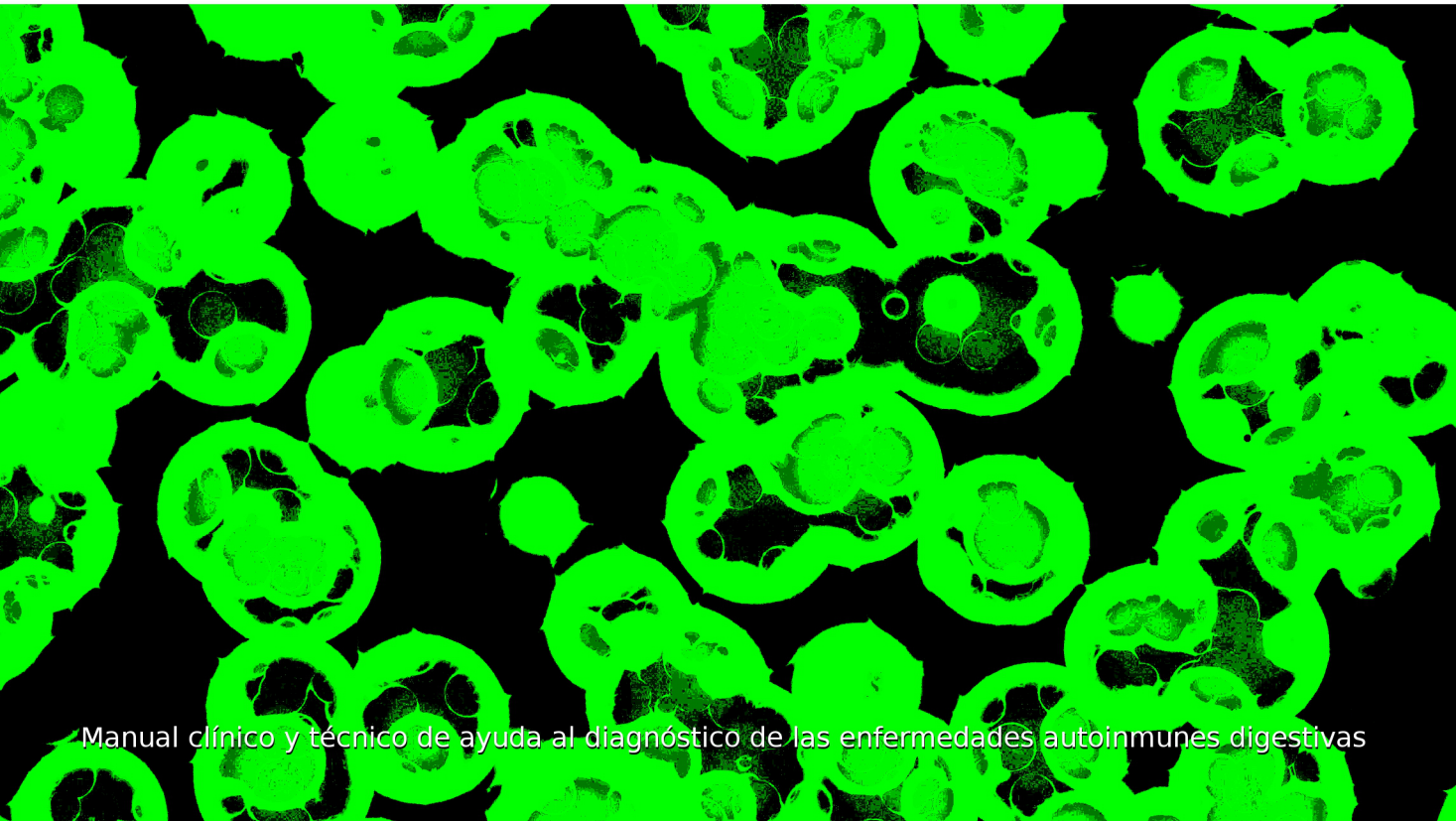


# Manual de laboratorio en las enfermedades autoinmunes digestivas

M<sup>a</sup> José López García, Antonia Osuna Molina  
Rosario Osuna Molina

Revisado por: Juan Francisco Rodríguez Gutiérrez



Manual clínico y técnico de ayuda al diagnóstico de las enfermedades autoinmunes digestivas

# Manual de laboratorio en las enfermedades autoinmunes digestivas

Manual clínico y técnico de ayuda al diagnóstico de las  
enfermedades autoinmunes digestivas

**M<sup>a</sup> José López García, Antonia Osuna Molina,  
Rosario Osuna Molina**

**Revisado por: Juan Francisco Rodríguez Gutiérrez**

## Open Access Support

Si encuentra este libro interesante le agradeceríamos que diera soporte a sus autores y a OmniaScience para continuar publicando libros en Acceso Abierto.

Puede realizar su contribución en el siguiente enlace: <http://dx.doi.org/10.3926/oss.11>

Manual de laboratorio en las enfermedades autoinmunes digestivas

Autores:

M<sup>a</sup> José López García, Antonia Osuna Molina, Rosario Osuna Molina

Revisor: Juan Francisco Rodríguez Gutiérrez



ISBN online: 978-84-695-7741-7

ISBN impreso: 978-84-940624-8-3

DL: B 12674-2013

DOI: <http://dx.doi.org/10.3926/oss.11>

© OmniaScience (Omnia Publisher SL) 2013

© Diseño de cubierta: OmniaScience

© Imágenes de cubierta: Jukovskyy – Fotolia.com

OmniaScience no se hace responsable de la información contenida en este libro y no aceptará ninguna responsabilidad legal por los errores u omisiones que puedan existir.

# Índice

## PRESENTACIÓN

## CAPÍTULO 1

### PATOLOGÍA

- 1.1 ENFERMEDAD AUTOINMUNE
- 1.2 ENFERMEDADES AUTOINMUNES DIGESTIVAS
  - 1.2.1. *Enfermedades hepato biliares*
  - 1.2.2. *Enfermedad inflamatoria intestinal*
  - 1.2.3. *Enfermedades pancreáticas*
  - 1.2.4. *Enfermedades gastrointestinales*

## CAPÍTULO 2

### PREANALÍTICA

- 2.1 SOLICITUD ANALÍTICA
- 2.2 DIETA
- 2.3 OBTENCIÓN DEL ESPECÍMEN DE LA SANGRE
- 2.4 CENTRIFUGACIÓN
- 2.5 ALMACENAMIENTO

## CAPÍTULO 3

### TÉCNICAS DE LABORATORIO EN AUTOINMUNIDAD

- 3.1 ANTICUERPOS EN LAS ENFERMEDADES HEPATOBILIARES
  - 3.1.1. *Técnicas de primera elección*
  - 3.1.2. *Técnicas de segunda elección*
  - 3.1.3. *Técnicas de tercera y cuarta elección*
- 3.2 ANTICUERPOS EN LA ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL
  - 3.2.1. *Técnicas de tercera elección*
- 3.3 ANTICUERPOS EN LA PANCREATITIS AUTOINMUNE
- 3.4 ANTICUERPOS EN LAS ENFERMEDADES GASTROINTESTINALES
  - 3.4.1. *Anticuerpos en la enfermedad celíaca*
  - 3.4.2. *Anticuerpos en la anemia perniciosa*

## CAPÍTULO 4

### INFORME DEL LABORATORIO DE AUTOINMUNIDAD

- 4.1 INFORME DE LOS AUTOANTICUERPOS DE LAS ENFERMEDADES HEPATOBILIARES
- 4.2 INFORME DE LOS AUTOANTICUERPOS DE LAS ENFERMEDADES INFLAMATORIAS INTESTINALES
- 4.3 INFORME DE LOS AUTOANTICUERPOS DE LAS ENFERMEDADES PANCREÁTICAS
- 4.4 INFORME DE LOS AUTOANTICUERPOS DE LAS ENFERMEDADES GASTROINTESTINALES
  - 4.4.1. *Enfermedad celíaca*
  - 4.4.2. *Anemia perniciosa*

## CAPÍTULO 5

### BIBLIOGRAFÍA

### SOBRE LOS AUTORES DEL LIBRO

### SOBRE EL REVISOR DEL LIBRO

# Índice de tablas

[Tabla 1. Criterios diagnósticos de HAI propuestas por SIGLES](#)

[Tabla 2. Criterios diagnósticos de CBP](#)

[Tabla 3. Criterios diagnósticos de CEP](#)

[Tabla 4. Criterios diagnósticos de EC](#)

[Tabla 5. Criterios diagnósticos de CU](#)

[Tabla 6. Criterios diagnósticos de PAI según distintos grupos](#)

[Tabla 7. Criterios diagnósticos de PAI \(Japan Pancreas Society\)](#)

[Tabla 8. Criterios diagnósticos de PAI en Asan Medical Center](#)

[Tabla 9. Criterios diagnósticos de CQ propuestos por ESPGHAN](#)

[Tabla 10. Criterios diagnósticos de la Anemia perniciosa](#)

[Tabla 11. Resumen de los Perfiles analíticos de Solicitud y Procedimientos de Toma de muestras para las Enfermedades Autoinmunes Digestivas](#)

[Tabla 12. Clasificación de los Autoanticuerpos de las Enfermedades Hepatobiliares, según su localización y composición](#)

[Tabla 13. Resumen de los Protocolos del Laboratorio de Autoinmunidad para las muestras de Enfermedades Digestiva](#)

[Tabla 14. Diagnóstico de HAI mediante el sistema SCORE](#)

[Tabla 15. Presencia de los marcadores serológicos en la PAI](#)

[Tabla 16. Valores predictivos positivos y negativos en función de las sensibilidades y especificidades de los autoanticuerpos en la CQ](#)

# Índice de ilustraciones

[Ilustración 1. Factores asociados al desarrollo de la autoinmunidad](#)

[Ilustración 2. Estructuras celulares que generan autoanticuerpos en las enfermedades del hepatobiliares](#)

[Ilustración 3. Proceso esquemático del fundamento del método Inmunofijación indirecta](#)

[Ilustración 4. Dibujo de la imágenes microscópicas de los patrones de algunos autoanticuerpos digestivos por IFI. Detalles y abreviaciones en el texto](#)

[Ilustración 5. Proceso esquemático del fundamento del método Inmunoblot](#)

[Ilustración 6. Dibujo de las imágenes microscópicas de los distintos patrones de los ANCA por IFI](#)

[Ilustración 7. Proceso esquemático del fundamento del método Enzimoimmunoanálisis tipo competitivo](#)

[Ilustración 8. Proceso esquemático del fundamento del método Enzimoimmunoanálisis tipo sándwich](#)

[Ilustración 9. Proceso esquemático del fundamento del método Aglutinación por látex](#)

[Ilustración 10. Proceso esquemático del fundamento de los métodos Turbidimetría \(ángulo 0º\) y Nefelometría \(ángulo 90º\)](#)

[Ilustración 11. Proceso esquemático del fundamento del método Inmunoanálisis Quimioluminiscente asociado a Citometría de flujo](#)

[Ilustración 12. Valoración de los autoanticuerpos en el diagnóstico de las enfermedades hepatobiliares autoinmunes](#)

[Ilustración 13. Valoración de los autoanticuerpos en el diagnóstico diferencial de la EI](#)

[Ilustración 14. Valoración de los autoanticuerpos en el diagnóstico de la enfermedad celiaca en los pacientes con síndrome de mala absorción](#)

[Ilustración 15. Valoración de los autoanticuerpos en el diagnóstico de la Anemia Perniciosa](#)



## Presentación

Las enfermedades autoinmunes digestivas son un grupo de patologías de gran importancia, para numerosos especialistas, por sus manifestaciones clínicas y complicaciones durante la evolución, y en ocasiones plantean dificultad diagnóstica y terapéutica. Recientemente las sociedades científicas han revisado los criterios diagnósticos de muchas de estas enfermedades y a su vez las técnicas y procedimientos analíticos están avanzando hacia una mayor eficiencia en el manejo de estas patologías.

El objetivo de este manual es actualizar los conocimientos clínicos, analíticos y técnicos, con el fin último de ayudar al diagnóstico, pronóstico y seguimiento de las enfermedades autoinmunes digestivas por parte del laboratorio de Análisis Clínicos, especialmente desde el área de Autoinmunidad, dentro de Inmunología.

Va dirigido al personal en formación y a profesionales del ámbito sanitario, principalmente del laboratorio (técnicos y analistas) pero también a los clínicos prescriptores (pediatría, digestivo, dermatología...). Recorre por tanto las áreas asistenciales (atención primaria y especialista), toma de muestras y áreas del laboratorio de soporte general (recepción, distribución y preparación de las muestras), automatización, nuevas tecnologías y áreas de conocimiento.

Para la elaboración del manual nuestro grupo de trabajo ha realizado una revisión completa y actualizada de las enfermedades autoinmunes digestivas sobre la que ha seleccionado los criterios diagnósticos con mayor evidencia clínica, así como los perfiles analíticos, técnicas instrumentales, procedimientos y algoritmos de laboratorio que ofrecen una mayor sensibilidad y especificidad en el diagnóstico, pronóstico y seguimiento de cada una de estas enfermedades.

Abril 2013





# Capítulo 1

## Patología

### 1.1 Enfermedad autoinmune

La autoinmunidad es una condición de respuesta inmunológica anómala frente a uno o varios antígenos propios. Se caracteriza por una pérdida de tolerancia inmune. Una respuesta autoinmune persistente desencadena una lesión tisular y alteración de la homeostasis que da lugar a la enfermedad autoinmune. Mientras la autoinmunidad es un fenómeno fisiológico, la enfermedad autoinmune es un síndrome clínico, caracterizado por la activación de las células de T o de las células de B, o ambas, que conducen a daño tisular.

Los factores asociados al desarrollo de la autoinmunidad se pueden clasificar en genéticos, inmunológicos, hormonales y ambientales. Ilustración 1.

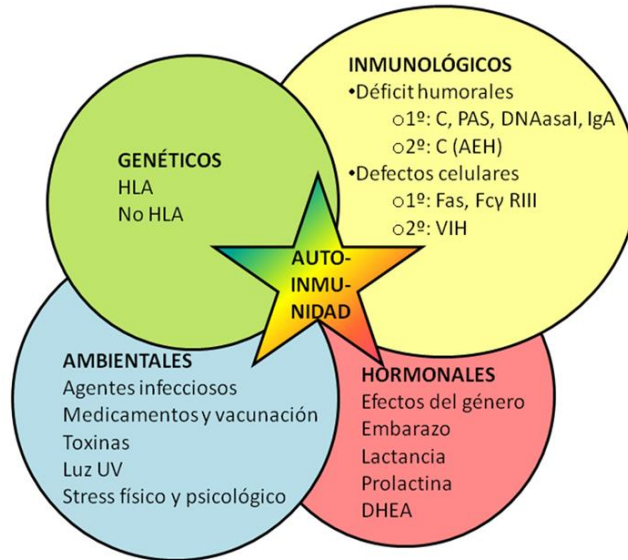


Ilustración 1. Factores asociados al desarrollo de la autoinmunidad

*C: Complemento; PAS: proteína amiloide sérica; IgA: Inmunoglobulina A; AEH: angioedema hereditario; Deficiencias Fas/Fas Ligando (proteína de membrana, miembro del Factor de Necrosis Tumoral). Polimorfismos de receptor Fcγ RIII (Receptor III que se une a la IgG por la Fracción del Complemento); VIH: virus de la inmunodeficiencia humana; DHEA: dehidroepiandrosterona*

Las enfermedades autoinmunes pueden ser específicas de órgano o sistémicas. En este manual trataremos las principales enfermedades autoinmunes específicas de los órganos del aparato digestivo y su abordaje desde el Laboratorio Clínico.

## 1.2 Enfermedades autoinmunes digestivas

La diversidad de autoanticuerpos que se encuentra en el suero de los pacientes con enfermedades autoinmunes de órgano es mucho más reducida que en las enfermedades sistémicas, ya que en las primeras los autoanticuerpos, y las células dianas de la enfermedad, se limitan a un solo órgano, e incluso a antígenos concretos de algún tipo celular de dicho órgano.

Por otra parte en las enfermedades específicas de órgano, los autoanticuerpos o son especie específicos o reaccionan con más alta afinidad con antígenos de la propia especie. Además, en las enfermedades autoinmunes específicas de órgano sólo se afecta el órgano diana, mientras que en las sistémicas, la repercusión del fenómeno autoinmune, alcanza diversas estructuras del organismo.

El número de enfermedades a las que se adjudica un mecanismo autoinmune específico de órgano, se ha incrementado con el tiempo, lo que se debe por una parte, al desarrollo de técnicas más sensibles para la detección de autoanticuerpos y, por otra al empleo de técnicas de estudio funcional, que permiten demostrar el efecto que producen dichos anticuerpos.

Debido a su función, el aparato digestivo está expuesto continuamente a una gran carga antigénica que incluye gérmenes, toxinas, fármacos, células tumorales y antígenos de la dieta. Actualmente se acepta que la pérdida de la tolerancia frente a antígenos propios puede desencadenarse por toda esta carga antigénica externa, en individuos susceptibles por su genética o niveles hormonales.

### **1.2.1. Enfermedades hepatobiliares**

La clasificación de los distintos tipos de patologías autoinmune hepatobiliar se basa en las características clínicas de las enfermedades así como en la identificación de autoanticuerpos presentes.

#### **A) Hepatitis autoinmune**

La hepatitis autoinmune (HAI) se presenta cuando el sistema inmunológico ataca a los hepatocitos, provocando inflamación y necrosis celular, fibrosis y distorsión de la arquitectura que, en forma progresiva, conduce a cirrosis. Se postula que en la patogenia pueden intervenir diversos elementos mediante una compleja interacción la cual involucra predisposición genética, pérdida de tolerancia del sistema inmunológico, formación de neoantígenos por factores desencadenantes y mimetismo molecular. Se acompaña de hiperglobulinemia y presencia de autoanticuerpos.

Se reconocen tres tipos de HAI:

- Tipo I. Es la más frecuente, un 80 % de los casos. Afecta principalmente a mujeres entre 20 y 40 años: cuando se asocia al haplotipo HLA-DR3 su comienzo es generalmente antes de los 30 años, y son más frecuentes los brotes agudos y la progresión a cirrosis; cuando se asocia a HLA-DR4 su comienzo es más tardío, después de los 30 años. Se caracteriza inmunológicamente por la presencia de: autoanticuerpos contra el músculo liso (ASMA), con una sensibilidad y especificidad del 75% pero bastante más específicos cuando detectan a la Actina, principal antígeno de los ASMA; y los anticuerpos antinucleares (ANA) con escasa especificidad. También se asocian a los anticuerpos contra el citoplasma de neutrófilos con patrón perinuclear atípico (pxANCA).
- Tipo II. Representa un 20 % de los casos. Afecta principalmente a niños entre 2 y 14 años que presentan generalmente altas concentraciones de bilirrubina y aminotransferasas en suero y desarrollan una enfermedad más severa y con progresión a cirrosis más frecuente que los pacientes tipo I. Se asocia con HLA-DQ2. Inmunológicamente se caracteriza por: anticuerpos contra el antígeno microsomal hepático y renal (LKM tipo1 principalmente, o LKM tipo 3 presente sólo en el 10-15% de las hepatitis D); y/o anticuerpos contra la proteína citosólica hepática 1 (LC1), presentes en el 30% de los pacientes y con alta especificidad diagnóstica.
- Tipo III. Se caracteriza por la existencia de anticuerpos contra el antígeno hepático soluble/hepático pancreático (SLA/LP), cuya especificidad es muy alta (> 95%) pero la sensibilidad baja (10-30%). Este tipo tiene las mismas características clínicas,

bioquímicas, histológicas y pronósticas que la tipo I, por lo que a menudo acaba englobándose en el tipo I como una misma entidad. No obstante, identifica a individuos con cambios histológicos severos: un 11-22% de adultos con HAI-tipo I y el 18-44% de niños con HAI tipo II.

También pueden encontrarse los anticuerpos anti-membrana hepática (LM) en hepatitis inducida por hidralacina y en hepatitis asociada con el Síndrome Poliglandular Autoinmune tipo 1 (SPA) o los anticuerpos anti-receptor de asialoglicoproteínas (ASGPR), que se detectan en el 82-85% del las HAI tipo I pero no son específicos.

Los autoanticuerpos, circulantes utilizados comúnmente para el diagnóstico (ANA, ASMA, etc), no son órganos específicos y los antígenos a los cuales van dirigidos, están ubicados en el interior de las células; por lo tanto, no son normalmente accesibles. Por estos motivos, se considera que si bien constituyen marcadores, los cuales ayudan al diagnóstico, no son responsables de los mecanismos directamente involucrados en la necrosis hepatocelular.

