

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRES  
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUIMICAS  
CARRERA DE BIOQUIMICA  
INSTITUTO SELADIS**



**VALORACIÓN DE LA PRUEBA DE INMUNOFLUORESCENCIA  
INDIRECTA PARA EL DIAGNÓSTICO DE HEPATITIS AUTOINMUNE  
TIPO 1, QUE UTILIZA COMO SUSTRATO CORTES HISTOLÓGICOS DE  
ESTOMAGO DE RATÓN.**

ELABORADO POR:

UNIV. VARGAS NATTEZ SANDRA GRISEL

TESINA PARA OPTAR AL TITULO DE LICENCIATURA EN BIOQUÍMICA

LA PAZ - BOLIVIA

2010

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS  
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICAS  
CARRERA DE BIOQUÍMICA  
INSTITUTO SELADIS**



**VALORACIÓN DE LA PRUEBA DE INMUNOFLUORESCENCIA  
INDIRECTA PARA EL DIAGNÓSTICO DE HEPATITIS AUTOINMUNE  
TIPO 1, QUE UTILIZA COMO SUSTRATO CORTES HISTOLÓGICOS DE  
ESTOMAGO DE RATÓN.**

ELABORADO POR:

UNIV. VARGAS NATTEZ SANDRA GRISEL

ASESORADO POR:

DR. LUIS FERNANDO SOSA TORDOYA

TESINA PARA OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIATURA EN BIOQUÍMICA

LA PAZ - BOLIVIA

2010

## **INDICE DE CONTENIDOS**

RESUMEN.....	1
CAP. I INTRODUCCION.....	2
CAP. II ANTECEDENTES.....	4
A. MARCO TEORICO.....	5
1. ESPECTRO DE LAS ENFERMEDADES AUTOINMUNES.....	5
1.1 ENFERMEDADES ESPECIFICAS DE ÓRGANOS.....	5
1.2 ENFERMEDADES NO ESPECIFICAS DE ÓRGANOS.....	5
2. HEPATOPATÍA AUTOINMUNE.....	6
2.1. AUTOANTICUERPOS EN LAS ENFERMEDADES HEPÁTICAS.....	6
2.1.1. ANTICUERPOS ANTINUCLEARES (ANA).....	7
2.1.2 ANTICUERPOS ANTI-MÚSCULO LISO (AML).....	8
2.1.3 ANTICUERPOS ANTI-MITOCONDRIALES (AMA).....	9
2.2 SÍNDROME DE SOBREPOSICIÓN AUTOINMUNE (SS).....	9
3. CIRROSIS BILIAR PRIMARIA (CBP).....	10
3.1 ETIOPATOGENIA DE LA CIRROSIS BILIAR PRIMARIA (CBP).....	11
3.3 DIAGNÓSTICO DE LA CIRROSIS BILIAR PRIMARIA (CBP).....	12
3.4 SÍNDROME DE SOBREPOSICIÓN (HAI) - (CBP).....	13
3.5 TRATAMIENTO DE LA CIRROSIS BILIAR PRIMARIA (CBP).....	13
4. COLANGITIS ESCLEROSANTE PRIMARIA (CEP).....	14
4.1 ETIOPATOGENIA DE LA (CEP).....	15
4.3 DIAGNÓSTICO DE LA (CEP).....	16
4.4 SÍNDROME DE SOBREPOSICIÓN: ENTRE (HAI) - (CEP).....	16
4.5 TRATAMIENTO DE LA (CEP).....	16
5. HEPATITIS AUTOINMUNE.....	17
5.1 CLASIFICACIÓN DE LA HEPATITIS AUTOINMUNE (HAI).....	19
5.1.1. HEPATITIS AUTOINMUNE DE TIPO 1.....	19
5.1.2 HEPATITIS AUTOINMUNE DE TIPO 2.....	19
5.1.3 HEPATITIS AUTOINMUNE TIPO 3.....	20
5.1.4 HEPATITIS AUTOINMUNE TIPO 4.....	20
5.2 ETIOLOGÍA DE LA HEPATITIS AUTOINMUNE (HAI).....	21
5.3. AUTOANTICUERPOS PRESENTES EN LA (HAI).....	21
5.3.1 ANTICUERPOS ANTINUCLEARES (ANA).....	22
5.3.2 ANTICUERPOS ANTIMÚSCULO LISO (AML).....	23
5.3.3 ANTICUERPOS FRENTE A (LKM) Y (LC).....	24
5.3.4 OTROS ANTICUERPOS EN LA (HAI).....	25

---

5.4 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL EN LA (HAI).....	25
5.4.1 CRITERIOS PARA EL DIAGNÓSTICO DE (HAI).....	25
5.5 TRATAMIENTO PARA LA HEPATITIS AUTOINMUNE.....	26
CAP III. JUSTIFICACION.....	27
CAP. IV PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	29
CAP. V OBJETIVOS.....	30
A. OBJETIVO GENERAL.....	30
B. OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	30
CAP. VI DISEÑO METODOLOGICO.....	31
A. PASOS PARA LA VALIDACIÓN DE UNA PRUEBA DIAGNÓSTICA.....	31
1. SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD.....	32
2 EFICIENCIA.....	32
3. VALOR PREDICTIVO.....	33
4. PRUEBAS DE CONCORDANCIA.....	33
5. PRUEBA DE CHI CUADRADO ( $X^2$ ).....	34
6. REPRODUCIBILIDAD.....	34
7. TEST DIAGNOSTICO.....	35
B. CRITERIOS DE INCLUSION Y EXCLUSION.....	35
1. CRITERIOS DE INCLUSION.....	35
2. CRITERIOS DE EXCLUSION.....	35
C. MUESTRAS.....	35
1. PANEL DE SUEROS DE INDIVIDUOS CON HAI.....	35
2. PANEL DE SUEROS DE INDIVIDUOS SANOS.....	36
D. MATERIAL BIOLÓGICO.....	36
E. DISEÑO DE ESTUDIO.....	36
F. MATERIAL Y METODOS.....	37
G. MÉTODO DE ANÁLISIS.....	37
1. INMUNOFLORESCENCIA INDIRECTA.....	37
1.1. OPTIMIZACIÓN DE LA TÉCNICA CASERA DE IFI.....	38
1.2. PREPARACIÓN DE LA GLOBULINA ANTIHUMANA, MARCADA CON FLUORESCÉINA.....	39
1.3. CORTES DE TEJIDO DE ESTÓMAGO DE RATONES.....	39
1.3.1. FIJACIÓN DE LOS CORTES HISTOLÓGICOS.....	39
1.4. DILUCIONES Y SIEMBRA DE LOS SUEROS.....	40
1.5. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS.....	40
2. ELISA KIT (TRINITY BIOTECH) PARA LA DETECCIÓN DE AMA.....	41

2.1. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS.....	41
3. IFI – ANA KIT (ORGENICS) PARA LA DETECCIÓN DE ANA	41
CAP VII RESULTADOS.....	43
A. TITULACIÓN DEL CONJUGADO.....	43
B. RESULTADOS OBTENIDOS DE LOS PANELES DE SUEROS.....	43
1. PRUEBAS DE CONCORDANCIA PAR EL GOLD ESTANDAR CON EL MÉTODO OPTIMIZADO.....	44
2. CORRELACIÓN DE LOS SUEROS POSITIVOS DE (AML-O) Y (AML-G) FRENTE A LOS (ANA) .....	45
2.1.CORRELACIÓN DE RESULTADOS DE (AML-G) CON LOS RESULTADOS DE ANA .....	45
2.2.CORRELACIÓN DE RESULTADOS DE (AML-G) CON LOS RESULTADOS DE ANA.....	46
3.CORRELACIÓN DE LOS SUEROS POSITIVOS DE (AML-O) Y EL (AML-G) FRENTE A LOS (AMA).....	46
3.1.CORRELACIÓN DE RESULTADOS DE (AML-O) CON LOS RESULTADOS DE AMA.....	47
3.2.CORRELACIÓN DE RESULTADOS DE (AML-G) CON LOS RESULTADOS DE AMA.....	47
4. RESULTADOS OBTENIDOS SEGÚN GÉNERO.....	48
5. RESULTADOS OBTENIDOS DE LA PRUEBA DE REPETIBILIDAD	49
CAPITULO VIII. DISCUSIÓN.....	50
CAPITULO IX. CONCLUSIÓN.....	54
CAP. X. REFERENCIA BIBLIOGRAFICA.....	55
ANEXOS.....	58

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>CUADRO 1. AUTOANTICUERPOS CONVENCIONALES EN EL ESTUDIO DE LAS ENFERMEDADES HEPÁTICAS.....</b>	<b>7</b>
<b>CUADRO 2. ESTADIOS ANÁTOMO-PATOLÓGICOS EN LA CIRROSIS BILIAR PRIMARIA. ....</b>	<b>12</b>
<b>CUADRO 3. CRITERIOS DIAGNÓSTICOS DE HEPATITIS AUTOINMUNE.....</b>	<b>18</b>
<b>CUADRO 4. AUTOANTICUERPOS PRESENTES EN LA HEPATITIS AUTOINMUNE.....</b>	<b>22</b>

---

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. ALGORITMO CLASIFICATORIO SEGÚN CRITERIOS SEROLÓGICOS PARA LA HEPATITIS AUTOINMUNE (HAI). ..... 20

FIGURA 2. PATRÓN HOMOGÉNEO EN UNA PRUEBA DE IFI PARA DETECTAR ANTICUERPOS ANTINUCLEARES ANA ..... 23

FIGURA 3. PATRÓN INMUNOFUORESCENTE EN UNA PRUEBA DE IFI PARA DETECTAR ANTICUERPOS ANTIMUSCULO LISO..... 24

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. FORMATO BÁSICO PARA LA CONSTRUCCIÓN DE UNA TABLA 2X 2, DONDE SE MUESTRAN LOS RESULTADOS QUE SE OBTIENEN POR 2 DIFERENTES MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO. .... 33

TABLA 2. TITULACIÓN DEL CONJUGADO GLOBULINA ANTIHUMANA, MARCADA CON FLUORESCÉINA..... 43

TABLA 3. RESULTADOS OBTENIDOS DE LOS PANELES DE SUEROS POSITIVO Y NEGATIVO DONDE SE MUESTRAN LOS RESULTADOS OBTENIDOS POR LA TÉCNICA OPTIMIZADA DE IFI QUE MIDE AML USANDO COMO SUSTRATO CORTES HISTOLÓGICOS DE ESTOMAGO DE RATÓN FRENTE A LOS RESULTADOS OBTENIDOS POR EL MÉTODO COMERCIAL..... 43

TABLA 4. COMPARACIÓN DE LA SENSIBILIDAD, ESPECIFICIDAD, EFICIENCIA Y LOS VALORES PREDICTIVOS DEL KIT COMERCIAL FRENTE AL MÉTODO OPTIMIZADO..... 44

TABLA 5. RESULTADOS E INTERPRETACIÓN DE LAS CONCORDANCIAS Y CORRELACIONES OBTENIDAS PARA EL MÉTODO VALIDADO DE ANTICUERPOS ANTI-MUSCULO LISO QUE USA COMO SUSTRATO CORTES HISTOLÓGICOS DE ESTOMAGO DE RATÓN..... 44

ÍNDICE DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1. CORRELACIÓN DE % ANA VS (AML-O).....	45
GRÁFICO 2. CORRELACIÓN % ANA VS AML-G.....	46
GRÁFICO 3. CORRELACIÓN % AMA VS AML-O.....	47
GRÁFICO 4. CORRELACIÓN % AMA VS AML-G.....	48
GRÁFICO 5. PORCENTAJE DEL TOTAL DE MUESTRAS SEGÚN GÉNERO.....	48
GRÁFICO 6. PORCENTAJE SEGÚN GÉNERO DE SUEROS POSITIVOS.....	49
GRÁFICO 7. PORCENTAJE DE REPETIBILIDAD.....	49

## RESUMEN

La hepatitis autoinmune (HAI) es uno de los ejemplos de enfermedades autoinmunes órgano específicas, que se caracteriza por una respuesta del sistema inmune hacia tejidos propios con presencia de anticuerpos dirigidos contra proteínas del citoesqueleto, generalmente frente a los filamentos de actina <sup>(1)</sup>. Los estudios realizados en Europa indican que la incidencia media anual es de 1,9 por 100.000 habitantes. Afecta predominantemente a las mujeres en una relación 3,6:1 con respecto a los hombres, siendo todas las edades y grupos étnicos susceptibles. El 40% de los pacientes con enfermedad severa no tratada mueren a los 6 meses del diagnóstico <sup>(5)</sup>.

La determinación de los anticuerpos antimúsculo liso (AML), se utiliza principalmente para apoyar el diagnóstico de HAI tipo 1. El propósito de este trabajo es valorar una prueba optimizada de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI), usada para la identificación de AML en pacientes con diagnóstico presuntivo de HAI tipo 1, para lo cual se utilizó como sustrato cortes histológicos a congelación de estomago de ratón. Los resultados obtenidos en este estudio para la prueba optimizada presentan una sensibilidad del 100%, una especificidad del 95%, eficiencia del 96%. Los valores predictivos positivos y negativo de 89.3% y 100% respectivamente. También se determinó el grado de correlación que existe entre los resultados de ambas pruebas tanto para el kit comercial (Gold estandar) como para la prueba optimizada, para tal efecto se utilizó el índice de Kappa que mostró un valor de **0.82**, que de acuerdo al score que maneja este índice puede clasificarse en “**muy buena**”, el valor de chi cuadrado encontrado fue de **60.29** lo que nos indica que existe una buena correlación entre ambas pruebas. Conjuntamente, se correlacionaron los resultados obtenidos de anticuerpos antimúsculo liso (AML), anticuerpos antinucleares (ANA) y anticuerpos antimitocondriales (AMA), donde se encontró que el patrón predominante para ANA en los sueros positivos para AML fue el **difuso** con un porcentaje del **56 %**, en cuanto a los AMA se encontró que el **20%** de los sueros positivos para AML resultaron ser positivos para AMA debido posiblemente a la existencia de casos de “sobreposición”. Al realizarse la prueba de repetibilidad encontramos un 90% de aciertos para el método optimizado esto quiere decir que estos datos incrementa la confianza en la prueba validada, sin embargo por la cantidad de falsos positivos encontrados nos indican que la prueba de tamizaje de IFI-AML debe ser necesariamente acompañada de pruebas de mayor especificidad y sensibilidad como ser la prueba de AMA, para poder descartar la presencia de cirrosis biliar primaria (CBP) o la prueba de ANA para identificar los patrones fluorescentes predominantes.

**Palabras clave.** HAI, IFI, AML, ANA, AMA Y SOBREPOSICIÓN.



## **CAP. I INTRODUCCION**

Cuando nos referimos a enfermedades autoinmunes relacionadas con el hígado debemos considerar lo siguiente:

- 1) La intolerancia puede estar dirigida a antígenos comunes al hígado y a alguna otra parte en el contexto de una enfermedad autoinmune sistémica (Lupus Eritematoso Sistémico y el Síndrome de Budd Chiari).
- 2) La intolerancia puede estar dirigida contra antígenos propios del hígado, lo que constituiría una enfermedad autoinmune hepática. Si el blanco de la respuesta autoinmune son los conductos biliares se presenta la Cirrosis Biliar primaria (CBP) o la Colangitis Esclerosante Primaria (CEP); y si los hepatocitos son los afectados, entonces se habla de Hepatitis Autoinmune (HAI).<sup>(1-4)</sup>

Las hepatopatías autoinmunes incluyen tres enfermedades autoinmunes mayores denominadas (HAM): La colangitis esclerosante (CEP), cirrosis biliar primaria (CBP) y hepatitis autoinmune (HAI), en las cuales existen alteraciones de la inmunidad humoral y celular y que se caracterizan, además por la presencia de autoanticuerpos que son esenciales, en muchos casos, para llegar a establecer el diagnóstico.<sup>(2)</sup> Para definir cada una de la HAM, estas deben cumplir una serie de criterios clínicos, bioquímicos, histológicos y colangiográficos.<sup>(3)</sup>

La hepatitis autoinmune es uno de los ejemplos de enfermedades autoinmunes órgano específicas que puede ser desarrollada por un individuo, que se caracteriza por una respuesta del sistema inmune hacia tejidos propios, Las hepatitis autoinmunes se caracterizan por la presencia de anticuerpos dirigidos contra proteínas del citoesqueleto, generalmente frente a los filamentos de actina, pero también pueden estar dirigidos frente a miosina, troponina y tropomiosina.<sup>(1)</sup> El porcentaje de pacientes con hepatitis autoinmune que presentan AML en su suero es del 52 al 85%, en cuanto a los enfermos de cirrosis biliar primaria el 22% presentan AML y en menor proporción 10% los que cursan por una infección viral como la mononucleosis infecciosa.<sup>(1)</sup>

En Bolivia hasta el momento no se han encontrado reportes acerca de la prevalencia de esta enfermedad, no obstante en el laboratorio de Histocompatibilidad e Inmunogenética del SELADIS-FCFB-UMSA, con la finalidad de responder a las necesidades de los pacientes y médicos, se han estandarizado, optimizado y validado una serie de pruebas de laboratorio.

Entre las que se encuentran detección de: anticuerpos antinucleares, anticuerpos antimitocondriales (por publicar); En el caso de la hepatitis autoinmune en el instituto SELADIS se ha optimizado una prueba de IFI que utiliza como sustrato a riñón de ratón para detectar la presencia de anticuerpos antimúsculo liso; pero hasta la fecha no se conoce el valor diagnóstico de esta prueba por lo que el presente trabajo pretende determinar la sensibilidad y eficacia de este método para de esta forma conocer su valor diagnóstico, por lo cual es una prioridad del laboratorio realizar la validación de la prueba que detecta AML para realizar una correcta discriminación entre CBP y HAI tipo 1 y tipo 2 y también realizar un estudio sobre la prevalencia de esta enfermedad según sexo y edad para tener antecedentes sobre esta enfermedad en nuestro medio.

.

## **CAP. II ANTECEDENTES**

El primer reporte de la enfermedad de hepatitis autoinmune se debe a Jan Waldenström quien en el año 1950 describió una forma de hepatopatía crónica que afectaba principalmente a mujeres jóvenes y se manifestaba por ictericia, hipergammaglobulinemia, amenorrea y en los últimos estadios ascitis. Posteriormente en 1955 la asociación con el síndrome de lupus eritematoso fue observada, pero el término de hepatitis lúpica fue propuesto en el año 1956<sup>(4)</sup>; En 1992, el Grupo Internacional para el estudio de esta enfermedad recomendó el nombre de hepatitis autoinmune, el cual es aceptado universalmente en los momentos actuales.<sup>(4-5)</sup> Los anticuerpos antimúsculo liso (AML) fueron identificados por primera vez por Johnson en 1965 sobre secciones de estómago de ratón por la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI) en pacientes con hepatitis autoinmune de tipo I (HAI-1), posteriormente llamada “Hepatitis crónica activa”.<sup>(28)</sup>

En el año 2007 Choque publicó un estudio relacionado al tema, el cual lleva por título “Determinación de la sensibilidad y especificidad de la prueba de IFI-ANA frente a un ensayo inmunoenzimático para antígenos nucleares extractables (perfil ENA)”, que fue realizado en el Instituto SELADIS FCFB - UMSA. La sensibilidad encontrada en este estudio fue de 70.96%, especificidad 85.87%, valores predictivos positivo y negativo de 77.88% y 80.85% respectivamente. También se determinó el grado de correlación que existe entre los resultados de ambas pruebas y el índice Kappa encontrado fue de 0.58 que corresponde a una correlación moderada. Estos resultados indicaron que la prueba de tamizaje FANA debe ser necesariamente acompañada por pruebas de mayor sensibilidad y especificidad como ser el perfil ENA, Anti Ds-DNA, lo que a su vez permitirá una mejor correlación entre el laboratorio y la clínica del paciente.<sup>(40)</sup>

En el año 2009 Poma realizó la evaluación de la prueba de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) para diagnosticar cirrosis biliar primaria (CBP) que detecta anticuerpos antimitocondriales (AMA). En la que evalúa tres sustratos que fueron: corte histológico (riñón de ratón), células Hep-2 (células epiteliales derivadas del carcinoma laríngeo) y células BHK-21 (Monocapa de fibroblastos de riñón de hámster sirio) que se fueron comparando con la prueba confirmatoria

Gold Estandar ELISA (ensayo inmunoenzimático) que mide anticuerpos anti antígenos M2 mitocondriales marca (Trinity Biotech). Los cortes criostáticos de riñón de ratón mostraron ser los más eficientes con una sensibilidad y especificidad de 92% respectivamente. Además mostraron emitir resultados de mayor concordancia con el método de ELISA considerado como Gold estándar (Kappa 0.84). En general se conoce que la sensibilidad y especificidad de los métodos de IFI para AMA son del 95%. Estos resultados mostraron que el método evaluado era tan bueno como los ofertados por las diferentes casas comerciales. <sup>(41)</sup>

## **A. MARCO TEORICO**

### **1. ESPECTRO DE LAS ENFERMEDADES AUTOINMUNES**

Las enfermedades autoinmunes se desarrollan cuando existe una falla en la tolerancia hacia los propios antígenos, ocasionando un aumento en la producción de autoanticuerpos en suero, dirigidos en contra de una variedad de antígenos celulares y extracelulares. La detección de estos es una importante herramienta para el diagnóstico de estas enfermedades, pero la ausencia de estos no es una regla para la existencia de una enfermedad autoinmune <sup>(6)</sup>.

