



ORIGINALES

ELISA ANCA-GBM de detección rápida. Una herramienta de urgencia en el diagnóstico precoz de las glomerulonefritis rápidamente progresivas (GNRP) de tipo I y III

O. Arranz*, J. Ara*, R. Rodríguez*, R. Poveda**, A. Serra***, J. Solé-Amigó****, J. Fort*****, E. Mirapeix* y A. Darnell*

*Servicio de Nefrología, Instituto Clínico de Nefrología y Urología del Hospital Clínico, Instituto de Investigaciones Biomédicas (IDIBAPS), Universidad de Barcelona y Servicios de Nefrología del **Hospital de Bellvitge, ***Hospital Germans Trias i Pujol de Badalona, ****Centro Hospitalario y Cardiológico de Manresa y *****Hospital General Vall d'Hebron de Barcelona.

RESUMEN

Las glomerulonefritis rápidamente progresivas (GNRP) de tipo I y III son formas de GNRP necrotizante asociadas a anticuerpos anti-membrana basal glomerular (anti-GBM) y a anticuerpos anticitoplasma del neutrófilo (ANCA) anti-proteinasa-3 (anti-PR3) y anti-mieloperoxidasa (anti-MPO). Estas enfermedades tienen asociado una progresión rápida hacia la insuficiencia renal.

En este estudio hemos comparado los ELISAs semicuantitativos para la detección de anticuerpos anti-GBM, ANCA anti-PR3 y anti-MPO y la técnica de inmunofluorescencia (IFI) con el ELISA rápido para la detección conjunta (en un tiempo de 30 minutos) de estos anticuerpos en pacientes con alta sospecha de GNRP. El valor diagnóstico de estos ELISAs semicuantitativos y de la técnica de IFI en el diagnóstico de pacientes con GNRP tipo I o III es conocido. El test de detección rápida no ha mostrado diferencias significativas con los resultados de ELISA anti-GBM, anti-PR3 o anti-MPO para los tres anticuerpos ($p > 0,05$). Asimismo, no se han encontrado diferencias significativas en los resultados del test rápido para anticuerpos anti-PR3 y anti-MPO respecto a los valores de IFI para C-ANCA y P-ANCA ($p > 0,05$). Su validez como herramienta diagnóstica de las GNRP tipo I y III comparada con los ELISAs semicuantitativos y la técnica de IFI ha sido, igualmente, confirmada.

De los resultados de este estudio se desprende que el test de detección rápida es una herramienta tan útil como el ELISA semicuantitativo anti-GBM en el diagnóstico de GNRP tipo I y también lo es en el diagnóstico de GNRP tipo III comparado con las técnicas de IFI y ELISA semicuantitativo anti-PR3 o anti-MPO. Pero además, el test rápido tiene la ventaja añadida de procurar resultados en sólo 30 minutos y la comodidad de combinar tres resultados de tres anticuerpos diferentes en un solo test.

Palabras clave: **ELISA rápido. Anti-GMB. ANCA. GNRP.**

Recibido: 1-XII-2000.

En versión definitiva: 12-III-2001.

Aceptado: 12-III-2001.

Correspondencia: Dr. Óscar Arranz
Servicio de Nefrología
Hospital Clínico de Barcelona
Villarroel, 170
08036 Barcelona

THE ANCA-GBM ELISA SCREENING TEST: A RAPID TEST FOR THE DIAGNOSIS OF RAPIDE PROGRESSIVE GLOMERULONEPHRITIDES

SUMMARY

Rapidly progressive glomerulonephritides (RPGN) are forms of necrotizing glomerulonephritis associated with anti-glomerular basement membrane (anti-GBM) and anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) against the antigens proteinase-3 (anti-PR3) and myeloperoxidase (anti-MPO). RPGN have a course of rapid progression to renal failure.