En la mayoría de los pacientes, el comienzo del cuadro es insidioso presentándose con malestar general, hiporexia y fatiga. Alrededor del 30% presenta sintomatología aguda severa, semejante a la de hepatitis viral aguda, pudiendo evolucionar hacia una insuficiencia hepática fulminante o subfulminante. Un 10% de los pacientes están asintomáticos en el momento del diagnóstico. Un porcentaje alto, entre 30% a 80% de los pacientes, ya han progresado a cirrosis cuando son diagnosticados. En las mujeres jóvenes son frecuentes los trastornos menstruales. Muchos de los pacientes tienen evidencias de otros trastornos autoinmunes, como el síndrome de Sjögren, rectocolitis ulcerosa, artritis y anemia hemolítica autoinmune. Los hallazgos más frecuentes al examen físico inicial publicados en una serie de trabajos son: ictericia (48-86%), hepatomegalia (67-86%), esplenomegalia (49-54%), arañas vasculares (45-53%), acné (21%).

El diagnóstico depende tanto de elementos positivos (cumplimiento de 2 de los 3 requisitos: bioquímica, autoanticuerpos, histología) como de datos negativos (ausencia de otras causas de hepatitis: virus, medicamentos, alcohol, etc). El diagnóstico puede apoyarse también en la respuesta al tratamiento. La Asociación Internacional para el Estudio del Hígado (SIGLES), reunido en 1992, recomendó una serie de criterios para el diagnóstico, siendo revisados y actualizados en 1999. Se detallan en la tabla 1. Si el diagnóstico de hepatitis autoinmune no está claro, se debe utilizar el método de puntuación o score.

	DEFINITIVO	PROBABLE
<b>a) Cumplimiento de 2 de las 3 criterios:</b>		
1. Bioquímica	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Predominio de elevación de transaminasas séricas respecto a fosfatasa alcalina.</li> <li>- Nivel de globulinas, Yglobulinas o Ig-G <math>\geq 1,5</math> de niveles normales.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Predominio de elevación de transaminasas séricas respecto a fosfatasa alcalina.</li> <li>- Hiper-Y-globulinemia de cualquier grado.</li> </ul>
2. Autoanticuerpos	<ul style="list-style-type: none"> <li>- ANA, ASMA, anti-LKM1: <math>\geq 1/80</math>, en adultos.</li> <li><math>\geq 1/20</math>, en niños.</li> <li>- AMA negativos.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- ANA, ASMA, anti-LKM1 (u otros autoanticuerpos)*: <math>\geq 1/40</math>, en adultos.</li> </ul>
3. Histología	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Interfase de hepatitis.</li> <li>- No lesiones biliares, granuloma o cambios prominentes sugestivos de otra enfermedad.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Interfase de hepatitis.</li> <li>- No lesiones biliares, granuloma o cambios prominentes sugestivos de otra enfermedad.</li> </ul>
<b>b) Ausencia de:</b>		
Lesión tóxica o alcohólica.	Consumo de alcohol diario $< 25$ g/d y no uso frecuente de drogas hepatotóxicas.	Consumo de alcohol diario $< 50$ g/d y no uso frecuente de drogas hepatotóxicas.
Enfermedad hepática genética.	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Fenotipo normal de <math>\alpha_1</math>-antitripsina.</li> <li>- Niveles séricos normales de ceruloplasmina, hierro y ferritina.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Déficit parcial de <math>\alpha_1</math>-antitripsina.</li> <li>- Anormalidades inespecíficas de cobre, ceruloplasmina, hierro y/o ferritina.</li> </ul>
Infección viral activa.	Ausencia de marcadores de infección viral activa para virus de hepatitis A, B y C.	Ausencia de marcadores de infección viral activa para virus de hepatitis A, B y C.

(\*) pANCA, anti-SLA/LP, anti-actina, anti-LC1 y anti-ASGPR.

Tabla 1. Criterios diagnósticos de HAI propuestas por SIGLES

## B) Cirrosis biliar primaria

La cirrosis biliar primaria (CBP) es una enfermedad inflamatoria crónica, de progresión lenta, del hígado. Se llama así porque la lesión comienza alrededor de los pequeños conductillos biliares intrahepáticos, y no por obstrucción (por cálculos biliares) de los conductos extrahepáticos, de mayor diámetro. En las fases avanzadas de la enfermedad, el hígado sufre un proceso de cicatrización fibrosa que es el que define la cirrosis. Sin embargo, la mayoría de los enfermos sólo tienen una ligera fibrosis y no cirrosis en sentido estricto. La enfermedad se divide en cuatro estadios en función de la gravedad (I-IV). En ocasiones, la enfermedad se pone de manifiesto por prurito e ictericia en el embarazo o tras la ingesta de anticonceptivos.

La CBP afecta a todos los grupos de edad, pero a la mayoría de los pacientes se les diagnostica entre los 40 y los 70 años de edad. El 90% de los enfermos son mujeres. Anteriormente, se consideraba que la CBP era una enfermedad rara, pero estudios recientes han comprobado que puede afectar a 1 de cada 4.000 personas, y a 1 de cada 1.000 mujeres por encima de los 40 años.

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 de las pruebas de función hepática con aumento de las fosfatasa alcalinas, de la IgM y presencia de anticuerpos antimitocondriales (AMA): los AMA tipo M2 se encuentran en el 90-95% de las CBP; los AMA tipo M9 se detectan en pacientes asintomáticos o con CBP en estadios iniciales. La presencia de AMA es una de las pruebas más importantes para el diagnóstico, ya que está presente en casi todos los pacientes con CBP. La biopsia hepática es muy útil puesto que da información tanto del diagnóstico como del estadio evolutivo de la misma.

Otros autoanticuerpos inespecíficos que se pueden encontrar en la CBP son:

- Los anticuerpos frente a la proteína GP210 (anti-GP210) del poro nuclear, una glucoproteína transmembrana, presentes en el 25% de los pacientes con CBP con AMA positivos y hasta en el 50% de los pacientes CBP con AMA negativos.
- Los anticuerpos frente a la proteína Sp100 que se detectan entre el 30 y el 40 % de pacientes con CBP, y están presentes en el otro 50 % de enfermos AMA negativos.
- Los ANA con patrón moteado (normalmente con especificidad frente a Sp100) y centromérico están presentes en un 5%.
- Otra glicoproteína del complejo del poro nuclear, la gp62, ha sido descrita como un autoantígeno en un tercio de los pacientes.

Se diagnostica la CBP al cumplir al menos 2 de los 3 criterios aceptados internacionalmente.

Cumplimiento de 2 de los 3 criterios:
1. Niveles AMA >1:40.
2. Fosfatasa alcalina = 2 a 10 veces el valor normal, durante más de 6 meses.
3. Histología compatible.

Tabla 2. Criterios diagnósticos de CBP

### C) Colangitis esclerosante primaria

La colangitis esclerosante 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).

La colangitis esclerosante primaria (CEP) ocurre generalmente en hombres, aproximadamente un 70%, entre los 20 y 40 años, con una edad promedio de 39.

La CEP posee una patogenia inmune, con factores etiológicos desconocidos. Se ha establecido una susceptibilidad genética asociada con ciertos haplotipos de HLA.

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 CEP el antígeno diana sería una proteína específica de los granulocitos, presente en la membrana nuclear.

Se conoce la asociación de la CEP con la enfermedad inflamatoria intestinal (EII). El 70% de los pacientes con CEP padecen una EII en forma asociada (la mayoría son colitis ulcerativas crónicas inespecíficas), aunque sólo el 3-7.5% de los casos con EII presentan CEP. Se ha descrito también su asociación con otras patologías como la tiroiditis de Riedel, fibrosis retroperitoneal, pseudotumor orbitario, linfoma angioinmunoblástico.

La enfermedad puede ser asintomática. Hay formas específicas de afección de las pequeñas vías biliares intrahepáticas, de predominio en la infancia y síndromes de solapamiento con la hepatitis autoinmunitaria. Se ha descrito una forma caracterizada por un aumento de IgG4 que generalmente se asocia con pancreatitis autoinmunitaria. El colangiocarcinoma es una consecuencia de la enfermedad y comporta un mal pronóstico. Puede llevar a colestasis crónica, cirrosis biliar, hipertensión portal e insuficiencia hepática. Sólo el trasplante hepático permite prolongar la supervivencia. Son evidencias de mal pronóstico la hepatomegalia, esplenomegalia, incremento de la fosfatasa alcalina, estadio histológico y edad. Los criterios para el diagnóstico de CEP se describen en la tabla 3.

<b>a) Presencia de anomalías colangiográficas típicas: estrechamientos de la vía biliar, sobre todo de la extrahepática. Visibles mediante:</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Colangiografía retrógrada (por endoscopia).</li> <li>- Colangiografía retrógrada (por endoscopia).</li> </ul>
<b>b) Hallazgos clínicos, bioquímicos e histológicos compatibles pero no específicos:</b>
<b>1. Síntomas.</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>- En el momento del diagnóstico, generalmente sin síntomas, cuando los hay, el cansancio y el prurito son los más frecuentes.</li> <li>- En casos avanzados, coloración amarilla del blanco de los ojos (ictericia). La falta de bilis en el intestino puede reducir la absorción de grasas y vitaminas A, D, E y K. Esto producirá diarrea grasa (esteatorrea), pérdida de peso, dificultad de visión nocturna, osteoporosis y alteraciones de la coagulación.</li> <li>- Finalmente daño progresivo del hígado hasta dejar de funcionar.</li> </ul>
<b>2. Análisis.</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Elevación de la fosfatasa alcalina y alcalina (&gt; 3 veces lo normal en 85% de los casos) y la gamma-glutamiltiraspeptidasa, lo que refleja dificultad de eliminación de la bilis. Posterior elevación de la bilirrubina. En el 25% de los pacientes se observa hipergammaglobulinemia y se incrementan los niveles de IgM en el 40-50% de los casos.</li> <li>- Se observan niveles elevados de varios anticuerpos inespecíficos, en particular los anticuerpos antineutrófilos perinucleares citoplasmáticos (pANCA) que aparecen en el 33-88% de los afectados.</li> </ul>
<b>3. Biopsia hepática.</b>
La imagen de CEP en la biopsia es típica pero no siempre aparece. Sin embargo, la biopsia sí puede valer para descartar otras causas de enfermedad hepática.
<b>c) Exclusión de:</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Cirugía de tracto biliar.</li> <li>- Anomalías congénitas de la vía biliar.</li> <li>- Colangiopatía por SIDA.</li> <li>- Estenosis por isquemia.</li> <li>- Neoplasias de los conductos biliares (a menos que haya diagnóstico previo de CEP).</li> <li>- Exclusión de otras causas de colestasis intrahepática: cirrosis biliar primaria; hepatitis crónica; enfermedad hepática por alcohol.</li> </ul>

Tabla 3. Criterios diagnósticos de CEP

## D) Síndromes solapamiento

Se trata de pacientes con HAI de características atípicas que presentan manifestaciones de la HAI y de otros tipos de hepatopatías crónicas, pueden llegar a representar un 15%.

- Solapamiento con cirrosis biliar primaria: el 5% de pacientes con HAI tiene sintomatología de CBP, y el 19% de CBP con clínica de HAI. Cumplen 2 de los 3 criterios de cada una de las patologías hepáticas. Predomina en la mujer y se asocia con frecuencia al HLA B8, DR3 o DR4. Buena respuesta a corticosteroides.
- Solapamiento con colangitis esclerosante primaria: se trata de pacientes que presentan clínica, histología y serología de HAI-tipo1, pero radiología de CEP. Se desarrolla en la Infancia y presentan anticuerpos anti-Anhidrasa Carbónica.
- Solapamiento con colangitis autoinmunitaria: es una inflamación crónica del hígado con características de HAI combinados con CBP con AMA negativos o una CEP de vías pequeñas. Normalmente encontramos ANA, ASMA o ambos. DM-PM es una enfermedad rara con una incidencia anual de 5-10 casos por millón, la prevalencia es de 50-90 casos por millón, tiene una incidencia bimodal, presentando los picos en la infancia (5-15 años) y en la vida adulta (30-50 años). Las mujeres se afectan más que los hombres en una proporción de 2-3. Histológicamente lo que se aprecia es un infiltrado inflamatorio predominantemente mononuclear con algunas características que permiten diferenciar la DM de la PM. En la DM el infiltrado es de tipo perivascular alrededor de los fascículos, se observan fibras necróticas en grupos y atrofia perifascicular en el 90% de los niños y 50% de los adultos. En esta, el órgano blanco son los vasos sanguíneos. En la PM el infiltrado se localiza dentro de los fascículos musculares, las fibras necróticas son escasas y esparcidas y el órgano blanco son las miofibrillas.

### 1.2.2. *Enfermedad inflamatoria intestinal*

La denominación enfermedad inflamatoria intestinal (EII) se emplea para referirse a una serie de problemas que afectan predominantemente al intestino, y que se caracterizan porque producen una inflamación crónica, que no tiende a la curación. Agrupa varias enfermedades, pero sobre todo la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa. Además, algunas personas en las que presentan una clínica solapada entre EC y CU, se las diagnostica de colitis indeterminada (CI). Dentro de la EII, otros autores incluyen otras enfermedades diferentes, pero son estas tres las que habitualmente consideramos realmente como parte de este grupo.

Actualmente se considera que los factores genéticos desempeñan, junto con los ambientales, un papel fundamental en la etiopatogenia de la EII; así, es sabido que el riesgo relativo de sufrir una EII se encuentra aumentado (16-30%) en los familiares de primer grado de pacientes con dicho diagnóstico.

En este bloque nos referiremos a la enfermedad crónica intestinal donde la colitis ulcerosa (CU) y la enfermedad de Crohn (EC) representan dos entidades en las que el sistema inmune se encuentra involucrado. Se produce una respuesta inmune desmesurada hacia la flora bacteriana



entérica de individuos genéticamente susceptibles que da lugar a lesiones intestinales de profundidad y extensión variable.

La endoscopia con biopsia intestinal es el “patrón oro” para el diagnóstico de la EII, pero presenta el inconveniente de ser una prueba invasiva, cara y limitada al no visualizar todo el intestino. Por ello en la actualidad es de gran utilidad la determinación previa de la calprotectina fecal, un marcador sensible, específico, económico, no invasivo, fácil de realizar y que, por tanto, permite seleccionar a los pacientes que deben someterse a una colonoscopia. Los niveles de calprotectina se correlacionan con la actividad de la EII, presentando valor pronóstico ante un brote o tras una resección quirúrgica intestinal. Es útil en la monitorización durante los periodos de remisión de la EII, y puede predecir recaídas antes de la aparición de síntomas clínicos. Por otra parte, la determinación combinada de anticuerpos anticitoplasma de neutrófilos con patrón periférico atípico (pANCA) más frecuentes en la CU, y de anticuerpos anti-Saccharomyces cerevisiae (ASCA) más frecuentes en la enfermedad de Crohn, podría ser de utilidad en el diagnóstico diferencial.

### **A) Enfermedad de Crohn**

La EC es una enfermedad crónica de origen desconocido que quizás tiene un componente autoinmune en la cual el sistema inmunitario del individuo ataca su propio intestino produciendo inflamación. Frecuentemente la parte afectada es el íleon o tramo final del intestino delgado, aunque la enfermedad puede aparecer en cualquier lugar del tracto digestivo.

Su aparición suele darse en dos rangos de edades, la primera entre los 20 y 30 años y la segunda a partir de los 60, afectando de igual forma a ambos sexos. Los episodios agudos suelen darse cada pocos meses o años. Si se prolonga durante muchos años se deteriora notablemente la función intestinal, y esos segmentos del intestino deben ser extirpados quirúrgicamente. La evolución de la enfermedad es a través de brotes seguidos de remisiones espontáneas.

Los síntomas comunes incluyen movimientos intestinales frecuentes, sueltos o líquidos. Otros síntomas son espasmos abdominales, fiebre y algunas veces sangrado rectal. Pérdida de apetito y pérdida subsecuente de peso también pueden ocurrir. Durante los periodos de síntomas activos, los pacientes también pueden experimentar fatiga, dolores articulares y posibles problemas cutáneos. Algunos pacientes pueden desarrollar grietas en la pared anal (fisuras) que pueden causar dolor y sangrado especialmente durante los movimientos intestinales. La inflamación también puede causar que una fístula se desarrolle. Esta es un túnel que lleva de un tramo de intestino a otro o que conecta el intestino con la vejiga, vagina o piel. Las fístulas ocurren más comúnmente alrededor del área anal. Si estas complicaciones suceden, usted puede notar que hay drenaje de mucosa, pus o deposiciones por esta abertura. Debido a que la EC es una enfermedad crónica, los pacientes experimentarán periodos de brotes, seguidos por periodos de remisión. Pero en general, las personas con EC llevan una vida activa y productiva. Así mismo, padecer esta enfermedad trae aparejado como consecuencia la carencia de Vitamina B12 y hierro, debido a que implica tener mala absorción.

Los anticuerpos ASCA son anticuerpos que reconocen secuencias de residuos oligomanosídicos de la pared celular de una variante SU1 de la levadura *S. cerevisiae* (*saccharomyces uvarum*), y tienen una fuerte correlación con la enfermedad de Crohn, lo que hace sospechar un posible

origen inmunitario frente a hongos colinizantes. Tanto los isotipos IgG como IgA se encuentran con mayor frecuencia en pacientes de EC (50%-80%) que en pacientes con CU (2%-14%) o en individuo sanos (1%-7%). Aproximadamente dos tercios de los pacientes de EC con ASCA IgG también son positivos para ASCA IgA. En EC, la especificidad llega hasta el 90% en aquellos casos que son positivos para ASCA IgG e IgA, especialmente cuando la concentración de los anticuerpos de ambos isotipos es alta. La sensibilidad para anticuerpos ASCA varía entre el 41%-76%.

Por otra parte, los pANCA aparecen en el 5-25% de los pacientes con enfermedad de Crohn. Se tratan de anticuerpos que van a estar dirigidos contra antígenos citoplasmáticos y/o nucleares de los neutrófilos, fundamentalmente dirigido frente a una proteína de la cubierta nuclear de identidad aun no filiada. Las especificidades proteinasa-3 y Mieloperoxidasa, asociadas a vasculitis de vasos pequeños, son negativas.

Los criterios para el diagnóstico definitivo de EC se describen en la tabla 4.

<b>a) Cumplimiento de 1 de los 3 criterios:</b>
1. Úlcera intestinal longitudinal o deformidad inducida por una úlcera longitudinal o patrón de empedrado.
2. Ulceraciones intestinales aftosas pequeñas organizadas en forma longitudinal en al menos 3 meses, más granulomas no caseosos.
3. Ulceraciones aftosas múltiples y pequeñas en tracto digestivo superior e inferior, no necesariamente con organización longitudinal, por al menos 3 meses, más granulomas no caseosos.
<b>b) Exclusión de:</b>
1. Colitis ulcerosa (de utilidad: pANCA / ASCA).
2. Enterocolitis isquémica.
3. Enterocolitis infecciosa aguda.

Tabla 4. Criterios diagnósticos de EC

## B) Colitis ulcerosa

La CU es una enfermedad inflamatoria del colon. Está caracterizada por la inflamación y ulceración de la pared interior del colon. Los síntomas típicos incluyen diarrea, frecuentemente con sangre y dolor abdominal.

La colitis ulcerativa puede afectar a cualquier grupo de edad, aunque hay picos en edades comprendidas entre los 15 y 30 años y de nuevo entre los 50 y 70.

La inflamación normalmente comienza en el recto y en la porción inferior del intestino (sigmoide) y se propaga hacia arriba por todo el colon. La enfermedad es más severa cuanto mayor porcentaje del colon esté comprometido. La inflamación suele ser continua sin respetar segmentos. La afectación del intestino delgado sólo se produce en la zona final de este, llamada íleon, y como inflamación de vecindad. Tras 10 años padeciendo la enfermedad, se aumenta ligeramente el riesgo de sufrir una malignidad colónica, por este motivo el paciente debe seguir un control exhaustivo con seguimiento endoscópico.

El curso de la CU es típicamente recurrente, con exacerbaciones que alternan con periodos de completa remisión, circunstancia que no alcanza en un pequeño porcentaje de pacientes. El riesgo de recurrencia parece mayor en mujeres e individuos jóvenes.

La manifestación más típica es la presencia de diarrea con salida de abundante mucosidad y con frecuencia hay sangre en las heces. El color de la sangre es determinante, cuanto más oscura es el tamaño de afectación del colon es mayor. Además suele producir en el paciente dolor abdominal cólico, generalmente en hipogastrio y flancos. Puede presentar manifestaciones extraintestinales como artralgias, artritis y uveítis.

La confirmación se establece realizando una endoscopia digestiva baja (rectoscopia o colonoscopia). Durante este examen se puede examinar por medio de una cámara la mucosa del colon. En el caso de la CU, la mucosa se observa con evidentes signos inflamatorios como enrojecimiento mucoso, ulceraciones, presencia de moco y material fibrinoide y los llamados pseudopólipos. Para su confirmación definitiva se deben de tomar biopsias que deben de ser examinadas por un patólogo, la presencia de abscesos crípticos es un buen indicio de esta enfermedad.