Las enfermedades autoinmunes están clasificadas dentro de 2 grandes grupos:

#### **1.1 Enfermedades específicas de órganos**

Caracterizado por la producción de autoanticuerpos órgano específico, entre estas enfermedades específicas de órganos se encuentran la tiroiditis de Hashimoto, tirotoxicosis, anemia perniciosa, enfermedad de Addison, infertilidad masculina, Miastemia gravis, diabetes juvenil <sup>(5)</sup>.

#### **1.2 Enfermedades no específicas de órganos**

Las enfermedades autoinmunitarias órgano inespecíficas representadas por lupus eritematoso sistémico (LES), se caracterizan por presentar reactividad autoinmune contra núcleos de células normales o sus antígenos citoplasmáticos de órganos no específicos distribuidos ampliamente. Por lo general intervienen muchos antígenos propios, tales enfermedades también pueden desarrollarse después de respuestas autoinmunitarias anormales contra un solo antígeno blanco, el cual esta expresado en diferentes órganos <sup>(5)</sup>. Los cambios patológicos están diseminados en forma amplia y en general se trata de lesiones del tejido conectivo con necrosis fibrinoide. Se

observa en la piel (erupción facial con forma de mariposa), sufren también alteraciones severas de glomérulos renales, las articulaciones, las membranas serosas y los vasos sanguíneos <sup>(2)</sup>.

## **2. HEPATOPATÍA AUTOINMUNE**

Las hepatopatías autoinmunes incluyen tres enfermedades en las cuales existen alteraciones de la inmunidad humoral y celular y que se caracterizan, además por la presencia de auto-anticuerpos que son esenciales, en muchos casos, para llegar a establecer el diagnóstico <sup>(1)</sup>. Por la importancia que tienen la hepatitis autoinmune, la cirrosis biliar primaria y la colangitis esclerosante primaria dentro del espectro de enfermedades autoinmunes del hígado, se ira desglosando cada una de ellas poniendo principal enfoque en la primera siendo que en esta es de notable importancia la presencia o no de los anticuerpos antimúsculo liso, por la utilidad que tienen para apoyar el diagnóstico de hepatitis autoinmune, además que es muy importante para la diferenciación entre la hepatitis autoinmune de tipo 1 de la de tipo 2 .

### **2.1. Autoanticuerpos en las enfermedades hepáticas**

Los autoanticuerpos son inmunoglobulinas que están dirigidas contra proteínas normales del huésped y su presencia en las enfermedades hepáticas implica que ciertos mecanismos inmunológicos han sido activados <sup>(24)</sup>. La activación de estos mecanismos inmunológicos puede estar involucrada de manera directa con los procesos patogénicos de la enfermedad o ser una repuesta secundaria a la destrucción de las células hepáticas y la liberación de antígenos no específicos. A la fecha, ninguno de los autoanticuerpos descritos en las enfermedades hepáticas tiene un papel patogénico y muchos no son específicos de la enfermedad, más aun, los títulos de anticuerpos varían durante el curso de la enfermedad, su expresión puede desaparecer y reaparecer y no existe buena correlación entre los niveles de anticuerpos y la actividad de la enfermedad. <sup>(25)</sup>

Los anticuerpos usualmente solicitados para el diagnóstico de las enfermedades autoinmunes del hígado son los anticuerpos antinucleares (ANA), anticuerpos antimúsculo liso (AML), anticuerpos anti-mitosomas de hígado-riñón tipo 1 (anti-LKM1), anticuerpos anti-

mitocondriales (AMA) y anticuerpos anti-citoplasma de neutrófilos perinucleares (p-ANCA), ya que los ensayos para su detección en suero habitualmente se encuentran disponibles (Cuadro 1).<sup>(24)</sup>

**CUADRO 1 Autoanticuerpos convencionales en el estudio de las Enfermedades hepáticas (Czaja et al., 2001)**

Tipo de auto-anticuerpo	Antígenos blanco	Aplicaciones clínicas
Anticuerpos anti-nucleares (ANA)	Histonas, ribonucleoproteínas, centrómeros de los cromosomas	Marcadores de hepatitis autoinmune tipo 1 Marcadores de gravedad en CBP Síndrome de sobreposición HAI/CBP
Anticuerpos anti-músculo liso (SMA)	Tubulina, actina, filamentos intermedios	Marcadores de hepatitis autoinmune tipo 1 Síndrome de sobreposición HAI/CBP
Anticuerpos anti-mitocondriales (AMA)	Auto-antígenos mitocondriales subtipo M2: subunidad E2 del complejo piruvato deshidrogenasa (2-oxo-ácido deshidrogenasa, $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa e hidrolipoamida deshidrogenasa)	
Anticuerpos anti-microsomas de hígado-riñón tipo 1 (anti-LKM1)	Enzimas CYP2D6 del citocromo P450	Marcador de hepatitis autoinmune tipo 2
Anticuerpos anti-citoplasma de neutrófilos perinucleares (p-ANCA)	Probablemente contra una proteína mielóide de la envoltura nuclear de 50-kD	Marcadores de colangitis esclerosante primaria, colitis ulcerativa y en la evaluación de pacientes con hepatitis criptogénica

HAI: hepatitis autoinmune; CBP: cirrosis biliar primaria; CYP: citocromo P450.

Por la importancia que amerita a este trabajo de investigación solo se describirán tres de estos anticuerpos: ANA, ASMA, ANA.

### **2.1.1. Anticuerpos antinucleares (ANA)**

Los ANA pueden presentarse en varias enfermedades hepáticas y no hepáticas y constituyen el marcador prototipo de la reactividad inmunológica. Estos anticuerpos pueden encontrarse en la hepatitis autoinmune, hepatitis virales, enfermedad grasa del hígado no alcohólica, enfermedad hepática inducida por medicamentos, varias enfermedades no hepáticas y se han reportado hasta en 32% de las mujeres sanas de la tercera edad.<sup>(22)</sup>

Los ANA reaccionan contra varios antígenos nucleares incluyendo histonas, ribonucleoproteínas y centrómeros de los cromosomas. Los ANA son los anticuerpos más característicos de la hepatitis autoinmune y en estos pacientes la reactividad nuclear no tiene correlación con el patrón homogéneo o moteado que se observa en la inmunofluorescencia indirecta; además, carecen de especificidad diagnóstica o valor pronóstico.<sup>(26)</sup>

Los pacientes con hepatitis autoinmune y ANA comparten las mismas características de los pacientes sin estos anticuerpos en relación con edad, género, niveles de aminotransferasas y respuesta al tratamiento inmunosupresor. En estos pacientes los ANA pueden desaparecer y reaparecer durante el curso de la enfermedad y comúnmente coexisten con los AML. Los títulos de anticuerpos no se correlacionan con la gravedad de la enfermedad y su determinación no debe utilizarse como parámetro de respuesta al tratamiento. Los pacientes que después del tratamiento alcanzan respuesta sostenida pueden perder los ANA de manera permanente, pero esto generalmente se presenta después de un largo periodo de inactividad de la enfermedad. <sup>(18)</sup> En los pacientes con cirrosis biliar primaria los ANA están presentes en 30% a 50%. Algunos estudios han demostrado que la presencia de ANA en pacientes con CBP caracteriza un subgrupo de pacientes con enfermedad más agresiva y con mayor riesgo de presentar falla hepática. <sup>(25)</sup>

### **2.1.2 Anticuerpos anti-músculo liso (AML)**

Los anticuerpos antimúsculo liso (AML) fueron identificados por primera vez por Johnson en 1965 sobre secciones de estomago de ratón por la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI) en pacientes con hepatitis autoinmune de tipo I (HAI-1), posteriormente llamada “Hepatitis crónica activa”. <sup>(28)</sup> Dentro de poco tiempo otros blancos antigénicos de los (AML) fueron reconocidos en otros tejidos inicialmente en el mesangio glomerular por Whittingham en 1966, posteriormente 3 tipos de reactividad a los (AML) fueron reportados: hacia los glomérulos renales (AML-g); túbulos renales (AML-t) y sobre el músculo vascular (AML-v) que fueron descrito por Bottazo en 1976. <sup>(27)</sup>

Estos anticuerpos están dirigidos contra la actina, tubulina y los filamentos intermedios, siendo el antígeno blanco principal la actina y se encuentran hasta en 75% de los pacientes con hepatitis autoinmune. Los AML se determinan principalmente para apoyar el diagnóstico de hepatitis autoinmune, ya que su presencia no se asocia con la gravedad de la enfermedad o con la respuesta al tratamiento inmunosupresor. Además, no son específicos de la enfermedad o de afección hacia un órgano en particular, ya que pueden encontrarse en otras enfermedades hepáticas, diferentes enfermedades infecciosas y neoplasias. Debido a que los ANA y AML frecuentemente se presentan de manera concomitante y ambos son autoanticuerpos no específicos para la enfermedad, parece que los mecanismos por los que se generan son similares y no juegan

un papel central en los procesos patogénicos. Los AML son determinados por inmunofluorescencia indirecta en tejido gástrico o renal murino; si bien, en un futuro parece que la técnica de EIA para detectar anticuerpos contra actina reemplazará a la técnica de inmunofluorescencia indirecta, los títulos séricos de 1:20 o mayores son considerados positivos para AML por inmunofluorescencia indirecta.<sup>(25)</sup>

### **2.1.3 Anticuerpos antimitocondriales (AMA)**

Estos anticuerpos son marcadores de diagnóstico para CBP y están dirigidos contra el complejo enzimático de las 2-oxo-ácido deshidrogenasas. Los antígenos blanco son la dihidrolipoamida aciltransferasa (subunidad E2) del complejo enzimático piruvato deshidrogenasa e incluyen las subunidades E2 de la piruvato deshidrogenada (PDC-E2), 2-oxo-ácido deshidrogenasa (OADC-E2) y la 2-oxoglutamato deshidrogenasa (OGDC-E2). Los AMA en los pacientes con CBP son los anticuerpos con mayor sensibilidad de todas las enfermedades hepáticas y su especificidad para distinguir pacientes con CBP de pacientes con hepatitis autoinmune es de 92%.<sup>(28)</sup>

La presencia de anticuerpos antimitocondriales (AMA) en el suero de los pacientes con CBP es un indicador diagnóstico de primera magnitud y se hallan en más del 95% de los pacientes<sup>(27)</sup>. Usualmente se detectan por IFI, pero existen otros procedimientos como ELISA con una elevada sensibilidad y especificidad. Utilizando técnicas más precisas se pueden llegar a detectar estos anticuerpos en los pacientes que son negativos por las técnicas más tradicionales.<sup>(2)</sup> Los AMA generalmente son evaluados por inmunofluorescencia indirecta en células murinas de túbulos distales de riñón y parietales gástricas. La identificación de las subunidades E2 como los principales antígenos de los AMA, permitió el diseño de una prueba de EIA basada en estos antígenos. Aproximadamente, 73% de los pacientes con CBP y AMA negativos por inmunofluorescencia, son positivos por prueba de EIA; lo que demuestra que el desarrollo y la implementación de técnicas con mejor sensibilidad disminuyen la frecuencia de los pacientes con CBP AMA-negativos.<sup>(25)</sup>

## **2.2 Síndrome de sobreposición autoinmune (SS)**

En la actualidad se conocen 3 hepatopatías autoinmunes mayores denominados (HAM): La colangitis esclerosante (CEP), cirrosis biliar primaria (CBP) y hepatitis autoinmune (HAI). Para



definir cada una de la HAM, estas deben cumplir una serie de criterios clínicos, bioquímicos, histológicos y colangiográficos. <sup>(8)</sup>

También se deben considerar los síndromes de sobreposición (SS) que consisten en alteraciones con componentes de dos de estas enfermedades que cumplen completamente los criterios para ambas entidades, generalmente el solapamiento entre CBP y HAI, y el solapamiento entre CEP y HAI, Sin embargo, aun existe controversia en cuanto a si estos forman entidades diferentes o solo son variantes de la HAM. <sup>(6)</sup>

La asociación de dos HAM de acuerdo a sus características clínicas, bioquímicas, imagenológicas e histopatológicas se puede definir de la siguiente manera: <sup>(8)</sup>

- **Sobreposición:** presencia de dos HAM que cumplen criterios completos para cada una de ellas
- **Secuenciales:** aquellas que durante su evolución viran de una HAM a otra
- **Entrecruzamiento:** coexistencia de dos HAM, en la que una de ellos solo cumple criterios parciales para el diagnóstico.
- **Variantes:** no cumplen criterios completos para una HAM.

### 3. CIRROSIS BILIAR PRIMARIA

La cirrosis biliar primaria es una enfermedad inmunitaria de causa desconocida, descrita inicialmente por Addison y Gull en 1851 y luego de forma más pormenorizada por Hanot. <sup>(9)</sup>

La enfermedad esta caracterizada principalmente por la inflamación y destrucción de los conductos biliares intrahepáticos, que da lugar a un cuadro de colestasis crónica y finalmente una cirrosis hepática. Las principales manifestaciones clínicas son prurito, ictericia, presencia de xantomas a consecuencias de la malabsorción intestinal, tales como deficiencias vitamínicas y osteoporosis. <sup>(10)</sup>

La enfermedad suele afectar a mujeres entre los 40 y los 60 años. Aunque se han referido casos dentro de la misma familia no hay evidencias epidemiológicas de que la enfermedad sea hereditaria ni que afecte a determinados grupos étnicos o sociales. <sup>(11)</sup>

La relación mujer/hombre es de 9/1. Se estima una prevalencia tan elevada como 200 casos por millón de habitantes en Estados Unidos y en países del norte de Europa. En Latinoamérica y países del denominado “tercer mundo” la prevalencia es más baja. Frecuentemente se asocian otras enfermedades autoinmunes como enfermedad tiroidea, esclerodermia, artritis reumatoidea, y lupus eritematoso sistémico, entre otras. En general, el curso de estas enfermedades inmunológicas es independiente del curso de la CBP. <sup>(12)</sup>

### **3.1 Etiopatogenia de la cirrosis biliar primaria (CBP)**

La causa de la CBP continúa siendo desconocida. Dadas las numerosas alteraciones inmunológicas presentes en esta enfermedad, se han establecido distintas hipótesis etiopatogénicas, ninguna de ellas demostrada hasta la actualidad. La existencia de una cierta agrupación familiar de la enfermedad, así como de alteraciones inmunológicas en los familiares de los enfermos han sugerido que pudiera existir una cierta predisposición genética, aun cuando no existe un marcador genético conocido. En este sentido se ha señalado que los pacientes con CBP presentan una menor expresión de los genes que regulan el intercambiador de aniones tipo 2, que juega un papel fundamental en la excreción de bicarbonato y en la generación de flujos hidroiónicos, tanto en el tracto biliar como en otras glándulas exocrinas, como las salivares o el páncreas. Tales alteraciones podrían contribuir a la colestasis y al síndrome seco que acompañan a la CBP. <sup>(3)</sup>

Además, en estas células también se ha descrito un aumento en la expresión de moléculas de adhesividad de tipo 1, necesarias para la interacción entre los linfocitos y sus células diana. Otros hallazgos contribuyen a la hipótesis de una regulación anormal del sistema inmune en la CBP, tales como la presencia casi universal en los enfermos con CBP de anticuerpos antimitocondriales, la existencia de una situación de anergia, una marcada disminución en la respuesta a la inmunización, una deficiente respuesta linfocitaria a mitógenos, la presencia de alteraciones en las subpoblaciones linfocitarias circulantes, la existencia de una significativa reducción en la capacidad citotóxica de las células "Natural Killer" y la presencia de linfocitos circulantes activados, tanto T como B. <sup>(3)</sup>

Se ha propuesto también la hipótesis de que estas alteraciones inmunológicas en la CBP pudieran tener su origen en un fenómeno de mimetismo molecular entre antígenos de agentes infecciosos,

y antígenos mitocondriales. En este sentido se han implicado ciertos hongos, como *Neurospora* y enterobacterias como *E. Coli*.<sup>(3)</sup>

### **3.2 Diagnóstico de la cirrosis biliar primaria (CBP)**

El diagnóstico de la CBP se puede establecer a través de varios mecanismos. Debe sospecharse ante cualquier paciente de mediana edad, en especial una mujer, que presenta prurito, con ictericia o sin ella. Alteración en las pruebas de función hepática con aumento de las fosfatasas alcalinas, de la IgM y presencia de anticuerpos antimitocondriales (AMA). La presencia de AMA es una de las pruebas más importantes para el diagnóstico, ya que esta presente en casi todos los pacientes con CBP.<sup>(9)</sup>

La biopsia hepática es muy útil puesto que da información tanto del diagnóstico como del estadio evolutivo de la misma. La enfermedad se divide en cuatro estadios en función de la gravedad (I-IV) (Cuadro 2). En ocasiones, la enfermedad se pone de manifiesto por prurito e ictericia en el embarazo o tras la ingesta de anticonceptivos.<sup>(8)</sup>

**CUADRO 2. Estadios anatomopatológicos en la cirrosis biliar primaria. (Guerrero et al., 2007)**

ESTADIO	PRINCIPALES CARACTERISTICAS
I	Inflamación que afecta a las vías biliares intrahepáticas. Infiltrado mononuclear Granulomas no caseificantes en los espacios porta Necrosis y destrucción de conductos biliares interlobulares
II	Proliferación de conductillos biliares en el espacio porta Actividad inflamatoria más extendida Las lesiones pueden ser por completo similares a las de una hepatitis crónica activa
III	Fibrosis que se extiende como septos entre espacios porta No se encuentran conductos biliares en el espacio porta, aun cuando todavía puede verse alguna lesión florida. Existe colestasis periportal
IV	Presencia de una cirrosis hepática. El diagnóstico diferencial con otros tipos de cirrosis puede ser difícil. Ausencia de conductos biliares en los espacios porta

### **3.3 Síndrome de sobreposición: hepatitis autoinmune (HAI) -cirrosis biliar primaria (CBP)**

Con base en la manifestación clínica, los estudios de laboratorio y la biopsia hepática que se realizó a un caso de Síndrome de sobreposición: hepatitis autoinmune - cirrosis biliar primaria, se estableció el diagnóstico de síndrome de sobreposición: hepatitis autoinmunitaria - cirrosis biliar primaria, de acuerdo con los siguientes criterios: <sup>(10)</sup>

#### **a) Para hepatitis autoinmune:**

1. ALT elevada cinco veces por arriba de su límite superior.
2. IgG elevada al doble de sus concentraciones normales
3. anticuerpos antimúsculo liso positivos.
4. Biopsia hepática con necrosis en la interfase.

#### **b) Para cirrosis biliar primaria:**

1. Fosfatasa alcalina elevada al doble de sus concentraciones normales
2. Anticuerpos antimitocondriales séricos positivos.
3. Biopsia hepática con lesión florida de los conductos biliares

### **3.4 Tratamiento de la cirrosis biliar primaria (CBP)**

En conclusión se puede decir que la CBP es una enfermedad progresiva, sin tratamiento curativo, tiene una etiología autoinmune, pero responde mal a inmunosupresores, el UDCA (ursodesoxicólico) a dosis de 13-15 mg/kg de peso /día de por vida, consigue una mejoría de las pruebas de función hepática, los síntomas de la enfermedad, retrasa la progresión histológica y mejora la supervivencia y es el único que demuestra una sobrevida mayor libre de trasplante, la sobrevida post trasplante es buena, pero la recurrencia es posible. <sup>(11-3)</sup>

Se han encontrado múltiples mecanismos de acción del UDCA, pero los más importantes son: <sup>(12)</sup>

- a) Cambiar el “pool” de los ácidos biliares, aumentando los ácidos hidrofílicos hepatoprotectores, y disminuyendo los ácidos hidrofóbicos (cólico, quenodeoxicólico, litocólico) que tienen potencial hepatotóxico.
- b) Efecto anticoléstatco mejorando la coleresis de bicarbonato y mejorando la expresión del transportador AE2, lo cual favorece el mejor transporte canalicular.
- c) Antiapoptósico, siendo un estabilizador de membrana y previniendo la disfunción mitocondrial. Otros posible mecanismos terapéuticos del UDCA son como antioxidante, detoxificante y anti-inflamatorio.