We compared the results from the semiquantitative ELISAs for anti-GBM antibodies, PR3-ANCA and MPO-ANCA and the indirect immunofluorescence technique (IIF) against a new rapid assay (30 minutes) for the same antibodies in patients with clinically suspected RPGN. The semiquantitative ELISAs for anti-GBM antibodies and PR3-ANCA and MPO-ANCA have a proven diagnostic significance in patients with RPGN I and III. There were no significant differences between the ANCA-GBM screening test and the results from the semiquantitative ELISAs ($p > 0.05$). We did not find significant differences between the results for PR3-ANCA and MPO-ANCA from the ANCA-GBM screening test with C-ANCA and P-ANCA IIF values ($p > 0.05$). We also corroborated that the ANCA-GBM screening test is a diagnostic tool for RPGN I and III as useful as the semiquantitative ELISAs and the IIF technique.

The ANCA-GBM ELISA screening test is a tool as useful as the semiquantitative ELISA against anti-GBM antibodies for diagnosis of RPGN I. The comparison of the screening ELISA with the IIF technique and the semiquantitative ELISAs against PR3-ANCA and MPO-ANCA showed similar utility for diagnosis of RPGN III. The advantages of the new screening assay are that three antibodies are tested at the same time, yielding results in only 30 minutes.

Key words: **ELISA screening. Anti-GBM. ANCA. RPGN.**

INTRODUCCIÓN

Las glomerulonefritis rápidamente progresivas (GNRP) son entidades caracterizadas por el desarrollo rápido, a menudo irreversible, de insuficiencia renal asociado al desarrollo de lesiones glomerulares inflamatorias con predominio de proliferación extracapilar. La mejor clasificación se basa en los datos de la inmunofluorescencia directa sobre el tejido renal y en la determinación en suero de varios parámetros inmunológicos entre los que destacan los anticuerpos anti-membrana basal glomerular (anti-GBM) o los anticuerpos anti-citoplasma del neutrófilo (ANCA). Entre los diferentes subtipos de GNRP se identifican las GNRP tipo I y III, formas de glomerulonefritis asociadas a anticuerpos anti-GBM o ANCA. La GNRP tipo I y la GNRP tipo III representan el 75-80% de todas las glomerulonefritis rápidamente progresivas. La GNRP tipo I se caracteriza por la presencia en el suero de anticuerpos anti-GBM y por la detección en la inmunofluorescencia directa de la biopsia renal de depósitos lineales de IgG y C3 difusos y de ubicación capilar. Se observa de modo característico en el sín-

drome de Goodpasture y en la enfermedad por anticuerpos anti-GBM. Hasta un 30% de estos pacientes pueden presentar ANCA anti-MPO¹, particularmente aquellos con signos de vasculitis sistémica. La GNRP tipo III suele ser una de las formas de expresión renal de formas de vasculitis sistémicas como la granulomatosis de Wegener (GW), la poliangeítis microscópica (PAM) y las vasculitis limitadas al riñón (VLR). En ciertos casos, el síndrome de Churg-Strauss (SCS) puede iniciar su clínica en la forma de GNRP. Estas entidades se caracterizan por una alta asociación a la presencia sérica de ANCA y una inmunofluorescencia denominada *pauci immune* en la biopsia renal.

Los anticuerpos anti-GBM en suero son de gran utilidad en el diagnóstico de la GNRP tipo I mientras que la determinación de los ANCA es de utilidad para el diagnóstico de las formas de GNRP como la GW o la PAM. La prevalencia de anticuerpos anti-GBM y ANCA en los pacientes con GNRP oscila entre el 60 y el 90% según las diferentes series²⁻⁸ y el pronóstico de pacientes con GNRP tipo I y III depende en gran medida de la posibilidad de realizar un diagnóstico precoz para poder instaurar rápida-

mente una terapia eficaz⁹. Es por ello que se recomienda realizar lo antes posible una determinación serológica de ANCA y anticuerpos anti-GBM.