Se puede asociar a otras enfermedades autoinmunes como la CEP, que afecta el hígado y sus vías biliares.

<b>a) Criterios clínicos :</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Rectorragias.</li> <li>- Diarrea crónica (en un 10% estreñimiento).</li> <li>- Dolor abdominal.</li> <li>- Manifestaciones extraintestinales.</li> </ul>
<b>b) Criterios radiológicos:</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Cambios mucosos: mucosa granular, úlceras espiculares o en botón de camisa, pseudopólipos.</li> <li>- Cambios del calibre: estrechamiento de la luz (aumento del espacio recto-sacro), acortamiento del colon, pérdida de haustración.</li> </ul>
<b>c) Criterios endoscópicos:</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Mucosa eritematosa, granular, edematosa y/o friable.</li> <li>- Exudado o ulceraciones.</li> <li>- Hemorragia al roce o espontánea.</li> <li>- Pseudopólipos y pólipos.</li> <li>- Lesiones característicamente continuas y con afectación prácticamente constante de recto.</li> </ul>
<b>d) Criterios anatomopatológicos:</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Mayores: inflamación exclusiva de la mucosa, úlceras superficiales, distorsión de las criptas, microabscesos, depleción de células caliciformes.</li> <li>- Menores: infiltrado inflamatorio crónico difuso, aumento de la vascularización mucosa, metaplasia de las células de Paneth, atrofia mucosa, hiperplasia linfoide.</li> </ul>

Tabla 5. Criterios diagnósticos de CU

Los anticuerpos pANCA atípicos y otros autoanticuerpos han sido identificados en pacientes con EII y sus familiares, aunque ningún estudio ha demostrado todavía su implicación directa en la patogénica de dicha enfermedad y los títulos de dichos anticuerpos no parecen correlacionarse con la intensidad del proceso. Sin embargo, algunos estudios realizados en población pediátrica han encontrado que la presencia mantenida de ASCA en EC es predictiva de mayor tasa de recidivas. La medición de dichos anticuerpos puede ser útil para diferenciar CU (pANCA+ y ASCA-) y EC (pANCA- y ASCA+). Los pacientes con CI se pueden diferenciar en subgrupos según este perfil de anticuerpos: así el perfil pANCA-/ASCA+ predice la evolución de CI a EC en un 80% de los pacientes y si presentan pANCA+/ASCA- evolucionarían a CU el 64% de los pacientes.

### **1.2.3. Enfermedades pancreáticas**

#### **A) Pancreatitis crónica autoinmune**

La Pancreatitis crónica autoinmune (PAI) no es una entidad homogénea, puede comprometer difusamente el páncreas o producir lesiones focales. Clínicamente puede manifestarse en forma pseudotumoral, en forma de pancreatitis crónica con insuficiencia exocrina, o menos frecuente como pancreatitis aguda con elevaciones enzimáticas. Su forma de presentación es variada, observándose con cierta frecuencia una masa circunscrita al páncreas, asociación con otras patologías autoinmunes o hallazgos serológicos positivos. En muchos casos resulta difícil descartar el cáncer de páncreas y finalmente sólo el estudio histológico de la pieza quirúrgica puede comprobar su diagnóstico.

La PAI se presenta en ambos sexos, siendo dos veces más común en hombres que en mujeres. La edad de presentación más frecuente es entre los 50 y 60 años con un rango que va desde los 30 a los 80 años.

La PAI puede aparecer aislada o asociada a otras enfermedades autoinmunes, como cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante primaria, síndrome de Sjögren, enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa.

En algunos pacientes existe una predisposición genética a desarrollar pancreatitis crónica. Por el momento, mutaciones en tres genes (tripsinógeno catiónico, SPINK1 y CFTR) han sido claramente asociados a pancreatitis crónica, ya sea en la forma de pancreatitis hereditaria familiar, como en la forma de pancreatitis idiopática. El estudio de la mutación R122H en el tripsinógeno catiónico ha permitido describir esta forma de pancreatitis como un proceso patológico de expresividad clínica variable. Individuos afectados de la mutación pueden ser asintomáticos y pertenecer a una familia en la que otros individuos padecen brotes agudos de pancreatitis, otras manifestaciones tardías de pancreatitis crónica, y aún otros cánceres de páncreas sin sintomatología previa de pancreatitis. En la población japonesa, se ha descrito asociación con el haplotipo HLA DRB1\*0405-DQB1\*0401, no demostrada en otros grupos étnicos. Además, se han descrito asociaciones de ciertos polimorfismos de nucleótido simple del gen CTLA-4 en la población oriental. Sin embargo, no está demostrada la utilidad de los estudios genéticos en el diagnóstico de la PAI.

Los síntomas más frecuentes son el dolor abdominal de variable intensidad y frecuencia, la diarrea, la malnutrición, la pérdida de peso y la diabetes mellitus. Según su etiología pueden concurrir otras manifestaciones, como fenómenos de autoinmunidad o hepatopatía.

La aparición de brotes de pancreatitis aguda, pseudoquistes o masas inflamatorias forma parte de la historia natural de la enfermedad. Se consideran complicaciones: los pseudoquistes complicados; la estenosis de vía biliar, duodeno o colon; la trombosis venosa (esplénica, mesentérica-portal); los pseudoaneurismas; la hemorragia intraquística, intrabdominal o digestiva; las fístulas internas o externas; la ascitis, y el cáncer de páncreas.

La mayoría de los pacientes con PAI, muestran niveles normales o ligeramente elevados de amilasa y lipasa. En las pruebas de función hepática se puede encontrar un perfil colestásico. También se ha encontrado hipergammaglobulinemia >2g/dL (en un 53%-71% de los casos) y niveles séricos de IgG >1800 mg/dL (53%-76%). Existe eosinofilia periférica con más de 600 células/mm en 11%, e incremento de IgE en 34%.

Aunque los niveles de IgG4 séricos pueden ser normales aun en presencia de hallazgos histológicos clásicos de PAI, a menudo los pacientes con PAI tienen un incremento en el nivel de la IgG4 sérica. Los niveles séricos de IgG4 son más altos en pacientes con PAI con lesiones sistémicas extrapancreáticas que en aquellos que no las presentan. Se postula que la medición combinada de la IgG total y de la IgG4 sérica puede incrementar la sensibilidad diagnóstica sin sacrificar la especificidad, comparada con la IgG4 sola.

Los marcadores serológicos que con frecuencia, y de manera no específica, se encuentran en los pacientes con PAI son los anticuerpos antianhidrasa carbónica II (ACA-II), antilactoferrina (ALA), anti-alfa amilasa 2 (AMY-2A), anticuerpos antinucleares (ANA) y factor reumatoide (FR), y anticuerpos antimúsculo liso (ASMA), que apoyan el origen autoinmune de la PAI. Actualmente, los anticuerpos más recomendados para realizar el diagnóstico de PAI y, sobre todo, para el diagnóstico diferencial con cáncer de páncreas son los ACA-II y los anti-AMY-2A. Estos últimos pueden señalar grupo de pacientes con riesgo de desarrollar diabetes tipo I fulminante.

En 2009 se determinaron los anticuerpos específicos para péptidos en muestras séricas obtenidas a partir de estos pacientes con pancreatitis autoinmune. Entre los péptidos detectados, el AIP1-7 se reconoció en 18 muestras de los 20 pacientes con pancreatitis autoinmune y en 4 de 40 afectados de cáncer pancreático. En las muestras de pacientes sanos no se detectó su presencia. El péptido muestra homología con una secuencia de aminoácidos de la proteína de unión a plasminógeno (PBP) de *Helicobacter pylori*, y con un componente n-recognina 2 (UBR2) de la proteína ligasa ubicuitina 3, una enzima que indica una expresión elevada en células acinares del páncreas. Posteriormente se demostró que el péptido PBP no se detectó en pacientes con pancreatitis crónica causada por el exceso de alcohol ni en tumores mucinosos papilares intraductales. Los resultados se validaron en otra serie de pacientes afectados por las dos patologías: en 14 de un total de 15 pacientes con pancreatitis autoinmune el test fue positivo en un 93%, mientras que en los casos de cáncer de páncreas sólo dio positivo en un 1%. Las conclusiones de ambos grupos fueron claras: el anticuerpo aparece en la mayoría de los pacientes con pancreatitis autoinmune, pero sólo en algunos casos de cáncer de páncreas.

Recientemente se ha propuesto que el anticuerpo anti-inhibidor de secreción del tripsinógeno pancreático (PSTI) de la subclase IgG1 puede ser un marcador diagnóstico altamente específico para diferenciar PAI de otras enfermedades pancreáticas.

Existen distintos criterios diagnósticos de la PAI según los correspondientes grupos de expertos (tabla 6). Nosotros hemos detallado aquellos en los que el laboratorio juega un papel más determinante (tablas 7 y 8).

I. 2002/2006	Japan Pancreas Society	Imagen + laboratorio y/o histología.
II. 2003	Grupo italiano	Histología o citología + asociación otras inmunopatías + respuesta a esteroides.
III. 2006	Asan Medical Center Korea	Imagen + laboratorio o histología o respuesta a esteroides.
IV. 2006	HISORt Mayo Clinic	Histología + imagen o serología o compromiso otros órganos o respuesta a esteroides.

Tabla 6. Criterios diagnósticos de PAI según distintos grupos

<b>a) Cumplimiento de 1 de los criterios radiológicos</b>		
Imágenes en cortes transversales	ERCP o MRCP	
Páncreas aumentado difusamente.	Estrechamiento ductal pancreático segmentario.	
Incremento de la hipotenuación del anillo periférico "halo".	Estrechamiento ductal pancreático focal.	
Masa de baja atenuación en la cabeza del páncreas.	Estrechamiento ductal pancreático difuso.	
<b>b) Cumplimiento de 1 de los criterios serológicos o histológicos</b>		
Análisis Serológico	Análisis Histológico Pancreático Biliar	Análisis Histológico no Gastrointestinal
Niveles elevados de IgG4.	Fibrosis o infiltración linfoplasmocitario periductal.	Nefritis tubulointersticial con depósitos inmunes en la membrana basal tubular.
Niveles elevados de IgG o $\gamma$ -globulinas.	Flebitis obliterativa.	Infiltración linfoplasmocitario intersticial pulmonar con IgG4(+) en plasmocitos.
Presencia de ALA, ACA-II, ASMA, o ANA.	IgG4(+) en plasmocitos de tejido.	Sialadenitis crónica con IgG4(+) en plasmocitos. <sup>1</sup>

<sup>1</sup> La presencia de células con IgG4 positiva en los tejidos no es necesariamente anormal, pero una infiltración con un número incrementado de estas células es anormal.

Tabla 7. Criterios diagnósticos de PAI (Japan Pancreas Society)

<b>Cumplimiento del criterio 1 y cualquiera de los criterios 2, 3 o 4.</b>
1. Imágenes pancreáticas
- TC: Agrandamiento difuso (tumefacción) del páncreas.
- ERCP: Estrechamiento irregular difuso o segmentario del ducto pancreático principal.
2. Hallazgos de laboratorio
- Niveles elevados de IgG y/o IgG4.
- Anticuerpos detectados.
3. Hallazgos histopatológicos: Fibrosis e infiltración linfoplasmocitaria.
4. Respuesta a los esteroides.

ERCP: Colangio-Pancreatografía Retrógrada Endoscópica.

MRCP: Colangio-Pancreatografía por Resonancia Magnética.

TC: Tomografía Computarizada

*Tabla 8. Criterios diagnósticos de PAI en Asan Medical Center*

#### **1.2.4. Enfermedades gastrointestinales**

##### **A) Enfermedad celíaca**

La Enfermedad celiaca o Celiarquía (CQ) una intolerancia permanente a la gliadina del gluten y otras prolaminas asociadas que se encuentran en algunos cereales (trigo, cebada y centeno), y que se caracteriza por presentarse como un "Síndrome de mala absorción Intestinal", con anomalías histológicas de la mucosa duodeno yeyunal.

La CQ es una enfermedad sistémica inmuno-mediada que afecta a individuos genéticamente predisuestos (HLA-DQ2 y HLA-DQ8) al entrar en contacto con los alimentos que contienen gluten. El daño originado en la mucosa intestinal abarca un espectro que oscila desde casos en los que solo se aprecia un aumento de la población de linfocitos intraepiteliales hasta formas avanzadas de atrofia vellositaria.

Diversos péptidos presentes en los cereales intervienen en el desencadenamiento de la enfermedad, unos a través de la activación de la inmunidad adquirida linfocito T dependiente, y otros activando la inmunidad innata con un mecanismo en el que es central la interleucina-15. Una de las características de esta enfermedad es la aparición de anticuerpos dirigidos contra antígenos propios (reticulina, antitransglutaminasa) y extraños (gliadina).

Afecta hasta a un 1% de la población occidental. La enfermedad puede manifestarse a cualquier edad a partir de la incorporación del gluten a la dieta, afectando tanto a niños como a adultos. Cursa con manifestaciones clínicas muy variadas, siendo en muchos casos una enfermedad asintomática, lo que origina que un porcentaje importante de los casos permanece sin detectar en edad adulta. Por regla general los primeros síntomas aparecen ya en la infancia, edad en la que es muy importante obtener el diagnóstico e instaurar el tratamiento específico. La relación mujer/varón es 2:1.

El comienzo de la enfermedad puede ser agudo o desencadenado por algún factor intercurrente (infección intestinal, embarazo, gastrectomía etc.) o bien, puede ser de presentación insidiosa lo que explica que los pacientes consulten con frecuencia por complicaciones derivadas de la mala absorción.

Los síntomas y signos que pueden presentarse en la CQ se pueden agrupar en los siguientes:

- Intestinales: diarrea crónica o intermitente, falta de apetito, náuseas, vómitos, dolor abdominal recurrente, estreñimiento, hábito intestinal irregular, flatulencia, distensión abdominal.
- Extraintestinales: alteraciones del carácter como apatía, introversión y tristeza, retraso en la pubertad, irregularidades menstruales, artralgias y artritis, astenia, calcificaciones intracraneales, malnutrición, retraso ponderoestatural, talla baja, hipotrofia y/o debilidad muscular, aftas orales, hipoplasia del esmalte, osteopenia, fracturas patológicas, ferropenia y/o anemia ferropénica y aumento de transaminasas.
- Dermatitis herpetiforme. Es la expresión cutánea de la CQ. Se presenta en niños mayores, adolescentes y adultos jóvenes en forma de lesiones vesiculares pruriginosas en piel normal o sobre placas maculares localizadas simétricamente en cabeza, codos, rodillas y muslos.

En la actualidad podemos reconocer distintas formas de presentaciones clínicas.

- Floridas:
  - Síndrome de mala absorción agudo: las 3 “D” correspondientes a diarrea, distensión, desnutrición,
  - Síndrome de mala absorción crónico: baja talla comparativa y signos carenciales en piel, mucosas y faneras.
  - CQ y enfermedades asociadas: inmunodeficiencias, enfermedades autoinmunes, del colágeno y genéticas.
- Mono u oligosintomáticas.
  - Silente: asintomáticos con familiares directos y hallazgos de screening.
  - Latente: haber sido celíaco confirmado mediante biopsias, pruebas terapéuticas y desafíos y no presentar en la actualidad atrofia vellositaria con la ingesta regular de gluten, manteniendo integridad del epitelio intestinal y buen estado general.
  - Potencial: tener los marcadores genéticos, la predisposición para desarrollarla y no padecerla.

La Sociedad Europea de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátrica (ESPGHAN) ha revisado en 2012 los criterios para el diagnóstico de la CQ. La puntuación tiene en cuenta cuatro criterios: síntomas, anticuerpos, HLA y hallazgos de biopsia, contribuyendo cada uno una vez. Tabla 9.

La utilidad principal de los marcadores inmunes es ayudar a la selección previa de aquellos pacientes con una alta posibilidad de padecer una CQ. Por tanto, debemos conocer cuál es el marcador o marcadores más idóneos, para asegurar el diagnóstico. Los marcadores serológicos de enfermedad celíaca constituyen la prueba de elección para llevar a cabo la detección



sistemática de la enfermedad. De entre todos los marcadores autoinmunes, según la evidencia disponible, los anticuerpos IgA ATGt son la prueba inicial recomendada.

Los anticuerpos con valor diagnóstico son los de isotipo IgA, salvo en individuos con déficit selectivo de esta subclase de inmunoglobulina. Por ello, el estudio inicial, debe incluir la determinación de IgA total, evitando los falsos negativos de estos pacientes. Además, se conoce que el déficit selectivo de IgA es más frecuente entre la población celiaca que entre la población sana.

<b>Sumatoria de 4 puntos</b>	
	<b>PUNTOS</b>
<b>SINTOMAS</b>	
- Síndrome de mala absorción.	2
- Otro síntoma relevante de CQ, tener diabetes mellitus tipo 1 o ser un 1er grado de miembro familiar afecto.	1
- Asintomático	0
<b>ANTICUERPOS SÉRICOS</b>	
- AAE (+) y/o ATGt > 10 veces el nivel normal	2
- ATGt ligeramente (+) o APGD (+) de forma aislada.	1
- Serología no realizada.	0
- Todos los anticuerpos negativos.	-1
<b>HLA</b>	
- DQ2 homocigótico (cis o trans) o DQ8 heterocigótico.	1
- HLA no realizado o sólo presente el DQB1 0202.	0
- Ausencia de DQ2 y DQ8	-1
<b>HISTOLOGÍA</b>	
- Marsh 3c (atrofia vellositaria total) o - Marsh 3b (atrofia vellositaria subtotal)	2
- Marsh 3a (atrofia vellositaria parcial) o - Marsh 2 (hiperplasia de criptas) o - Marsh 1 (incremento en el número de linfocitos intraepiteliales) junto con ATGt (+) en tejido, o - Marsh 0 (mucosa preinfiltrativa) junto con ATGt (+) en tejido.	1
- Marsh 1 (incremento en el número de linfocitos intraepiteliales) o - Marsh 0 (mucosa preinfiltrativa) o - Biopsia sin realizar.	0

APGP: anticuerpos contra formas desamidadas de péptidos de gliadina. EMA: anticuerpos antiendomiso. ATGt: anticuerpos antitransglutaminasa

*Tabla 9. Criterios diagnósticos de CQ propuestos por ESPGHAN*

#### *Anticuerpos antigliadina (AGA)*

Son anticuerpos dirigidos contra determinantes antigénicos de la alfa gliadina. Su presencia indica sensibilización al gluten pero no necesariamente lesión intestinal. Son poco sensibles para la detección de celíacos poco sintomáticos o silentes, como los pertenecientes a los grupos de riesgo y su sensibilidad disminuye cuando aumenta la edad. Por el contrario, pueden ser

positivos en enfermedades que cursan con aumento de la permeabilidad intestinal (enfermedad de Crohn, intolerancias alimentarias, síndromes postenteritis) o incluso aparecer en sujetos sanos, sobre todo los de tipo IgG. Los AGA-IgA tienen una sensibilidad superior al 80% y una especificidad que ronda el 90% principalmente para los pacientes menores de 3 años.

#### *Anticuerpos antiendomiso (AAE)*

Son anticuerpos frente al endomiso, que es el tejido amorfo que rodea las fibras musculares lisas. En realidad son anticuerpos frente a la transglutaminasa extracelular, por lo que miden lo mismo que los anti-transglutaminasa tisular. Su presencia guarda relación con la existencia de lesión en la mucosa intestinal. Son preferentemente de isotipo IgA. La sensibilidad y especificidad de los EMA es superior al 90%, la especificidad es discretamente inferior en adultos que en niños.

#### *Anticuerpos antitransglutaminasas (ATGt)*

Son anticuerpos dirigidos contra la transglutaminasa tisular o transglutaminasa 2, que ha sido identificada como el principal antígeno de los AAE con los que presentan una excelente correlación. La mayoría de los autores coinciden en una sensibilidad cercana al 98% y una especificidad superior al 99% en poblaciones pediátricas; resultados muy similares a los obtenidos con los AAE. En el caso que haya déficit de IgA se usarán los de clase IgG.

#### *Anticuerpos antipéptido de gliadina deaminado (APGD)*

Son anticuerpos frente a péptidos sintéticos que se corresponden a secuencias de gliadina deaminada. Son los últimos marcadores descritos y tienen una sensibilidad y especificidad superiores a los AGA nativos. Los de clase IgG son los que aportan más al diagnóstico de la EC puesto que parecen presentar una elevada especificidad, al tiempo que permiten diagnosticar pacientes con déficit de IgA y son válidos en niños menores de 2-3 años.