## **4. COLANGITIS ESCLEROSANTE PRIMARIA**

En los años cincuenta Werthemann y Roberts utilizan por primera vez el término colangitis estenosante, posteriormente Schwartz y Date en 1958 reportan una pequeña serie de casos y acuñan el término de colangitis esclerosante, dicho término implica fibrosis no traumática ni maligna ocurrida en las porciones submucosas de los conductos biliares y que produce engrosamiento de sus paredes, con el consiguiente estrechamiento de su luz (esclerosis y estenosis). <sup>(13)</sup>

Actualmente se sabe que la colangitis esclerosante primaria (CEP) es una enfermedad de causa desconocida, caracterizada por una afectación inflamatoria difusa y fibrosis que produce un estrechamiento hasta la obliteración de los conductos biliares. Se trata de una enfermedad de

curso lentamente progresivo que conduce al desarrollo de una cirrosis biliar secundaria, hipertensión portal e insuficiencia hepatocelular, que es la principal causa de muerte en estos pacientes. <sup>(14)</sup>

La CEP es un proceso fibroinflamatorio del árbol biliar. Puede afectar los conductos biliares intra y extrahepáticos, como también así la ampolla de Vater. Se subdivide en tipos primario o idiopático y secundario, en el cual intervienen diversas patologías obstructivas de la vía biliar (cirugía biliar, colédocolitiasis, infecciones) <sup>(15)</sup>

La colangitis esclerosante es rara, aunque la incidencia publicada varía según los criterios de diagnósticos empleados. Cuanto más estrictos son éstos, más rara es la enfermedad. Myers, Cooper y Padis contabilizaron hasta 1970, 40 casos aceptables en la bibliografía mundial. Los pacientes suelen tener entre 30 y 60 años, en la serie reportada por Warren, y el indica que de 12 pacientes con colangitis esclerosante 10 tienen entre 20 y 40 años. La padecen los hombres con más frecuencia que las mujeres en una relación de 3:1, sin embargo cuando se asocia a colitis ulcerativa, la relación es de 1:1. <sup>(13)</sup>

#### **4.1 Etiopatogenia de la Colangitis esclerosante primaria (CEP)**

La colangitis esclerosante primaria o idiopática posee una patogenia inmune, con factores etiológicos desconocidos. Se ha establecido una susceptibilidad genética asociada con ciertos haplotipos de HLA. <sup>(8)</sup> Aun cuando no se conoce la causa de esta enfermedad, probablemente en su desarrollo confluyen tanto determinantes genéticos como factores adquiridos. Por una parte, se conoce la importante asociación de esta enfermedad con determinados antígenos del sistema mayor de histocompatibilidad, tales como el HLA-B8 y en especial el haplotipo HLA A1 B8 DR3 Drw52a. <sup>(15)</sup>

Muchos pacientes presentan reactividad para anticuerpos anticitoplasma de neutrófilos (ANCA.) Este anticuerpo aparenta estar dirigido contra múltiples antígenos. En estudios recientes se ha postulado que en la colangitis esclerosante primaria el antígeno blanco sería una proteína específica de los granulocitos, presente en la membrana nuclear. <sup>(8-15)</sup>

Esta enfermedad se asocia, con colitis ulcerosa en un 75% de los casos, y hasta un 5% de los pacientes con colitis ulcerosa padecen o padecerán una CEP. La CEP puede preceder a la colitis ulcerosa, y el curso clínico de la enfermedad intestinal no parece afectar al desarrollo o la progresión de la CEP. <sup>(8)</sup>

Así mismo, se han descrito múltiples asociaciones y polimorfismos del factor de necrosis tumoral-alfa (TNF-a) y de la interleucina 10 (IL-10). Sin embargo, sólo se ha encontrado asociación significativa en pacientes que poseen TNF-a, quienes son más susceptibles a presentar colangitis esclerosante. <sup>(13)</sup>

En cuanto a los factores adquiridos es poco lo que se conoce, aunque se ha implicado en el desarrollo de CEP a tóxicos, infecciones virales y trastornos inmunitarios, en relación por una parte por su asociación con haplotipos HLA propios de enfermedades autoinmunes y por otra con la existencia de algunas alteraciones del sistema inmune presentes en estos enfermos, tales como la existencia de inmunocomplejos, de activación del complemento, de infiltrado linfocitario en los conductos biliares o la presencia de anticuerpos anti-citoplasma de neutrófilo. <sup>(14)</sup>

#### **4.2 Diagnóstico de la Colangitis esclerosante primaria (CEP)**

El diagnóstico se basa en criterios clínicos, bioquímicos, radiológicos e histológicos. Además de los datos bioquímicos propios de una colestasis progresiva, en la CEP pueden encontrarse anticuerpos anti-citoplasma de neutrófilo (pANCA) hasta en un 70% de los casos. Radiológicamente es característica la existencia de estenosis multifocales difusas en el árbol biliar, lo que puede mostrarse mediante colangio-pancreatografía retrógrada endoscópica o, más recientemente, mediante colangio-resonancia. El estudio histológico puede mostrar una colangitis obliterante fibrosa, patognomónica de la enfermedad, pero que es poco frecuente poder observarla en biopsias por punción. <sup>(14)</sup>

#### **4.3 Síndrome de sobreposición: hepatitis autoinmune (HAI)- Colangitis esclerosante primaria (CEP)**

Al igual que otras enfermedades autoinmunes, la sobreposición de las enfermedades autoinmunes mayores HAM es una entidad bien reconocida, observándose en los últimos años un importante aumento en su incidencia. La asociación de HAI-CBP es considerada como el síndrome de sobreposición mas frecuente en adultos y la asociación de HAI-CEP es considerada poco frecuente, existiendo hasta la actualidad solo 45 reportes de casos en la literatura de la lengua inglesa.<sup>(8)</sup>

La sobreposición de HAI y CEP con base en la evaluación histológica se han descrito en 6% de los pacientes con HAI. Por otra parte el diagnóstico de sobreposición se estableció en 8% de 113 pacientes con CEP evaluados de manera retrospectiva con el uso del puntaje internacional modificado por la HAI.<sup>(9)</sup>

#### **4.5 Tratamiento de la colangitis esclerosante primaria**

La patogenia de la CEP es desconocida; en consecuencia, no existe un tratamiento específico de esta enfermedad. Ningún fármaco ha demostrado de forma definitiva una modificación clara de la historia natural de la enfermedad.<sup>(14-15)</sup>

Entre los diversos tratamientos médicos ensayados en esta entidad se pueden citar agentes antifibrogénicos, como la colchicina, cupruréticos como la D-penicilamina, o inmunosupresores, como los corticoides, azatioprina, metotrexato o ciclosporina. Sin embargo ninguno de ellos ha demostrado eficacia sobre la evolución de la enfermedad o la supervivencia; Recientemente, las dosis elevadas de ácido ursodeoxicólico (UDCA) han mostrado efectos beneficiosos sobre la evolución analítica y la histología de los pacientes con esta enfermedad.<sup>(15)</sup>

En pacientes con enfermedad avanzada el trasplante hepático es una opción terapéutica importante, con una supervivencia y evolución similar a la de otras causas de hepatopatía.<sup>(7)</sup>

### **5. HEPATITIS AUTOINMUNE**

Conocida inicialmente como "hepatitis crónica viral", se considera que fue descrita con rigor por primera vez en 1950 por Waldeström, al observar en Suecia un tipo de hepatitis persistente que



afectaba principalmente a mujeres jóvenes y se asociaba con infiltración hepática de células plasmáticas, hipergammaglobulinemia, amenorrea y manifestaciones dermatológicas. <sup>(16)</sup>

En 1955, Joske describió la presencia del fenómeno LE (anticuerpos antinucleares, ANA) en hepatitis crónicas activas y en 1956 MacKay la denominó (erróneamente, pues no está relacionada con el lupus) como hepatitis lupoide. También fue denominada como: cirrosis con síndrome adrenogenital y hepatitis plasmocelular. Posteriormente, en 1966, Whittingham observó la asociación con anticuerpos antimúsculo liso (AML) y denominó la enfermedad como hepatitis crónica activa autoinmune, estableciéndola como una entidad diferenciada. <sup>(16)</sup>

La aceptación nominal y la definición genérica de hepatitis crónica activa se hizo formal cuando se establecieron los criterios de la "Asociación internacional para el estudio del hígado" (I.A.S.L. siglas en inglés) en 1976 <sup>(18)</sup>. Pero en 1982 Hodges y Cols describieron un artículo clásico en Lancet sobre el "Espectro de la enfermedad" de la hepatitis crónica activa que incluye además del lupus, la hepatitis B, la sensibilidad a medicamentos, la deficiencia del a-1 antitripsina, la enfermedad de Wilson, el alcoholismo y la hepatitis C, es decir se define a la hepatitis crónica activa como un síndrome y se le atribuyen diversos factores etiológicos como causal del síndrome. <sup>(18)</sup> La enfermedad quedó definida en 1992 por el Grupo Internacional de Hepatitis Autoinmune (GIHA) siguiendo un sistema de puntuación que fue revisado posteriormente. (*Ver tabla 2, pág 54*) <sup>(21)</sup>

### **Cuadro 3. Criterios diagnósticos de hepatitis autoinmune (Donaldson et al.,2002)**

CRITERIO	PUNTAJE	CRITERIO	PUNTAJE
Masculino	0	Otros marcadores de enfermedad viral	-3
Femenino	2	Ausencia de marcadores virales	3
Relación F.alcalina:AST >3	-2	hepatotóxicos o transfusiones: Sí	-2
<3	2	No	1
Gammaglobulina o IgG >2N	3		
1,5 -2	2	Consumo de alcohol (según dosis)	0,-1,-2,+2
1 -1,5	1	Enfermedad autoinmune asociada	1
<1	0	HLAB8 -DR3 -DR4	1
ANA,ASMA o AntiLKM1		Necrosis <i>piecemeal</i> , hepatitis	3
>1:80	3	lobular y/o puentes	
1:80	2	Necrosis lobular solamente	2
1:40	1	Formación de rosetas	1
<1:40	0	Cambios ductales	-1,o -3
Otros autoanticuerpos hepáticos	2	Infiltrado plasmocitario	1
AMA presente	-2	Cambios histológicos incompatibles	-3
ausente	0		
HAV IgM, HBsAg, Core IgM,	-3		
o HCV RNA			
Anti HCV +, RIBA +	-2		

1) Hepatitis autoinmune definida (15 puntos pretratamiento, 17 con tratamiento);

2) Hepatitis autoinmune probable (10–15 puntos pretratamiento, 12 –17 con tratamiento), y

3) Sin diagnóstico (menos de 10 puntos pre-tratamiento, menos de 12 con tratamiento). (21)

Actualmente la hepatitis autoinmune (HAI) es la inflamación crónica y progresiva del hígado, de causa desconocida, que se caracteriza por una interfase de hepatitis e infiltración portal de células plasmáticas en el examen histológico, hipergammaglobulinemia y autoanticuerpos. Refleja una compleja interacción entre, autoantígenos, predisposición genética y el sistema inmunoregulador. (17)

Su incidencia media anual es de 1,9 por 100.000 habitantes. Afecta predominantemente a las mujeres en una relación 3,6:1 con respecto a los hombres, siendo todas las edades y grupos étnicos susceptibles. (19)

El 40% de los pacientes con enfermedad severa no tratada mueren a los 6 meses del diagnóstico. De los que sobreviven, el 40% desarrollan cirrosis, el 54% desarrollan várices esofágicas a los 2

años después de la cirrosis; y el 20% de los individuos con várices esofágicas mueren por hemorragias. <sup>(16)</sup>

### **5.1 Clasificación de la hepatitis autoinmune (HAI)**

Tradicionalmente la hepatitis autoinmune se subdivide en dos tipos en base al perfil inmunológico por la detección en suero de autoanticuerpos, que se utilizan como marcadores inmunoserológicos. No obstante existe bibliografía que clasifican a la hepatitis autoinmune en 4 Según el tipo de autoanticuerpos identificados: <sup>(21)</sup>

#### **5.1.1. Hepatitis autoinmune de tipo 1**

Es la hepatitis autoinmune clásica o lupoides, que afecta fundamentalmente a mujeres jóvenes con un promedio de edad entre 35 y 40 años. En ella se destaca la presencia de anticuerpos antinucleares (ANA), antimúsculo liso (AML) y antiactina. Este último, el más específico, aunque no muy fácilmente asequible desde el punto de vista tecnológico. Los pacientes presentan niveles serológicos de enzimas hepáticas AST (aspartato aminotransferasa) y ALT (alanina aminotransferasa) elevados, aunque inferiores a los que se encuentran en pacientes con hepatitis tipo 2. Altos niveles de IgG e IgA y bajos de C4 suelen ser parámetros acompañantes. <sup>(23)</sup>

En relación al HLA podemos diferenciar dos grupos de pacientes: los que son DR3 positivos, en los que la enfermedad suele aparecer antes de los 30 años y los DR4 positivos, en los que la enfermedad se instaura después de los 30. En el primer caso los brotes de agudización de la enfermedad son más frecuentes y la progresión a cirrosis también. En general se puede decir que los pacientes con hepatitis de tipo 1 responden bien al tratamiento con inmunosupresores. <sup>(23)</sup>

#### **5.1.2 Hepatitis autoinmune de tipo 2**

Se caracteriza por la presencia de anticuerpos antimicrosoma hepato/renal de tipo I (anti MHR1). Esta forma predomina en los niños (2-14 años), pero los adultos también pueden padecerla. Se aprecia con mayor frecuencia que en el tipo 1 la aparición de enfermedades inmunológicas asociadas. La hipergamma-globulinemia es menos pronunciada que en el tipo 1 y progresa de manera más rápida a la cirrosis. <sup>(12)</sup>

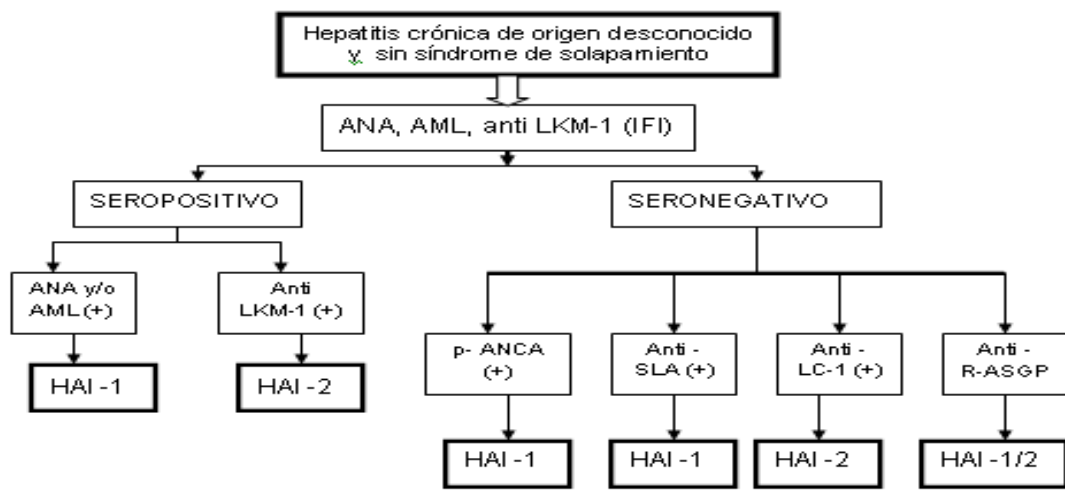
Es una enfermedad en la mayoría de los casos pediátrica, que al igual que la de tipo 1, afecta sobre todo a mujeres. En esta entidad además de altos títulos de transaminasas, se encuentra elevación de la bilirrubina. Los niveles de gammaglobulina no suelen estar tan altos como en la de tipo 1 y los de IgA, así como los de C4 suelen estar bajos. La hepatitis autoinmune tipo 2 es mucho menos frecuente que la de tipo 1, relación 8 a 2. Se asocia con el alelo DR3 DQ2. <sup>(23)</sup>

### 5.1.3 Hepatitis autoinmune tipo 3

Este grupo no se diferencia en sus características de la hepatitis autoinmune tipo 1. También presenta autoanticuerpos inespecíficos antinucleares y antimúsculo liso, pero tiene la particularidad de presentar un autoanticuerpo anti SLA dirigido contra el autoantígeno soluble hepático. Algunos grupos no diferencian la hepatitis autoinmune tipo 3 de la hepatitis autoinmune tipo I. <sup>(12)</sup>

### 5.1.4 Hepatitis autoinmune tipo 4

Es la llamada hepatitis criptogénica: es igual que la hepatitis autoinmune tipo 1 en sus manifestaciones clínicas, en la elevación de las gammaglobulinas y en la respuesta al tratamiento. Sin embargo, se caracteriza por presentar negatividad a los autoanticuerpos. Constituye hasta el 13% del total de casos de hepatitis autoinmune. <sup>(22)</sup>



**Fig. 1.** Algoritmo clasificatorio según criterios serológicos para la hepatitis autoinmune (HAI). (ORTS., 2004)

## **5.2 Etiología de la hepatitis autoinmune (HAI)**

Actualmente se desconoce la etiología de la enfermedad, sospechándose que en individuos genéticamente predispuestos algún agente ambiental activa el sistema inmune contra antígeno hepático, provocando una inflamación progresiva crónica. El mimetismo molecular con proteínas virales o con otros autoantígenos podría tener también un papel clave en el desarrollo de la HAI. (18)

La HAI se ha asociado con diferentes infecciones virales: herpes virus, virus del sarampión, virus de la hepatitis A y B. También el virus de la hepatitis C, se ha relacionado con el fenómeno, pero los estudios realizados con análisis de PCR sólo han detectado genoma viral en una minoría de los pacientes. Igualmente, se ha descrito que el citocromo CYP450 2D6, uno de los autoantígenos reconocidos por los anticuerpos anti-LKM-1 presentes en la HAI tipo 2, comparte similitudes antigénicas con el VHC y el HSV tipo 1. (12)

Fármacos como la aminociclina, isoniazida, a-metildopa, hidralazina y nitrofurantoina, así como diversas toxinas y aditivos alimentarios también podrían desencadenar la HAI. (22) En mujeres con hepatitis C crónica (HCC) y susceptibilidad genética, una HAI latente podría desarrollarse por los efectos inmunoestimuladores de la terapia con interferón-a (IFN-a). (12) La inducción o exacerbación de enfermedades autoinmunes hepáticas o extra-hepáticas por esta terapia se conoce desde hace tiempo y podría estar relacionada con la citotoxicidad celular dependiente o por la expresión aberrante de antígenos HLA con la consiguiente citotoxicidad mediada por linfocitos T. (20)

## **5.3 Autoanticuerpos presentes en la hepatitis autoinmune HAI**

La hepatitis autoinmune (HAI) es una enfermedad hepática crónica debida a la destrucción de los hepatocitos como consecuencia de la pérdida de tolerancia inmunológica frente a estas células. En general, se detectan anticuerpos antinucleares (ANA), antimúsculo liso (AML), o antimicrosomales frente a hígado o riñón, conocidos como anti-LKM (9). La presencia de estos anticuerpos, aunque no exclusivos de las enfermedades hepáticas de naturaleza autoinmune, ayuda al diagnóstico y permiten distinguir dos tipos de HAI, la tipo 1 asociada a ANA y/o AML,

y la tipo 2 relacionada con la presencia de LKM-1 (tabla 3). Estas dos formas, en general, son mutuamente excluyentes y solo existen pocos casos de doble positividad serológica. <sup>(28)</sup>

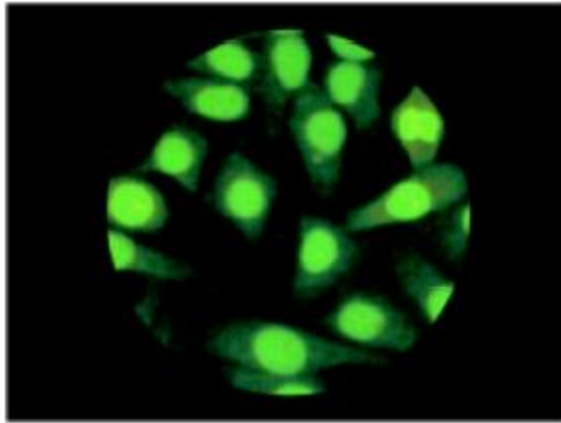
**Cuadro 5 Autoanticuerpos presentes en la hepatitis autoinmune (Longhi et al., 2010)**

TIPO DE ANTICUERPOS	Tipo I	Tipo II	Tipo III
Anticuerpos antinucleares (ANA)	+	-	-
Anticuerpos antimusculo liso (AML)	+	-	(+)/(-)
Anticuerpos contra proteina hepatica especifica (anti PHE)	+	+	+
Anticuerpos contra receptor de asialoglicoproteinas	+	+	+
Anticuepos contra antígeno de membrana hepatica	-	+	(+)/(-)
Anticuerpos antimicrosoma heptatorrenal (anti MHR)	-	+	-
Anticuerpos anticitosol hepatico 1 (anti CH-1)	-	+	-
Anticuerpos contra el antígeno hepatico soluble (anti AHS)	-	-	+

### 5.3.1 Anticuerpos antinucleares (ANA)

La asociación entre ANA y HAI se describió hace más de 50 años y permitió acuñar el término de hepatitis lupoide, por la existencia de hepatitis y anticuerpos antinucleares, tal como se halla en el lupus eritematoso sistémico. Los ANA se detectan de forma rutinaria por inmunofluorescencia indirecta (IFI) en cortes de hígado, riñón y estómago de ratón. En la HAI el patrón suele ser homogéneo, pero puede ser moteado. Los ANA están dirigidos frente a distintas estructuras nucleares tales como centrómeros, ribonucleoproteinas, ciclina A e histonas. El patrón homogéneo suele estar dirigido frente al nucleosoma o a histonas <sup>(29)</sup>.