La determinación serológica de anticuerpos anti-GBM se realiza a través de una técnica de ELISA contra el antígeno del extremo C-terminal de la cadena α_3 del colágeno tipo IV. Estos anticuerpos están considerados marcadores biológicos de las GNRP tipo I. En la práctica clínica, se utilizan dos técnicas para la detección de ANCA en suero: la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI) sobre neutrófilos humanos y las técnicas de ELISA frente a los antígenos purificados proteinasa-3 (PR3) y mieloperoxidasa (MPO). La combinación de ambas técnicas tiene una alta sensibilidad y especificidad diagnóstica de vasculitis sistémicas idiopáticas¹⁰. Sin embargo, la interpretación de la técnica de IFI requiere experiencia y personal cualificado, y el tiempo empleado en la realización de todas estas técnicas, tanto la IFI como los diferentes tipos de ELISA comentados, puede exceder las necesidades de diagnóstico precoz de estos pacientes. Por todo ello, el grupo de los doctores Westman y cols.¹¹ concibió la idea de poner a punto un nuevo tipo de ELISA rápido que agrupase en un solo test la detección de anticuerpos anti-GBM, ANCA anti-MPO y anti-PR3 en un tiempo inferior al de las técnicas de detección habituales (30 minutos).

Nuestro objetivo fue analizar la concordancia de los resultados entre las técnicas habituales de laboratorio para la detección de anticuerpos anti-GBM (ELISA semicuantitativo) y de ANCA (ELISAs semicuantitativos anti-PR3 y anti-MPO y técnica de IFI) con el ELISA de detección rápida. También analizamos la distribución de estos resultados según el diagnóstico final de nuestros pacientes en GNRP tipo I y III.

PACIENTES Y MÉTODOS

Pacientes

Durante un período de tiempo de 2 años hemos analizado de forma prospectiva en nuestro laboratorio 71 muestras de suero de pacientes con alta sospecha de GNRP. Se trataba de 71 enfermos, 35 hombres y 36 mujeres, con una media de edad de 59,73 \pm 19,18 años (rango 9-93 años) (ver tabla I).

Para el diagnóstico de GNRP tipo I se requirió la demostración histológica de una glomerulonefritis necrotizante con proliferación extracapilar con depósitos lineales de IgG y C3 a nivel del capilar glomerular. Para el diagnóstico de GNRP tipo III se requirió la demostración histológica de una glomerulonefritis necrotizante segmentaria y focal *pauci immune* con proliferación extracapilar. Dentro de este grupo el diagnóstico de GW, PAM, SCS o VLR se realizó de acuerdo con las definiciones de la Conferencia de consenso de Chapel-Hill¹².

De acuerdo con estos criterios, 8 pacientes fueron diagnosticados de GNRP tipo I y 22 de GNRP tipo III. El resto, 41 pacientes, agrupó un conjunto de enfermos posteriormente diagnosticados de diferentes tipos de enfermedades que no incluyó ni GNRP tipo I ni GNRP tipo III.

Métodos

Los ELISAs semicuantitativos para la detección de anticuerpos anti-GBM y ANCA anti-PR3 fueron realizados siguiendo las instrucciones del fabricante (Wieslab. Lund. Suecia). El ELISA anti-MPO fue rea-

Tabla I. Resultados de las técnicas de ELISA de detección rápida, ELISAs semicuantitativos e IFI agrupados según diagnóstico

Diagnóstico	ELISA rápido			ELISAs semicuantitativos			IFI		
	n	anti-GBM	anti-PR3	anti-MPO	anti-GBM	anti-PR3	anti-MPO	C-ANCA	P-ANCA
GNRPI	8	8	0	4	8	0	4	0	2
GNRP III	22	0	2	19	0	2	20	2	20
PAM	18	0	0	17	0	0	18	0	18
GW	3	0	2	1	0	2	1	2	1
SCS	1	0	0	1	0	0	1	0	1
OTROS	41	0	1	0	1	1	0	1	0
TOTAL	72	9	3	23	10	3	24	3	24

GNRPI: glomerulonefritis rápidamente progresiva de tipo I. GNRPIII: glomerulonefritis rápidamente progresiva de tipo III. PAM: poliangeítis microscópica. GW: granulomatosis de Wegener. SCS: síndrome de Churg-Strauss. Otros: grupo de pacientes que presentaba una alta sospecha inicial de padecer GNRP I o III, pero que posteriormente fueron diagnosticados de otras enfermedades que no fue GNRP tipo I, III ni enfermedad vasculítica. Anti-GBM: sueros con anticuerpos anti-membrana basal glomerular. Anti-PR3: sueros con ANCA anti-PR3. Anti-MPO: sueros con ANCA anti-MPO. C-ANCA: sueros con ANCA patrón citoplasmático. P-ANCA: sueros con ANCA patrón perinuclear.