#### *Anticuerpos anti-reticulina (AAR)*

Forman parte de un grupo de autoanticuerpos no específicos de órganos que presentan la propiedad de reaccionar con componentes del tejido conectivo. Presentan una sensibilidad diagnóstica baja y aunque su especificidad diagnóstica es alta, su valor como marcador de la enfermedad celiaca es muy limitado y actualmente está en desuso. Su utilidad radica en la detección ocasional de una posible EC cuando se solicita un estudio de autoanticuerpos ante una sospecha de otras enfermedades autoinmunes.

### **B) Gastritis tipo inmune: Anemia perniciosa**

La anemia perniciosa es una enfermedad autoinmune organoespecífica en la que coexisten la anemia megaloblástica por deficiencia de vitamina B12 y la gastritis crónica atrófica corporal difusa (gastritis tipo A). Se caracteriza por la pérdida de las células parietales gástricas, productora de ácido clorhídrico y factor intrínseco, y de células zimógenas productora de pepsina, que llevan a la atrofia de la mucosa del cuerpo y fundus gástrico, respetando el antro. Se genera hipergastrinemia, anemia ferropénica y una disminución de la secreción de ácido y pepsinógeno I. En la fase final puede producirse anemia perniciosa por déficit de vitamina B12, siendo ésta la causa más común de deficiencia de la vitamina.

Se considera una enfermedad de la vejez, aunque el 15% de los pacientes son jóvenes e incluso puede presentarse en niños. Existe una posible predisposición genética, con un ratio mujer/varón de 3:1. En un 90% de los casos se asocia a la presencia de anticuerpos anti-células parietales (ACP) productoras del factor intrínseco (FI). En un 50% de casos se asocia a anticuerpos anti FI, cuya presencia en otras enfermedades autoinmunes es excepcional.

Existe una anemia perniciosa juvenil que aparece en menores de 10 años en los que el FI no es activo y no se observan anticuerpos.

Suele asociarse a otras enfermedades de origen autoinmune: tiroiditis de Hashimoto; vitíligo; tirotoxicosis (Enfermedad de Graves); diabetes Mellitus; enfermedad de Addison; hipoparatiroidismo; aganmaglobulinemia; LES.

En la anemia perniciosa existen anticuerpos para tres antígenos de las células parietales gástricas. Todos son específicos de estas células.

- Una lipoproteína de las microvellosidades del sistema canalicular de las células parietales.
- Un antígeno aún no bien caracterizado localizado en la membrana de la superficie de la célula parietal.

Estos dos anticuerpos de las células parietales se encuentran en el suero del 90% de los enfermos con anemia perniciosa y el 60-85% de los pacientes con gastritis autoinmune.

- Una glucoproteína llamada factor intrínseco. Los anticuerpos para el factor intrínseco (AFI) se encuentran en el 60% a 76% de las anemias perniciosas.

Hay dos tipos de anticuerpos contra el FI:

- El tipo I que bloquea el acoplamiento de la vitamina B12 con el factor intrínseco.
- Y el tipo II que reacciona con un sitio alternativo del FI o con el complejo FI-vitamina B12, impidiendo su unión a los receptores del íleon terminal. Tradicionalmente se consideraba que los anticuerpos del tipo II, estaban presentes en 25% con respecto al tipo I y rara vez se presentaban en ausencia de éstos; pero, estudios realizados en la última década han informado su presencia solos o en combinación con los del tipo I, siendo más frecuente que lo informado, y los autores enfatizan la utilidad de las técnicas de laboratorio para detectar ambos tipos de anticuerpos. Estos anticuerpos, son altamente específicos para la anemia perniciosa y pueden ser detectados en saliva, jugo gástrico y suero.

Las pruebas de interés diagnóstico más ampliamente aceptadas son: (tabla 10)

Niveles séricos
- Vitamina B12 ↓↓ y Ácido fólico N
- Acido metilmalónico ↑ y homocisteína ↑
- AFI (+)
- ACP (+)
- Gastrina
Test de Schilling
Gastroscopia

Tabla 10. Criterios diagnósticos de la Anemia perniciosa

- Niveles séricos de vitamina B12 (< 100 pg/ml) y ácido fólico (>4 ng/ml).
- La determinación de anticuerpos anti FI (sensibilidad: 66%; especificidad: 95%) y el nivel sérico de gastrina (si está disponible) permiten el diagnóstico del 90-95% casos.
- Anticuerpos anti-células parietales (sensibilidad: 80%; especificidad: baja, 3-10% personas sin anemia perniciosa lo tienen elevado).
- Niveles de ácido metilmalónico y homocisteína plasmáticos: ambos aumentan en el déficit de vitamina B12 de forma precoz (incluso antes de la aparición de la anemia y con déficit mínimos de B12). Podrían estar indicados en situaciones dudosas, con cifras límite de vitamina B12.
- Test de Schilling (patrón de oro en el diagnóstico). Se inyecta por vía intramuscular 1000 µg de cobalamina no marcada para saturar el transportador y se ingiere por vía oral cianocobalamina marcada con cobalto, a continuación se recoge la orina de 24 horas y en ella se cuantifica la excreción urinaria de cianocobalamina marcada. Los pacientes con mala absorción eliminan menos del 2%.
- Gastroscopia: Para valorar la atrofia de mucosa gástrica (suele respetar el antro) y las lesiones gástricas (pólipos y/o carcinoma asociados a la anemia perniciosa).

Otras pruebas útiles en el seguimiento y diagnóstico diferencial son:

- Hematimetría.
  - Anemia macrocítica con ovalocitosis y poiquilocitosis. VCM aumentado (signo más precoz). Reticulocitos disminuídos.
  - Leucopenia. Neutrófilos polisegmentados, envejecidos y con desviación a la derecha. El hallazgo de más de 6 segmentaciones es muy indicativo.
  - Trombopenia.
- Signos secundarios de hemólisis. Descenso de la haptoglobina y aumento de la LDH, bilirrubina indirecta y ferritina.
- Hormonas tiroideas. Puede asociarse a tiroiditis autoinmune. En un 5-10% de los casos existe hipotiroidismo y en <5% hipertiroidismo.

La evidencia demuestra que los anticuerpos para el factor intrínseco son capaces de inhibir la absorción in vivo de vitamina B12 mediada por el factor intrínseco, y que el anticuerpo contra las células parietales canaliculares puede inhibir la secreción ácida liberada por las células parietales. Además, se ha demostrado que en presencia del complemento, los anticuerpos de la clase IgG contra la superficie de la célula parietal poseen una citotoxicidad específica.

Los anticuerpos gástricos en el suero son primordialmente de la clase IgG, con algunos anticuerpos IgA y raramente IgM.

## **Capítulo 2**

### **Preeanalítica**

#### **2.1 Solicitud analítica**

Ante la sospecha de una enfermedad autoinmune digestiva, el clínico de primaria debe solicitar una analítica de despistaje que confirme la existencia de alteración digestiva y además descarte otras causas frecuentes de origen no autoinmune, como pueden ser: infecciones, neoplasias, alcoholismo, déficit alimentarios...

Una vez en la consulta del especialista, basándose en los criterios diagnósticos expuestos en el capítulo anterior, el clínico solicitará el perfil más adecuado para cada enfermedad en concreto. Nuestro grupo de trabajo ha seleccionado los parámetros con mayor sensibilidad y especificidad diagnóstica de cada enfermedad autoinmune digestiva, calificándolos de primera, segunda, tercera o cuarta elección en función de su importancia en el diagnóstico, y/o bien como parámetros de seguimiento en el tratamiento, pronóstico de la gravedad o riesgo relativo de padecer la enfermedad. Tabla 11. En muchos laboratorios estos parámetros ya están protocolizados por perfiles o grupos para cada sospecha diagnóstica e incluso funcionan como algoritmos, es decir, se van realizando de forma secuencial, en cascada, según la validación y criterio del analista, permitiendo así una mayor eficiencia diagnóstica y económica.

## 2.2 Dieta

En general, siempre que se solicita una analítica de sangre se ha de recomendar estar en ayunas unas 8-10 horas previas. Esto es imprescindible cuando se van a determinar metabolitos bioquímicos, pero sólo recomendable cuando únicamente se solicitan anticuerpos. No obstante, en alguna de las técnicas inmunológicas empleadas en serología sí puede haber interferencia lipémica, como por ejemplo en la aglutinación en látex.

Por otra parte, en los exámenes de diagnóstico de celiaquía es importante que el paciente esté realizando una dieta normal mientras se efectúa el estudio, puesto que el efecto de la dieta sin gluten sobre la serología y el estudio histológico es impredecible.

## 2.3 Obtención del espécimen de la sangre

### Extracción

La punción venosa es la forma más corriente de obtener sangre para análisis.

- Por lo general se escoge una vena del pliegue del codo, con el brazo del paciente en extensión.
- Es necesario aplicar un torniquete al brazo, por encima del sitio donde se va a puncionar, para provocar distensión venosa, pero este debe mantenerse el menor tiempo posible, pues puede provocar modificaciones importantes en los valores de algunos parámetros.
- La aguja debe poseer un diámetro apropiado (0,8 a 1,1 mm para adultos), si se emplea una aguja de calibre muy pequeño provocaría hemólisis.

La punción cutánea es el procedimiento ideal para obtener pequeñas cantidades de sangre, es por tanto el método de elección en recién nacidos, lactantes, obesos importantes, etc.

- En recién nacidos y lactantes menores de un año se usa la superficie plantar interna o externa del talón. En niños mayores y adultos se pueden usar también la superficie palmar o lateral de los dedos de la mano o el lóbulo de la oreja.
- Calentar el pie en una bandeja con agua templada a 41°C, secar y desinfectar.
- Puncionar con la lanceta energética y perpendicularmente al lateral del talón (en los recién nacidos y lactantes, la profundidad no superará NUNCA los 2.4 mm).
- Presionar de forma intermitente el talón, nunca exprimiendo ni forzando.

### Llenado de los tubos

- Al finalizar la extracción venosa se separará la aguja de la jeringa y se procederá a verter la sangre con suavidad por las paredes internas de cada tubo, evitando la

formación de espuma, pues también favorece la hemólisis. En el caso de que se emplee el sistema de tubos al vacío (Vacutainer), este paso se obvia.

- En la extracción cutánea desechar la primera gota y llenar los tubos o el capilar por goteo (debe fluir libremente). Los capilares son finos tubos de vidrio recubiertos en su interior con heparina y que precisamente se llenan con las gotas de sangre mediante capilaridad. Una vez rellenos se han de procesar inmediatamente.

### Tipos de tubos

#### *Con gelosa*

- Los parámetros de Inmunología (anticuerpos, proteínas...) y de Bioquímica General (enzimas, metabolitos, iones...) se determinan en suero (plasma libre de fibrinógeno), por lo que la sangre tan sólo necesita un tubo seco o bien con gelosa para favorecer la coagulación.
- Generalmente el código de color del tapón de Inmunología es amarillo, para facilitar la distribución interna en el laboratorio, separada de la Bioquímica General, a la que se le suele asignar el tapón de color marrón.
- Los tubos de suero han de ser los primeros en llenarse con la sangre para evitar la posible contaminación con los anticoagulantes de los siguientes tubos. No obstante, si la punción ha sido capilar este tubo conviene llenarlo el último y llenar antes el resto, para evitar que se coagule la sangre en aquellos tubos que llevan anticoagulantes

#### *Con anticoagulantes*

- En el caso de que se desee trabajar con sangre completa, es necesario emplear un anticoagulante. La sal disódica o dipotásica del ácido etilén diaminotetraacético (EDTA) es el quelante empleado en Hematología.
- El código de color del tapón de los tubos de Hematología es lila.
- La mezcla con la sangre debe ser adecuada, invirtiendo el tubo unas 3 veces de forma suave. Si la mezcla se realiza de manera enérgica, se corre el riesgo de provocar hemólisis; en cambio, si es insuficiente, provocará que la muestra se coagule.
- La proporción entre el espécimen y el anticoagulante debe ser respetada. Una proporción incorrecta, es causa de serios errores en los resultados, por tanto, el volumen de anticoagulante que llevan los tubos no ha de ser manipulado y la cantidad de sangre con que se llenen ha de ser exacta, enrasarse hasta la señal que llevan dibujada.

### Precentrifugación

- Un aspecto importante para los tubos de suero es la fase de precentrifugación, consiste en que antes de centrifugar los especímenes de sangre debemos esperar que se complete la formación del coágulo a temperatura ambiente (18-24°C) para la obtención de suero, aproximadamente 20 minutos desde la extracción de la muestra.



- En el caso de la Homocisteína se ha de mantener el tubo recién llenado a 4°C hasta su centrifugación, con ello se evita la interferencia de los hematíes que liberan rápidamente este aminoácido.

## 2.4 Centrifugación

La centrifugación se utiliza en la sangre para separar dos fases: suero ó plasma, de las células.

Es fundamental observar el principio del “equilibrio”; para ello se colocarán tubos y/ó cubetas transportadoras de igual peso, forma y tamaño que los del recipiente de la muestra en posiciones opuestas en la cabeza de la centrífuga, buscando una disposición geoméricamente simétrica (utilizando tubos llenos de agua en caso necesario).

Los laboratorios deberían utilizar centrífugas con control de la temperatura, ya que éstas pueden generar un calor interno inapropiado para la estabilidad de la magnitud a determinar.

Para la obtención del suero, la sangre se centrifuga antes de 1-2 horas desde su recogida durante 10 minutos aproximadamente a una fuerza de centrifugación relativa (F.C.R.) de 850 a 1000 g, manteniendo los recipientes contenedores cerrados durante todo el proceso para evitar la evaporación del agua sérica.

$$FCR = 1,118 \times 10^{-5} \times R \times V^2.$$

R = Radio (en cm)

V= Velocidad (en revoluciones por minuto).

Las centrífugas modernas permiten seleccionar tanto r.p.m. como FCR.

## 2.5 Almacenamiento

Si la determinación de los analitos no se va a realizar de inmediato los especímenes se han de guardar en tubos apropiados, rotulados de forma correcta, con un cierre hermético y conservarlos a una temperatura adecuada.

### Refrigeración

- Aproximadamente a partir de 4 horas desde la extracción, es necesario guardar los especímenes en la nevera (a 4-6°C), excepto los sueros para la determinación de homocisteína que se han de mantener desde el primer momento a 4°C.
- Los sueros pueden permanecer viables en refrigeración hasta 1 semana.

A partir de estos periodos las muestras necesitan congelarse para su correcto almacenamiento.

Congelación

- Las muestras se mantienen congeladas ( $\leq -20^{\circ}\text{C}$ ) durante un periodo de tiempo bastante prolongado (aprox. 3 meses, variable dependiendo del parámetro que estamos estudiando).
- Si las muestras son sucesivamente congeladas y descongeladas, se pueden obtener resultados falsos positivos y negativos.

SOSPECHA DIAGNÓSTICA	TIPO DE MUESTRA	PERFIL ANALÍTICO:		
		Despistaje	Diagnóstico Seguimiento Pronóstico: 1º, 2º, 3º, 4º	Riesgo relativo
<b>Enfermedades Hepatobiliares</b>				
Hepatitis Autoinmune	<p>●● Sangre en tubo con gelosa. Centrifugar. No hemólisis.</p> <p>● Sangre en tubo con EDTA. Mezclar. No coágulos.</p>	<p>● GOT, GPT, GGT, FAL. Ceruloplasmina, hierro, ferritina.</p> <p>● HCV, HAV, AgHBs, Anti-HBc</p>	<p>● 1º. ANA, ASMA, anti-LKM</p> <p>2º. <u>Anti-LC</u>, anti-SLA/LP, <u>anti-ASGPR</u>, <u>anti-Actina</u>, <u>pxANCA</u>, Anti-CYP2D6</p> <p>3º Anti-LKM3</p> <p>4º. Anti-LM</p>	<p>● HLA DR3/4 HLA-B8</p>
Cirrosis Biliar Primaria		<p>● FAL</p> <p>● IgM</p>	<p>● 1º. ANA, AMA</p> <p>2º <u>anti-Sp100</u>, <u>anti-GP210</u>, anti-GP62, anti-M2</p>	<p>● HLA DR3/4</p>
Colangitis Esclerosante Primaria		<p>● FAL, GGT Bilirrubina.</p> <p>● IgM , VIH, Proteinograma</p>	<p>● pxANCA</p>	<p>● HLA-B8, HLA-DR3</p>
Síndrome Solapamiento			<p>● ANA, ASMA AAC-II</p>	
<b>Enfermedad Inflamatoria Intestinal</b>				
Colitis Ulcerosa	<p>● Sangre en tubo con gelosa. Centrifugar. No hemólisis.</p>	<p>○ SOH</p> <p>Coprocultivo, Toxina <i>C. difficile</i>, Enterovirus Parásitos</p>	<p>○ 1º Calprotectina</p> <p>● 2º pxANCA</p>	
Enfermedad Crohn	<p>○ Otros</p>		<p>○ 1º Calprotectina</p> <p>● 2º <u>ASCA</u></p>	

Tabla 11. Resumen de los Perfiles analíticos de Solicitud y Procedimientos de Toma de muestras para las Enfermedades Autoinmunes Digestivas

SOSPECHA DIAGNÓSTICA	TIPO DE MUESTRA	PERFIL ANALÍTICO:		
		Despistaje	Diagnóstico Seguimiento Pronóstico: 1º, 2º, 3º, 4º	Riesgo relativo
<b>Pancreatitis Autoinmune</b>				
	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Sangre en tubo con gelosa. Centrifugar. No hemólisis.</li> <li>● Sangre en tubo con EDTA. Mezclar. No coágulos.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Amilasa, lipasa.</li> <li>● Proteinograma</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 1º. Ig G(4),</li> <li>● 2º. AAC-II, <u>Anti-AMY-2A</u>, ALA, ASMA, ANA, FR.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● HLA DRB1*0405-DQB1*0401, en población japonesa.</li> </ul>
<b>Enfermedades Gastrointestinales</b>				
Celiaquía	<ul style="list-style-type: none"> <li>● ● Sangre en tubo gelosa. Centrifugar. No hemólisis</li> <li>● Sangre en tubo con EDTA. Mezclar. No coágulos.</li> </ul>		<ul style="list-style-type: none"> <li>● 1º. Ig A</li> <li>● 2º. ATGt, <u>APGD-IgG</u></li> <li>● 3º. AAE, <u>APGD-IgA</u></li> <li>● HLA DQ2</li> <li>● HLA DQ8</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● HLA DQ2/DQ8</li> </ul>
			<ul style="list-style-type: none"> <li>● ATGt IgA</li> <li>● ATGt IgG</li> </ul>	
Anemia Perniciosa	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Sangre en capilar con heparina.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Hemograma, reticulocitos.</li> <li>● LDH</li> <li>● Haptoglobina</li> <li>● Ác. Fólico</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 1º Vitamina B12,</li> <li>● 2º AMM</li> <li>● Homocisteína</li> <li>● 3º AFI</li> <li>● 4º ACP</li> <li>● 5º Gastrina</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● HLA DRB1*04</li> <li>● DRB1*03</li> <li>● HLA B8</li> </ul>

**GOT:** glutámico oxalacético transaminasa, **GPT:** glutámico pirúvico transaminasa, **GGT:** gamma glutamil transpeptidasa, **FAL:** fosfatasa alcalina, **LDH:** lactato deshidrogenasa, **HCV:** virus de Hepatitis C, **HAV:** virus de Hepatitis A, **VIH:** virus de inmunodeficiencia humana, **AgHBs:** antígeno de superficie del virus de Hepatitis B, **Anti-HBc:** anticuerpos core del virus de Hepatitis B, **Ig:** inmunoglobulina, **SOH:** sangre oculta en heces, **ANA:** anti-cuerpos anti-nucleares, **ASMA:** anticuerpos anti-músculo liso, **LKM:** anticuerpos anti-microsomas contra hígado y riñón, **anti-CYP2D6:** anticuerpos anti-citocromo P450 2D6, **anti-LC:** anticuerpos anti-antígeno citosólico hepático, **anti-SLA:** anticuerpos anti-antígeno hepático soluble/hígado-páncreas, **pxANCA:** anticuerpos anticitoplasma de neutrófilos con patrón periférico atípico, **LM:** anticuerpos anti-membrana hepática, **ASGPR:** anticuerpos anti-receptor de asialoglicoproteínas, **AMA:** anticuerpos anti-mitocondriales, **Anti-Sp100:** anticuerpos anti-proteína Sp100, **anti-GP210:** anticuerpos anti-glicoproteína 210, **anti-GP62:** anticuerpos anti-glicoproteína 62, **AAC-II:** anticuerpos anti-anhidrasa carbónica II, **ASCA:** anticuerpos anti-*Saccharomyces cerevisiae*, **Anti-AMY-2A:** anticuerpos anti-alfa amilasa 2, **ALA:** anticuerpos anti-lactoferrina, **FR:** factor reumatoide, **ATGt:** anticuerpos antitransglutaminasas **AAE:** anticuerpos anti-endomisio, **APGD-G o A:** Anticuerpos antipeptido de gliadina deaminado IgG o IgA, **AMM:** ácido metilmalónico, **AFI:** anticuerpos anti-factor intrínseco, **ACP:** anticuerpos anti-células parietales, **HLA:** antígeno leucocitario humano.