El título necesario para confirmar la positividad debe ser superior a 1/40 pero, en general, se obtienen títulos mucho más altos. Los ANA no son exclusivos de la HAI ya que también pueden detectarse en otras enfermedades hepáticas, algunas de naturaleza autoinmune como la CBP y la CEP, sino también en pacientes con una hepatopatía de etiología viral, generalmente por el virus de la hepatitis C, y en pacientes alcohólicos. Además, en personas sanas generalmente de edad avanzada pueden detectarse títulos bajos de ANA sin ninguna significación diagnóstica. <sup>(28)</sup>

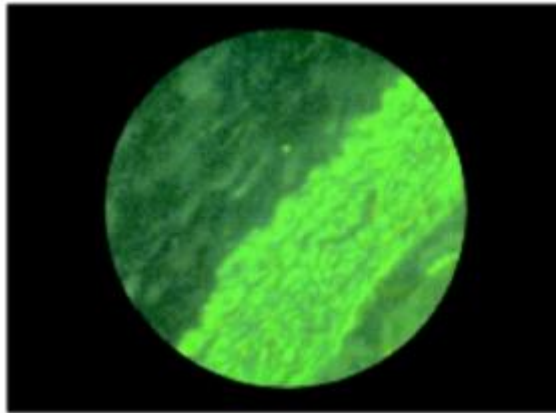


**Figura 5.** Patrón homogéneo en una prueba de IFI para detectar anticuerpos antinucleares ANA (Martínez et al., 2008)

### **5.3.2 Anticuerpos antimúsculo liso (AML)**

Estos anticuerpos reaccionan frente a proteínas del citoesqueleto, generalmente frente a filamentos de actina, pero también frente a miosina, troponina y tropomiosina. Se detectan usualmente por inmunofluorescencia indirecta (IFI) en los mismos sustratos que los ANA. Se han descrito tres patrones de IFI en los cortes de riñón, según tiñan los vasos (AMLv), los vasos y los glomérulos renales (AMLvg), y los vasos, glomérulos y túmulos (AMLvgt). El significado de estos patrones todavía debe ser definido de forma completa <sup>(30)</sup>, aunque se ha podido evidenciar que la mayoría de los kits que miden anticuerpos antimúsculo liso utilizan como sustrato estomago de rata.

Al igual que los ANA, los AML no son específicos de la HAI y pueden detectarse en otras enfermedades hepáticas de naturaleza autoinmune, viral (hepatitis C y mononucleosis infecciosa) <sup>(28)</sup>. Se considera, no obstante, que un título superior a 1/20 en el contexto adecuado y con un patrón (AMLvgt) es muy sugestivo de HAI tipo 1 en pacientes jóvenes con afección hepática grave <sup>(31)</sup>. Últimamente se están desarrollando nuevos procedimientos diagnósticos mediante enzimo inmuno ensayo (ELISA) frente a F-actina, con la pretensión de facilitar el cribaje de enfermedad en pacientes sospechosos o susceptibles.



**Figura 3.** Patrón inmunofluorescente en una prueba de IFI para detectar anticuerpos antimúsculo liso AML (Martínez et al., 2008)

### **5.3.3 Anticuerpos frente a hígado-riñón (LKM) y citosol hepático (LC)**

Estos anticuerpos están dirigidos frente a distintos antígenos microsomales de hígado y riñón (LKM). Según el antígeno se han descrito hasta tres formas. El sustrato de LKM-1 es la isoforma 2D6 del citocromo p450 y el antígeno frente al que reacciona el LKM-3 es la uridin difosfato glucoronil transferasa <sup>(28)</sup>. Su presencia se relaciona con la forma de HAI-2 que tiene una clínica y un curso distinto de la HAI-1.

Los LKM-2 se asociaron a la hepatitis tóxica inducida por ticrinafeno, un diurético úrico-súrico que fue retirado tras demostrarse su hepatotoxicidad, y por tanto en la actualidad tiene un interés meramente histórico.

Estos anticuerpos tampoco son específicos de la HAI, y se han descrito relacionados con enfermedades hepáticas de naturaleza vírica como las hepatitis C y D, y con hepatitis inducidas por fármacos <sup>(31)</sup>. Se han detectado en hasta el 10% de pacientes con infección crónica por el virus de la hepatitis C, y los títulos se han relacionado directamente con la actividad de la enfermedad <sup>(30)</sup>. La presencia de LKM-1 en pacientes con hepatitis C debe tenerse en cuenta, especialmente en pacientes candidatos a tratamiento antiviral, ya que el interferón puede inducir una reacción autoinmune. Estas características de los LKM, de aparecer tras la exposición a agentes infecciosos o fármacos, apoyarían la hipótesis de que estas formas de hepatitis tuvieran como iniciador a un agente exógeno de naturaleza biológica o química. <sup>(28)</sup>



### **5.3.4 Otros anticuerpos en la hepatitis autoinmune**

Se han hallado otros autoanticuerpos en pacientes con HAI. Destacan los que tienen su diana al receptor de la asialoglicoproteína y los anticuerpos perinucleares observados en el citoplasma de los neutrófilos, que se considera que son propiamente anticuerpos antinucleares, ya que la diana real forma parte de la envoltura nuclear. Los p-ANCA se detectan por IFI en hasta el 90% de pacientes con HAI-1, pero también pueden estar presentes en la CEP, la CBP y las hepatitis virales. Su papel patogénico y diagnóstico en la HAI todavía es incierto. <sup>(28)</sup>

Los anticuerpos anti citosol hepático o LC se detectan fundamentalmente en sujetos con AIH tipo 2, y menos frecuentemente en pacientes con HAI-1 e hepatitis crónica por virus C. Cuando se determinan por inmunofluorescencia pueden ocultarse por los LKM-1 y en estos casos mejora la detección si se realiza por inmunoblotting o contraelectroforesis. Se ha referido que su presencia se asocia con la gravedad y progresión de la HAI-2 <sup>(18)</sup>.

### **5.4 Diagnóstico laboratorial en la hepatitis autoinmune**

El diagnóstico inmunológico de las enfermedades hepáticas de origen autoinmune no tienen un examen diagnóstico único y puede inicialmente ser indistinguible de otros desórdenes hepáticos <sup>(18-19)</sup>; la heterogeneidad clínica es uno de los rasgos más llamativos de esta enfermedad, con un rango de manifestaciones que va desde la ausencia de síntomas hasta su presentación en forma de una hepatitis aguda grave. <sup>(22)</sup>

Desde el punto de vista de laboratorio, la presencia de hipergammaglobulinemia policlonal es casi constante. La detección de títulos elevados (>1:80) de los anticuerpos no-órgano y órgano específicos considerados como marcadores de la enfermedad permiten, además de contribuir al diagnóstico positivo, clasificar el tipo de HAI. Otros hallazgos de laboratorio son la elevación de las cifras de aminotransferasas, fosfatasa alcalina y bilirrubina. <sup>(17)</sup>

#### **5.4.1 Criterios para el diagnóstico de hepatitis autoinmune**

Existe una alta prevalencia en mujeres jóvenes, evolución potencial hacia la cirrosis, existencia de mecanismos autoinmunes en la etiología, exclusión de otras causas conocidas de hepatopatía crónica y buena respuesta al tratamiento con glucocorticoides. <sup>(33)</sup>

### **I. Criterios mayores**

- Elevación persistente de las transaminasas.
- Hipergammaglobulinemia (2,5 g/dL o mayor).
- Autoanticuerpos circulantes y/o células LE positivas.
- Marcadores serológicos para virus de hepatitis, negativos.

### **II. Criterios menores**

- Manifestaciones sistémicas como fiebre, artralgias, erupciones cutáneas.
- Complicaciones con otras enfermedades autoinmunes, incluyendo las del colágeno.
- Eritrosedimentación acelerada.

### **III. Histología**

- Hepatitis crónica o cirrosis con marcada infiltración de células y necrosis de hepatocitos.
- Ausencia de hallazgos específicos para el diagnóstico de otras entidades.

## **5.6 Tratamiento para la Hepatitis Autoinmune**

Es característica en esta afección la respuesta favorable al tratamiento con glucocorticoides, por lo que esto constituye el pilar básico. Deben tratarse todos los enfermos, independientemente del tipo de HAI y de la forma de presentación, incluidos aquéllos con enfermedad leve y cifras no muy elevadas de aminotransferasas. Para el tratamiento suele usarse un esquema que esta basado en las diferentes asociaciones de medicamentos para el tratamiento de hepatitis autoinmune. <sup>(12)</sup>

*Esquema I:* Prednisona (PDN) 1 mg./Kg./día hasta lograr remisión bioquímica de la enfermedad, en dicho momento se disminuye progresivamente la dosis de PDN hasta retirarla, y se asocia azatioprina 50 mg/día.

*Esquema II:* Asociación de PDN 0.5 mg/Kg./día y azatioprina 50-100 mg/día. Una vez lograda la remisión bioquímica se disminuye la dosis de PDN progresivamente hasta retirarla.

*Esquema III:* En aquellos casos que por la severidad de la enfermedad hepática crónica el nivel de albúmina estaba muy disminuido, y el paciente tenía un puntaje de Child-Pugh superior a 9, se administró Prednisona a solo 10 mg/día <sup>(11)</sup>

### **CAP III. JUSTIFICACIÓN**

Las enfermedades autoinmunes en la mayoría de los casos son difíciles de diagnosticar usando solo la sintomatología del paciente. La hepatitis autoinmune al ser una etiología hepática crónica, en la cual se destruyen gradualmente los hepatocitos conduciendo a la fibrosis y a la cirrosis hepática necesita de un diagnóstico rápido y certero, ya que el 40% de los pacientes con enfermedad severa no tratada mueren a los 6 meses del diagnóstico. <sup>(2)</sup> En medicina se dice que la base de un buen diagnóstico es el estudio clínico; Una buena historia clínica nunca podrá ser sustituida por estudios de laboratorio y gabinete. Lamentablemente la mayoría de las enfermedades autoinmunes se caracterizan por presentar un gran número de signos y síntomas, la valoración correcta de los análisis de laboratorio se constituye en una gran ayuda para individualizar algunas entidades. Así como también puede ser causa de errores de diagnóstico cuando los resultados se interpretan mal. En este sentido es importante para el médico conocer el valor diagnóstico que tienen las pruebas de laboratorio, por lo tanto, es responsabilidad de los profesionales de laboratorio el contar con un menú de pruebas debidamente validadas

En el laboratorio de Histocompatibilidad e Inmunogenética del SELADIS-FCFB-UMSA, con la finalidad de responder a las necesidades de nuestros usuarios (pacientes y médicos), se han estandarizado, optimizado y validado una serie de pruebas de laboratorio. Entre las que se encuentran detección de: anticuerpos antinucleares (ANA), anticuerpos antimitocondriales (AMA); En el caso de la hepatitis autoinmune en el instituto SELADIS se ha optimizado una prueba de IFI que utiliza como sustrato a riñón de ratón para detectar la presencia de anticuerpos antimúsculo liso (AML); pero hasta la fecha no se conoce el valor diagnóstico de esta prueba por lo que el presente trabajo pretende determinar la sensibilidad, especificidad, eficacia, valor predictivo positivo y negativo, índice Kappa y el chi cuadrado de la prueba optimizada, ya que es

importante mencionar que toda prueba antes de ser ofertada al público debe ser optimizada para cumplir con las normas de control de calidad.

Ahora bien es importante mencionar que si bien los AML, se utilizan principalmente para apoyar el diagnóstico de hepatitis autoinmune, cabe recalcar que al igual que los ANA este método puede catalogarse como una técnica de tamizaje ya que su presencia no se asocia con la gravedad de la enfermedad o con la respuesta al tratamiento inmunosupresor, esto debido principalmente a

que los AML no son específicos de la hepatitis autoinmune y pueden detectarse en otras enfermedades hepáticas de naturaleza autoinmune. Pero aun así su presencia se considera de apoyo en el diagnóstico de hepatitis autoinmune y descarte de cirrosis biliar primaria en caso de anticuerpos ANA y AML negativo, además que es muy importante para la diferenciación entre la hepatitis autoinmune de tipo 1 de la de tipo 2 y es que la hepatitis autoinmune de tipo 2 no presenta los AML. <sup>(1)</sup>

#### **CAP. IV PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

En el laboratorio de Histocompatibilidad e Inmunogenética del SELADIS-FCFB-UMSA, se tiene una prueba optimizada para la detección de anticuerpos antimúsculo liso, pero hasta la fecha no se conoce el valor diagnóstico de esta prueba, esto delimita la aplicabilidad de la prueba dentro del laboratorio ya que para que una prueba pueda ofertarse a nuestros usuarios (médicos y pacientes), esta prueba debe cumplir con las normas de control de calidad que son necesarias para valorar una prueba; para ello prueba debe presentar la máxima sensibilidad, especificidad y eficacia; además que la correlación existente entre las prueba optimizada y el kit comercial (Gold estandar) debe ser muy buena. El conocimiento de todos estos aspectos hace que exista la garantía en que. el diagnóstico de laboratorio por un determinado método sea eficiente y confiable. En este sentido el presente trabajo de investigación pretende realizar la valoración de la prueba de IFI para el diagnóstico de HAI tipo 1, que usa como sustrato cortes histológicos de estomago de ratón.

## **CAP. V OBJETIVOS**

### **C. OBJETIVO GENERAL**

- Valorar la prueba de inmunofluorescencia indirecta para el diagnóstico de Hepatitis autoinmune tipo 1, que utiliza como sustrato cortes histológicos de estómago de ratón frente a otro método comercial de inmunofluorescencia que utiliza el mismo sustrato.

### **D. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Optimizar la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI) que utiliza como sustrato estómago de ratón.
- Determinar la sensibilidad (S), especificidad (E), eficiencia, valor predictivo positivo (VPP), valor predictivo negativo (VPN), de la prueba de inmunofluorescencia optimizada.
- Aplicar pruebas de concordancia para evaluar el nuevo método optimizado con un mismo panel de suero positivo y negativos frente a los resultados obtenidos por un método comercial debidamente validado y certificado.
- Realizar un estudio comparativo de correlación entre los resultados obtenidos de AML, ANA y AMA.

- Determinar el porcentaje de afectación de HAI tipo 1 según género.
  
- Determinar el porcentaje de repetibilidad de resultados que se obtienen al realizar el diagnóstico de HAI tipo 1 por el método optimizado en el laboratorio

## **CAP. VI DISEÑO METODOLOGICO**

### **A. Pasos para la validación de una prueba diagnóstica**

La validación consiste en la evaluación de un proceso a fin de determinar su idoneidad para un uso particular e incluye la optimización de una prueba y la demostración de las características de su realización. <sup>(34)</sup>

Un ensayo validado proporciona de modo repetitivo unos resultados mediante una prueba que identifican a los elementos como positivos o negativos para un componente o proceso determinado (por ejemplo un anticuerpo, un antígeno, o la induración cutánea localizada en el sitio de prueba) y, por deducción, permite predecir de modo preciso el estado de infección y/o exposición de los pacientes con un grado predeterminado de fiabilidad estadística. <sup>(34)</sup>

Los procedimientos analíticos deben validarse para garantizar la fiabilidad de los resultados obtenidos. Cada laboratorio establecerá los requisitos que deben cumplir estos métodos, con objeto de demostrar que son adecuados para la finalidad pretendida.

Para demostrar que un método es adecuado para la aplicación que se pretende es preciso determinar mediante estudios sus especificaciones técnicas que pueden incluir, entre otras:

- Precisión
- Sensibilidad
- Especificidad
- Eficiencia

- Valores predictivos
- Repetibilidad

Los parámetros que es preciso determinar difieren según el alcance y objetivo a validar. Así mismo, habrá de tener en cuenta las características de los equipos que se van a utilizar.

Al realizar la validación de un procedimiento, es recomendable consultar la existencia a de protocolos recomendados por sociedades científicas o entidades de conocida solvencia, para seguimiento y aplicación tanto del diseño como de la metodología estadística a seguir.

El laboratorio dispondrá de los protocolos necesarios para realizar las actividades de validación de métodos, mantendrá registros de los resultados obtenidos y de la evaluación de los mismos. <sup>(35)</sup>

### **1. Sensibilidad y especificidad**

La especificidad analítica es el grado en que el ensayo no muestra reacción cruzada con otras sustancias y la sensibilidad analítica de un ensayo es la cantidad más pequeña de la sustancia en cuestión que puede detectar la prueba validada. <sup>(35)</sup> Al evaluar una prueba diagnóstica pueden darse 4 situaciones posibles:

- a) Un resultado positivo verdadero (VP): La prueba es positiva y el paciente tiene la enfermedad.
- b) Un resultado falsamente positivo (FP): La prueba es positiva pero el paciente no padece la enfermedad.
- c) Un resultado falsamente negativo (FN): La prueba es negativa pero el paciente presenta la enfermedad.
- d) Un resultado negativo verdadero (VN): La prueba es negativa y el paciente no tiene la enfermedad.

Las mejores pruebas diagnósticas son aquellas que generan pocos falsos positivos y falsos negativos. En general las pruebas diagnósticas se evalúan calculando su sensibilidad y su especificidad. La sensibilidad (Proporción de individuos con la enfermedad que presentan un resultado positivo) indica lo buena que es la prueba para identificar a las personas enfermas. La especificidad (Proporción de individuos sin la enfermedad que presentan un resultado negativo) indica hasta que punto es buena la prueba, para identificar a los individuos que no tienen la enfermedad. <sup>(36)</sup>

$$\text{Sensibilidad} = \frac{\text{VP}}{\text{VP} + \text{FN}} \times 100\%$$



$$2 \quad \text{Especificidad} = \frac{VN}{VN + FP} \times 100\% \quad \text{Eficiencia}$$

La eficiencia se define como la capacidad de una prueba para detectar correctamente las muestras positivas y negativas. Responde a la siguiente formula.

$$\text{Eficiencia} = \frac{VP + VN}{VP + FN + VN + FP} \times 100\%$$

### 3. Valor predictivo

El valor predictivo de una prueba con resultado positivo (VPP) es la probabilidad de que una persona con resultado positivo tenga en realidad la enfermedad. Es igual a la probabilidad de presentar un resultado positivo verdadero o un falso positivo.

El valor predictivo de una prueba con resultado negativo (VPN) es la probabilidad de que una persona con un resultado negativo no tenga en realidad la enfermedad es igual a la probabilidad de presentar un resultado negativo verdadero dividido por la probabilidad de presentar un resultado negativo verdadero o un falso negativo.

El valor predictivo es una buena medida de la utilidad clínica global, porque incorpora información tanto sobre la prueba como sobre la población estudiada. <sup>(36)</sup>

$$\text{Valor predictivo de una prueba positiva} = \frac{VP}{(VP + FP)} \times 100\%$$

$$\text{Valor predictivo de una prueba negativa} = \frac{VN}{(VN + FN)} \times 100\%$$

**TABLA 1.** Formato básico para la construcción de una tabla 2x 2, donde se pueden mostrar los resultados que se obtienen por 2 diferentes métodos de diagnóstico. (Dawson, 1994)

PRUEBA AML OPT.	AML - KIT		TOTAL
	POSITIVA	NEGATIVA	
POSITIVA	VP	FP	TOTAL
NEGATIVA	FN	VN	TOTAL
<b>TOTAL</b>	TOTAL	TOTAL	TOTAL

VP= Verdadero positivo; FP= Falso positivo

FN= Falso negativo; VN = Verdadero negativo

#### 1.4. Pruebas de concordancia

Cuando se requiere la evaluación de varios reactivos o diferentes métodos frente a un mismo panel de sueros de referencia se usan estudios de concordancia (o eficiencia) como por ejemplo:

Índice de Kapa (**K**), que es un test de concordancia que se basa en la comparación de índice de concordancia esperada ( $P_e$ ) con los índices de concordancia observados ( $P_o$ ).

$$K = \frac{(P_o - P_e)}{(1 - P_e)}$$

Una forma común de asegurar la confiabilidad es realizar mediciones de repetibilidad, en especial con propósitos de investigación es repetir la medición y valorar el grado de concordancia. El parámetro estadístico que con mayor frecuencia se emplea para medir la correspondencia entre dos observaciones ante una variable dicotómica es el índice de Kappa. <sup>(34)</sup>

El índice de concordancia Kappa (K) puede clasificarse en 5 grupos distintos <sup>(37)</sup>

CONCORDANCIA	INDICE DE KAPPA
Deficiente	< 0,20
Regular	0,21 - 0,40
Moderada	0,41 - 0,60
Buena	0,61 - 0,80
Muy buena	0,81 - 1,00

Cura, E. (OPS), 1994

#### 4.1 Prueba de Chi cuadrado ( $X^2$ )

Es el método más común que se emplea para comparar proporciones, debido a que puede usarse para comparar dos o más proporciones independientes. <sup>(38)</sup>

$$X^2 = \frac{\sum(o - e)^2}{e}$$

(o) = Frecuencia observada

(e) = Frecuencia esperada

## **5. Repetibilidad**

La evidencia preliminar de repetibilidad (concordancia entre los duplicados dentro de un mismo ensayo y entre distintas realizaciones de la prueba) resulta necesarias para garantizar el posterior desarrollo del ensayo a validar. Esto se lleva a cabo evaluando los resultados de, como mínimo, tres de las cuatro muestras internas que representan la actividad dentro del rango lineal del ensayo. La variación entre diferentes realizaciones del mismo ensayo se analiza utilizando las mismas muestras en un mínimo de 20 realizaciones (en total), por dos o más operarios, preferiblemente en fechas diferentes. Todas las realizaciones deben llevarse a cabo de forma independiente. <sup>(34)</sup>

## **6. Test diagnóstico**

Un test diagnóstico ha de tener una serie de características que le permitan su futura aplicabilidad clínica, por esta razón evaluar la eficiencia de un test diagnóstico es una importante tarea científica, las variables que deben medirse son: variable predictora, que es el resultado del test, especificidad, sensibilidad. En este tipo de test se suele emplear casos tomados al azar. Es necesario tener un estándar de oro o de referencia para el diagnóstico correcto de los casos. El estudio se debe hacer ciego: no se puede conocer el resultado previo del ensayo. Cuando se conozca el resultado definitivo del estándar de oro se contrasta con el resultado del test. <sup>(39)</sup>

# **B. CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN**

## **1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN**

Fueron incluidas en el panel de sueros positivos las muestras de pacientes que tenían diagnóstico clínico y laboratorio de Hepatitis autoinmune (HAI). Formaron parte del panel de muestras negativas muestras de pacientes en las cuales se descartó clínica y laboratorialmente la presencia de HAI. Se incluyeron todas aquellas muestras ingresadas en la gestión 2009 debidamente conservadas a -20°C y que cumplían el criterio antes mencionado.

