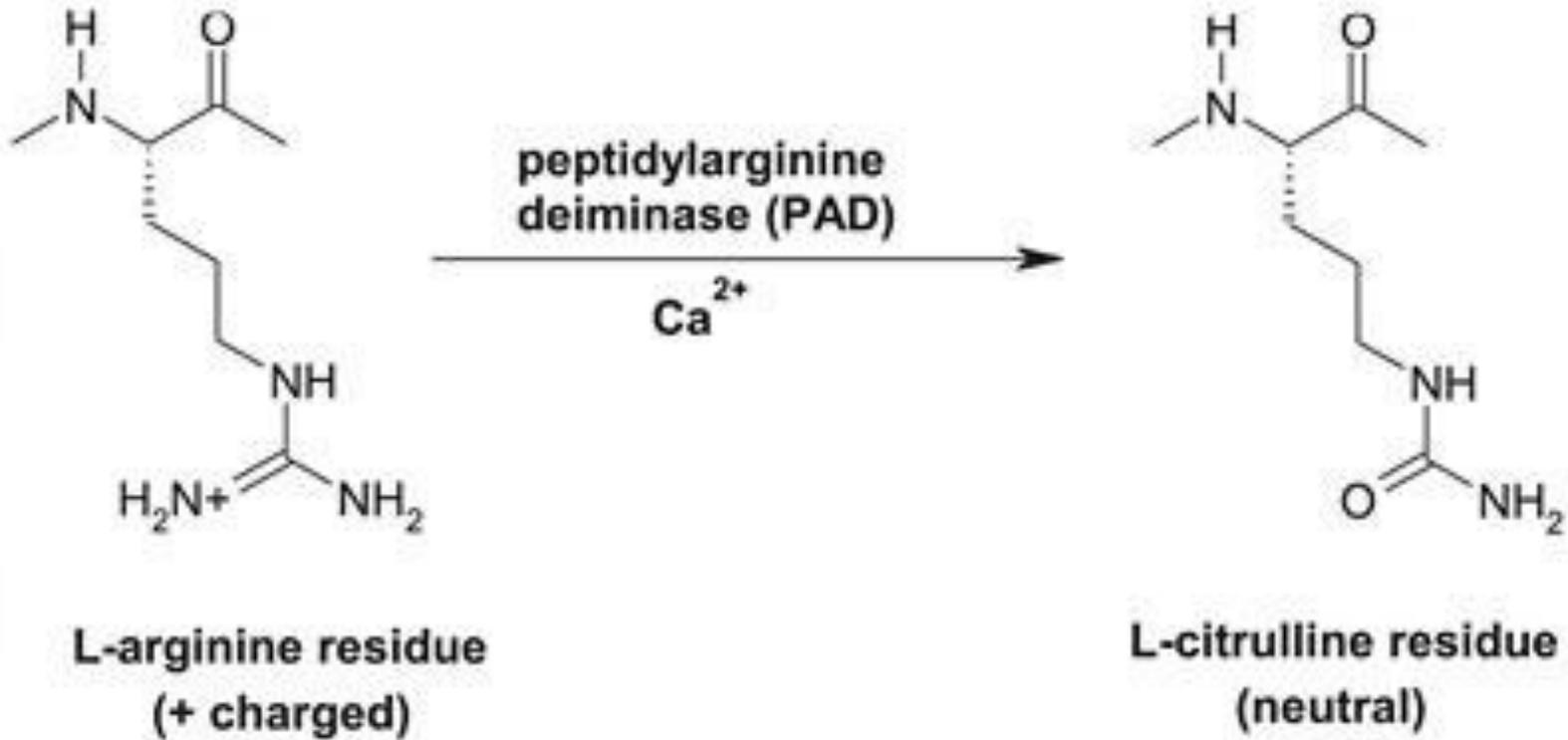
Table 3. The 2010 American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism classification criteria for rheumatoid arthritis