Tabla 11 continuación. Resumen de los Perfiles analíticos de Solicitud y Procedimientos de Toma de muestras para las Enfermedades Autoinmunes Digestivas

## Capítulo 3

# Técnicas de laboratorio en autoinmunidad

Una característica de las enfermedades autoinmunes digestivas, es la presencia de autoanticuerpos frente a antígenos específicos de un solo órgano del aparato digestivo, e incluso a antígenos concretos de algún tipo celular de dicho órgano. No obstante tal y como hemos visto en el primer capítulo, no se presentan en exclusividad, ya que también podemos encontrar autoanticuerpos no órganos específicos como los ANA, ASMA, etc.

En cuanto a las técnicas de laboratorio de Autoinmunidad, el inmunoanálisis constituye la técnica básica. A diferencia de los otras áreas del Laboratorio Clínico en el que se emplean inmunoanálisis, en autoinmunidad se utiliza para determinar anticuerpos (autoanticuerpos) y no antígenos. Por este motivo son necesarios antígenos lo más parecidos a su estado nativo como reactivos.

### 3.1 Anticuerpos en las enfermedades hepatobiliares

Ante la solicitud de autoanticuerpos para el diagnóstico de enfermedades hepatobiliares autoinmunitarias, el laboratorio establece un protocolo de técnicas de cribaje en el primer nivel con las que se podría detectar la mayoría de los casos de HAI, y a posteriori otras técnicas de segundo y tercer nivel para el resto de las HAI, CBP y CEP.

A continuación se detallan de forma esquemática y gráfica los principales autoanticuerpos motivo de estudio. Tabla 12 y Ilustración 2.

ESTRUCTURA CELULAR	ANTÍGENO	ANTICUERPO
<b>Núcleo</b>		
Nucleosoma	ADNs, ADNss, Histona, CenpB	ANAs y ENAs
Nucleolo	tRNA,	
Nucleoplasma	SSA-Ro, RNPs , Ciclina A, Proteína Sp100	
Membrana nuclear	Lamininas A y C Glucoproteína 210 del poro nuclear Glucoproteína 62 del poro nuclear	
Membrana nuclear	HMG1 y 2: proteínas cromosómicas de alta movilidad no histonas	pxANCA
<b>Citoplasma</b>		
Mitocondria	Dihidrolipoamida s-acetiltransferasa (subunidad E2) de las 2-oxo-ácido deshidrogenasas (DH): Piruvato-DH, 3- metil-2-oxobutanoato DH y oxoglutarato DH.	AMA
Citoplasma	F-Actina, vimentina, desmina	ASMA
Citoplasma	P395-414: Proteína asociada a ARNt represor UGA	Anti-SLA/LP
Citoplasma	Formimino-tetrahydro-folato ciclodeaminasa	Anti-LC1
Retículo Endoplasmático	Citocromo P450 1A2	Anti-LM
Retículo Endoplasmático	Citocromo P450 2D6	Anti-LKM1
Retículo Endoplasmático	UDP Glucuronil transferasa tipo 1	Anti-LKM3
Membrana citoplasmática	Receptor de asialoglicoproteína	Anti-ASGPR

**ENAs:** anticuerpos antinucleares extraíbles.

*Tabla 12. Clasificación de los Autoanticuerpos de las Enfermedades Hepatobiliares, según su localización y composición.*

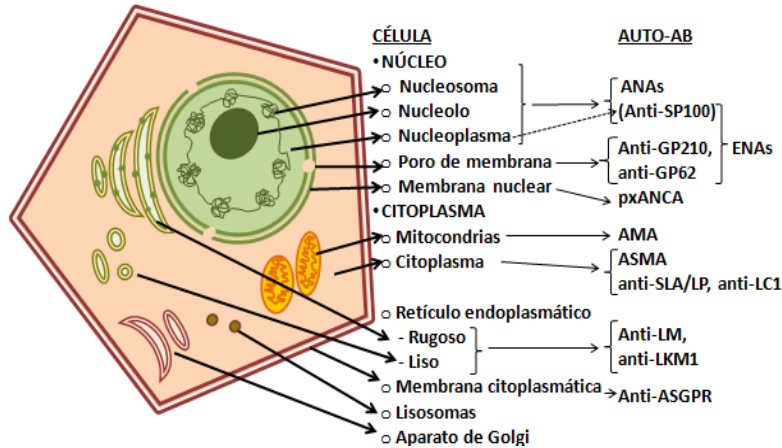


Ilustración 2. Estructuras celulares que generan autoanticuerpos en las enfermedades del hepatobiliares

### 3.1.1. Técnicas de primera elección

#### Imunofluorescencia indirecta (IFI)

El empleo de la IFI para la determinación de anticuerpos séricos o el reconocimiento de inmunoglobulinas en tejidos ha sido internacionalmente aceptado desde el trabajo original de Coons en 1954. Actualmente, mediante esta técnica se determinan los autoanticuerpos ANA, anti-LKM1, ASMA y AMA en el cribado de las enfermedades autoinmunes hepatobiliares por su alta sensibilidad diagnóstica. No obstante, el sustrato a emplear en cada autoanticuerpo varía:

- Los ANA se estudian sobre la línea celular Hep2 (células de epiteloma de laringe humana).
- Los anti-LKM1 sobre el tejido triple de rata LKS (hígado, riñón, estómago).
- Los ASMA y AMA se pueden estudiar sobre el triple tejido o células Hep2. Se considera que los tejidos son menos sensibles, sin embargo, son más específicos.

En la técnica IFI las muestras diluidas de los pacientes son incubadas en láminas cuyas áreas de reacción están cubiertas por un sustrato específico. En una reacción positiva, anticuerpos específicos de clases IgA, IgG e IgM se fijan a los antígenos del sustrato. En un segundo paso, los anticuerpos fijados son marcados con Fluoresceína unida a anticuerpos antihumano y se hace visible con el microscopio de fluorescencia. A continuación se detalla el método por su alta aplicación en el laboratorio.

#### Método. Ilustración 3

- 1º. Reconstitución del buffer fosfato salino (BFS) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se puede conservar a 4°C hasta 4 semanas.

- 2º. Dilución de las muestras. Los sueros deben ser diluidos según el punto de corte del método y rango poblacional, para lo cual se usará el buffer BFS. No diluir los controles del equipo, están listos para usar.
- 3º. Preparación de las improntas:
  - Retirar los portaobjetos del envase, dejar secar a temperatura ambiente durante 15 minutos.
  - Sembrar los sueros controles positivos, negativos y muestras a procesar. Precaución de no tocar con la pipeta las áreas reactivas, dejando caer suavemente la gota de la dilución sobre el área reaccionante.
- 4º. Incubación: Incubar 20 minutos a temperatura ambiente (18-25°C), en una cámara húmeda tapada para evitar la evaporación de las muestras.
- 5º. Lavado: Sacar los portaobjetos y lavarlos con abundante BFS derramando con una pipeta el líquido directamente sobre cada área para evitar la contaminación entre las mismas. Sumergir los portaobjetos 5 minutos en BFS en un frasco tipo Coplin agitando suavemente. Retirar el BFS y reemplazarlo por BFS fresco y dejarlo 5 minutos más en reposo. El lavado puede prolongarse más tiempo sin afectar los resultados.
- 6º. Incubación con antigamma globulina humana marcada con isotiocianato de fluoresceína (diluido previamente con BFS). Sacar los portaobjetos del baño con BFS.
- 7º. Secar con papel de filtro entre las áreas y cubrirlas con la antigamma. Incubar a temperatura ambiente 20 minutos. La cámara húmeda debe estar tapada para evitar la evaporación y el efecto fluorocromo de la antigamma.
- 8º. Lavado: Repetir el paso 5º.
- 9º. Montaje: Sacudir suavemente los portaobjetos sobre papel de filtro. Secar entre las áreas con papel de filtro, cuidando de no tocar las áreas reactivas. Montar con cubreobjetos escrupulosamente limpios y con una gota de medio de montaje. Cubrir los portaobjetos suavemente evitando la formación de burbujas que dificultan la lectura.
- 10º. Lectura: Leer en lo posible dentro de las primeras horas. Se pueden conservar en frigorífico 2-8°C por algunos días sellando los bordes del cubreobjeto con esmalte de uñas.

### Interpretación

Para su lectura se emplea un microscopio de fluorescencia. Se recomienda un aumento total de 200X para la detección selectiva de positivos y negativos, y de 400X para el reconocimiento de patrones y estructuras celulares.

- **Negativos:** Se considera que un suero es negativo si la tinción es igual o inferior a la del pocillo de control negativo, sin patrón claramente discernible.

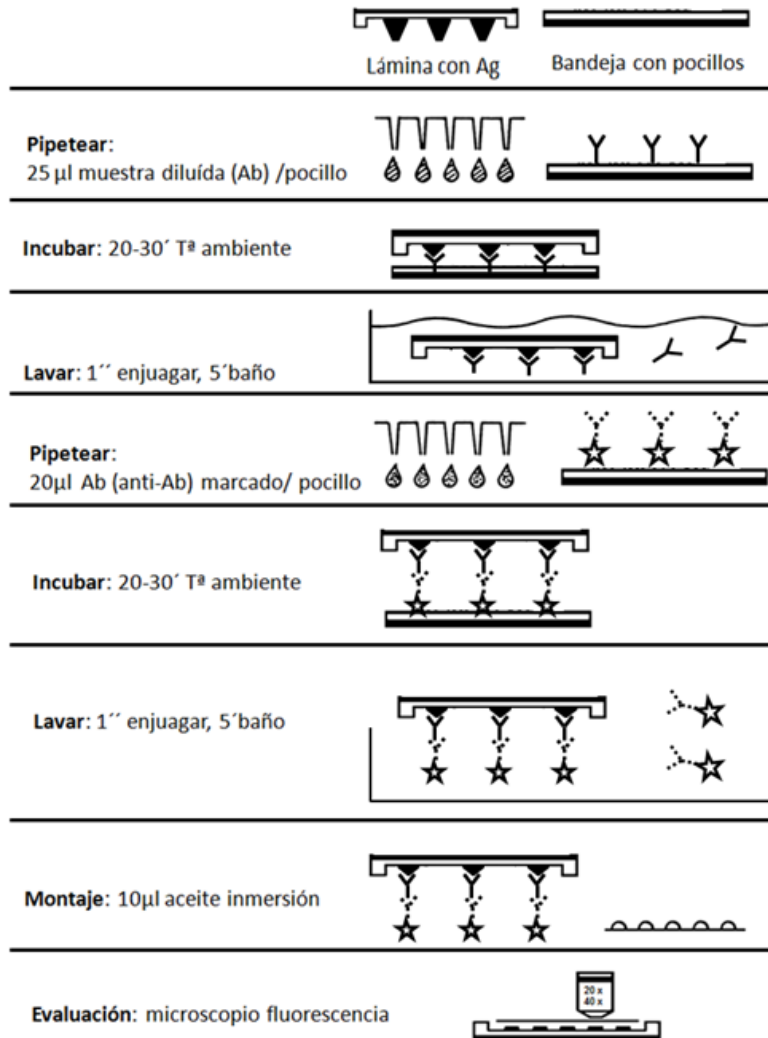


Ilustración 3. Proceso esquemático del fundamento del método de inmunofijación indirecta

- **Positivos:** Se considera que un suero es positivo si el núcleo/citoplasma muestra un patrón de tinción claramente discernible en una mayoría de las células que se encuentran en la interfase.
- **Títulos:** el punto de corte en la población adulta para las técnicas con la línea celular HEp2 es de 1/80, mientras que para el sustrato triple de rata LKM es de 1/40. En los niños, para el triple tejido LKM, cualquier positividad ha de ser informada.
- **Patrones.** Ilustración 4.
- ANA en Hep2. Los antígenos diana son heterogéneos y no completamente definidos por lo que los patrones nucleares más frecuentes son los homogéneos



para los antígenos ADNds, ADNss, Histonas (Ilustración 4-i), moteados para RNPs, SSA-Ro y Sp100 (ilustración 4-j) y centroméricos para CenpB (Ilustración 4-k).

- Anti-LKM en triple tejido. Estos autoanticuerpos muestran unas características típicas dependiendo del tipo de tejido y que permiten diferenciarlos de los AMA.
  1. En el hígado se observa tinción intensa y homogénea en el citoplasma de los hepatocitos. (Ilustración 4-a).
  2. En el riñón se observa una tinción del citoplasma de los túbulos proximales pero no de los túbulos distales. (Ilustración 4-c).
  3. En el estómago el citoplasma de las células parietales no muestran tinción, salvo que coexistan anticuerpos anti LKM con otra clase de autoanticuerpos, tales como anticuerpos anti células parietales gástricas o anticuerpos anti microsomales gástricos.
- AMA.
  - En células HEp2 se observa fluorescencia citoplasmática granular. Su presencia se ha de confirmar con un ensayo que utilice el riñón como sustrato antigénico. (Ilustración 4-h).
  - En Triple o doble tejido se diferencian de los anti-LKM en las siguientes características:
    1. En hígado se observa tinción granular en el citoplasma de los hepatocitos. (Ilustración 4-b).
    2. En riñón de rata se observa fluorescencia en forma de gránulos en el citoplasma de los túbulos distales y, en menor grado, en los túbulos proximales. (Ilustración 4-d).
    3. En el estómago, sí que se observa fluorescencia en el citoplasma de las células parietales gástricas. (Ilustración 4-f).

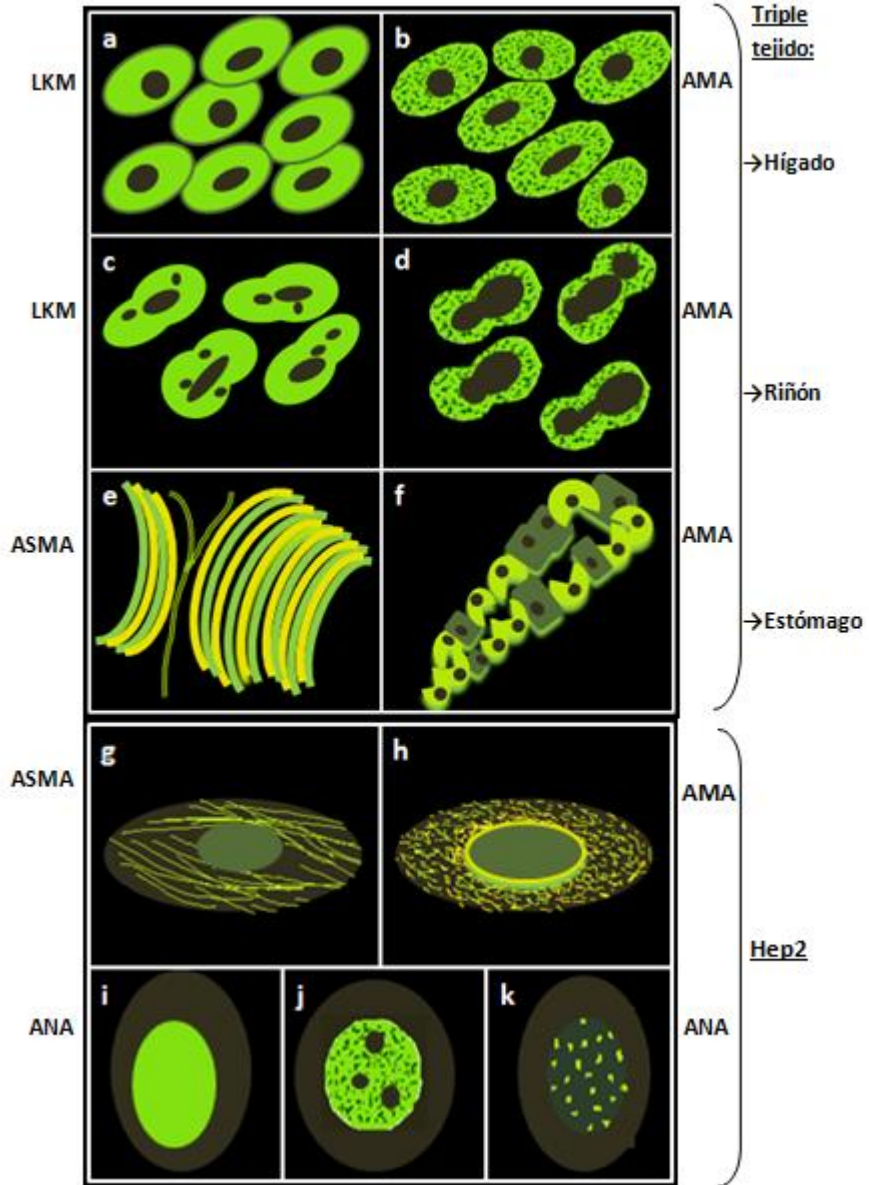


Ilustración 4. Dibujo de la imágenes microscópicas de los patrones de algunos autoanticuerpos digestivos por IFI. Detalles y abreviaciones en el texto

- ASMA.
  - En Hep2 se observan como cables de filamentos fluorescentes que cruzan las células y con apariencia de una "tela de araña". Se ha de confirmar con tejido de rata. (Ilustración 4-g).
  - En el estómago de rata se observa fluorescencia en todas las estructuras que contienen músculo liso, como la extensa capa muscular del estómago, la muscularis mucosae y los vasos sanguíneos. (Ilustración 4-e).

### 3.1.2. Técnicas de segunda elección

Conforme se avanza en el nivel de diagnóstico analítico, se han de ir desarrollando las técnicas de mayor especificidad diagnóstica, tanto por los parámetros a determinar como por el método utilizado. Así, si las técnicas del primer cribado resultan negativas se pasa al siguiente nivel o bien se pueden realizar de forma selectiva para confirmar resultados de títulos intermedios.

Los métodos más adecuados para estas determinaciones son la IFI, el enzoinmunoensayo (ELISA) y el Inmunoblot. Este último método, el Inmunoblot o Dot Blot, es el que está más extensamente implantado en los laboratorios para estos perfiles, por su fácil elaboración y permitir la determinación conjunta de todos los parámetros descritos en el mismo test. No obstante, para la determinación de los pANCA sí está indicada la IFI con un sustrato de neutrófilos granulocíticos (PMN) fijados con etanol o formalina.

#### Inmunoblot (IB)

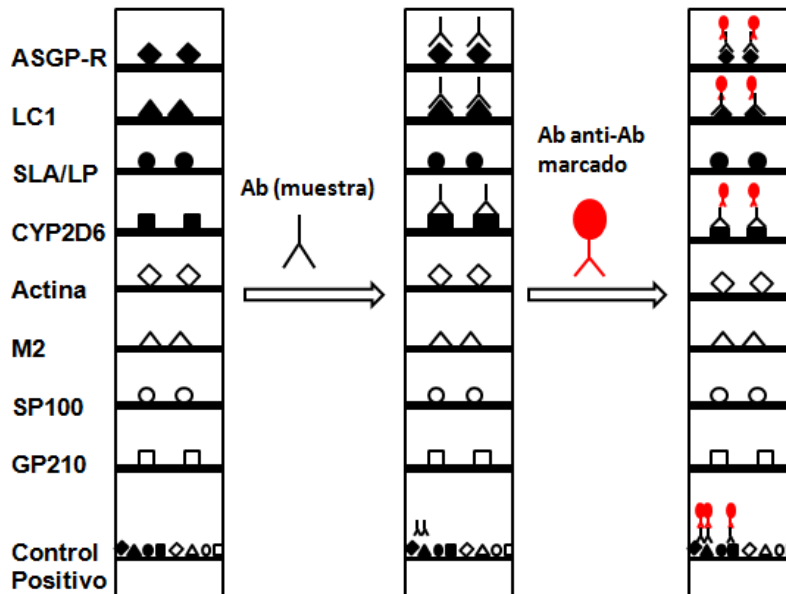


Ilustración 5. Proceso esquemático del fundamento del método Inmunoblot

Se emplea una membrana que actúa de soporte, la cual lleva impresa antígenos purificados o recombinantes. A posterior se enfrentará con el suero del paciente que contiene los posibles anticuerpos; en caso de existir, se unen a los antígenos formando inmunocomplejos. Ilustración 5. La identificación se consigue mediante anticuerpos específicos marcados con enzimas o isótopos reactivos, y se visualizan mediante bandas coloreadas que dependiendo de la altura puede deducirse a qué proteína corresponde la banda reconocida.