## **2. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN**

No se tomaron en cuenta muestras hemolizadas, lipémicas, mal identificadas o que no contaban con diagnóstico presuntivo.

### **C. MUESTRAS**

#### **1. Panel de sueros de individuos con HAI**

Constituido por un panel de 25 sueros de pacientes con diagnóstico de Hepatitis autoinmune (HAI) confirmados por estudios clínicos y laboratoriales, como ser la prueba de IFI que consiste en la utilización del Kit comercial que tiene como sustrato cortes histológicos de estomago de ratón, considerándose como positivos todas aquellas muestras que presentaban un título igual o mayor a 1/20, confirmatorio de presencia de anticuerpos anti-musculo liso.

#### **2. Panel de sueros de individuos sanos.**

Constituido por un panel de 55 sueros de individuos en los cuales se demostró laboratorialmente la ausencia de anticuerpos anti músculo liso utilizando la prueba de Inmunofluorescencia, considerándose como negativos todas aquellas muestras que presentaban un título menor a 1/20.

El tamaño muestral ha sido definido de acuerdo al “Manual de procedimientos de control de calidad para los laboratorios de serología de los bancos de sangre”, como una publicación oficial de la Organización Panamericana de la Salud (OPS, 1994), que sugiere un tamaño de muestra constituido de un panel de sueros positivos y negativos de por lo menos 50 sueros, para la validación de un procedimiento serológico frente a otro similar normalizado.

### **D. MATERIAL BIOLÓGICO**

#### **1. NATURALEZA**

Esta constituido por muestras de sangre de pacientes de las cuales se obtienen los sueros como material biológico.

## **2. NÚMERO DE MUESTRAS**

El total de muestras analizadas esta constituido por 80 sueros distribuidos en un panel de 25 sueros positivos y un panel de 55 sueros negativos ingresadas a la unidad de histocompatibilidad e inmunogenética del instituto SELADIS entre el periodo enero 2009 a enero 2010

## **E. DISEÑO DE ESTUDIO**

### **1. TIPO DE ESTUDIO**

- El presente estudio se trata de un test diagnóstico

## **F. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **1. EQUIPOS**

- Criostato “Shandon” N° 2212-1592-792
- Microscopio de inmunofluorescencia “ OLYMPUS”
- Shaker, tipo 711 class E-I N°1147
- Lector de microplacas de EIA “SIGMA diagnostics”

### **2. MATERIALES**

- Cajas Koplín
- Camaras humedas
- Dispensador
- Papel adsorbente
- Hojas de estilete

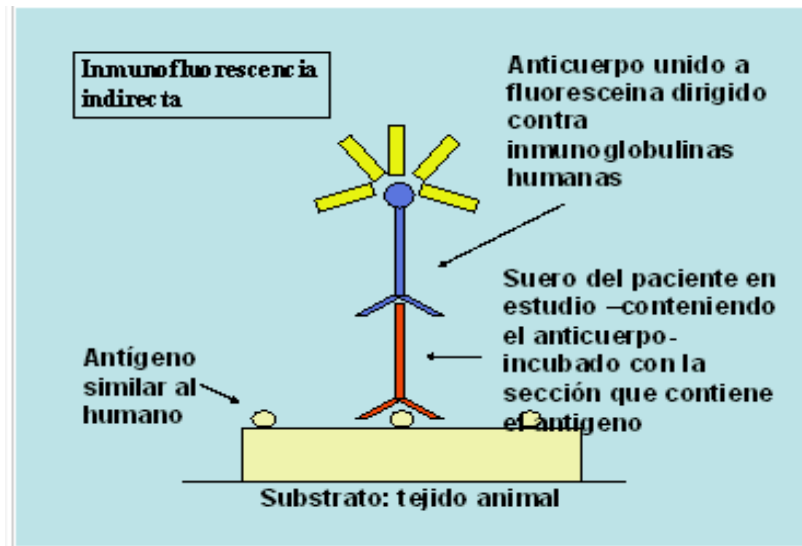
### **3. REACTIVOS**

- PBS IFI 1x
- Acetona fría (-20°) p.a.
- Conjugado 1/80 (anticuerpos antiantígeno de globulinas humanas IgG) marcado con tiocianato.

- Carboximetil celulosa 4%
- Glicerina tamponada
- Azul de Evans

## G. MÉTODO DE ANÁLISIS

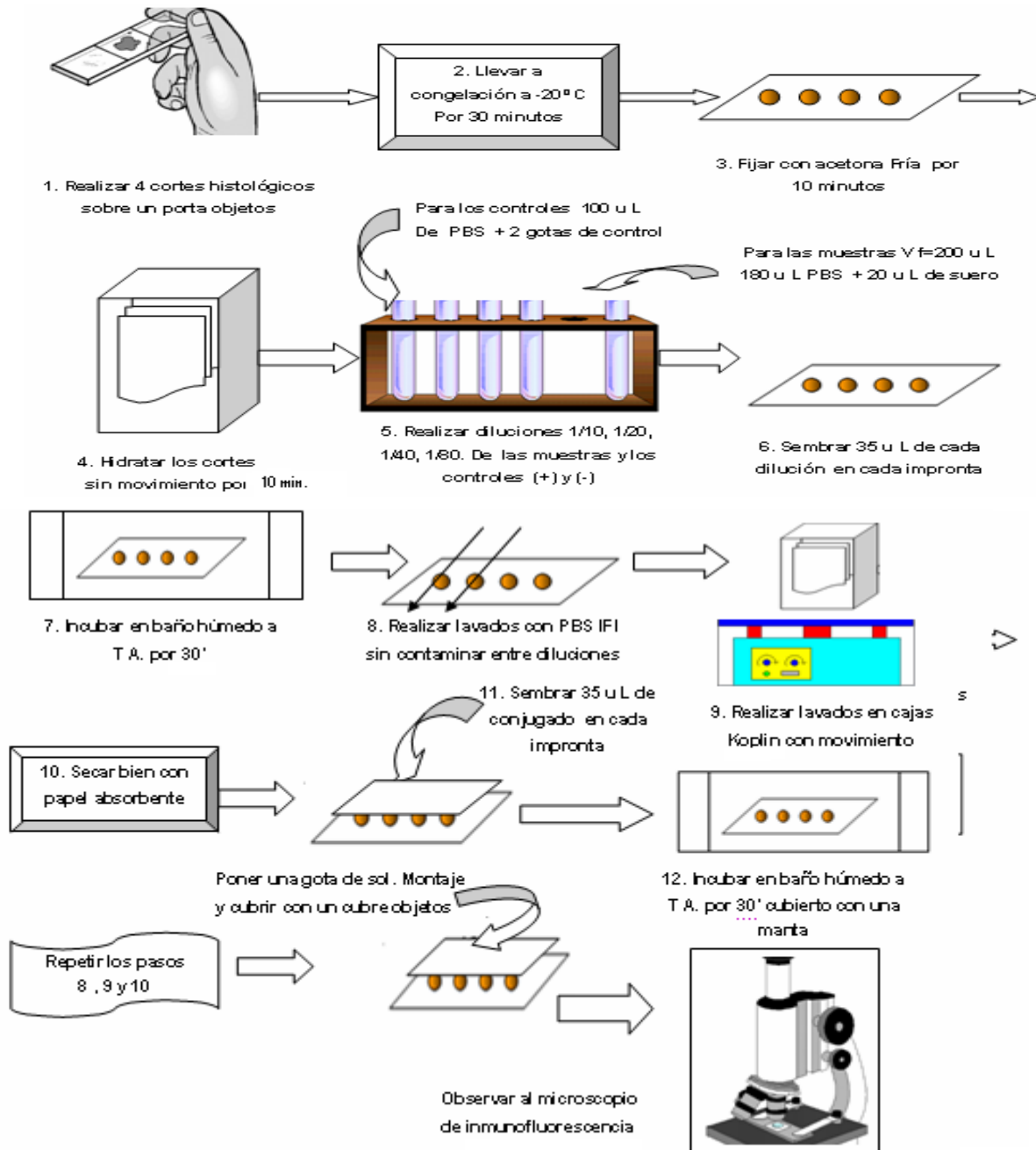
### 1. El método serológico empleado fue inmunofluorescencia indirecta



La inmunofluorescencia indirecta (IFI) es una técnica de dos pasos que tiene como objetivo la demostración de anticuerpos circulantes en el suero del paciente dirigidos contra estructuras epidérmicas. Para ello se incuba un sustrato con el suero del paciente a estudio y posteriormente se incuba con anticuerpos marcados con fluoresceína dirigidos contra las inmunoglobulinas.

#### 1.1. Optimización de la técnica casera de inmunofluorescencia que mide anticuerpos anti-músculo liso

**PRIMERA PARTE**



**1.2. Preparación de la globulina antihumana, marcada con fluoresceína**

Para el inicio de la investigación de anticuerpos antimúsculo liso por inmunofluorescencia se realizó la determinación del título de los sueros control positivo y negativo provenientes de un Kit comercial de IFI para AML.

Para ello se realizó la prueba de IFI con el sustrato de cortes de estómago de ratón, con las diluciones de los sueros control 1/10, 1/20, 1/40 y 1/80. así mismo se realizaron diferentes diluciones del conjugado (1/110, 1/100, 1/90 y 1/80). para posteriormente determinar cual es la dilución más alta de conjugado que permite volver a encontrar el titulo con los patrones fluorescentes conocidos de los sueros control positivo y negativo.

### **1.3. Sustrato: cortes de tejido de estómago de ratones**

- Se realizaron cortes de tejido de estomago de ratón de la especie **Swiss Albins**, obtenidos del bioterio de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas.
- Se utilizó un total de 10 ratones, a los que se realizó la eutanasia respectiva, para posteriormente diseccionar a cada uno de los animales con material de disección estéril, para la obtención del estómago del ratón.

#### **1.3.1. Fijación de los cortes histológicos de estómago de ratón**

- Se procedió a la recolección del estómago sobre cajas petri que contenían carboximetilcelulosa (CMC) al 4% en frío (ver anexos), para mantener la viabilidad de las células del tejido. Posteriormente estos se cubrieron con parafilm y se almacenaron a -20 °C hasta el momento de su uso. Cada uno de los días que se destinaron para el procesamiento tanto de los sueros positivos como de los negativos, se procedió a realizar los cortes en criostato a -20°C con un espesor aproximado de 5 micras.
- 4 de estos cortes se recogían sobre un portaobjetos, los cuales inmediatamente debían llevarse a refrigeración (-20°C) por un lapso de 20 a 30 minutos.
- Posteriormente los cortes se fijaban durante 10 minutos con acetona fría almacenada a (-20°C), que debe cubrir por completo el portaobjetos ya que la acetona suele evaporarse.
- Se hidrataron los cortes de tejido por 10 minutos sin agitación en una caja Koplin con PBS IFI diluida 1X.

#### **1.4. Diluciones y siembra de los sueros**



- Finalmente se seco la parte exterior de los cortes con papel absorbente y se colocaron en una cámara húmeda. Se realizaron diluciones seriadas (1/10, 1/20, 1/40, 1/80) de sueros del panel, control positivo, control negativo, con el tampón PBS IFI 0,015 M, 1X, pH 7.4 para un volumen final de 200 uL.(ver anexos).
- Se depositaron 30 uL de cada una de las diluciones seriadas sobre los cortes de tejido que se encontraban en la cámara húmeda, luego se incubaron 30 minutos a temperatura ambiente. Durante los últimos 10 minutos se preparó el diluyente del conjugado “Azul de Evans - PBS IFI” en una relación 2 gotas de azul de Evans + 3.5 mL del tampón PBS IFI, posteriormente se realizó una dilución 1/80 del conjugado (Anti IgG marcado con fluoresceína), en un volumen necesario para cubrir cada corte del tejido.
- Una vez culminada el primer tiempo de la incubación se lavaron las placas con tampón PBS IFI por 2 minutos usando un bulbo plástico, cuidando no contaminar las improntas entre las diluciones.
- Posteriormente se lavó en agitación durante 10 minutos en el “shaker”, secar con papel absorbente y depositar nuevamente en la cámara húmeda.
- Añadir 30 uL del conjugado a cada una de las improntas e incubar 30 minutos a temperatura ambiente, cubriendo la cámara húmeda con una manta oscura.
- Repetir los pasos de lavado y secado, y por último añadir a cada una de las improntas una pequeña gota de solución de montaje y sellar con cubreobjetos.
- Guardar las muestras protegidas de la luz hasta el momento de la lectura en el microscopio de inmunofluorescencia.

### **1.5. Interpretación de los resultados**

- Títulos iguales o menores a 1/20 se consideran negativos para Hepatitis autoinmune.
- Títulos de 1/20 se encuentran en el umbral, es posible que indiquen Hepatitis autoinmune pero el resultado deberá ser confirmado apoyados en los resultados de AMA y ANA.
- Títulos iguales o mayores a 1/40 se consideran positivos para Hepatitis autoinmune.

## **2. ELISA Kit (Trinity Biotech) para la detección de Anticuerpos Antimitocondriales.**

Una vez procesado el total de las muestras con el método optimizado para AML, a todas las muestras positivas se les realizó la prueba de ELISA que detecta anticuerpos antimitondriales con el fin de realizar la correlación entre AML y AMA.

- Los reactivos utilizados: diluyente de la muestra, buffer de lavados se utilizaron según las recomendaciones del kit comercial (Trinity Biotech).
- Se realizó dilución del suero problema 1/21 con buffer diluyente de las muestras y se sembró 100 ul esta dilución previa en placas ELISA además de los controles (+) y (-) mas los calibradores del Kit, luego se transfirió 100ul de cada dilución y se incubó a 37°C por 30 min. Se lavó 3 veces con buffer de lavados del Kit y se secaron las placas en papel absorbente.
- Se colocó el conjugado 100ul (antigamaglobulina humana IgG y se sembró por 30 min a 37°C luego se realizó 3 lavados con 300 ul de buffer de lavados y el correspondiente secado de la placa. Se colocó 100ul del sustrato dejando actuar por 15 min a temperatura ambiente y en oscuridad finalizado este tiempo se colocó solución stop 100ul (H2SO4) 1N y su posterior lectura de las DO (Densidades Ópticas) en lector de ELISA con filtro de 450nm y filtro diferencial de 630 nm de longitud de onda.

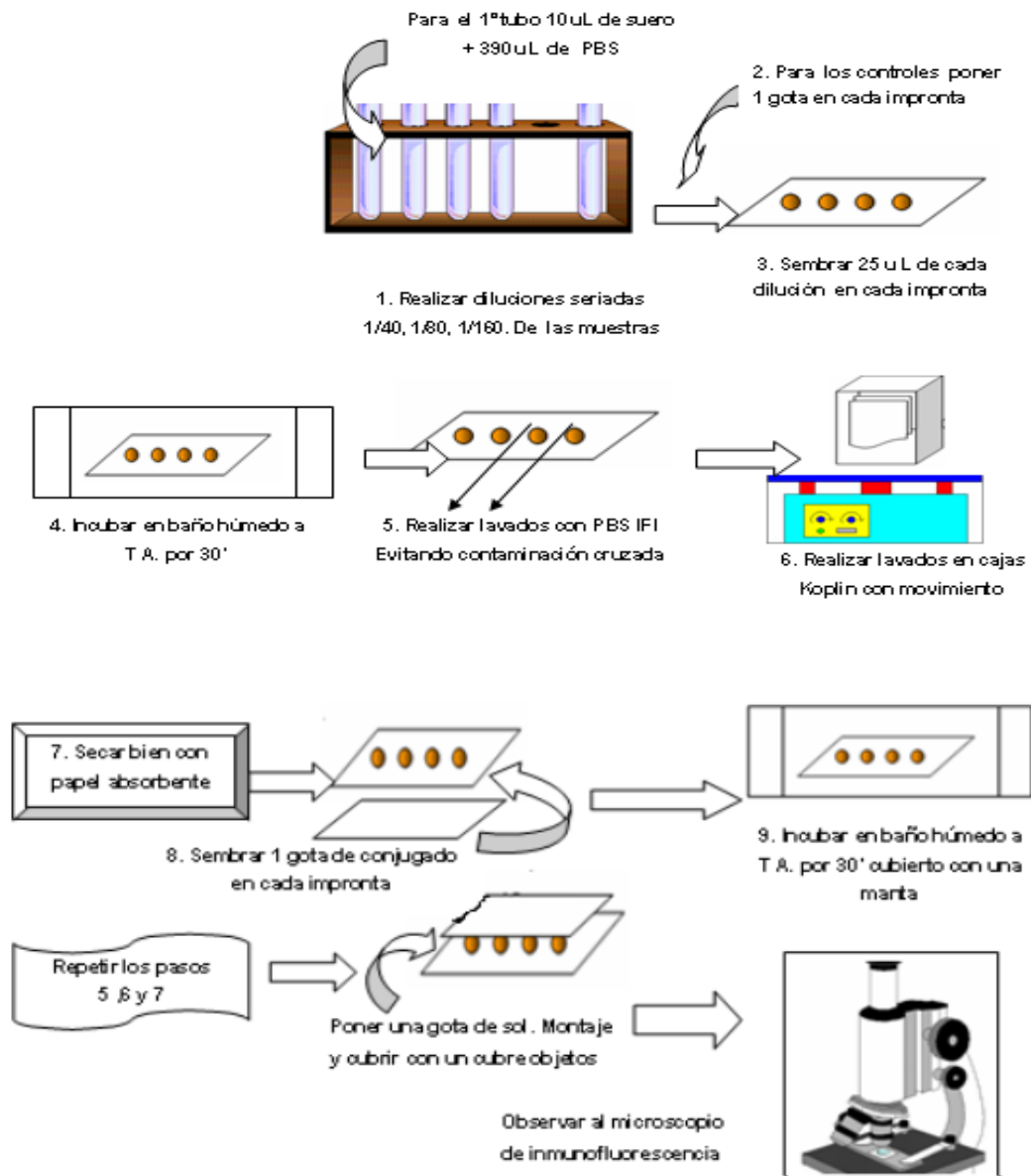
### **2.1. Interpretación de los resultados**

Las muestras con índice que muestran valores menores o iguales a 0.90 se consideran negativos para anticuerpos antimitocondriales y entre 0.91 – 1.09 se encuentran en la zona de duda y deben repetirse. Muestras con índice mayor a 1.10 son positivos para anticuerpos anti mitocondriales.

### **3. IFI – ANA Kit (ORGENICS) para la detección de Anticuerpos Antinucleares.**

Una vez procesado el total de las muestras con el método optimizado para AML, a todas las muestras positivas se les realizó la prueba de IFI - ANA que detecta anticuerpos antinucleares con el fin de realizar la correlación entre AML y ANA.

### **Protocolo de IFI - ANA (Orgenics)**



## CAP VII RESULTADOS

### A. Titulación del conjugado

Después de realizar el proceso de titulación del conjugado determinó que el título óptimo era de 1/80, ya que a esta concentración del conjugado se volvió a encontrar los patrones fluorescentes en la intensidad recomendada por el kit comercial, que mide anticuerpos antimúsculo liso que usa como sustrato cortes histológicos de estomago de rata. (Ver tabla 2)

**TABLA 2.** Titulación del conjugado globulina antihumana, marcada con fluoresceína.

DILUCIÓN CONJUGADO	VARIABLE	DILUCIÓN DE	LOS CONTROLES	POSITIVO Y	NEGATIVO
	POS,NEG	(1/10)	(1/20)	(1/40)	(1/80)
(1/150)	Positivo	(D)	(-)	(-)	(-)
	Negativo	(-)	(-)	(-)	(-)
(1/120)	Positivo	(+)	(D)	(-)	(-)
	Negativo	(-)	(-)	(-)	(-)
(1/100)	Positivo	(+)	(+)	(D)	(-)
	Negativo	(-)	(-)	(-)	(-)
(1/90)	Positivo	(+)	(+)	(+)	(D)
	Negativo	(-)	(-)	(-)	(-)
(1/80)	Positivo	(+) (+)	(+)	(+)	(+)
	Negativo	(-)	(-)	(-)	(-)
(1/60)	Positivo	(+) (+)	(+) (+)	(+)	(+)
	Negativo	D	(-)	(-)	(-)

(+) = Positivo;

(-) = Negativo

(D) = Dudoso

### B. Resultados obtenidos del test diagnóstico a partir de paneles de sueros positivos y negativos

De los 25 sueros provenientes de pacientes con hepatitis autoinmune se obtuvieron 25 resultados positivos, es decir 25 verdaderos positivos y 3 falsos positivos; De los 55 sueros de pacientes negativos a la prueba de anticuerpos antimúsculo liso por el kit, se obtuvieron 49 verdaderos negativos, y 3 falsos negativos. (Ver tabla 3)

**TABLA 3.** Resultados obtenidos de los paneles de sueros positivo y negativo donde se muestran los resultados obtenidos por la técnica optimizada de IFI que mide AML usando como sustrato cortes histológicos de estomago de ratón frente a los resultados obtenidos por el método comercial.