	Score
Target population (Who should be tested?): Patients who	
1) have at least 1 joint with definite clinical synovitis (swelling)*	
2) with the synovitis not better explained by another disease†	
Classification criteria for RA (score-based algorithm: add score of categories A–D; a score of $\geq 6/10$ is needed for classification of a patient as having definite RA)‡	
A. Joint involvement§	
1 large joint¶	0
2–10 large joints	1
1–3 small joints (with or without involvement of large joints)#	2
4–10 small joints (with or without involvement of large joints)	3
>10 joints (at least 1 small joint)**	5
B. Serology (at least 1 test result is needed for classification)††	
Negative RF <i>and</i> negative ACPA	0
Low-positive RF <i>or</i> low-positive ACPA	2
High-positive RF <i>or</i> high-positive ACPA	3
C. Acute-phase reactants (at least 1 test result is needed for classification)‡‡	
Normal CRP <i>and</i> normal ESR	0
Abnormal CRP <i>or</i> abnormal ESR	1
D. Duration of symptoms§§	
<6 weeks	0
≥ 6 weeks	1

Table 3. The 2010 American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism classification criteria for rheumatoid arthritis

	Score
Target population (Who should be tested?): Patients who	
1) have at least 1 joint with definite clinical synovitis (swelling)*	
2) with the synovitis not better explained by another disease†	
Classification criteria for RA (score-based algorithm: add score of categories A–D; a score of $\geq 6/10$ is needed for classification of a patient as having definite RA)‡	
A. Joint involvement§	
1 large joint¶	0
2–10 large joints	1
1–3 small joints (with or without involvement of large joints)#	2
4–10 small joints (with or without involvement of large joints)	3
>10 joints (at least 1 small joint)**	5
B. Serology (at least 1 test result is needed for classification)††	
Negative RF <i>and</i> negative ACPA	0
Low-positive RF <i>or</i> low-positive ACPA	2
High-positive RF <i>or</i> high-positive ACPA	3
C. Acute-phase reactants (at least 1 test result is needed for classification)‡‡	
Normal CRP <i>and</i> normal ESR	0
Abnormal CRP <i>or</i> abnormal ESR	1
D. Duration of symptoms§§	
<6 weeks	0
≥ 6 weeks	1