lizado por una técnica previamente descrita¹³ y ligeramente modificada¹⁴. Brevemente, utilizamos placas NUNC que fueron sensibilizadas con 1,5 µg de MPO (Calbiochem, La Jolla, EE.UU.). Los sueros se testaron a una dilución 1/100 en PBS con BSA 1% y Tween20 0,05%. Posteriormente, se añadió un anticuerpo anti-IgG humano conjugado con fosfatasa alcalina (Dako, Barcelona, España) diluido 1/1.000. Revelamos con p-nitrofenolfosfato. La lectura se hizo a una densidad óptica de 405 nm con un lector de placas Dinattech. Los sueros fueron comparados con una curva estándar y considerados positivos si superaban un valor de 20 UE/ml (unidades de ELISA/ml).

La detección por IFI de ANCA sobre neutrófilos fijados en etanol fue realizada siguiendo las indicaciones de Wiik A y cols.¹⁵.

El ELISA de detección rápida para la identificación combinada de ANCA anti-MPO, anti-PR3 y anticuerpos anti-GBM fue realizado según las instrucciones del fabricante (Wieslab. Lund. Suecia). Brevemente, el suero de cada uno de los pacientes y los controles fueron incubados diluidos 1:4 frente a los antígenos MPO, PR3, el antígeno del anticuerpo anti-GBM y contra albúmina sérica humana durante 10 minutos en una misma placa de microtier. Como anticuerpo conjugado se utilizó una IgG anti-IgG humana conjugada con fosfatasa alcalina y como sustrato se empleó p-nitrofenolfosfato. La reacción se leyó a una densidad óptica (DO) de 405 nm. Los resultados fueron considerados positivos si la relación entre $DO_{\text{suero}}/DO_{\text{control negativo}}$ era superior a 4. Por el contrario, si la relación era inferior a 3 la prueba se consideraba negativa. Los valores comprendidos entre 3 y 4 se consideraban dudosos. En su conjunto, el tiempo estimado para la realización de esta prueba fue de 30 minutos.

Los resultados de los ELISAs semicuantitativos anti-GBM, anti-PR3 y anti-MPO y del ELISA rápido fueron categorizados en valores positivos y negati-

vos. La concordancia entre estos valores fue analizada por el test de la χ^2 . En el análisis de datos se empleó el paquete estadístico Statgraphics plus for Windows 4.0 (Statistical Graphics Corp.). Se consideraron significativos aquellos resultados del test con una $p < 0,05$.

RESULTADOS

Concordancia

No se constataron diferencias significativas entre los resultados obtenidos por los diferentes tipos de ELISA semicuantitativos y ELISA rápido ($p > 0,05$). Tampoco se encontraron diferencias significativas entre los valores C-ANCA y P-ANCA de la IFI con respecto a los resultados para ANCA anti-PR3 y anti-MPO respectivamente por ELISA rápido ($p > 0,05$).

De los 9 casos positivos para anticuerpos anti-GBM por ELISA semicuantitativo, 8 también lo fueron por ELISA rápido (88,9%) y un caso fue negativo (tabla II). Un resultado anti-GBM dudoso por ELISA rápido resultó negativo por la técnica de ELISA semicuantitativo.

De los 24 casos anti-MPO positivos por ELISA semicuantitativo, y P-ANCA positivos por IFI, 23 fueron ANCA anti-MPO positivos por ELISA rápido (95,8%) y un caso fue considerado dudoso.

Hubo 3 casos ANCA anti-PR3 positivos por ELISA semicuantitativo y C-ANCA positivos por IFI que fueron ANCA anti-PR3 positivos por ELISA rápido (100%).

Diagnóstico

En la tabla I se presentan los resultados de las diversas técnicas estudiadas según diagnóstico.