PRUEBA ANA (Kit)	AML - KIT		TOTAL
	POSITIVO	NEGATIVO	
POSITIVO	25	3	28
NEGATIVO	0	52	52
<b>TOTAL</b>	25	55	80

El Kit comercial de la marca Orgenics que mide AML por inmunofluorescencia, fue utilizado como Gold estandar ya que este cuenta con sensibilidad, especificidad, eficiencia, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo de un 95%.

Para el método optimizado que usa como sustrato estomago de ratón, se determinó una **sensibilidad del 100%, Especificidad del 95%, Eficiencia del 96%, valor predictivo positivo 89% y valor predictivo negativo 100%**.(Ver tabla 4)

**TABLA 4.** Comparación de la sensibilidad, especificidad, eficiencia y los valores predictivos del método optimizado frente al del kit comercial.

Método empleado	Sensibilidad	Especificidad	Eficiencia	Valor predictivo positivo	Valor predictivo negativo
Gold estandar (Kit comercial)	95%	95%	95%	95%	95%
Método Optimizado	100%	95%	96%	89,30%	100%

### **1. Pruebas de concordancia empleados para comparar el Gold estandar con el método optimizado.**

Las pruebas de concordancia que se emplearon en este estudio fueron el índice Kappa, y prueba de Chi cuadrado. Siendo el índice Kappa el utilizado como referencia para determinar el grado de concordancia o correlación, ya que este cuenta con un score que nos indica el grado de correlación obtenida.

El **índice de Kappa** encontrado para el método optimizado fue de **0.82** que según podemos observar en la escala de este índice (ver Pág. 39) corresponde a una concordancia muy buena con los resultados obtenidos a través del kit comercial que se usa de manera rutinaria en el laboratorio (Gold estandar), por la prueba del **chi cuadrado** el resultado obtenido fue de **60.29** mayor a 3.84 que es el valor critico que se espera en casos de que exista independencia (sin relación) entre los resultados de dos métodos de diagnóstico, por tanto determina que existe una relación de resultados entre ambos métodos.

**TABLA 5.** Resultados e interpretación de las concordancias y correlaciones obtenidas para el método optimizado.

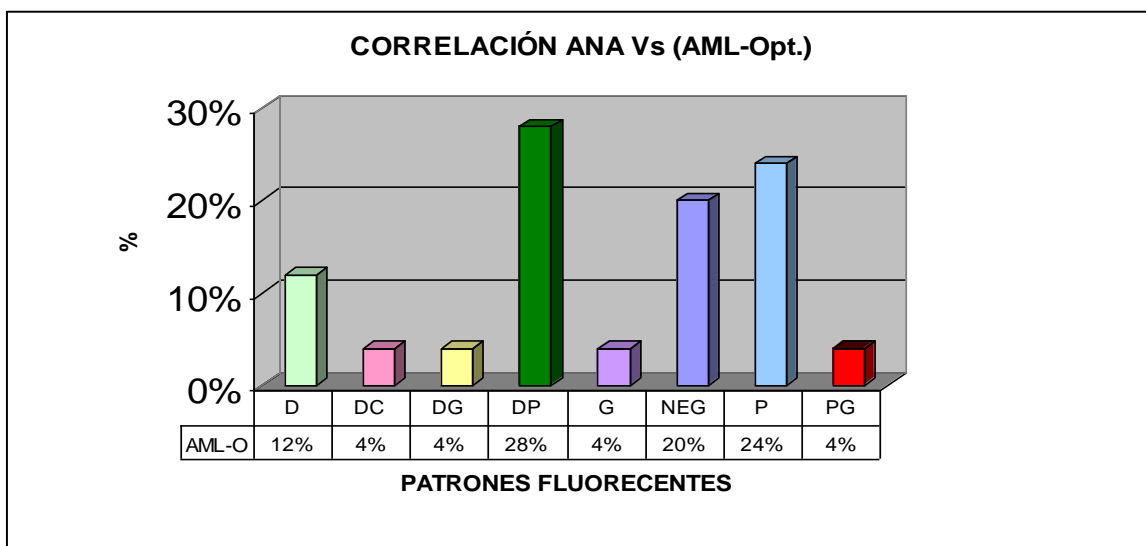
MÉTODO OPTIMIZADO	INDICE DE KAPPA	PRUEBA DE X <sup>2</sup>	INTERPRETACIÓN "indice kappa"
Cortes Histologicos Estomago de ratón	<b>0,82</b>	<b>60,29</b>	Concordancia muy buena

**2. Correlación de los sueros positivos del método optimizado (AML-Opt.) y el método comercial (AML-Kit) frente a los anticuerpos anti-nucleares (ANA).**

Para determinar el grado de correlación que existe entre los resultados de las pruebas que determinan anticuerpos antinucleares (ANA) y anticuerpos antimúsculo liso (AML), se le realizó a los 25 sueros positivos para AML la prueba de ANA, en donde se encontró que el 80% de los sueros eran positivos a la prueba de ANA, pero existía diferencia entre los patrones fluorescentes presentes en cada uno de ellas. A continuación se muestran los resultados de correlación ANA - AML obtenidos para cada uno de los métodos estudiados.

**2.1. Correlación de resultados de (AML-Opt.) con los resultados de ANA**

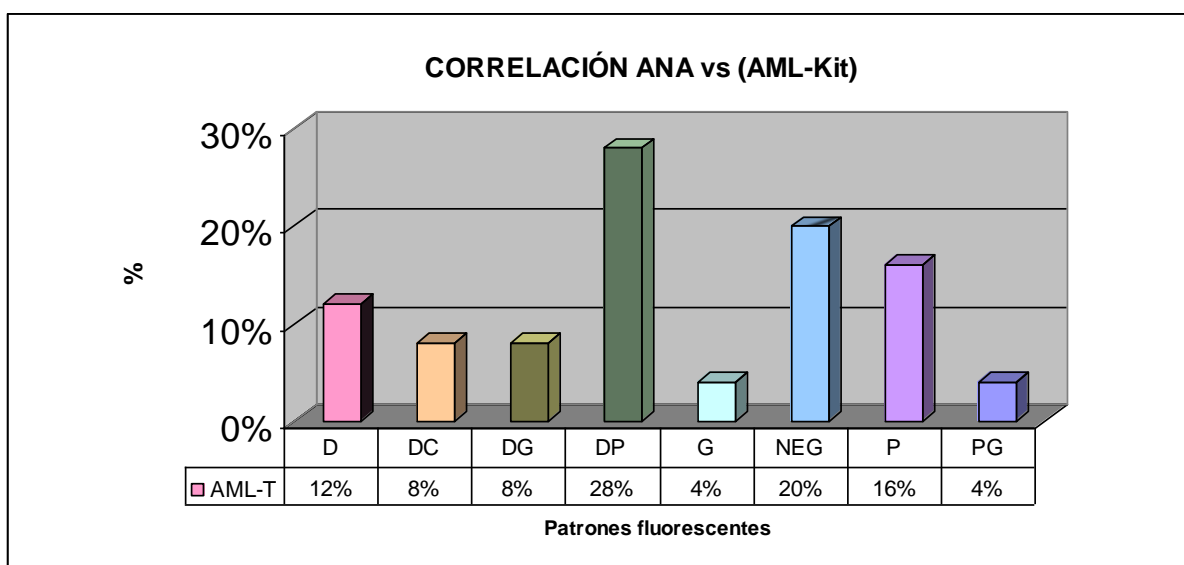
Los resultados obtenidos de la Correlación de los sueros positivos del método optimizado frente a los anticuerpos anti-nucleares (ANA), nos mostraron que el **28%** de las muestras positivas para (AML-Opt.) presentan el patrón **difuso periférico (DP)**, **24%** el patrón **periférico (P)**, **12%** el patrón **difuso (D)**, **4%** patrón **difuso centromérico (C)**, **4%** patrón **difuso granular (DG)**, **4%** el patrón **granular (G)**, **4%** el patrón **periférico granular (PG)** y **20%** dieron **negativos** a la prueba. (Grafico 1). En base a estos resultados se concluye que en el 80% de los resultados positivos de ANA, de manera general en el 40 % de ellos estaba presente el patrón fluorescente difuso y en el otro 40% el patrón fluorescente periférico.



**GRÁFICO 1.** Correlación de % ANA vs (AML-O)

## **2.2. Correlación de resultados de (AML-kit) con los resultados de ANA**

Los resultados obtenidos de la Correlación de los sueros positivos procesados por el kit comercial (AML-Kit) frente a los anticuerpos anti-nucleares (ANA), nos mostraron que también **28%** de las muestras positivas para (AML-Kit), presentan el patrón **difuso periférico (DP)**, **16%** el patrón **periférico (P)**, **12%** el patrón **difuso (D)**, **8%** patrón **difuso centromérico (DC)**, **8%** patrón **difuso granular (DG)**, el patrón **granular (G)**, **4%** el patrón **periférico granular (PG)** y **20%** dieron **negativos** a la prueba (Grafico 2).



**GRÁFICO 2.** Correlación % ANA vs AML-G

## **3. Correlación de los sueros positivos para el método de (AML-Opt.) y el (AML-kit) frente a los anticuerpos antimitocondriales (AMA).**

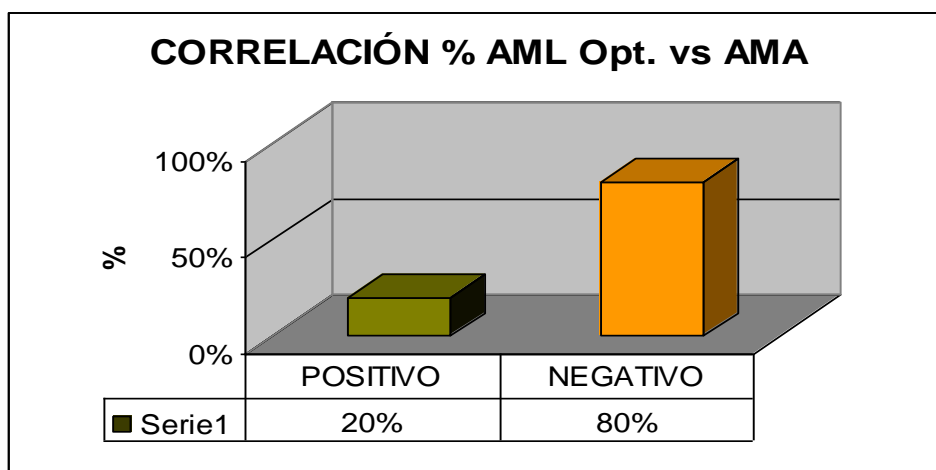
En virtud a que existen antecedentes que indican que el síndrome de sobreposición de enfermedades hepáticas autoinmunes puede producir que algunos pacientes expresen al mismo tiempo anticuerpos antimitocondriales y anticuerpos antimúsculo liso, se decidió evaluar la correlación de resultados que existen entre estas pruebas.

Es así que se realizó una correlación entre los resultados obtenidos de los AMA con los resultados de AML por el método optimizado y los resultados obtenidos con el kit comercial por separado, en cada uno de los casos se determinó el porcentaje de correlación.

Para determinar el grado de correlación que existe entre los AML y los AMA, se le realizó a los 25 sueros positivos la prueba de AMA, en donde pudimos encontrar que el 80% de los sueros eran negativos a la prueba de AMA, y el 20% restante correspondía a pacientes que presentaban ambos anticuerpos al mismo tiempo.

### **3.1. Correlación de resultados de (AML-Opt.) con los resultados de AMA**

Los resultados obtenidos de la correlación de los sueros positivos del método optimizado (AML-Opt.) frente a los anticuerpos antimitocondriales (AMA), nos dieron que **20%** de las muestras positivas para (AML-Opt.), dieron **positivo** a la pruebas de AMA y **80%** dieron **negativo** a la prueba de AMA. (Gráfico 3)

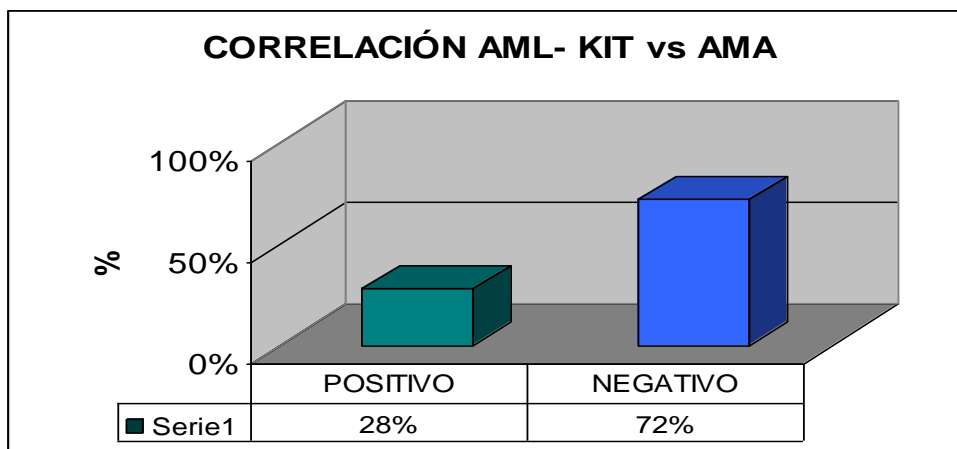


**GRÁFICO 3.** Correlación % AML-Opt. vs. AMA.

### **3.2. Correlación de resultados de (AML-kit) con los resultados de AMA**

Los resultados obtenidos de la correlación de los sueros positivos para el método comercial (AML-kit) frente a los anticuerpos antimitocondriales (AMA), nos dan que **28%** de las muestras positivas para AML-kit, dieron **positivo** a la pruebas de AMA y **72%** de las muestras positivas para AML-kit dieron **negativo** a la prueba de AMA. (Gráfico 4)

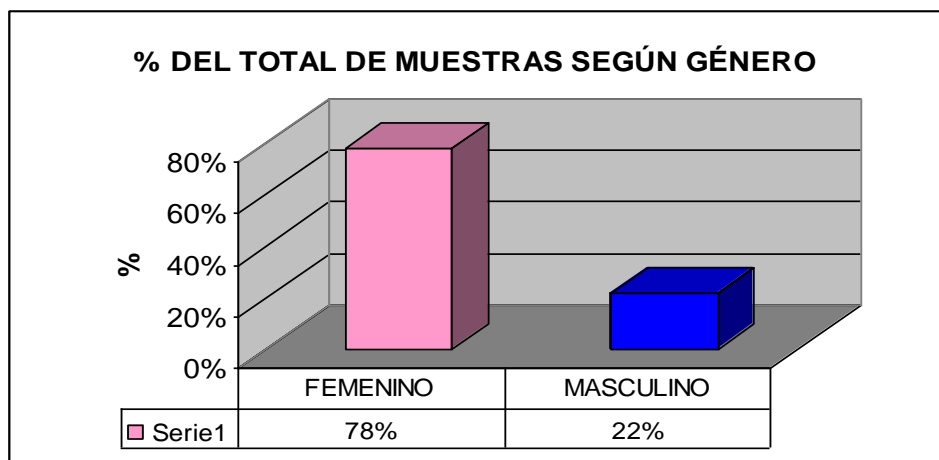




**GRAFICO 4.** *Correlación % AMA vs AML-G*

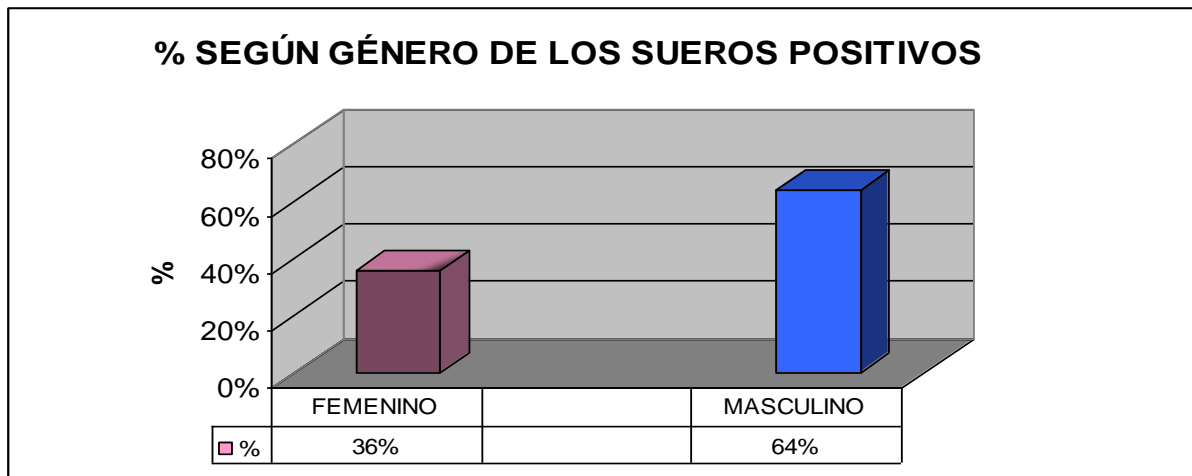
**4. Afectación HAI tipo 1 según género**

Del total de 80 pacientes remitidos al laboratorio durante la gestión 2009, con diagnóstico clínico presuntivo de HAI se determinó que el **77.6%** pertenecían a pacientes del sexo femenino, y tan solo un **22.4%** a pacientes del sexo masculino. (Gráfico 5). Con estos datos se establece que la sospecha clínica de la enfermedad tiene una relación mujer/hombre de 3.5:1.



**GRÁFICO 5.** *Porcentaje del total de muestras según género*

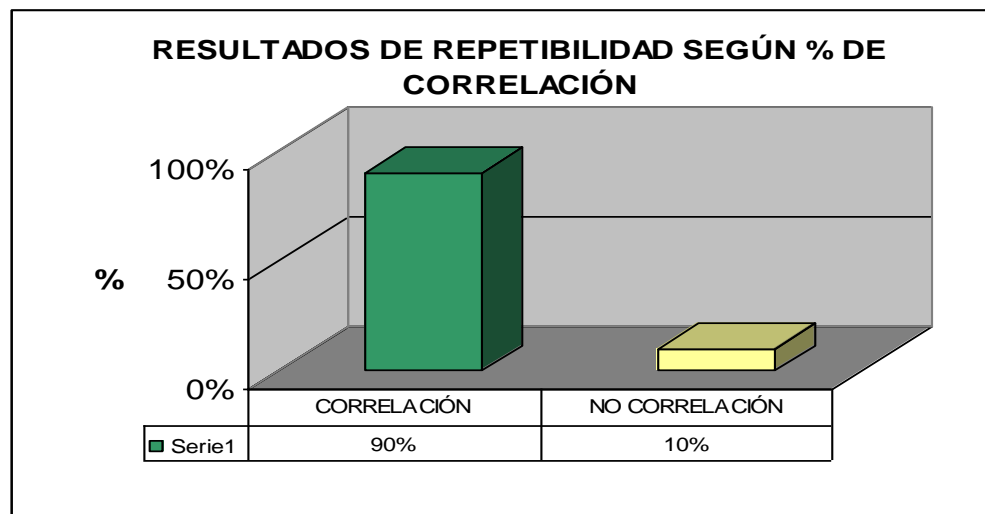
Posteriormente se analizó los datos de las muestras de pacientes positivos para AML en el cual se determinó que el **64%** pertenecía a pacientes del sexo masculino y el **36%** a pacientes del sexo femenino. (Gráfico 6).



**GRÁFICO 6.** Porcentaje según género de sueros positivos

### **5. Resultados obtenidos de la prueba de repetibilidad**

Para determinar la repetibilidad de resultados emitidos por la prueba optimizada, se seleccionaron 20 muestras al azar y se determinó la presencia de AML en dos diferentes tiempos. Los resultados obtenidos muestran que para ambos métodos existe una buena correlación ya que pudimos encontrar un 90 % de repetibilidad entre ambos resultados.



**GRÁFICO 7.** Resultados de repetibilidad.

## **CAPITULO VIII. DISCUSIÓN**

En 1994 en la ciudad de los Ángeles-USA se realizó el Primer Congreso Mundial de Gastroenterología en el que aprobaron el Informe del Grupo de Trabajo de Nomenclatura de las Enfermedades del Hígado, en este establecieron los parámetros etiológicos para la clasificación de la Hepatitis Autoinmune. De acuerdo a estos y en base al patrón de anticuerpos circulantes se han propuesto tres tipos de hepatitis autoinmune (HAI): HAI tipo 1 (anticuerpos antinucleares (ANA) y anti-músculo liso positivos (AML)); HAI tipo 2 (anticuerpos antimicrosomas hepático renal tipo 1 (anti LKM1)) y la de tipo 3 que se caracteriza por presentar un autoanticuerpo anti SLA dirigido contra el autoantígeno soluble hepático.<sup>(22)</sup>

Al ser los anticuerpos antimúsculo liso uno de los marcadores específicos para el diagnóstico de hepatitis autoinmune tipo 1 nos propusimos optimizar y validar la prueba de inmunofluorescencia que usa como sustrato cortes histológicos de estomago de ratón, para determinar estos anticuerpos en los sueros de los pacientes.