La reacción de Citrulinación



**La carga perdida influirá en
la carga total**

la distribución de las cargas

el punto isoeléctrico

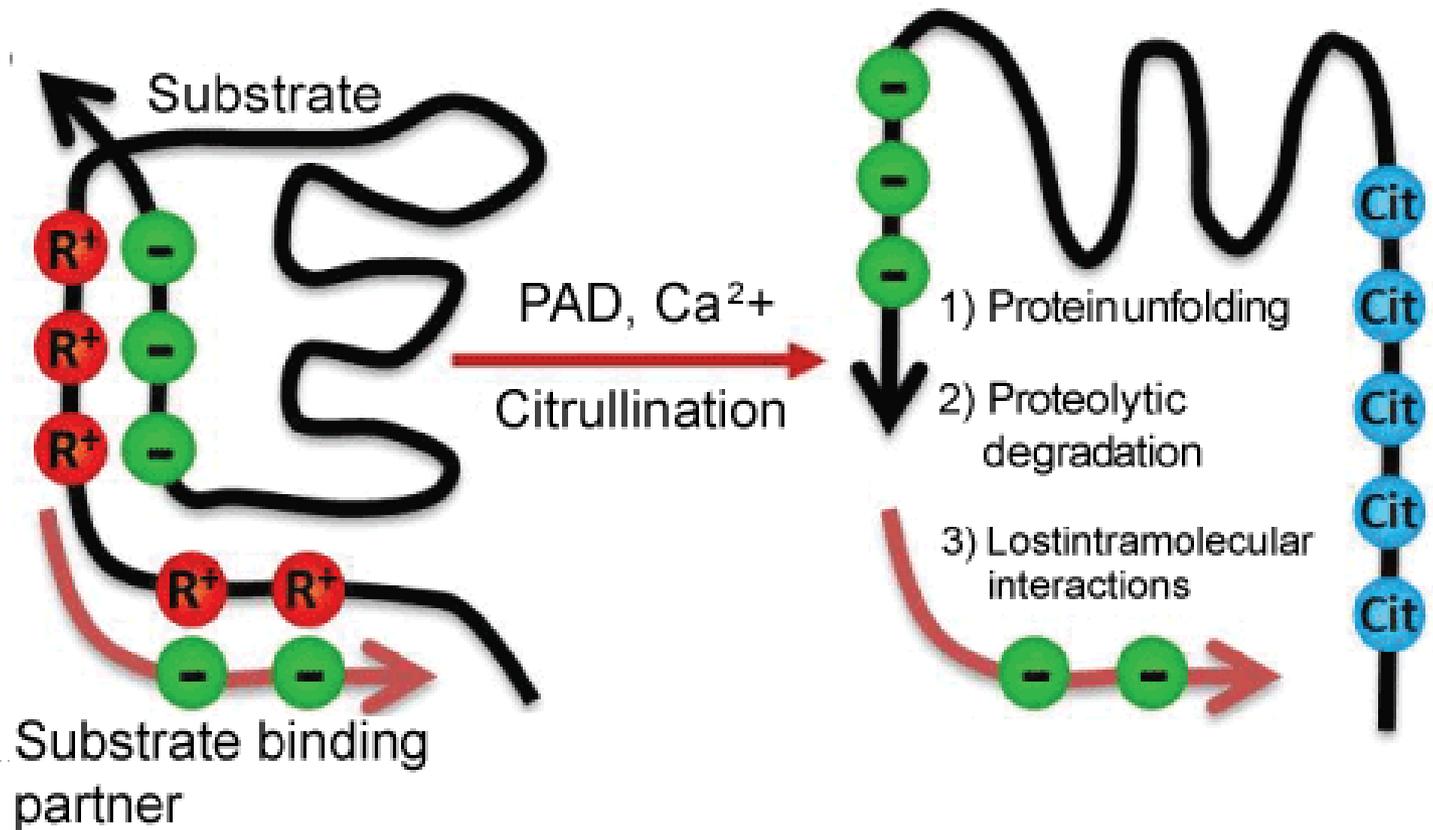
los puentes iónicos y de hidrógeno

la relación proteína - proteína



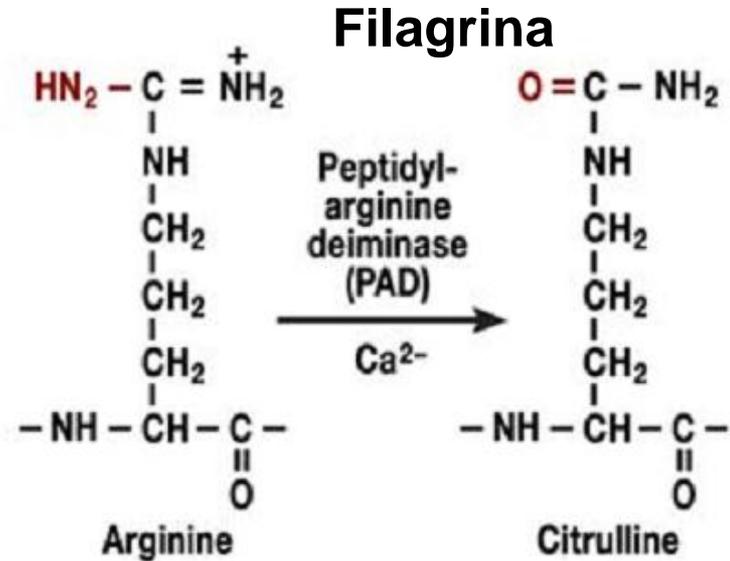
Consecuencias Generales de la citrulinación

- Altera la estructura 1°, 2° y 3° de la proteína
- Menos organizada
- Configuración mas abierta