El 100% de los pacientes diagnosticados de GNRP tipo I tenían anticuerpos anti-GBM (8/8) por ELISA semicuantitativo y por ELISA rápido. En nuestra serie, un 50% (4/8) de estos pacientes también poseía ANCA anti-MPO (P-ANCA) por ELISA semicuantitativo y rápido.

Dentro del grupo con GNRP tipo III encontramos pacientes con PAM, GW, SCS y VLR. Los enfermos con PAM poseían ANCA anti-MPO por ELISA semicuantitativo con patrón P-ANCA en un 100% de los casos (18/18), de los que un 94,4% (17/18) también eran ANCA anti-MPO por ELISA rápido y un 5,5% (1/18) era dudoso para ANCA anti-MPO por esta técnica. Los 3 pacientes con GW presentaron ANCA sérico en un 100% de los casos por las diferentes técnicas empleadas en este estudio (2 ANCA anti-

Tabla II. Análisis de la concordancia entre las técnicas de ELISA semicuantitativo, rápido e IFI

		IFI		
		P-ANCA	C-ANCA	
ELISA rápido	Anti-MPO	23/24	—	
	Anti-PR3	—	3/3	
		ELISAs semicuantitativos		
		GBM	MPO	PR-3
ELISA rápido	Anti-GBM	8/9	—	—
	Anti-MPO	—	23/24	—
	Anti-PR3	—	—	3/3

PR3 con patrón C-ANCA, 1 ANCA anti-MPO con patrón P-ANCA). El único paciente con SCS mostró ANCA anti-MPO por ELISA semicuantitativo y rápido con patrón P-ANCA.

En los pacientes que no fueron diagnosticados ni de GNRP tipo I ni de GNRP tipo III (41 casos), 39 fueron negativos por todas las técnicas estudiadas. Sólo un caso de artritis reumatoide fue ANCA anti-PR3 positivo, y patrón C-ANCA, por ELISA semicuantitativo (30 UE/ml) y rápido (coeficiente de 5,1). Otro paciente diagnosticado de glomerulonefritis proliferativa mesangial inmunonegativa fue ELISA anti-GBM semicuantitativo positivo (21 UE/ml) y ELISA rápido para anti-GBM negativo. En ambos casos se trataba de positividad débil.

DISCUSIÓN

La utilidad de los anticuerpos anti-GBM y de los ANCA en el diagnóstico de las GNRP tipo I y III respectivamente está bien establecida. Los anticuerpos anti-GBM son considerados marcadores biológicos de síndrome de Goodpasture o de enfermedad por anticuerpos anti-GBM. Asimismo, en el diagnóstico de GNRP tipo III, y más concretamente en las vasculitis como GW, PAM o VLR, combinando las técnicas de IFI sobre neutrófilos humanos y ELISA anti-PR3 y anti-MPO, la sensibilidad oscila entre 67-82% con una especificidad del 99%¹⁰.

La enfermedad por anticuerpos anti-GBM es una entidad con una alta mortalidad a pesar de aplicar tratamiento inmunodepresor y plasmaféresis (20% al año de seguimiento). La supervivencia renal al año de seguimiento depende del grado de insuficiencia renal en el momento del diagnóstico. Así, los pacientes que se diagnostican con niveles de creatinina inferiores a 6 mg/dl tienen porcentajes de función renal al año que oscilan entre el 36 y el 93% en función de las series¹⁶⁻¹⁹ mientras que los pacientes que se diagnostican con creatinina superior a 6 mg/dl no suelen recuperar función renal a pesar del tratamiento inmunodepresor.

Las vasculitis ANCA positivas son enfermedades agresivas que tienen una morbi-mortalidad alta a pesar del tratamiento. La supervivencia del paciente al primer año oscila entorno a un 80%^{20,21}. Hoffman y cols.²² encontró afectación irreversible de los órganos en un 86% de estos pacientes. La presencia de hemorragia pulmonar o afectación renal se consideran factores de mal pronóstico general. El mejor predictor de la supervivencia renal es la cifra de creatinina en el momento del diagnóstico y el porcentaje de glomérulos sanos en la biopsia renal^{23,24}.