Por los resultados obtenidos en el presente estudio, se ha observado que la técnica optimizada alcanza una sensibilidad del 100% y una especificidad del 95%, lo que significa que este método tiene una alta capacidad de seleccionar a pacientes con sospecha de HAI tipo I. Sin embargo cuando se obtiene un resultado positivo por cualquiera de los dos procedimientos de AML estudiados (Técnica optimizada o el kit comercial), este resultado debe correlacionarse con la clínica del paciente y otras pruebas de laboratorio de apoyo, ya que existe un 5% de resultados falsos positivos y la probabilidad del fenómeno de sobreposición con la Cirrosis biliar Primaria (AMA positivo). Las técnicas de inmunofluorescencia en general se consideran de tamizaje por el hecho de ser semicuantitativas. En un estudio similar (Sosa et al., 2001) verificó que utilizando cortes histológicos para la determinación de anticuerpos antinucleares ANA se obtenía un alto porcentaje de falsos positivos ya que la especificidad de la prueba no superaba el 69%, y que a raíz de estos resultados obtenidos sugirió que para confirmar o descartar el resultado es necesario aplicar una prueba confirmatoria que presente mayor especificidad como ser la detección de anti-ds-DNA por ELISA. Estos resultados nos confirman que el diagnóstico de la hepatitis

autoinmune no solo debe basarse en la prueba de inmunofluorescencia, sino que es necesario utilizar otros marcadores como ser los ANA (realizados por IFI), AMA (realizado por ELISA) y ELISA frente a F-actina que recientemente ha sido descrito como un marcador específico de la enfermedad. El diagnóstico de HAI debe manejarse al igual que el resto de las enfermedades autoinmunes en donde es necesario evaluar al menos tres marcadores laboratoriales para confirmar o descartar una patología.

Como habíamos mencionado anteriormente, cuando se requiere la evaluación de diferentes métodos frente a un mismo panel de sueros de referencia se usan estudios de concordancia (o eficiencia) como ser el índice de Kappa. En cuanto a los análisis de concordancia aplicados al método optimizado frente al kit comercial, se encontró que existía un índice Kappa de **0.82** ( $p > 0,005$ ) lo cual según este índice corresponde a una concordancia muy buena entre ambos resultados, similar hallazgo fue encontrado en los estudios de correlación obtenidos por (Poma et al., 2009) quien realizó la evaluación de tres sustratos empleados en la prueba de IFI que mide anticuerpos antimitocondriales para el diagnóstico de cirrosis biliar primaria, donde encontró que la concordancia entre el método que usaba cortes criostáticos de riñón de ratón y el método de ELISA era muy buena ya que el índice Kappa fue de 0.84 ( $p > 0,005$ ). Al aplicar la prueba del chi cuadrado el resultado obtenido fue de 60.29 mayor a 3.84 que es el valor crítico que se espera en casos de que exista independencia (sin relación) entre los resultados de dos métodos de diagnóstico, por tanto se puede mostrar que existe una relación de resultados entre los métodos estudiados.

Ahora bien, cabe recalcar que para que un laboratorio pueda reproducir este método optimizado se debe seguir las condiciones descritas en este trabajo ya que se ha visto que para evitar que los cortes histológicos se desprendan del portaobjetos durante los lavados es necesario realizar una buena fijación de estos sobre el porta objetos, para esto la acetona debe permanecer todo el tiempo a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  y se debe respetar el tiempo de refrigeración de 30 minutos de las placas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  caso contrario se corre el riesgo de perder los cortes durante los lavados. También, se debe tomar en cuenta que para realizar una interpretación óptima de la lectura microscópica se debe evitar la desecación de las placas debido a que es necesario recorrer todos los campos para hacer una buena lectura y visualización del patrón fluorescente característico de AML. En cuanto al grosor

de los cortes es necesario que estos no superen las 5 micras ya que el no hacerlo no se podrá visualizar las estructuras de músculo liso presentes en el estomago de rata y se prodría a dar un resultado erróneo de la prueba.

La asociación entre ANA y HAI se describió hace más de 50 años y permitió acuñar erróneamente el término de hepatitis lupoide por la existencia de hepatitis y anticuerpos antinucleares, tal como se observa en el lupus eritematoso sistémico. <sup>(10)</sup> En la actualidad los ANA se detectan de forma rutinaria por inmunofluorescencia indirecta (IFI) en cortes de hígado, riñón y estómago de ratón. En los gráficos 1 y 2 se muestra que 20 de los 25 pacientes con AML positivos dieron resultados de ANA positivos lo cual tiene relación con lo encontrado por (Cassani et al., 1985), en el cual indica la fuerte asociación entre ANA y AML en pacientes con HAI tipo 1 y que el patrón predominante suele ser el difuso u homogéneo que suele estar dirigido contra el nucleosoma o histona. En la presente investigación encontramos que el patrón difuso se encuentra en un 60% de los pacientes positivos para AML, este patrón suele presentarse solo o acompañado de otro patrón fluorescente. También, encontramos que el patrón periférico se encontraba en un 48 % de los sueros positivos pero al igual que el anterior siempre acompañado de otro patrón fluorescente.

Se conoce que para el diagnóstico diferencial de CBP y HAI tipo 1 el criterio se basa en la presencia de anticuerpos antimitocondriales (AMA) y anticuerpos antimúsculo liso (AML) respectivamente, es por esta razón que en el presente estudio se les realizó a todas las muestras positivas para AML la prueba de AMA por ELISA. En el análisis de correlación AML/AMA se pudo evidenciar que 80% del total de sueros positivos para AML eran negativos para AMA, datos que concuerdan con los criterios de diagnósticos de la hepatitis autoinmune que otorga un puntaje de -2 a todos aquellos pacientes que den positivo a la prueba de AMA <sup>(21)</sup>, también se conoce que puede existir un fenómeno de OVERLAP o de sobreposición entre la CBP y la HAI en la que pueden estar presentes ambos tipos anticuerpos en un individuo <sup>(10)</sup>, este podría ser el caso del 20% de los pacientes que dieron positivo a la prueba de anticuerpos antimitocondriales, para confirmar estos hallazgos se deben realizar más estudios para correlacionar clínica e histológicamente los resultados de cada uno de los pacientes.

Se ha reportado que la incidencia media anual de la hepatitis autoinmune es de 1,9 por 100.000 habitantes, esta enfermedad afecta predominantemente a las mujeres en una relación 3,6:1 con respecto a los hombres. <sup>(19)</sup> Nuestro estudio muestra que la sospecha clínica de la enfermedad esta presente mayormente en mujeres con un (78%) siendo la relación de afectación mujer/hombre de 3.5:1 lo cual es similar a lo encontrado por Loja. <sup>(19)</sup> Un hallazgo importante se produjo cuando realizamos el análisis de solo los casos positivos involucrados en este estudio donde encontramos que un 64% de los sueros positivos pertenecían a pacientes del sexo masculino. Esto se puede atribuir a que al ser Bolivia un país poco concientizado respecto a enfermedades autoinmunes especialmente con aquellas que comprometen al hígado, muchos pacientes dejan de lado su salud por factores económicos muchas de las pacientes enfermas no se realizan el diagnóstico oportuno de la enfermedad. Otro factor importante es el consumo de alcohol que es más dañino en hombres que en mujeres que según Widmark “Las diferencias según el sexo son más acusadas ya que tiene gran influencia la cantidad de alcohol quemado por minuto y los kilogramos de peso de cada individuo, para un correcto metabolismo de el alcohol” <sup>(39)</sup>. Esto explicaría, al menos en parte, la mayor incidencia de pacientes masculinos en los casos positivos para AML ya que según los criterios de diagnósticos de la hepatitis autoinmune otorgan un puntaje de +2 a todos aquellos pacientes que ingieran bebidas alcohólicas. <sup>(12)</sup> Otra razón no menos importante es que en la mayoría de los casos las ordenes medicas en las que se solicita AML no vienen acompañadas de ANA o AMA para realizar un diagnostico adecuado de la enfermedad ya que como habíamos indicado anteriormente es necesario por lo menos 3 pruebas para descartar o afirmar la presencia de cualquier enfermedad autoinmune.

Para valorar plenamente un método se debe determinar la repetibilidad de resultados del método optimizado. Es en este sentido que al realizarse la prueba de repetibilidad encontramos que el método optimizado tiene un porcentaje de repetibilidad del 90%. Si sumamos este antecedente a los resultados de sensibilidad (100%), especificidad (95%) y la eficiencia del método del 96%, podemos afirmar que el método optimizado está valorado y puede ser empleado en el diagnóstico de laboratorio, pero siempre tomando en cuenta que para el correcto diagnóstico de una enfermedad autoinmune se requiere correlacionar la clínica con los hallazgos laboratoriales.

## **CAPITULO IX. CONCLUSIÓN**

En el presente estudio se logró primero optimizar todas las condiciones para desarrollar la fase analítica de la prueba de inmunofluorescencia indirecta para el diagnóstico de Hepatitis autoinmune tipo 1 que utiliza como sustrato cortes histológicos de estomago de ratón frente a otro método comercial de inmunoflorescencia que utiliza el mismo sustrato. En base a los resultados obtenidos hemos podido conocer entre otros indicadores la eficiencia del método optimizado que a su vez determina cual es la validez de los resultados que se emiten por esta prueba.

Se logró determinar que la prueba validada presenta una sensibilidad del 100%, especificidad del 95%, eficiencia del 96%, valor predictivo negativo del 100% y un valor predictivo positivo de 89.3%, lo cual valida la prueba para su uso como herramienta de diagnóstico de HAI tipo 1.

Mediante los resultados obtenidos se determinó que la concordancia del método validado frente al kit comercial es muy buena (índice kappa 0.82), lo cual indica que ambas pruebas podrían utilizarse de manera indistinta para el diagnóstico de hepatitis autoinmune tipo 1 por inmunofluorescencia.

Mediante el estudio comparativo de correlación entre los resultados obtenidos de AML, ANA y AMA encontramos, que en los sueros positivos para ambos métodos en un 80% de los casos los resultados de AML van acompañados de ANA (patrones fluorescentes difuso y/o periférico) y que un 20% de los casos de AML positivo puede estar acompañado de AMA positivo posiblemente debido a la presencia del síndrome de “sobreposición”

Se determinó que el 64% de los sueros positivos para AML pertenecían a pacientes del sexo masculino, pero que el 77% de pacientes en los que se sospecha la presencia de AML pertenecen al sexo femenino.

Se determinó que el método optimizado tiene una alta reproducibilidad debido a que se encontró que en el 90% de los casos se repetían los resultados de las muestras analizadas.

## **CAP. X. REFERENCIA BIBLIOGRAFICA**

1. Mesa C. y Covos E. Cirrosis biliar primaria. Fondo educativo interamericano S.A. . MEDISAN 2007: 23-26.
2. Guañabens N, Parés A, del Rio L, et al. Sodium fluoride prevents bone loss in primary biliary cirrhosis. J Hepatol 1992, 15:345-349.
3. Garassini M.A., Garassini M.E. Hepatitis autoinmune. GEN 1994; 48: 256-263.
4. Czaja A. Chronic Active Hepatitis: The challenge for a new nomenclature. Ann Intern Med 1993; 119 :510-517.
5. Figueroa R. Hepatitis Crónica. Rev Gastroent Perú 1995; (Supl.) 1: 577-588.
6. Silva H. Daño hepático crónico. Revista clínica CHilena 2004; 18: 194 -198
7. Davis JS. Antinuclear antibodies (ANA). In: Kelly WN, Harris ED, Ruddy S, Sledge CB, eds: Textbook of Rheumatology, Vol 1 . Philadelphia: WB Saunders Co. 1981: 671-709.
8. Guerrero I. Cols M. Hepatitis autoinmune y colangitis esclerosante primaria ¿asociación dependiente o independiente?. Rev. Gastroenterol Mex, Vol. 72, Núm. 3, 2007: 324-7.
9. Mesa L, Cobos E, García J, Zayas JR, Mesa M. Cirrosis biliar primaria. Artículo en línea. MEDISAN 2007; 11(3).
10. Valverde M, Gorraéz M. Patología latinoamericana, Revista hepatitis autoinmunitaria-cirrosis biliar primaria Volumen 46, núm. 2, abril-junio, 2008
11. Krawitt EL. Autoimmune hepatitis. N Engl J Med 2006; 354:54–66.



12. Gregorio GV, Portmann B, Karani J, et al. Autoimmune hepatitis/sclerosing cholangitis overlap syndrome in childhood: a 16-year prospective study. *Hepatology* 2001;33:544-53.
13. Sherlock S. Primary biliary cirrhosis, primary sclerosing cholangitis and autoimmune cholangitis. *Clin Liver Dis* 2000; 4:97-113
14. Martins A, Eduardo B. Sclerosing cholangitis. *Current opinion in gastroenterology* 2000;16: 444-449.
15. Brandan E, Bruno M. Colangitis esclerosante primaria. Presentación de un caso y revisión de la literatura. 1996 May; 23(5); 1105-11.
16. Orts J, Zúñiga A. Hepatitis autoinmune. *An. Med. Interna (Madrid)* v.21 n.7 Madrid jul. 2004. 1996 May; 23(5); 1105-11.
17. Infante M. Hepatitis autoinmune. Instituto Superior de Medicina Militar "Dr. Luis Díaz Soto". *Rev Cubana Med* 2000; 39(1):49-56.
18. Strassburg CP, Manns MP. Hepatitis autoinmune. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2003; 17: 291-306.
19. Loja D, Vilca V, AVILES G. Hepatitis autoinmune. *Rev Med Hered* 1997; 8:122-125.
20. Longhi M, Serena MA, Vergani G, etiopathogenesis of autoimmune hepatitis *Journal of Autoimmunity* 34 (2010) 7–14.
21. Donaldson PT. Genetics in autoimmune hepatitis. *Semin Liver Dis* 2002;22:353–64.
22. Quintanilla J, Hernández V, Gourzong CH. Hepatitis autoinmune (presentacion de un caso y revision de tema) *LXIII (577)*151-155; 2006.
23. Amengual G., Rodriguez S. Autoinmunidad en las enfermedades del hígado (I). VOL. 19 / Núm. 2 v 3. *INMUNOLOGIA*, 2000; PP 90-102
24. Czaja AJ, Homburger HA. Autoantibodies in liver disease. *Gastroenterology*. 2001; 120: 239-49.
25. Montaña A, Angulo P.. Auto-anticuerpos en las enfermedades hepáticas. *Rev Gastroenterol Mex*, 2007. Vol. 72, Núm. 1;62:62-68.
26. Czaja AJ, Cassani F, Cataleta M. Antinuclear antibodies and patterns of immunofluorescence in type 1 autoimmune hepatitis. *Dig Dis Sci* 1997; 42: 1688-96.

27. Courvalin JC, Worman HJ. Nuclear envelope protein autoantibodies in primary biliary cirrhosis. *Semin Liver Dis* 1997; 17: 79-90.
28. Martinez N, Remedios C., Mackay I.R. An actin–myosin functional assay for analysis of smooth muscle (anti-micro.lament) autoantibodies in human plasma. *Journal of Immunological Methods* 338 (2008) 63–66.
29. Invernizzi P, Lleo A, Podda M. Interpreting Serological Tests in Diagnosing Autoimmune Liver Diseases. *Sem Liv Dis* 2007;27:161-172.
30. Bottazzo GF, Florin-Christensen A, Fairfax A. Classification of smooth muscle autoantibodies detected by immunofluorescence. *J Clin Pathol* 1976; 29: 403–410.
31. Strassburg CP, Manns MP. Autoantibodies and autoantigens in autoimmune hepatitis. *Semin Liver Dis* 2002;22 :339–352.
32. Lapierre P., Béland K. and ALVAREZ F. Pathogenesis of autoimmune hepatitis: from break of tolerance to immune-mediated hepatocyte apoptosis. *Translational Research* 2007, Volume 149, Number 3;109; 108-113.
33. Firman G. Criterios de diagnostico de la hepatitis autoinmune *Avances Médicos*.NOV-2002: 100; 1710-1717.
34. Manual de la OIE sobre animales terrestres 2004. Principios de validación para las pruebas diagnósticas de enfermedades infecciosas. Capítulo actualizado (mayo de 2006).
35. Montoya B. S. Validación de pruebas diagnósticas. *Angiologia* 2007; 59: 433-8.
36. Hulley S. Diseño de la investigación clínica: Un enfoque epidemiológico. Barcelona: Ed. Doyma. 2008;48:169-176
37. Sosa L. Validación de métodos serológicos que se emplean para el diagnóstico de enfermedades reumáticas definidas: lupus eritematoso sistémico. Tesina, La Paz-Bolivia 2001; 1-55.
38. Dawson B. Bioestadística medica. México DF. El manual moderno; 1993: 380p.
39. Calabrese A. y Astolfi A. Toxicología. Ed. Buenos Aires: Editorial Kapelusz 1975. 362 p. 35.

40. Choque M, Sosa L, Paz M. Determinación de la sensibilidad y especificidad de la prueba de IFI-ANA frente al ensayo inmunoenzimático para antígenos nucleares extraíbles (perfil ENA);(17):1-77.
41. Poma P; SOSA L. Evaluación de 3 sustratos empleados en la prueba de inmunofluorescencia indirecta que mide anticuerpos antimitocondriales para diagnóstico de cirrosis biliar primaria Laboratorio de Histocompatibilidad e inmunogenética - SELADIS - UMSA; (46):1-59.

# ANEXOS

## ANEXO N° 1

### 1. Resultados obtenidos de los paneles de sueros positivos y negativos

#### FRECUENCIAS OBSERVADAS

PRUEBA AML OPT.	AML - KIT		TOTAL
	POSITIVO	NEGATIVO	
POSITIVO	25	3	28
NEGATIVO	0	52	52
<b>TOTAL</b>	25	55	80

VP= Verdadero positivo; FP= Falso positivo

FN= Falso negativo; VN = Verdadero negativo

## 2. Determinación de sensibilidad, especificidad, valores predictivos, eficiencia y concordancia de los de los resultados del método validado para detectar anticuerpos anti músculo liso.