### **IFI sobre PMN fijados con etanol o formalina**

Mediante IFI sobre un sustrato de polimorfonucleares fijados con etanol o formalina, se pueden observar 3 patrones de tinción:

- El patrón cANCA se caracteriza por presentar una tinción citoplásmica en neutrófilos fijados con etanol o acetona. Los anticuerpos que dan el patrón cANCA reconocen proteínas débilmente catiónicas o neutras como la proteinasa-3 (PR-3) y la proteína catiónica de 57 kDa (CAP-57), las cuales se liberan de los gránulos específicos por el tratamiento de las células con alcohol o acetona y se distribuyen de manera homogénea en el citoplasma de los neutrófilos (Ilustración 6-a).
- El patrón pANCA se observa en neutrófilos fijados con etanol o acetona y es perinuclear homogéneo. El patrón está dado por los anticuerpos que reconocen proteínas fuertemente catiónicas como: mieloperoxidasa (MPO), elastasa y azurocidina, las cuales cuando son liberadas de los gránulos primarios y específicos del neutrófilo se reorganizan en la periferia del núcleo, el cual tiene carga negativa por el DNA (Ilustración 6-b).
- El patrón pANCA se debe confirmar en neutrófilos fijados con formalina. La formalina es un solvente orgánico que reduce el efecto de atracción de las proteínas catiónicas (MPO, elastasa y azurocidina) hacia el DNA, con lo que quedan distribuidas en el citoplasma. Los anticuerpos que las reconocen dan un patrón citoplásmico en la IFI.
- El patrón pxANCA o atípico es el resultado del reconocimiento de las proteínas: catepsina G, lisozima y lactoferrina. Dichas proteínas se liberan de los gránulos específicos de los neutrófilos y se redistribuyen en la periferia del núcleo cuando son tratados con etanol, acetona o formalina (ilustración 6-c).

Es importante enfatizar que el efecto de reacomodo perinuclear de las proteínas mencionadas no se ve modificado en los neutrófilos fijados con formalina. Por ser un patrón perinuclear se puede confundir con el patrón pANCA, por lo que es importante estudiar las muestras de los pacientes que presentan dicho patrón en neutrófilos fijados con alcohol o acetona y en neutrófilos fijados con formalina.



Ilustración 6. Dibujo de las imágenes microscópicas de los distintos patrones de los ANCA por IFI: a) citoplasmático (cANCA), fijado con etanol o acetona; b) perinuclear (pANCA), fijado con etanol o acetona, y si se trata con formalina se transforma en el patrón citoplasmático; c) atípico (xANCA) tratado con etanol o acetona, y si se trata con formalina no se transforma en citoplasmático

### 3.1.3. Técnicas de tercera y cuarta elección

En el caso de que todos los parámetros de segunda elección resultaran negativos, se podría seguir investigando para tipificar las HAI, aumentando la sensibilidad y permitiendo la cuantificación de niveles más bajos, no obstante, actualmente tan sólo se realiza a nivel de investigación. Así, en un primer término se realizarían los anti-UGT1 (anti-LKM3), mediante Western-blot o enzoinmunoanálisis competitivo, y si éstos también resultaran negativos se realizarían los anti-LM y anti-CYP2D6, en este caso mediante radioinmunoanálisis.

Igualmente, en la CBP, los anti-M9 tan sólo se determinan en investigación y mediante inmunotransferencia.

### Enzoinmunoanálisis competitivo (ELISAcamp)

En el ensayo ELISA competitivo, existen dos anticuerpos compitiendo por el mismo antígeno fijado a la fase sólida: un anticuerpo conjugado y el otro el de la propia muestra. Primero se añade la muestra y tras un periodo de incubación se lava para eliminar los anticuerpos no específicos. A continuación se agrega el anticuerpo conjugado, se incuba y se lava. Por último se añade el sustrato enzimático y se libera el producto cuya absorbancia es inversamente proporcional a la reactividad (concentración) de los anticuerpos del paciente. Ilustración 7.

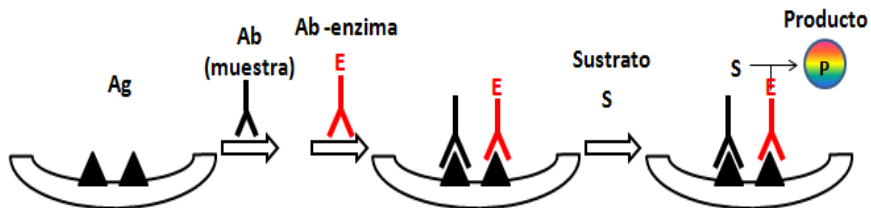


Ilustración 7. Proceso esquemático del fundamento del método Enzoinmunoanálisis tipo competitivo

## Radioinmunoanálisis (RIA)

El radioinmunoanálisis es la técnica que ofrece la mayor sensibilidad por su capacidad para identificar anticuerpos dirigidos a epítopes conformacionales. Este método se ha aplicado para la determinación de los anti-LM y anti-LKM1. En la técnica para la detección de los anti-LKM1 se usa el antígeno recombinante CYP2D6, obtenido previamente mediante transcripción/traslación in vitro, y posteriormente marcado con Metionina con el isótopo <sup>35</sup>S. Los anticuerpos que se unen al radioligando CYP2D6 son inmunoprecipitados y por último se miden sus niveles en cpm.

## 3.2 Anticuerpos en la enfermedad inflamatoria intestinal

### 3.2.1. Técnicas de tercera elección

Tras confirmar mediante biopsia a los pacientes con EII, previo cribaje con la calprotectina fecal, se ha de proceder al diagnóstico diferencial entre CU y EC, para el cual se determinan los anticuerpos pxANCA y ASCA. Los pxANCA ya los hemos estudiado en las HAI por lo que nos centramos ahora en los ASCA, cuya detección se realiza mediante ELISA tipo sándwich.

### Enzimoimmunoanálisis sándwich (ELISAsand)

Consiste en la detección cuantitativa combinada de anticuerpos tipo IgA e IgG *anti-S. cerevisiae* (ASCA) en suero humano, mediante enzimoimmunoensayo de fase sólida en microplaca con un antígeno altamente purificado de manano de la pared celular de *Saccharomyces cerevisiae*.

#### Método. Ilustración 8

- 1º. Sacar la microplaca del embalaje de aluminio y atemperar los reactivos.
- 2º. Diluir las muestras al 1/100 con el tampón.
- 3º. Dispensar las muestras y los controles en los pocillos de la microplaca.
- 4º. Se incuba. Los anticuerpos del paciente, si estuvieren presentes, se ligan al antígeno.
- 5º. Lavar. La fracción no ligada queda eliminada.
- 6º. Añadir la inmunoglobulina antihumana conjugada con peroxidasa de rábano picante (conjugado) con cada pocillo.
- 7º. Se incuba. La inmunoglobulina conjugada reacciona con el complejo antígeno-anticuerpo de la muestra en la microplaca.
- 8º. Lavar. El conjugado no ligado queda eliminado.
- 9º. Agregar el substrato cromogénico. Se generará una reacción enzimática colorimétrica que es detenida con ácido. La intensidad de coloración de la sustancia cromógena está

en función de la cantidad de conjugado ligado al complejo antígeno-anticuerpo y es proporcional a la concentración inicial de anticuerpos en la muestra del paciente.

10º. Leer la absorbancia (DO) de cada pocillo a 450nm en un plazo máximo de una hora.

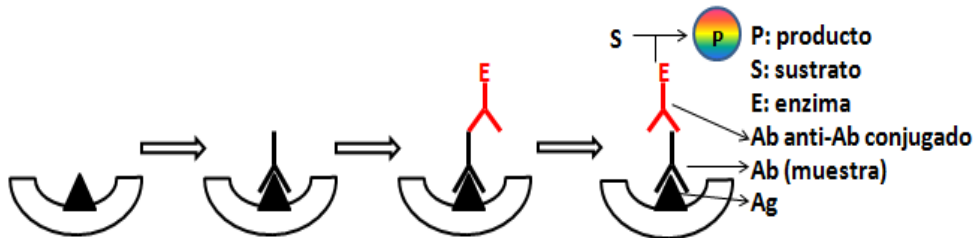


Ilustración 8. Proceso esquemático del fundamento del método Enzimoimmunoanálisis tipo sándwich

### Cálculo de resultados

La reactividad para cada muestra se calcula dividiendo la densidad óptica (o absorbancia) de la muestra por la densidad óptica del control ASCA IgA positivo débil. Por tanto, la absorbancia de la muestra es directamente proporcional a la reactividad. No hay un estándar internacional para ASCA, al igual que para la mayoría de los autoanticuerpos. Los resultados se expresan arbitrariamente en U/mL.

$$\text{Valor de la Muestra (xU)} = \frac{\text{DO Muestra}}{\text{DO ELISA Positivo Débil}} \times \text{Valor ELISA Positivo Débil (vg: 25 U)}$$

Hay que tener en cuenta en todos los métodos inmunológicos, que la reactividad de la muestra está relacionada de manera no lineal con la cantidad de anticuerpo presente. Mientras que los aumentos y disminuciones en la concentración de anticuerpos del paciente se reflejarán en el aumento o disminución correspondiente de la reactividad, los cambios no son en idéntica proporción, por ejemplo, al doblarse la concentración de anticuerpo (mg/dl) no se dobla la reactividad (U/ml).

### Interpretación

La técnica ELISA es muy sensible y es capaz de detectar pequeñas diferencias entre poblaciones de pacientes. Los valores presentados a continuación son sólo valores sugeridos. Cada laboratorio debe establecer su propio rango normal basado en su propia metodología, controles, equipo y población de pacientes.

La muestra puede clasificarse como ASCA negativo, equivoco, o ASCA positivo según la tabla siguiente.

Negativo 0.0 – 20.0 U/ml

Equívocos 20.1 – 24.9 U/ml

Positivo  $\geq 25$  U/ml

Las muestras calificadas como equivocas deben ser analizadas de nuevo antes de informarlas.

### **3.3 Anticuerpos en la pancreatitis autoinmune**

Independientemente de la IgG(4), los autoanticuerpos solicitados en la PAI son los ACA-II, anti-AMY-2A, ALA, ASMA, ANA y FR. Los ANA y ASMA ya hemos visto que se determinan por IFI sobre células Hep2 o triple tejido de rata, los anti-AMY-2A, ACA-II y ALA se realizan mediante IB o ELISA, y los FR que estudiaremos a continuación.

El factor reumatoide (FR) es un anticuerpo frente a la porción Fc de la inmunoglobulina IgG, que también es un anticuerpo. El FR y la IgG se unen para formar complejos inmunes que contribuyen al proceso de la enfermedad. Los isotipos de anticuerpos principalmente son del tipo IgM.

Las primeras técnicas empleadas estaban basadas en inmunoaglutinaciones (Waler-Rose o inmunohemaglutinación, y aglutinación por látex) dando los resultados en títulos (1/80). Posteriormente aparecen técnicas ELISA, que aportan mejores características técnicas pero eran muy lentas y poco reproducibles, por lo que se usaron poco. Actualmente se determinan mediante nefelometría o turbidimetría, de mayor rapidez, reproducibilidad y menor coste. Ello es debido a que estas tecnologías están incorporadas en equipos automatizados y las calibraciones emplean estándares basados en preparaciones de referencia internacionales, dando los resultados en UI/ml.

#### **Aglutinación por látex**

Esta técnica se usa principalmente para la búsqueda de Factores Reumatoides (FR). Se utilizan partículas de látex recubiertas con IgG, las cuales se aglutinan en contacto con FR poliméricos (Ilustración 9). Se usan diluciones progresivamente mayores del suero del paciente, y se informa como positivo o negativo a la última dilución en la que se observa aglutinación. Es un examen sencillo y barato.



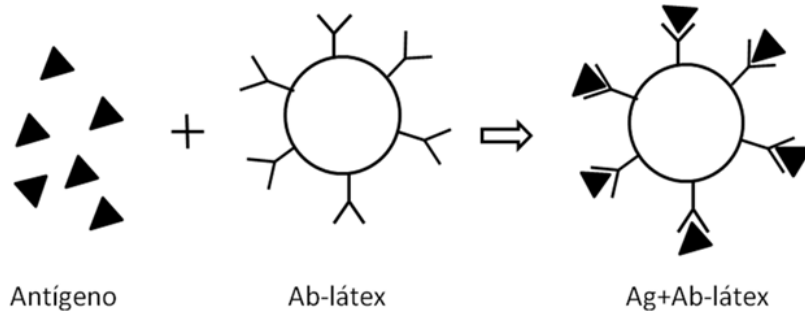


Ilustración 9. Proceso esquemático del fundamento del método Aglutinación por látex

### Turbidimetría y nefelometría

Consiste en el análisis automatizado de la dispersión de la luz al chocar contra complejos antígeno-anticuerpo formados al incubar suero del paciente con el reactivo. A mayor concentración de complejos (mayor "turbidez" de la suspensión), mayor la dispersión. Ilustración 10.

- En las determinaciones turbidimétricas se mide la cantidad de luz que atraviesa la suspensión sin ser dispersada. El detector se sitúa de manera que forme un ángulo de  $0^\circ$  con respecto a la dirección del rayo incidente.
- En nefelometría, por el contrario, el detector de radiación se sitúa a un ángulo distinto de  $0^\circ$  (generalmente a  $90^\circ$ , pero no siempre) de modo que pueda captar la cantidad de radiación dispersada en dicha dirección.

Para amplificar estas débiles señales se pueden emplear fotomultiplicadores.

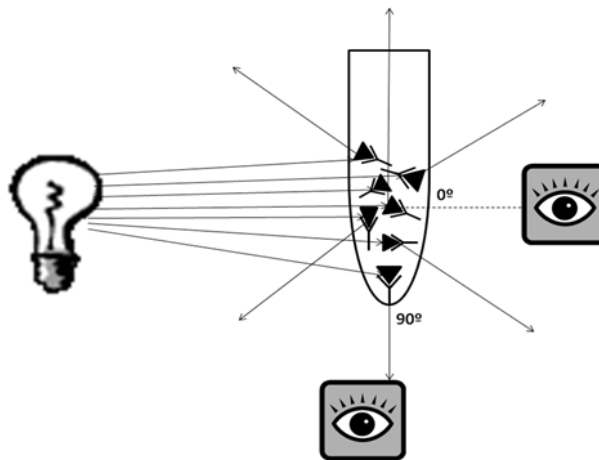


Ilustración 10. Proceso esquemático del fundamento de los métodos Turbidimetría (ángulo  $0^\circ$ ) y Nefelometría (ángulo  $90^\circ$ )

## 3.4 Anticuerpos en las enfermedades gastrointestinales

### 3.4.1. Anticuerpos en la enfermedad celíaca

La determinación de los autoanticuerpos que ayudan al diagnóstico de la CQ está protocolizada según las más recientes evidencias científicas. En el primer nivel de cribado está la medición de la IgA para detectar a los pacientes deficitarios de IgA, de esta manera se podrá dirigir la investigación hacia los autoanticuerpos de la clase IgA o IgG.

#### Técnicas de segunda elección

- Si los niveles de IgA son normales, dentro del rango de edad del paciente, se realizan los ATGt-IgA.
- Si los niveles de IgA son inferiores a 7 mg/dl, se realizan los ATGt-IgG y APGD-IgG.
- Si los niveles de IgA son iguales o superiores a 7 mg/dl, pero por debajo de los valores de normalidad del rango de edad del paciente, se realiza un test multiplex dirigido a la combinación de anticuerpos ATGt y APGD, de las clases IgG e IgA.

Las determinaciones de ATGt (IgA e IgG) y APGD-IgG se realizan por inmunoanálisis tipo sándwich, bien ELISA o Fluoro-enzimo-inmunoensayo (FEIA). El test multiplex se puede realizar por ELISA (Arup) o por Citometría de flujo (Biomedical Diagnostics), métodos novedosos que permiten la detección simultánea de distintos autoanticuerpos. Desarrollamos el último método por ofrecer una elevada exactitud y no necesitar confirmación posterior.

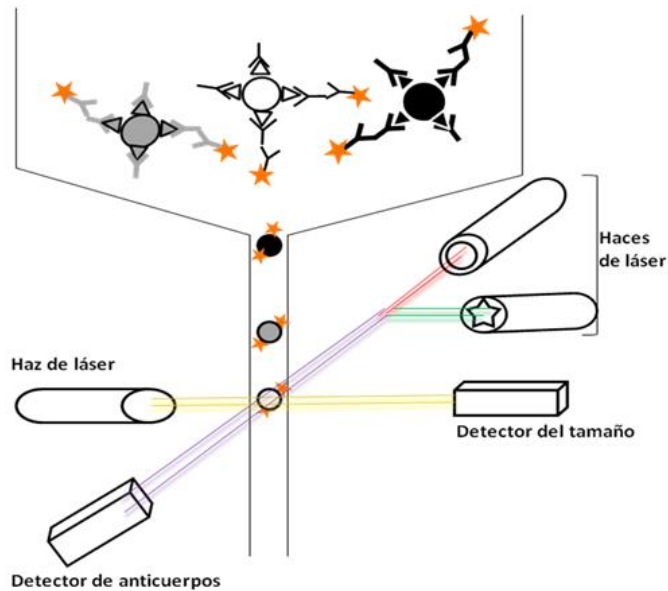
#### A) Inmunoanálisis quimioluminiscente asociado a citometría de flujo (CLIA-CF)

La citometría de flujo es un método rápido, objetivo y cuantitativo de análisis de células u otras partículas en suspensión. El principio en el que se basa esta tecnología es simple: hacer pasar las células o las partículas en suspensión, alineadas y de una en una por delante de un haz luminoso. La interacción de las células o las partículas con el rayo luminoso genera señales que se llevan a los detectores adecuados. La información producida puede agruparse en dos tipos fundamentales: la generada por la dispersión de la luz y la relacionada con la emisión de luz por los fluorocromos presentes en la célula o la partícula al ser excitados por el rayo luminoso. Las señales luminosas detectadas se transforman en impulsos eléctricos que se amplifican y se convierten en señales digitales que procesa el ordenador.

A lo largo de los últimos años, se han diseñado sistemas para inmunoanálisis con microesferas y detección por citometría de flujo que permiten la determinación simultánea de varias sustancias y se han aplicado a la medida de varios autoanticuerpos. El sistema utiliza microesferas de látex marcadas en su interior con diferentes proporciones de dos fluorocromos distintos. Cada fluorocromo puede tener hasta 10 intensidades de fluorescencia diferentes, lo que puede crear una familia de 100 conjuntos de microesferas diferenciables por su fluorescencia de emisión. Los antígenos correspondientes a los autoanticuerpos que quieran determinarse, se inmovilizan en las microesferas. De esta forma, cada una de las 100 microesferas que pueden diferenciarse por su fluorescencia lleva inmovilizado un antígeno específico para un único autoanticuerpo lo que hace posible determinar de forma simultánea hasta 100 autoanticuerpos.

Método. Ilustración 11

- Para realizar la prueba se incuba el suero con las microesferas durante un tiempo determinado, que suele ser alrededor de 30 minutos, en un pocillo de una placa de microtitulación. Se produce la unión de los autoanticuerpos presentes en el suero con los antígenos inmovilizados en las microesferas.
- A continuación, se lavan las microesferas y se añade una solución de un antisuero contra la IgG e IgA humana conjugado con otro fluorocromo y se incuba de nuevo durante unos 30 minutos a temperatura ambiente.



*Ilustración 11. Proceso esquemático del fundamento del método Inmunoanálisis Quimioluminiscente asociado a Citometría de flujo*

- Transcurrido ese tiempo, se lavan de nuevo las microesferas y se analizan directamente en el citómetro de flujo:
  - El paso de cada microesfera es detectado por la dispersión de la luz detectada.
  - Al pasar la microesfera por la cámara de detección, un láser rojo excita los colorantes internos, lo cual permite clasificar la microesfera en uno de los 100 conjuntos, según el antígeno que lleva inmovilizado.
  - Al mismo tiempo, un láser verde excita la fluorescencia naranja asociada con la unión del autoanticuerpo, es decir, con el antisuero secundario conjugado.

### **Técnicas de tercera elección**

En el caso de que los niveles de ATGt-IgA sean moderadamente positivos (20-99 U), procede realizar los AAE y APGD-IgA.

Los APGD-IgA, al igual que los de la clase IgG, se realizan por ELISA o FEIA. Los AAE (principalmente IgA) se realizan mediante IFI sobre el sustrato de músculo liso de la porción distal del esófago de mono o del cordón umbilical humano, y se visualizan con un patrón en nido de abeja correspondiente al endomisio que rodea las fibras musculares lisas.

#### **A) Inmuncromatografía (IC)**

Otra forma de determinar los ATGt es la utilización de los test inmuncromatográfico de lectura rápida. Estos test se realizan en unas gotas de sangre capilar y detectan al mismo tiempo los isotipos IgA e IgG de los ATGt, para obviar el problema de los pacientes con déficit selectivo de IgA. Es un test semicuantitativo cuya sensibilidad y especificidad parecen ser elevadas. Aunque son de interpretación sencilla, la experiencia del operador del test tiene importancia en la fiabilidad de los resultados.

Los test inmuncromatográficos estarían especialmente indicados en estudios epidemiológicos puesto que son sencillos y rápidos y suponen una mínima molestia para el paciente.