Los datos presentados anteriormente justifican la necesidad de realizar un diagnóstico precoz como hecho fundamental para mejorar el pronóstico renal y general de estos enfermos. Para ello se requiere que ante la sospecha clínica de alguna de estas entidades se realice el test de determinación de anticuerpos anti-GBM y/o ANCA. Ello nos permitirá por un lado tener una primera aproximación diagnóstica y por otro nos permitirá iniciar tratamiento hasta tener el resultado de la biopsia renal que confirmará definitivamente el diagnóstico.

Los resultados obtenidos por los tests semicuantitativos para anticuerpos anti-GBM, anti-PR3 o anti-MPO han mostrado una alta concordancia con los resultados del ELISA de detección rápida. Igualmente, ha habido una gran concordancia entre los resultados de la técnica de IFI para los patrones C-ANCA y P-ANCA con los valores obtenidos por la técnica de detección rápida para los ANCA anti-PR3 y anti-MPO respectivamente.

En nuestro estudio, el test de ELISA semicuantitativo y el test de ELISA rápido mostraron igual eficacia en el diagnóstico de GNRP tipo I. El test de ELISA semicuantitativo demostró una ligera mejor eficacia en el diagnóstico de GNRP tipo III respecto al ELISA de detección rápida. Sin embargo, el ELISA semicuantitativo dio un resultado positivo para anticuerpos anti-GBM en un paciente que no sufría de GNRP tipo I ni de GNRP tipo III.

En resumen, los resultados obtenidos a partir de nuestro grupo de pacientes confirman que el test de detección rápida es una herramienta muy útil en el diagnóstico diferencial de las glomerulonefritis asociadas a anticuerpos anti-GBM y a ANCA anti-PR3 y anti-MPO. Su utilización es recomendable en aquellos pacientes con alta sospecha de una de estas enfermedades, sobre todo si está acompañada de un gran deterioro en la función renal. Sin embargo, para concretar el diagnóstico final recomendamos que una vez se hayan realizado las pruebas de detección rápida éstas sean siempre validadas mediante las técnicas convencionales de detección de estos anticuerpos anti-GBM o ANCA y por una biopsia renal.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado con la beca FIS 99/0283. Nuestro agradecimiento a los Dres. Martínez Veá (Hospital Joan XXIII), Valdés y Javaloyas (Hospital de Viladecans) y Cuevas (Hospital de Terrassa) por su colaboración en la recogida de sueros. Agradecemos también la participación de Laboratorios Menarini que nos suministraron los ELISA de detección rápida.