Método empleado	Sensibilidad	Especificidad	Eficiencia	Valor predictivo positivo	Valor predictivo negativo
Gold estandar (Kit comercial)	95%	95%	95%	95%	95%
Método Optimizado	100%	95%	96%	89,30%	100%

$$\text{Sensibilidad} = \frac{25}{(25+0)} \times 100\% = 100\%$$

$$\text{Especificidad} = \frac{52}{(52+3)} \times 100\% = 95\%$$

$$\text{Eficiencia} = \frac{25 + 52}{25+0+52+3} \times 100\% = 96\%$$

$$\text{Valor predictivo de una prueba positiva} = \frac{25}{(25 + 3)} \times 100\% = 89\%$$

$$\text{Valor predictivo de una prueba negativa} = \frac{52}{(52+ 0)} \times 100\% = 100\%$$

## 3. Índice de Kappa

$$K = \frac{(Po - Pe)}{(1 - Pe)}$$

$$Po = \frac{VP + VN}{N}$$

$$Pe = \frac{CP + CN}{N}$$

Concordancia en el caso de positivos

Concordancia en el caso de negativos

$$CP = \frac{VP + FP}{N} \times \frac{VP+FN+N}{N}$$

$$CN = (FN + VN) - [(VP + FN) - CP]$$

$$Po = \frac{25 + 52}{80} = 0,96$$

$$CP = \frac{25 + 3}{80} \times \frac{25 + 0}{80} = 18,2$$

$$CN = (0 + 52) - [(25 + 0) - 18,2] = 45,2$$

$$Pe = \frac{18,2 + 45,2}{80} = 0,79$$

$$K = \frac{0,96 - 0,79}{(1 - 0,79)} = 0,82$$

#### 4. Prueba de chi cuadrado

$$X^2 = \frac{\sum(o - e)^2}{e}$$

#### FRECUENCIAS ESPERADAS

PRUEBA AML OPT.	AML - KIT		TOTAL
	POSITIVO	NEGATIVO	
POSITIVO	8,5	19,25	28
NEGATIVO	16,25	35,75	52
<b>TOTAL</b>	25	55	80

VP= Verdadero positivo; FP= Falso positivo

FN= Falso negativo; VN = Verdadero negativo

$$X^2 = \frac{(25 - 8,5)^2}{8,5} (+) \frac{(3 - 19,25)^2}{19,25} (+) \frac{(0 - 16,25)^2}{16,25} (+) \frac{(52 - 35,75)^2}{35,75}$$

$$X^2 = \frac{(25 - 8,5)^2}{8,5} (+) \frac{(3 - 19,25)^2}{19,25} (+) \frac{(0 - 16,25)^2}{16,25} (+) \frac{(52 - 35,75)^2}{35,75}$$

$$X^2 = 32 + 13,72 + 16,25 + 7,62$$

$$X^2 = 60,29$$

#### ANEXO N° 2

**Resultados prácticos de los resultados obtenidos de AML, ANA AMA y los títulos y patrones fluorescentes obtenidos en los dos primeros, y los resultados de ELISA para AMA**

Nº	Code- I	S	E	AML-G	1\10	1\20	1\40	1\80	ANA	1\40	1\80	1/160	AMA	AML-O	1\10	1\20	1\40	1\80
1	A-1	F	70	POSIT	(+)	(+)	(+)	(+)	D/P		P(+)	D(+)	P=1,66	POSIT	(+)	(+)	D	(-)
2	A-2	F	34	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)	NEG	(-)	(-)	(-)	N=0,56	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)
3	A-3	F	30	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)	NEG	(-)	(-)	(-)	N=0,58	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)
4	A-4	M	52	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)	NEG	(-)	(-)	(-)	N= 0,44	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)
5	B-1	F	35	POSIT	(+)	(+)	(+)	(+)	D/P		D/P(+)		N= 0,54	POSIT	(+)	(+)	(+)	D
6	B-2	F	54	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)	D	D(+)	D(d)		P= 2,95	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)
7	B-3	M	14	POSIT	(+)	(+)	(+)	(+)	D	D(+)			N= 0,68	POSIT	(+)	(+)	(+)	(+)
8	B-4	F	51	POSIT	(+)	(+)	(+)	(-)	D		D(+)		N= 0,66	POSIT	(+)	(+)	(+)	(-)
9	B-5	F	22	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)	D	D(+)			N= 0,63	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)
10	C-1	F	49	POSIT	(+)	(+)	(+)	(-)	C		C(+)		N= 0,61	POSIT	(+)	(+)	(+)	(+)
11	C-2	F	80	POSIT	(+)	(+)	(+)	(-)	D/P	D/P(+)	P(+)		N= 0,54	POSIT	(+)	(+)	D	(-)
12	C-3	M	23	POSIT	(+)	(+)	(+)	(+)	D/P	P(+)		D(+)	N= 0,64	POSIT	(+)	(+)	(+)	(+)
13	C-4	M	63	POSIT	(+)	(+)	(+)	(+)	P	P(+)			NT	POSIT	(+)	(+)	(+)	(-)
14	C-5	F	28	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)	NEG	(-)	(-)	(-)	P= 1,44	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)
15	D-1	F	26	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)	NEG	(-)	(-)	(-)	NT	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)
16	D-2	F	47	POSIT	(+)	(+)	(-)	(-)	G		G(+)		N=0,73	POSIT	(+)	(+)	(+)	(+)
17	D-3	F	66	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)	NEG	(-)	(-)	(-)	P= 1,11	POSIT	(+)	D	(-)	(-)
18	D-4	F	55	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)	NEG				P=3,36	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)
19	D-5	F	46	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)	D			D(+)	P= 1,22	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)
20	D-6	F	44	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)	D/P			D/P (+)	P= 4,86	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)
21	E-1	F	32	POSIT	(+)	(+)	(+)	(+)	D/G	D(+)		G(+)	P= 7,54	POSIT	(+)	(+)	(+)	(+)
22	E-2	M	60	POSIT	(+)	(+)	(+)	(+)	D		D(+)		N=0,48	POSIT	(+)	(+)	D	(-)
23	E-3	F	52	POSIT	(+)	(+)	(+)	(+)	D/G		D(+)	G(+)	P= 2,99	POSIT	(+)	(+)	(+)	(+)
24	F-1	M	62	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)	D/G		D/G(+)		N= 0,72	POSIT	(+)	(+)	(+)	(+)
25	F-2	F	34	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)	D/P	P(+)		D(+)	P= 3,42	POSIT	(+)	(+)	(+)	(+)
26	F-3	F	55	POSIT	(+)	(+)	(+)	(-)	D/P	D/P(+)	D(d)/P		NT	POSIT	(+)	(+)	(-)	(-)
27	F-4	M	19	POSIT	(+)	(+)	(+)	(-)	D/P				N= 0,82	POSIT	(+)	(+)	(+)	(-)
28	F-5	F	40	POSIT	(+)	(+)	(+)	(+)	D/G		D(+)	G(+)	NT	POSIT	(+)	(+)	(-)	(-)
29	F-6	M	18	POSIT	(+)	(+)	(-)	(-)	D/P		D/P(+)		N= 0,80	POSIT	(+)	(+)	D	(-)
30	F-7	F	51	POSIT	(+)	(-)	(-)	(-)	D	D(+)			P= 4,49	POSIT	(+)	(+)	(-)	(-)
31	G-1	F	29	POSIT	(+)	(+)	(+)	(+)	P/D	P(+)	D(+)		N=0,84	POSIT	(+)	(+)	(+)	D
32	G-2	M	70	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)	D/P	D/P(+)			D= 0,96	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)
33	G-3	M	52	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)	P	P(+)			N= 0,36	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)
34	G-4	F	21	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)	G	G(+)			D=10	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)
35	G-5	F	17	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)	D/P		P(+)	D(+)	P=2,24	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)
36	H-1	F	55	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)	D/P		P(+)	D(+)	NT	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)
37	H-2	F	62	POSIT	(+)	(+)	(+)	(+)	D/P	P(+)	D/P(+)		N=0,80	POSIT	(+)	(+)	D	(-)
38	H-3	F	60	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)	D	D(+)			NT	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)
39	I-1	M	36	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)	D	D(+)			D=0,96	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)

Nº	Code- I	S	E	AML-G	1\10	1\20	1\40	1\80	ANA	1\40	1\80	1/160	AMA	AML-O	1\10	1\20	1\40	1\80
40	I-2	F	28	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)	D/P				NT	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)
41	I-3	M	48	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)	P	P(+)			P=1,19	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)
42	I-4	F	52	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)	P/G		P/G(+)	P(d)	N=0,78	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)
43	I-5	F	66	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)	D/P			D/P(+)	NT	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)
44	I-6	F	25	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)	NEG	(-)	(-)	(-)	N=0,73	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)
45	I-7	F	28	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)	D/P		P(+)	D(+)	N=0,64	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)
46	I-8	M	48	POSIT	(+)	(+)	(+)	(+)	P		P(+)		N=0,66	POSIT	(+)	(+)	(+)	(+)
47	J-1	M	19	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)	NEG	(-)	(-)	(-)	N=0,58	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)
48	J-2	F	37	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)	P	P(+)			N=0,82	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)
49	J-3	F	61	POSIT	(+)	(+)	(+)	(-)	D/C		C(+)	D(+)	P=3,29	POSIT	(+)	(+)	D	(-)
50	J-4	F	52	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)	P	P(+)			P=1,17	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)
51	K-1	M	65	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)	P			P(+)	P=3,32	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)
52	K-2	F	66	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)	D		D(+)		NT	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)
53	K-3	F	34	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)	P			P(+)	P=1,21	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)
54	K-4	M	53	POSIT	(+)	(+)	(-)	(-)	D/P		D/P(+)		N=0,85	POSIT	(+)	D	(-)	(-)
55	K-5	F	21	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)	P/G			P/G(+)	N=0,80	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)
56	K-6	F	20	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)	P			P(+)	P2,42	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)
57	L-1	F	19	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)	NEG	(-)	(-)	(-)	D=1,06	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)
58	L-2	F	54	POSIT	(+)	(+)	(-)	(-)	D/P			D/P(+)	N=0,70	POSIT	(+)	(+)	(+)	(-)
59	L-3	F	15	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)	P	(-)	(-)P	(-)P	D=1,02	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)
60	L-4	F	55	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)	P	P(+)			P=1,46	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)
61	L-5	F	37	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)	NEG	(-)	(-)	(-)	N=0,82	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)
62	M-1	F	42	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)	OJO					NEG	(-)	(-)	(-)	(-)
63	M-2	F	53	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)	NEG	(-)	(-)	(-)	N=0,82	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)
64	M-3	F	29	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)	D	D(+)			NT	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)
65	M-4	F	62	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)	D/P	D/P(+)	P(+)	P(d)	N=0,90	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)
70	M-5	M	48	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)	P		P(+)		P=1,67	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)
71	M-6	F	61	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)	D/P		P(+)	D(+)	D=1,03	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)
72	M-7	F	53	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)	D	D(+)			N=0,65	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)
73	M-8	F	54	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)	D/P	D/P(+)	D/P(+)	P(+)	N=0,61	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)
74	M-9	F	21	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)	D			D(+)	P=1,66	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)
75	M-10	F	29	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)	NEG	(-)	(-)	(-)	N=0,61	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)
76	N-1	F	32	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)	P	P(+)			N=0,70	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)
77	N-2	F	21	POSIT	(+)	(+)	(-)	(-)	D/P			D/P(+)	N=0,52	POSIT	(+)	(+)	(+)	(+)
78	N-3	F	65	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)	P	P(+)			P=5,21	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)
79	N-4	F	48	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)	NEG	(-)	(-)	(-)	NT	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)
80	N-5	F	29	POSIT	(+)	(+)	(+)	(-)	NEG	(-)	(-)	(-)	NT	POSIT	(+)	(+)	D	(-)

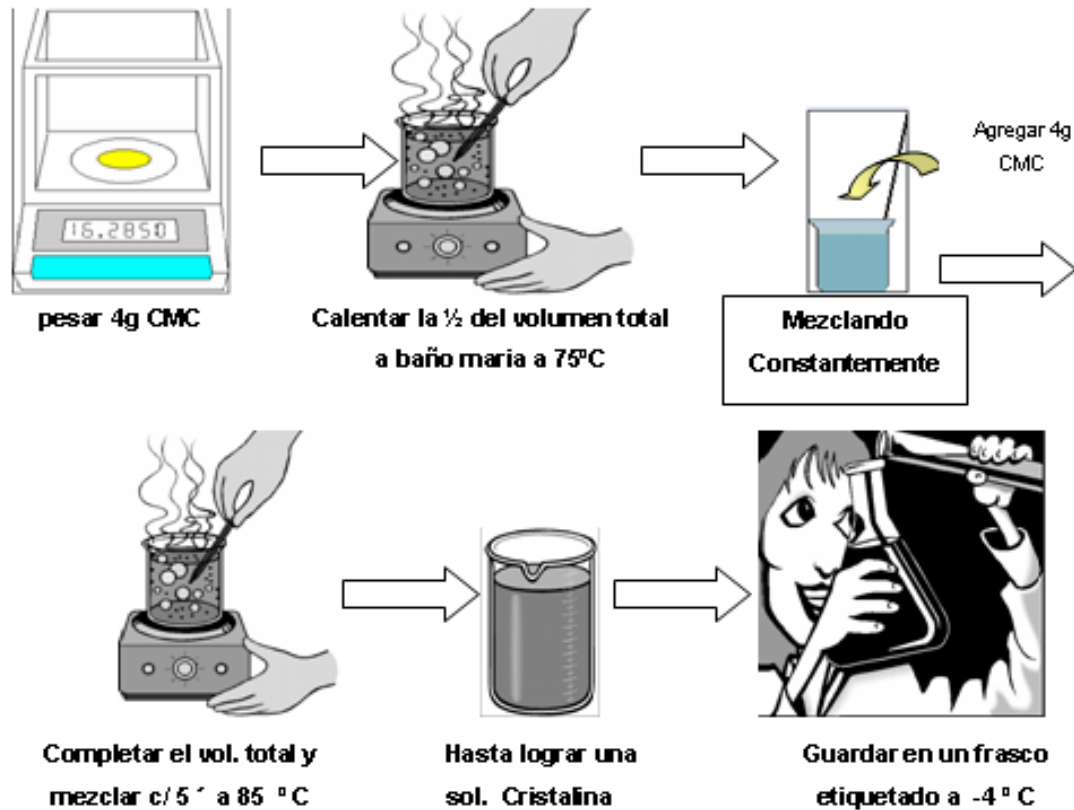
D	dudoso por la prueba practica, (+) por la prueba teorica
(-)	Falso negativo
(+)	Falso positivo



## ANEXO N° 3

**Estudio de reproducibilidad de los resultados del kit (G), del método optimizado (O) y el estudio de reproducibilidad (R). Donde se muestran los resultados obtenidos para cada método en dos diferentes tiempos.**

Codigo-l	(1/10)-G	(1/10)-O	(1/10)-R	(1/20)-G	(1/20)-O	(1/20)-R	(1/40)-G	(1/40)-O	(1/40)-R	(1/80)-G	(1/80)-O	(1/80)-R
Control (+)	(+)(+)	(+)	(+)(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Control (-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
(7-1)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	D	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)
(15-1)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
(6-2)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	D	(+)	D
(27-2)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	D	D	D
(4-3)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	D	D	(+)	(-)
(2-4)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	D	D	(+)	(-)
(1-4)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
(3-4)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	D	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
(1-5)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	D	(+)	D	(-)
(3-6)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
(5-4)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
(3-5)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
(2-5)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
(1-4)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
(1-6)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
(5-1)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
(2-4)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	D	(+)	(+)	(-)	D	D	(-)
(3-8)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
(9-1)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
(1-10)	(+)	(+)	(+)	(-)	(D)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

**ANEXO N° 4.** Preparación de Carboxi metil celulosa (CMC) al 4%**ANEXO N° 5**

Preparación de reactivo buffer salino fosfato para inmunofluorescencia (PBS IFI) PH 7.2 y concentración 0.1 M.

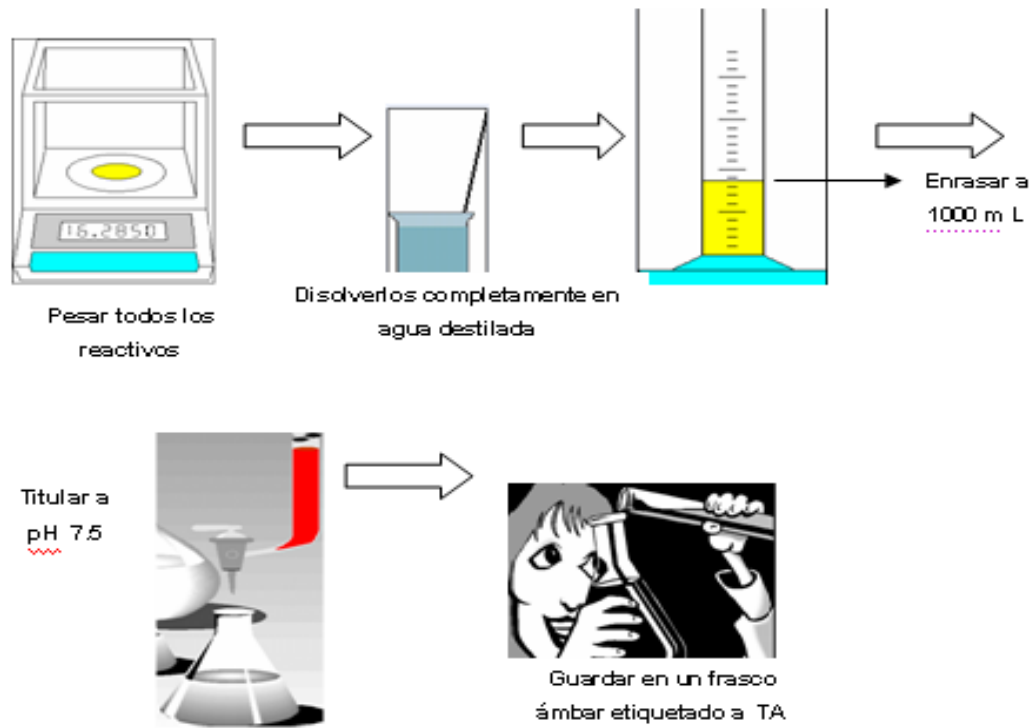
<b>REACTIVO</b>	<b>PESO</b>
NaCl	2,33 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> anhidro	1,78 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> anhidro	0,81 g
H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>	1000 ml
<b>Para usar diluir 1/10</b>	

Pesar todos los reactivos y luego disolverlos completamente en agua destilada, después titular a pH 7.5 y enrasar a 1000 mL con agua destilada. Finalmente realizar la dilución (1/10), para que la

concentración final del reactivo sea 0.1 M. Guardar el reactivo en un frasco limpio color ámbar correctamente etiquetado a temperatura ambiente.

### ANEXO N° 6.

Protocolo de la preparación de reactivo buffer salino fosfato para inmunofluorescencia (PBS IFI).



**ANEXO N° 7.** Preparación del conjugado anti-gamma-globulina humana para el sustrato de cortes histológicos de estomago de ratón.

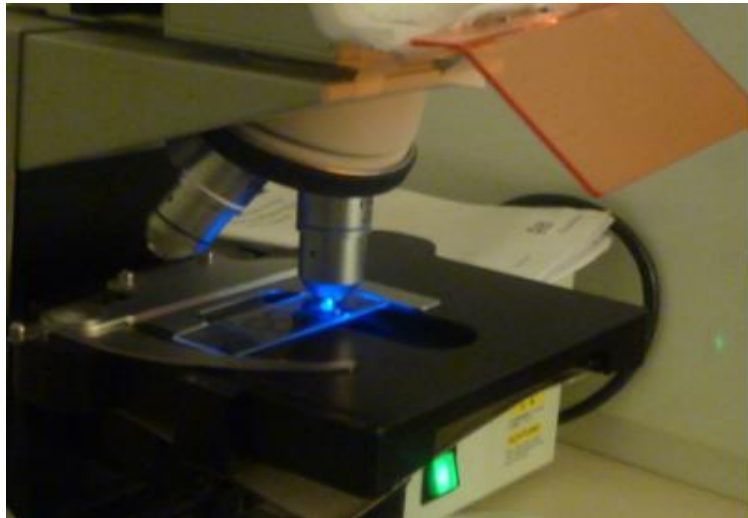
1. Determinar el volumen necesario del conjugado, para el número de placas “N” (multiplicar 35 ul de conjugado por tres diluciones en “N” placas totales).
2. Preparar el diluyente para las anti-gamma-globulinas humanas (por cada 3.5mL de PBS IFI, agregar una gota de colorante azul de Evans).
3. Con el diluyente ya preparado realizar la correspondiente dilución del conjugado, (1/80) para los cortes histológicos de estómago de rata.

**ANEXO N° 8**



*Criostato "Shandon" equipo en el que se realiza los cortes histológicos de estomago de ratón con un grosor aproximado de 5  $\mu$ m.*

**ANEXO N° 9**



*Microscopio de inmunofluorescencia “Olympus”, en el que se hacen las lecturas microscópicas de del patrón fluorescente presente en la prueba de AML.*

**ANEXO N° 10**



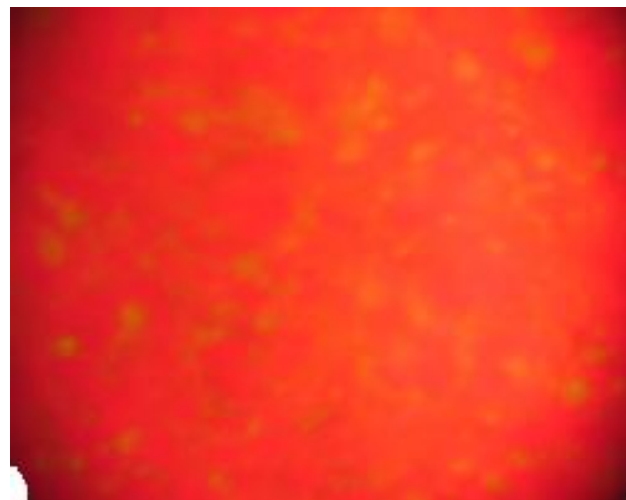
*Materiales empleados para realizar la prueba de AML optimizado*

**ANEXO N° 11**



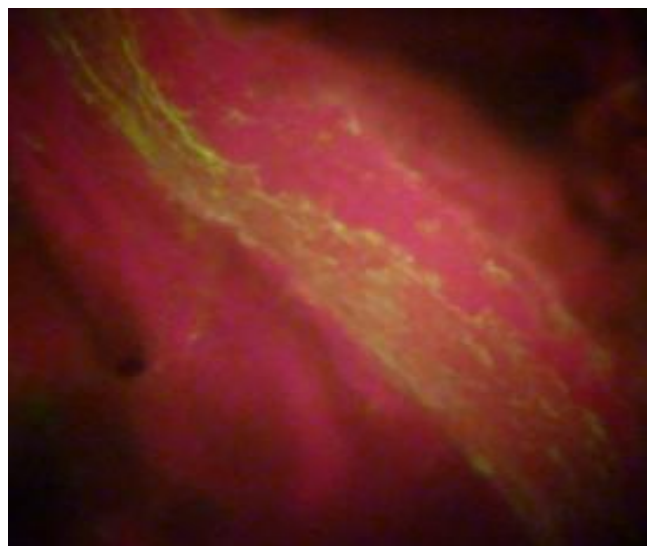
*En estas fotografía se observa cortes histológicos de estomago de ratón en donde claramente se puede distinguir la estructura para un suero negativo para la prueba de AML.*

**ANEXO N° 12**



*En estas fotografías se observa los cortes histológicos de estomago de ratón en donde claramente se puede distinguir los patrones fluorescentes característicos para los anticuerpos antimitocondriales, en un suero negativo para AML.*

### **ANEXO 13**



*En estas fotografías se observan los cortes histológicos de estomago de ratón en donde claramente se puede distinguir los patrones fluorescentes característicos para los anticuerpos antimúsculo liso perteneciente a un suero positivo.*