### **3.4.2. Anticuerpos en la anemia perniciosa**

#### **Técnica de tercera elección**

Una vez seleccionados los pacientes mediante el cribaje del déficit de Vitamina B12, con confirmación (si déficit moderado) de altos niveles de Ácido metilmalónico, el siguiente eslabón en el laboratorio de autoinmunidad para el diagnóstico de la anemia perniciosa, consiste en la determinación de los anticuerpos AFI.

El método de elección para la detección de los AFI es el ELISA. Esta técnica detecta los anticuerpos IgG, tanto de tipo 1 como de tipo 2. El antígeno de FI humano recombinante de longitud completa purificado se une a los pocillos de una placa de poliestireno microperforada en condiciones que conservan el antígeno en su estado original. Se añaden controles y muestras convenientemente diluidas en pocillos separados, uniéndose durante la incubación los AFI al antígeno que los recubre. El resto de componentes no unidos se elimina mediante lavado y se añade conjugado anti IgG humana a cada pocillo. Un segundo paso de incubación permite que el conjugado se una a los anticuerpos presentes. Tras un lavado que elimina el conjugado sobrante, se añade un sustrato cromogénico y tras incubación la actividad enzimática presente en el pocillo es proporcional a la intensidad de color desarrollado. El ensayo puede ser evaluado fotométricamente comparando la intensidad de color en las muestras con la de los controles.

### **Técnica de cuarta elección**

Si los AFI resultan negativos procede realizar los ACP. Estos anticuerpos pertenecen a la clase IgG, aunque también pueden detectarse isotipos IgA e IgM en pacientes con gastritis crónica atrófica. El ELISA es un método adecuado para la detección de ACP en el que se usa como sustrato antigénico la ATPase H+K+ de cerdo. Los resultados son comparables a los que se obtienen mediante IFI sobre secciones de estómago de roedor. El inmunoblot también es utilizado en la detección de anticuerpos ACP.

No obstante, la sociedad española de autoinmunidad propone hacer primero los ACP ya que los AFI aparecen en menos de un 5% de los pacientes.

MUESTRA PARA ESTUDIO DIAGNÓSTICO	AUTOANTICUERPO	DETERMINACIÓN
● Enfermedades hepatobiliares	<b>1º</b>	Título y patrón
	ANA	IFI-Hep2
	anti-LKM1	IFI-LKM
	ASMA	IFI-Hep2 y IFI-LKM
	AMA	IFI-Hep2 y IFI-LKM
	<b>→ Si 1º negativos → 2º</b>	
	anti-ASGP-R, anti-LC1, anti-SLA/LP, anti-CYP2D6, anti-Actina, anti-M2, anti-Sp100, anti-GP210 anti-GP62	IB, ELISA, o IFI
	pxANCA	IFI-PMN
	<b>→ Si 2º negativos → 3º</b>	
	anti-LKM3	WB, ELISAcamp
	<b>→ Si 3º negativo → 4º</b>	
anti-LM, anti-CYP2D6	RIA	
● Enfermedad Inflamatoria Intestinal	<b>3º (Si Calprotectina + y Biopsia +)</b>	
	pxANCA	IFI-PMN
	ASCA	ELISAsand
● Pancreatitis autoinmune	ANA	IFI-Hep2
	ASMA,	IFI-Hep2 y IFI-Tej
	ALA, ACA-II	ELISA
	FR	Aglutinación, ELISA, Turbidimetría, Nefelometría

Tabla 13. Resumen de los Protocolos del Laboratorio de Autoinmunidad para las muestras de Enfermedades Digestivas.

MUESTRA PARA ESTUDIO DIAGNÓSTICO	AUTOANTICUERPO		DETERMINACIÓN
<b>Enfermedades gastrointestinales</b>			
● <b>Enfermedad celiaca</b>	<b>2º : Si IgA</b>		
	IgA N	ATGt-IgA	ELISAsand, FEIA
	↓ IgA < 7mg/dl	ATGt-IgG y APGD-IgG	ELISAsand, FEIA
	↓ IgA ≥ 7mg/dl	ATGt-IgG -IgA y APGD-IgG -IgA	ELISA, CLIA-CF
	<b>→ Si ATGt-IgA = 20-99 U → 3º</b>		
	APGD-IgA		ELISAsand, FEIA
	AAE		IFI-Tej
	<b>Estudios de población</b>		
ATGt-IgG -IgA		IC	
● <b>Anemia Perniciosa</b>	<b>3º (Si Vit B12 ↓ y AMM ↑)</b>		
	AFI		ELISA
	<b>→ Si AFI negativo → 4º</b>		
ACP		ELISA, IFI-Tej, IB	

**IFI-Hep2:** inmunofluorescencia indirecta con sustrato de epiteloma de laringe humano. **IFI-LKM:** IFI con sustrato triple de roedor. **IFI-PMN:** IFI con sustrato polimorfonucleares. **IFI-Tej:** IFI con sustrato de tejido. **IB:** inmunoblot. **WB:** Western-blot. **ELISAcamp o sand:** inmunoanálisis enzimático competitivo o sándwich. **RIA:** inmunoanálisis con radioisótopos. **FEIA:** inmunoanálisis enzimático con fluorescencia. **CLIA:** inmunoanálisis por quimioluminiscencia. **CF:** citometría de flujo. **IC:** inmunocromatografía.

Tabla 13 continuación. Resumen de los Protocolos del Laboratorio de Autoinmunidad para las muestras de Enfermedades Digestivas.

## Capítulo 4

### Informe del laboratorio de autoinmunidad

Tal y como hemos visto (capítulo primero), la presencia y ausencia de los autoanticuerpos detectados con las técnicas de laboratorio estudiadas (capítulo tercero), contribuyen de forma determinante en el diagnóstico y clasificación de las enfermedades digestivas autoinmunes. No obstante, la interpretación del panel de anticuerpos resultante ha de ser conjunta con la presencia de síntomas, bioquímica y biopsias concordantes, además de la exclusión de otras enfermedades.

#### 4.1 Informe de los autoanticuerpos de las enfermedades hepatobiliares

Recordemos que para valorar autoanticuerpos por IFI en el cribaje del primer nivel, hemos de considerar que en la población adulta el punto de corte con la línea celular Hep2 es de 1/80, mientras que para el tejido triple de rata es de 1/40. No obstante, para que tengan significación clínica según los criterios diagnósticos de la HAI, la intensidad del título de los ANA, ASMA y anti-LKM ha de ser superior y así se cuantifica en la escala Score: tabla 14. En la población pediátrica cualquier positividad en sustrato LKS se ha de informar ya que los títulos  $\geq 1/10$  ya pueden tener significación clínica.

Si la carga autoinmune es elevada es más rápido el diagnóstico serológico pues basta con las técnicas de primera elección, pero si la carga autoinmune es baja, hay que seguir el algoritmo escalonado con las técnicas de segunda, tercera y cuarta elección respectivamente. Ilustración 12.



Para una correcta interpretación de los resultados y facilitar la comparación entre distintos laboratorios, siempre se debe especificar la técnica utilizada. Además, en los anticuerpos de las HAI que se hayan determinado por IFI, se ha de concretar el sustrato empleado e informar el título y el punto de corte como valor de referencia.

CATEGORÍA	FACTOR	SCORE
<b>Parámetros clínicos</b>		
Sexo	Femenino	+2
Fármacos	Si	-4
	No	+1
Alcohol	<25 g/día	+2
	>60 g/día	-2
Enfermedad autoinmune concurrente	no HAI	+2
<b>Parámetros bioquímicos</b>		
FAL/ GOT o GPT	>3	-2
	<1.5	+2
	1.5-3	0
Y-Globulinas o IgG (veces sobre el valor normal)	2	+3
	1.5-2	+2
	1-1.5	+1
	<1	0
<b>Parámetros inmunológicos y virológicos</b>		
ANA, ASMA o LKM1, mediante IFI-LKM	Adultos	
	>1/80	+3
	1/80	+2
	1/40	+1
	<1/40	0
	Niños	
	>1/20	+3
	1/10-1/20	+2
AMA	≥1/40	-4
pxANCA, anti-ASGPR, anti-LC1, anti-SLA/LP, anti-Actina, si 1ª elección son (-)	+	+2
HLA DR3 o DR4, si auto-anticuerpos (-)	+	+1
Marcadores de hepatitis vírica	+	-3
	-	+3
<b>Parámetros histológicos</b>		
Hepatitis de interfase	Presencia	+3
Infiltrado linfoplasmocitario	Predominante	+1
Rosetas (pseudoglandulas)	Presencia	+1
Ninguno de anteriores		-5
Alteraciones biliares	Presencia	-3
Características atípicas	Cualquiera	-3

Tabla 14. Diagnóstico de HAI mediante el sistema SCORE

CATEGORÍA	FACTOR	SCORE
<b>Respuesta al tratamiento</b>		
Completa		+2
Recaída tras suspender el tratamiento		+3
<b>SUMATORIA ANTES DEL TRATAMIENTO</b>		
HAI definitivo		>15
HAI probable		10-15
<b>SUMATORIA DESPUÉS DEL TRATAMIENTO</b>		
HAI definitivo		>17
HAI probable		12-17

Tabla 14 continuación. Diagnóstico de HAI mediante el sistema SCORE

		HAI-I	HAI-II	HAI-III	CBP	CEP	SPA	HCC
1º	ANA	++/-	-	-	+/-	+/-	-	-
	ASMA	++/-	-	-	-	+/-	-	-
	LKM1	-	++/-	-	-	-	-	-
	AMA	-	-	-	++/-	-	-	-
2º	pxANCA	+	-	-	-	++	-	-
	ASGPR	+	+/-	-	-	-	-	-
	LC1	-	+/-	-	-	-	-	-
	CYP2D6		+/-				-	-
	SLA/LP	-	-	+	-	-	-	-
	AAC	++	-	-	-	-	-	-
	M2	-	-	-	++	-	-	-
	SP100	-	-	-	+	-	-	-
3º	LKM3		+				-	-
	LM		+				+	-
4º	CYP2D6		+				-	-

Ilustración 12. Valoración de los autoanticuerpos en el diagnóstico de las enfermedades hepatobiliares autoinmunes.

HCC: Hepatitis crónica criptogénica.

- La utilidad clínica de los anticuerpos en las HAI es principalmente contribuir al diagnóstico, pero además algunos de ellos y en determinados pacientes, permiten un seguimiento de la enfermedad y aportan un pronóstico sobre su evolución.
  - Los ANA y ASMA no son totalmente específicos de la HAI porque pueden estar presentes en diversas enfermedades autoinmunes y otras hepatopatías: los ANA pueden dar positivo en el lupus eritematoso sistémico, CBP, CEP, etc; y hasta la tercera parte de los pacientes con hepatitis crónica viral B o C presentan ANA o ASMA, por lo general, en títulos bajos.
  - Los ANA, ASMA, y anti-LKM1 no son patogénicos por sí mismos. Su expresión puede variar durante la evolución de la enfermedad. Tampoco reflejan la respuesta al tratamiento y por tanto no deben ser monitorizados, no obstante, hay evidencias de que en pacientes pediátricos la respuesta sí es paralela.
  - Los ANA, ASMA, y anti-LKM1 pueden ser negativos en un 10%-20 % de los casos de HAI.
  - Los anti-LKM1 se presentan en la HAI tipo II y no se encuentran en otras enfermedades autoinmunes, son mutuamente excluyentes con los ANA y ASMA.
  - Los pANCA fueron asociados, en un principio, con CEP. Sin embargo, posteriormente se han documentado títulos altos en el suero de hasta el 90% de pacientes con HAI. Pueden ser útiles en el diagnóstico de pacientes seronegativos para los marcadores convencionales, su presencia en HAI se ha correlacionado con evolución más severa y mayor tendencia a recurrir.
  - Los anti-ASGP-R identifican a los pacientes con alta frecuencia de recaída tras la retirada del tratamiento. Sus títulos se correlacionan con la actividad de la enfermedad y declinan con el tratamiento inmunosupresor.
  - Los títulos de anti-LC1 se correlacionan con la actividad de la enfermedad.
  - Los anti-SLA/LP tienen una mayor precisión diagnóstica con un valor predictivo positivo de casi el 100%. Sin embargo su prevalencia es sólo de un 10-30% de pacientes con hepatitis autoinmune, con o sin ANA o ASMA. Pueden identificar a un porcentaje de pacientes con hepatitis crónica criptogénica que en realidad sufren de hepatitis autoinmune y que responden al tratamiento Inmunosupresor.
  - Los AMA son característicos CBP, pero pueden estar presentes en un grupo minoritario de pacientes con HAI.
- La utilidad clínica de los autoanticuerpos en la CBP está dirigida a la ayuda diagnóstica, alguno incluso con valor pronóstico, pero no son aplicables en el seguimiento de esta enfermedad. Su sobre interpretación es el error más frecuente en la aplicación clínica de los resultados serológicos.
  - Los AMA se encuentran en el 95% de las CBP y tienen una especificidad del 98%.

- No parece que los AMA sean citotóxicos: persisten después del trasplante de hígado; y sus títulos no se correlacionan ni con la severidad ni con la progresión de la enfermedad. Su monitorización no es útil.
- Cuando los anti-GP210 se detectan mediante IFI, su especificidad supera el 99% y parecen tener importancia pronóstica ya que identifican un subgrupo de pacientes con enfermedad hepática más grave y un mayor riesgo de muerte relacionada con causas hepáticas.
- Los anti-GP62 son altamente específicos, no colocalizan con los anti-GP210 y aparecen en distintos grupos de pacientes.
- Los anti-Sp100 son muy específicos de CBP, no han sido hallados en otras patologías hepáticas. Los anti-Sp100 y ANA-centrómero marcan una enfermedad que progresa más rápido.

#### 4.2 Informe de los autoanticuerpos de las enfermedades inflamatorias intestinales

Las sensibilidades de los pANCA y ASCA, para el diagnóstico de la CU y EC respectivamente, son muy deficientes (<60%), a diferencia de las especificidades, que son muy elevadas (>90%). Es por ello que limita de forma considerable su utilidad como método de cribado de la población con sospecha de EII, sin embargo sí apoya con relativa seguridad el diagnóstico de EC o de CU cuando el resultado es positivo.

No obstante, el informe y la interpretación de los pANCA para el diagnóstico de la CU y los ASCA para la EC, ha de ser de forma conjunta. La determinación simultánea de ambos anticuerpos, tiene una cierta utilidad para diferenciar entre CU y EC, pero siempre que el resultado de esta combinación incluya la positividad de un anticuerpo a la vez que la negatividad del otro. Ilustración 13.

		NO EII	EII			
			CU	EC	¿CU o EC?	
1º	CALPROTECTINA	-	+	+	+	
2º	BIOPSIA		+			
3º	pANCA		+	-	-	+
3º	ASCA		-	+	-	+

Ilustración 13. Valoración de los autoanticuerpos en el diagnóstico diferencial de la EII.

En resumen, la determinación de pANCA y ASCA no dispone de un valor predictivo negativo suficientemente elevado como para eliminar la necesidad de realizar otras pruebas diagnósticas, como las exploraciones radiológicas, endoscópicas e histológicas.

En cuanto a la utilidad clínica en el seguimiento de la EII, la mayoría de los estudios han demostrado que la presencia de pANCA o ASCA no guarda relación con la actividad de la CU o de la EC, respectivamente; por tanto, se puede concluir que la determinación de estos marcadores serológicos no es útil para monitorizar la actividad de la EII.

A nivel pronóstico, se ha de tener en cuenta que los portadores de los ASCA se asocian con mayor riesgo de sufrir cirugía precoz por modalidades ileales o ileocólicas y que en los niños la presencia mantenida de ASCA en EC es predictiva de mayor tasa de recidivas.

Por otra parte, en las CI el uso de estos marcadores serológicos podría aportarnos alguna información relevante, no sólo desde el punto de vista diagnóstico sino también terapéutico, por lo que su cuantificación podría ser una opción adecuada en este contexto.

### 4.3 Informe de los autoanticuerpos de las enfermedades pancreáticas

- Los anticuerpos se informan de forma cualitativa y su presencia únicamente es de apoyo diagnóstico.
- La presencia de ACA II y anti-AMY-2A sin hiper-IgG4 muestra mejor pronóstico que la presencia de estos anticuerpos con hiper-IgG4 mantenida en el tiempo, que parece predecir un mayor riesgo de cáncer de páncreas sobre una PAI.
- Los anti-AMY-2A ayudan al diagnóstico diferencial de la PAI (en donde la prevalencia es del 100%) con la pancreatitis crónica alcohólica y el cáncer pancreático (con prevalencias de 0%).

Sin embargo, la positividad de los anti-AMY-2A es un mal pronóstico por indicar un alto riesgo de desarrollar diabetes mellitus tipo I fulminante.

- Los autoanticuerpos no predicen brotes de la enfermedad, por lo que no se recomienda su utilización para hacer seguimiento.

Para una valoración correcta del informe serológico en la PAI, puede servir de ayuda la forma con la que esta enfermedad se suele manifestar biológicamente. Tabla 15.

SEROLOGÍA	PRESENCIA EN LA PAI	
<b>Presencia de autoanticuerpos</b>	<b>Japoneses</b>	<b>Europeos</b>
	ACA II	12,5%
ALA	20,8%	76%
Anti-AMY-2A	100%	
ANA	75%	
FR	25%	
<b>Aumento de <math>\gamma</math>-globulinas o IgG sérica</b>		
$\gamma$ -globulinas (> 2 g/dl)	59-76%	
IgG (> 1.800 mg/dl)	53-71%	
IgG4 (> 135 mg/dl)	77-92%	

Tabla 15. Presencia de los marcadores serológicos en la PAI

Los hallazgos de laboratorio (IgG4 y autoanticuerpos) pueden apoyar el diagnóstico, aun-que la confirmación definitiva de la PAI es histológica. El resultado de los autoanticuerpos presentes en los pacientes con sospecha de PAI no es concluyente en el diagnóstico puesto que ninguno de ellos presenta una sensibilidad ni especificidad significativas para esta enfermedad. A pesar de que la IgG4 es altamente sensible (95%) y específica (97%), el diagnóstico podría confirmarse aunque sus valores fuesen normales, siempre que se cumpla algún criterio de imagen más otro anatomopatológico o terapéutico.

## **4.4 Informe de los autoanticuerpos de las enfermedades gastrointestinales**

### **4.4.1. Enfermedad celíaca**

El laboratorio debe informar el valor numérico de los anticuerpos, especificar qué tipo de inmunoglobulina se está midiendo y el valor considerado como el límite alto de la normalidad para el rango de edad del paciente.

La determinación de los anticuerpos de la CQ es importante para:

- Identificar aquellos pacientes para los cuales la biopsia es necesaria.
- Realizar el seguimiento de pacientes de riesgo (enfermedades asociadas y familiares de primer grado).
- Controlar la adherencia a la dieta.
- Facilitar el diagnóstico diferencial.
- Realizar estudios epidemiológicos de la enfermedad.

1. Una vez que se tienen los resultados inmunológicos para el diagnóstico de la CQ, se han de valorar en función de la clínica del paciente.

- Si existe una alta sospecha de CQ por presentar síndrome de mala absorción, nuestro grupo propone un algoritmo de interpretación de la analítica basado en Laboratorios Arup y en ESPGHAN (Ilustración 14), ambos revisados en Enero de 2012. La biopsia tan sólo sería necesaria en aquellos casos en los que los niveles de ATGt-IgA fuesen intermedios y existiese discordancia entre el HLA y los anticuerpos APGD-IgA y/o AAE.

Es interesante reseñar la alta capacidad discriminante que tiene la determinación combinada de los dos isotipos (IgG e IgA) de los anticuerpos ATGt y APGD, realizados bien de forma simultánea mediante los nuevos ensayos multiplex o individualmente mediante ELISA o similares. Tabla 16.