Anti CCP

- Acs que reconocen formas citrulinadas de proteínas nativas:
Ac anti keratina
(anti filagrina)



Citrullination: Loss of the positive charge on arginine leads to a change in tertiary structure; possible structure of CCP

TÉCNICA

- ELISA

Primera generación

S 30-40%

E 95%

Última generación

S 80%



Anti CCP

Muy útil:

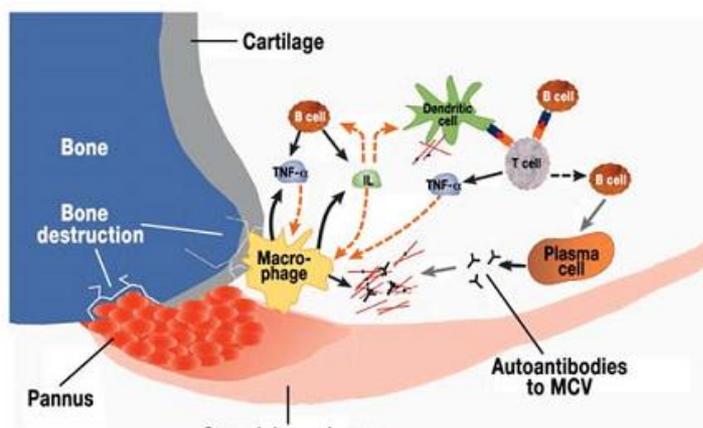
- Dx precoz de AR
- AR seronegativas
- Posible AR en un cuadro clínico donde FR pierde especificidad (hepatitis C, crioglobulinemia)

- Indicador pronóstico

Autoimmunity Rev 2005, 4:468-474; Clin Appl Immunol Rev 2003, 4: 109-123; South Med J 2005, 98: 704-10



Antivimentina citrulinada mutada anti MCV



Antibody diagnostic testing in patients with rheumatoid arthritis (RA)

	Rf IgM	Rf IgA	Anti-CCP2	Anti-MCV
RA sensitivity	60–80%	44%	39–94%	69.5–82%
RA specificity	80–95%	84%	81–100%	90.3–98%
Early RA sensitivity	15–30%	29–39%	25–58%	57–71%
Correlation with activity	doubtful	yes	no	yes
Correlation with outcome	yes	yes	yes	yes
Association with extra-articular manifestations	yes	yes	yes	unknown

Table 3. Comparison of ACPA and RF tests in terms of positive and negative predictive values

Reference	Number of patients (RA/control)	CCP2		CCP3		MCV		RF	
		PPV (%)	NPV (%)	PPV (%)	NPV (%)	PPV (%)	NPV (%)	PPV (%)	NPV (%)
Luis Caro-Oleas and colleagues [54]	124/158	95.2	73.1	92.3	70.5			90.9	73.6
Coenen and colleagues [44] ^d	133/165	89.7 to 91.4 ^a	87.1 to 89.1 ^a	76.7	88.2	80.0	87.2		
Correia and colleagues [39]	86/90	92.6 to 96.7 ^b	72.9 to 78.7 ^b	91.9 to 94.9 ^b	74.4 to 74.6 ^b			80.3	72.4
Dos Anjos and colleagues [40]	70/88	91.7	84.7	90.6	87.2				
Liu and colleagues [33]	170/136	95.5	66.8			93.7	77.4	82.0	69.9
Lutteri and colleagues [24]	120/170	87.7 to 96.2 ^c	76.6 to 78.3 ^c	92.6	78.1			77.9	79.5
Sghiri and colleagues [29]	170/309	91.1	86.3			66.0	84.7	58.6	79.9
Soos and colleagues [52]	119/118	97.6	74.4			90.0	78.8	80.2	74.0
Ursum and colleagues [48]	123/39	95.8				96.1			
Van der Linden and colleagues [17]	201/424	67.1	79.0	64.0	80.0	56.3	79.2	61.7	77.8
Average		91.2	78.4	84.9	79.8	80.4	81.5	75.9	75.3