BIBLIOGRAFÍA

1. Bosch X, Mirapeix E, Font J, Borrellas X, Rodríguez R, López-Soto A y cols.: Prognostic implication of anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies with myeloperoxidase specificity in anti-glomerular basement membrane diseases. *Clin Nephrol* 36: 107-13, 1991.
2. Saxena R, Bygren P, Arvastson B, Wieslander J: Circularizing autoantibodies as serological markers in the differential diagnosis of pulmonary renal syndrome. *J Intern Med* 238: 143-52, 1995.
3. Kallenberg CGM, Brouwer E, Weening JJ, CohenTervaert JW: Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies. Current diagnostic and pathophysiological potential. *Kidney Int* 46: 1-15, 1994.
4. Jayne DRW, Marshall PD, Jones SJ, Lockwood CM: Autoantibodies to GBM and neutrophil cytoplasm in rapidly progressive glomerulonephritis. *Kidney Int* 37: 965-70, 1990.
5. Andrassy K, Küster S, Waldherr R, Ritz E: Rapidly progressive glomerulonephritis: analysis of prevalence and clinical course. *Nephron* 59: 206-12, 1991.
6. Angangco R, Thiru S, Esnault VLM, Short AK, Lockwood CM, Oliveira DBG: Does truly «idiopathic» crescentic glomerulonephritis exist? *Nephrol Dial Transplant* 9: 630-6, 1994.
7. Levy JB, Winearls CG: Rapidly progressive glomerulonephritis: what should be first-line therapy? *Nephron* 67:402-7, 1994.
8. Ara J, Mirapeix E, Rodríguez R, Saurina A, Darnell A: Relationship between ANCA and disease activity in small vessel vasculitis patients with ANCA anti-MPO. *Nephrol Dial Transplant* 14: 1667-72, 1999.
9. Falk RJ, Hogan SL, Nachman PH, Jennette JC: Prognosis and treatment of systemic vasculitis: what is new? *Clin Exp Immunol* 120, Supl. 1: 11-2, 2000 (Abstract).
10. Hagen EC, Daha MR, Hermans J, Andrassy K, Csernok E, Gaskin G y cols., for the EC/BCR project for ANCA assay standardization: Diagnostic value of standardized assays for anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in idiopathic systemic vasculitis. *Kidney Int* 53: 743-53, 1998.
11. Westman KWA, Bygren PG, Eilert I, Wiik A, Wieslander J: Rapid screening assay for anti-GBM antibody and ANCAs; an important tool for the differential diagnosis of pulmonary renal syndromes. *Nephrol Dial Transplant* 12: 1863-8, 1997.
12. Jennette JC, Falk RJ, Andrassy K: Nomenclature of systemic vasculitides. Proposal of an international consensus conference. *Arthritis Rheum* 37: 187-92, 1994.
13. Hagen EC, Andrassy K, Csernok E, Daha MR, Gaskin G, Gross WL y cols.: Development and standardisation of solid phase assays for the detection of antineutrophil cytoplasmic antibodies. *J Immunol Methods* 196: 1-15, 1996.
14. Ara J, Mirapeix E, Rodríguez R, Pascual J, Álvarez L, Darnell A: Valor de los anticuerpos anticitoplasma del neutrófilo (ANCA) en el seguimiento de las vasculitis de pequeño vaso. *Med Clin (Barc)* 111: 536-8, 1998.
15. Wiik A, Rasmussen N, Wieslander J: Methods to detect autoantibodies to neutrophilic granulocytes. En: Van Veurooij WJ, Maini RD, editores. *Manual of Biological Markers of Disease*. Dordrecht: *Kluwer Academia Publishers* 1-14, 1993.
16. Briggs WA, Johnson JP, Teichman S, Yeager HC, Wilson CB: Antiglomerular basement membrane antibody-mediated glomerulonephritis and Goodpasture's syndrome. *Medicine (Baltimore)* 58: 348-61, 1979.
17. Simpson IJ, Doak PB, Williams LC, Blacklock HA, Hill RS, Herdson PB: Plasma exchange in Goodpasture's syndrome. *Am J of Nephrol* 2: 301-11, 1982.
18. Herody M, Bobrie G, Gouarin C, Grunfeld JP, Noel LH: Anti-GBM disease: predictive value of clinical, histological and serological data. *Clin Nephrol* 40: 249-55, 1993.
19. Saurina A, Ara J, Rodríguez R, Coll E, Poveda R, Martí-Vallès y cols.: Evolución clínica de la enfermedad por anticuerpos anti-membrana basal glomerular. *Nefrología* 19. Supl. 2: 19, 1999 (Abstract).
20. Levy JB, Winearls CG: Rapidly progressive glomerulonephritis: what should be first-line therapy? *Nephron* 67: 402-7, 1994.
21. Coward RA, Hamdy NAT, Shortland JS, Brown CB: Renal microvascularitis: a treatable condition. *Nephrol Dial Transplant* 1: 31-7, 1986.
22. Hoffman GS, Kerr GS, Leavitt RY, Hallahan CW, Lebovics RS, Travis WD: Wegener granulomatosis: an analysis of 158 patients. *Ann Intern Med* 116: 488-98, 1992.
23. Hogan SL, Nachman PH, Wilkman AS, Jennette JC, Falk RJ: Prognostic markers in patients with ANCA-associated microscopic polyangiitis and glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 7: 23-32, 1996.
24. Bajema IM, Hagen EC, Hermans J, Noël LH, Waldherr R, Ferrario F y cols.: The kidney biopsy as a predictor for renal outcome in ANA-associated necrotizing glomerulonephritis. *Kidney Int* 56: 1751-8, 1999.