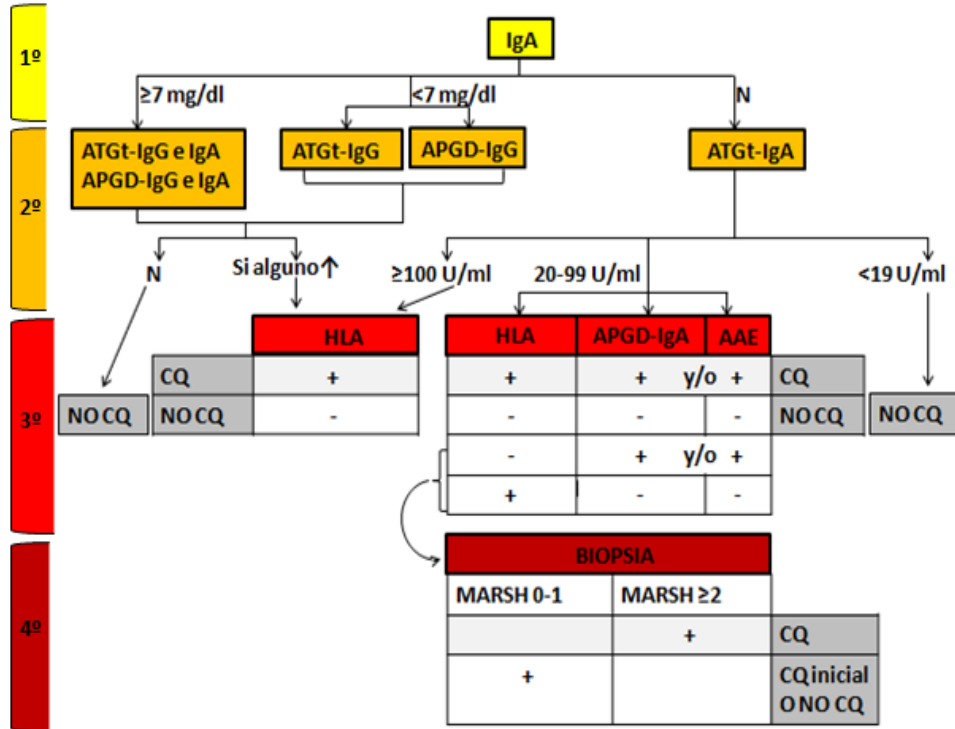


Ilustración 14. Valoración de los autoanticuerpos en el diagnóstico de la enfermedad celiaca en los pacientes con síndrome de mala absorción.

AUTOANTICUERPOS	SENSIBILIDAD	ESPECIFICIDAD	VPP	VPN
APGD-IgA	98.3%	93.8%	92.2%	98.7%
APGD-IgG	96.7%	100%	<b>100%</b>	97.6%
APGD: IgA+IgG	98.3%	98.8%	98.3%	79.6%
ATGt-IgA	95.0%	97.5%	96.6%	96.3%
APGD-IgA + ATGt	100%	97.5%	96.7%	<b>100%</b>
APGD-IgG + ATGt-IgA	100%	97.5%	96.7%	<b>100%</b>
APGD + ATGt: IgA+IgG	100%	96.3%	95.2%	<b>100%</b>

Tabla 16. Valores predictivos positivos y negativos en función de las sensibilidades y especificidades de los autoanticuerpos en la CQ.

- Por otra parte, cuando la clínica no es tan florida y aguda o simplemente inexistente, los resultados de laboratorio se habrían de valorar de forma distinta, según los criterios de sumatoria de puntos propuestos por ESPGHAN en el primer capítulo.

Si el paciente no padece síndrome de mala absorción sino otros síntomas de CQ o bien otras enfermedades autoinmunes, y los niveles de AAE (+) y/o ATGt son inferiores a 10

veces sus niveles normales, entonces sería imprescindible la biopsia para un diagnóstico definitivo de CQ. (Tabla 9).

2. En personas asintomáticas pero con sospecha de riesgo genético de padecer CQ, el primer test de cribaje habría de ser el HLA, y si este resulta DQ2 o DQ8 positivo entonces se pasaría a los siguientes eslabones del algoritmo: primero IgA, segundo ATGt y tercero AAE. Por último, en estos pacientes también sería imprescindible la realización de la biopsia para confirmar un resultado diagnóstico de CQ. (Tabla 9).

3. Una vez retirado el gluten de la dieta el proceso autoinmune (ATGt y AAE) tarda más en resolver que el humoral contra un antígeno exógeno (APGD). En pacientes con dieta libre de gluten los APGD, puesto que son gluten dependientes, se negativizan antes que ATGt y AAE, por lo cual pueden ser más útiles en el seguimiento para monitorizar la adherencia a la dieta y predecir la exposición inadvertida al gluten.

4. Los ATGt-IgA, por su elevada sensibilidad y determinación mediante ELISA o similar, se consideran los anticuerpos de elección en el despistaje de la CQ. Las concentraciones elevadas de estos anticuerpos, sobre todo si exceden 10 veces el valor normal, son altamente predictivos de atrofia vellositaria. Tras la dieta sin gluten estos anticuerpos siguen una dinámica similar a la de los AAE y, al igual que estos, no detectan las trasgresiones ocasionales de la dieta.

Las ventajas de buscar ATGt versus anticuerpos AAE tienen que ver con la metodología para determinarlos, ya que los primeros se realizan a partir de inmunoanálisis tipo sándwich automatizados frente a los segundos que utilizan métodos de IFI menos sensibles y menos funcionales. La ventaja que presenta este tipo de marcador frente a los AGA es que tiene mayor especificidad y alta sensibilidad.

En pacientes de alto riesgo para enfermedad celíaca, la aparición de los APDG-IgG puede preceder a la de la ATGt. En pacientes menores de 2 años con signos de enteropatía crónica y valores normales de los marcadores clásicos para CQ, ésta puede predecirse por los niveles elevados de APGD. (Tabla 16).

5. Los test rápidos de IC están restringidos al ámbito epidemiológico del estudio de la CQ. Hay que tener en cuenta que si los ATGt (IgG + IgA) resultan positivos deben ser siempre confirmados con las determinaciones en suero de ATGt, APGD (ELISA o similar) o AAE (IFI).

#### **4.4.2. Anemia perniciosa**

La utilidad clínica de los anticuerpos AFI y ACP es la de revelar si existe un origen autoinmune en la anemia megaloblástica que padece el paciente, contribuyendo de forma determinante en el diagnóstico serológico de la anemia perniciosa. Ilustración 15.

La positividad de los AFI o ACP en los pacientes con déficit de vitamina B12, severo o moderado (confirmado con elevación de AMM), es diagnóstico de anemia perniciosa. En caso de que los autoanticuerpos sean negativos, se ha de recurrir a la determinación de la Gastrina, que permite de forma indirecta el diagnóstico de la anemia perniciosa.



		NO A. PERNICIOSA			ANEMIA PERNICIOSA					
1 <sup>º</sup>	Vit-B12 pg/ml	>400	400- 100	400- 100	400- 100	400- 100	400- 100	<100	<100	<100
2 <sup>º</sup>	AMM μmol/l		<4	≥4	≥4	≥4	≥4			
3 <sup>º</sup>	AFI			-	+	-	-	-	-	+
4 <sup>º</sup>	ACP			-		+	-	-	+	
5 <sup>º</sup>	Gastrina pg/ml			<100			>100	>100		

Ilustración 15. Valoración de los autoanticuerpos en el diagnóstico de la Anemia Perniciosa.

## Capítulo 5

### Bibliografía

Aparisi Quereda, L. (2008). Pancreatitis crónica autoinmune. *Rev Esp Enferm Dig*, 100, 490-502.  
<http://dx.doi.org/10.4321/S1130-01082008000800008>

ARUP Laboratories. (2006-2012). Disponible en: <http://www.arupconsult.com>

Bermejo San José, F., & López San Román, A. (2008). Colitis ulcerosa. *Medicine*, 10(5), 284-290.

Bogdanos, D.P., Invernizzi, P., Mackay, I.R., & Vergani, D. (2008). Autoimmune liver serology: current diagnostic and clinical challenges. *World Gastroenterol*, 14, 3374-3387.  
<http://dx.doi.org/10.3748/wjg.14.3374>

Czaja, A.J., Donaldson, P.T., & Lohse, A.W. (2002). Antibodies to soluble liver antigen/liver pancreas and HLA risk factors for type I autoimmune hepatitis. *Am J Gastroenterol*, 97, 413-419.  
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1572-0241.2002.05479.x>

Czaja, A.J., Freese, D.K., & American Association for the Study of Liver Disease. (2002). Diagnosis and Treatment of Autoimmune Hepatitis. *Hepatology*, 36(2), 479-497.  
<http://dx.doi.org/10.1053/jhep.2002.34944>

- Czaja, A.J., Manns, M.P., & Limburger, H.A. (1992). Frequency and significance of antibodies to liver/Kidney microsome tipe I in adults with chroniaactive hepatitis. *Gastro-enterology*, 103, 1290-1295.
- Czaja, A.J., Ming, C., Shirai, M., & Nishioka, M. (1995). Frequency and significance of antibodies to histones in autoimmune hepatitis. *J. Hepatol*, 23, 32-38. [http://dx.doi.org/10.1016/0168-8278\(95\)80308-4](http://dx.doi.org/10.1016/0168-8278(95)80308-4)
- De Paz, R., & Hernández-Navarro, F. (2005). Manejo, prevención y control de la anemia perniciosa. *Nutr. Hosp*, 20(6), 433-435.
- Dienes, H.P., Popper, H., Manns, M., Baumann, W., & Thoenes, W. (1989). Meyer zum Büschenfelde K-II: Histologic features in autoimmune hepatitis. *Z Gastroenterol*, 27, 327-330.
- Endo, T., Takizawa, S., Tanaka, S., Takahashi, M., Fujii, H., Kamisawa, T., et al. (2009). Amylase-2A Autoantibodies. Novel Marker of Autoimmune Pancreatitis and Fulminant Type 1 Diabetes. *Diabetes*, 58(3), 732-737. <http://dx.doi.org/10.2337/db08-0493>
- Finkelberg, D.L., Sahani, D., Deshpande, V., & Brugge, W.R. (2006). Autoimmune pancreatitis. *N Engl J Med*, 355(25), 2670-2676. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMra061200>
- Forcione, D.G., Rosen, M.J., Kiesel, J.B., & Sands, B.E. (2004). Anti-Sacharomyces cerevisiae antibody (ASCA) positivity is associated with increase risk for early surgery in Crohn's disease. *Gut*, 53, 1117-1122. <http://dx.doi.org/10.1136/gut.2003.030734>
- García Sánchez, M.V., Iglesias-Flores, E., Gómez-Camacho, F., et al. (2006). Precisión diagnóstica de la Calprotectina fecal para predecir una colonoscopia patológica. *Med Clin (Barc)*, 127(2), 41-46. <http://dx.doi.org/10.1157/13090002>
- Gil-Rojas, N., Gayosso-Fosado, Macías-Angeles, Y., Saraiba-Reyes, M., Castillo-García, G., Higuera-de la Tijera, M.F., et al. (2011). Pancreatitis autoimmune. *Rev Med Hosp Gen Méx*, 74(3), 166-173.
- Gisberta, J.P., Gomollónb, F., Matéa, J., & Pajaresa, J.M. (2003). Papel de los anticuerpos anticitoplasma de los neutrófilos (ANCA) y anti-Saccharomyces cerevisiae (ASCA) en la enfermedad inflamatoria intestinal. *Gastroenterol Hepatol*, 26(5), 312-324.
- Gregorio, G.V., Melarlane, B., Bracken, P., Vergari, D., & Mieli-Vergari, G. (2002). Organ and non-organ specific autoantibody titres and IgG levels as markers of disease activity a longitudinal study in Childhood autoimmune liver disease. *Autoimmunity*, 35, 515-519. <http://dx.doi.org/10.1080/0891693021000056721>
- Grupo de Gastroenterología Pediátrica de la Zona Sur-Oeste (Madrid) (2012). Enfermedad Celíaca, Guías Conjuntas de Actuación Pediatría Primaria-Especializada en Patología Digestiva.
- Grupo de Trabajo sobre Diagnóstico precoz de la enfermedad celíaca. Diagnóstico precoz de la enfermedad celíaca (2008). Ministerio De Sanidad Y Consumo (Ed.). NIPO: 351-08-086-X

Husby, S., Koletzko, S., Korponay-Szabó, I.R., Mearin, M.L., PHILLIPS, A., SHAMIR, R. et al (2012). European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition Guidelines for the Diagnosis of Coeliac Disease. *JPGN*, 54(1), 136–160.

Instrucciones técnicas de BioMédical Diagnostics SA. FIDIS Celiac.

Instrucciones técnicas de INOVA Diagnostics, Inc. QUANTA Lite™ Intrinsic Factor ELISA

Instrucciones técnicas de INOVA Diagnostics, Inc. QUANTA Lite® LKM-1 ELISA

Instrucciones técnicas de INOVA Diagnostics, Inc. QUANTA Lite™ PBC Screen IgG/IgA ELISA

Instrucciones técnicas de INOVA Diagnostics, Inc. QUANTA Lite™ ASCA IgA (S. cerevisiae)

International Autoimmune Hepatitis Group report (1999). Review of criteria for diagnosis of autoimmune hepatitis. *J Hepatol*, 31, 929-938.

Japan Pancreas Society (2002). Diagnostic criteria for autoimmune pancreatitis. *J Jpn Pancreas Soc*, 17, 585-587.

Jonson, P.J., & McFarlane, I.G. (1993). Meeting report of the International Autoimmune Hepatitis Group. *Hepatology*, 18, 998-1005. <http://dx.doi.org/10.1002/hep.1840180435>

Kalliopi Zachou, K., Rigopoulou, E., & Dalekos, G.N. (2004). Autoantibodies and autoantigens in autoimmune hepatitis: important tools in clinical practice and to study pathogenesis of the Disease. *Journal of Autoimmune Diseases*, 1, 2. <http://dx.doi.org/10.1186/1740-2557-1-2>

Krawitt, El. (2006). Autoimmune hepatitis. *N Engl J Med*, 354, 54-66. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMra050408>

Ludwig, J., McFarlane, I.G., Rakela, J., et al. (1995). Terminology of Chronic Hepatitis: International Working Party. *Am J Gastroenterol*, 90, 181-189.

Manns, M. (2000). Antibodies to soluble liver antigen: specific marker of autoimmune hepatitis. *J Hepatol*, 33, 326-328. [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-8278\(00\)80375-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-8278(00)80375-X)

Manns, M., Gerken, G., Kyriatsoulis, A., Staritz, M. (1987). Meyer zum Buschenfelde Kh: Characterisation of a new subgroup of autoimmune Chronic active hepatitis by autoantibodies against a soluble liver antigen. *Lancet*, 1, 292-294.

Manns, M.P., Czaja, A.J., Gorham, J.D., Krawitt, EL., Mieli-Vergani, G., Vergani, D., et al. (2010). Diagnosis and Management of Autoimmune Hepatitis. *Hepatology*, 51(6), 2193-2213. <http://dx.doi.org/10.1002/hep.23584>

Marcos Tomás, J.V., Molina Gasset, R., & Sastre Pascual, J.F. (2008). *Algoritmos. Guías clínicas de ayuda a la petición de pruebas de laboratorio*. ROCHE.

Martins Eduardo, B. et al. (2000). Sclerosing cholangitis. *Current opinion in gastroenterology*, 16, 444-449. <http://dx.doi.org/10.1097/00001574-200009000-00010>

Mohaidle, A. Mella, J.M., Pereyra, L., Luna, P., Fischer, C., Cimmino D.G., et al. (2011). Rol de los anticuerpos en la enfermedad celíaca luego de un año de tratamiento para predecir la adherencia a la dieta libre de gluten. *Acta Gastroenterológica Latinoamericana*, 41(1), 23-28.

Morales, G., & Zavala, C. (2004). Colangitis esclerosante. *Médica Sur, México MG*, 11(2), Abril-Junio.

Moreira, F., & López San Román, A. (2007). Cirrosis biliar primaria. *Rev Esp Enferm Dig (Madrid)*, 99(6), 358.

Muñoz, C., Mancilla, C., Moyano, L., & Castillo, C. (2010). Pancreatitis autoinmune: Experiencia clínica y revisión de la literatura. *Rev Med Chile*, 138, 295-302.

Niveloni, S., Sugai, E., Cabanne, A., Vazquez, H., Argonz, J., Smecuol, J. et al. (2007). Antibodies against synthetic deamidated gliadin peptides as predictors of celiac disease: Prospective assessment in an adult population with a high pretest probability of disease. *Clinical Chemistry*, 53, 2186–2192. <http://dx.doi.org/10.1373/clinchem.2006.081364>

Orts Costa, J.A., Zúñiga Cabrera, A., & Alarcón Torres, I. (2004). Hepatitis autoinmune. *An Med Interna (Madrid)*, 21, 340-354.

Quail, M.A., Russell, R.K., Bellamy, C., Mieli-Vergani, G., & Gillett, P.M. (2009). Seronegative autoimmune hepatitis presenting after diagnosis of celiac disease: a case report. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 21, 576-579. <http://dx.doi.org/10.1097/MEG.0b013e3282fa1400>

Romero Valdez, J.G. et al. (2008). Anemia Megaloblástica: Revisión bibliográfica. *Revista de Posgrado de la Vía Cátedra de Medicina*, 177.

Sahuquillo, L. & López, A. (2011). Estudio de la función hepática: magnitudes bioquímicas. *Ed Cont Lab Clin*, 14, 78-102.

Santamaría, M. et al. (2004). Enfermedades hepáticas autoinmunes. *Ed Cont Lab Clín*, 7, 44-52.

Smyk D.S., Rigopoulou, E.I., Koutsoumpas, L., Kriese, S., Burroughs, A.K., & Bogdanos, D.P. (2012). Autoantibodies in Autoimmune Pancreatitis. *International Journal of Rheumatology*, 2012, Article ID 940831. <http://dx.doi.org/10.1155/2012/940831>

Stange, E.F., Travis, S.P.L., Vermeire, S., Beglinger, C. Kupcinkas, L. Geboes, K., et al. (2006). European evidence based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: definitions and diagnosis. *Gut*, 55, i1-i15. <http://dx.doi.org/10.1136/gut.2005.081950a>

Sternberg, S., Antonioli, D.A., Mills, S.E., Carter, D., Oberman, H.A. (Eds). (1999). *Diagnostic Surgical Pathology* (3ª Ed.).

Stevens, F.M., & Mel Oughlin, R.M. (2005). Is coeliac disease a potentially treatable cause of liver failure?. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 17, 1015-1017. <http://dx.doi.org/10.1097/00042737-200510000-00002>

Wichmann, I., Julià, M.R., Fernández A., & Escobar, D. (2005). Resultados del Taller de Autoinmunidad. Córdoba 2005. *Inmunología*, 24(3), 334-342.

Yahyaoui Macías, R., & Vicioso Recio, M.I. (2008). Bioquímica De Las Heces. *Ed Cont Lab Clín*, 11, 31-36.

Zauli, D., Ghetti, S., Gras, A., et al. (1997). Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in type 1 and 2 autoimmune hepatitis. *Hepatology*, 25, 1105-1107. <http://dx.doi.org/10.1002/hep.510250510>

### **Páginas webs recomendadas para ilustraciones de inmunofluorescencia**



<http://www.labodia.com/eng/ana/Atlas/index.htm>

[http://www.biocientifica.com.ar/es\\_int/images/imagenes/atlasimg/contenidos\\_espanol/principal\\_espanol.htm](http://www.biocientifica.com.ar/es_int/images/imagenes/atlasimg/contenidos_espanol/principal_espanol.htm)

## **Sobre los autores del libro**

### **M<sup>a</sup> José López García**

Doctora en Farmacia  
Facultativa especialista en Análisis Clínicos  
Hospital de Jerez, Cádiz  
Servicio Andaluz de Salud  
[lopezmjose.68@gmail.com](mailto:lopezmjose.68@gmail.com)

### **Antonia Osuna Molina**

Técnico Especialista de Laboratorio  
Hospital Virgen del Rocío. Sevilla  
Servicio Andaluz de Salud  
[tonipillin@hotmail.com](mailto:tonipillin@hotmail.com)

### **Rosario Osuna Molina**

Licenciada en Medicina, especialista Digestivo  
Facultativa especialista de Digestivo  
Hospital Juan Ramón Jiménez. Huelva  
Servicio Andaluz de Salud  
[charo.osuna@telefonica.net](mailto:charo.osuna@telefonica.net)

## **Sobre el revisor del libro**

### **Juan Francisco Rodríguez Gutiérrez**

Licenciado en Biología, especialista en Inmunología  
Facultativo Especialista en Inmunología  
Hospital de Jerez, Cádiz  
Servicio Andaluz de Salud  
[kikorg1977@hotmail.com](mailto:kikorg1977@hotmail.com)



---

Las enfermedades autoinmunes digestivas son un grupo de patologías de gran importancia, para numerosos especialistas, por sus manifestaciones clínicas y complicaciones durante la evolución, y en ocasiones plantean dificultad diagnóstica y terapéutica.

El objetivo de este manual es actualizar los conocimientos clínicos, analíticos y técnicos, con el fin último de ayudar al diagnóstico, pronóstico y seguimiento de las enfermedades autoinmunes digestivas por parte del laboratorio de Análisis Clínicos, especialmente desde el área de Autoinmunidad, dentro de Inmunología.

Va dirigido al personal en formación y a profesionales del ámbito sanitario, principalmente del laboratorio (técnicos y analistas) pero también a los clínicos prescriptores (pediatría, digestivo, dermatología...). Recorre por tanto las áreas asistenciales (atención primaria y especialista), toma de muestras y áreas del laboratorio de soporte general (recepción, distribución y preparación de las muestras), automatización, nuevas tecnologías y áreas de conocimiento.

---