



## Evaluación de tres sustratos empleados en la prueba de inmunofluorescencia indirecta que mide anticuerpos antimitocondriales para diagnóstico de cirrosis biliar primaria

POMA HUANCA, PATRICIA<sup>1</sup>

SOSA TORDOYA, LUIS FERNANDO<sup>1</sup>

CORRESPONDENCIA: PATRICIA POMA

AV. SAAVEDRA 2224 (EDIFICIO SELADIS, PISO 4). TELÉFONO: 2612445

PATY-PH111@HOTMAIL.COM

### Resumen

La cirrosis biliar primaria (CBP) es una enfermedad hepática inflamatoria crónica de etiología desconocida caracterizada por la destrucción de los conductos biliares intrahepáticos que desencadena una cirrosis hepática. En el presente estudio se evaluó tres sustratos comúnmente empleados para detectar anticuerpos antimitocondriales (AMA) por Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) para el diagnóstico de CBP. Los sustratos evaluados fueron: corte histológico (riñón de ratón), células Hep-2 (células epiteliales derivadas del carcinoma laríngeo humano) y células BHK-21 (fibroblastos de riñón de hámster dorado de Siria) los cuales fueron comparados con los resultados de la prueba confirmatoria (ensayo inmunoenzimático) comercial que mide anticuerpos anti antígenos M2 mitocondriales (ELISA, Trinity Biotech).

### Abstract

Primary biliary cirrhosis (PBC) is a chronic inflammatory liver disease of unknown etiology characterized by the destruction of the intrahepatic bile ducts that triggers liver cirrhosis. In the present study we evaluated three commonly used substrates for mitochondrial antibodies (AMA) by indirect immunofluorescence (IIF) for the diagnosis of PBC. The substrates were evaluated: histological (mouse kidney), Hep-2 cells (epithelial cells derived from human laryngeal carcinoma) and BHK- 21 (hamster kidney fibroblasts Golden Syrian) which were compared with the results of the confirmatory test (enzyme immunoassay) commercial antigens measured M2 mitochondrial antibodies (ELISA, Trinity Biotech).

We selected 25 positive sera for AMA by ELISA (index  $\geq 1.10$  IU / ml). Negative

1 Instituto de Servicio de Laboratorios de Diagnóstico e Investigación en Salud (SELADIS) -FCFB-UMSA

Se seleccionaron 25 sueros con resultados positivos para AMA por ELISA (índice  $\geq 1,10$  UI/mL). Los controles negativos eran sueros de pacientes que no tenían antecedentes de enfermedad hepática y presentaban resultados negativos para AMA (índice  $\leq a 0,90$  UI/mL).

De los tres sustratos evaluados, los basados en línea celular BHK-21 mostraron tener utilidad limitada, con valores de eficiencia del 56%, sensibilidad del 48%, especificidad del 64% y un índice de concordancia de Kappa de 0,12 (bajo) con respecto a los resultados de la prueba Gold estándar (ELISA-AMA). Para el sustrato Hep-2 se encontró una concordancia moderada (Kappa= 0,6) frente al Gold estándar, se obtuvo una especificidad =100%, sensibilidad = 60% y eficiencia de 80 % Los cortes histológicos de riñón de ratón mostraron una sensibilidad, especificidad y eficiencia del 92%; además mostraron resultados de mayor concordancia con el método de ELISA (Kappa= 0,84). De los tres métodos de inmunofluorescencia evaluados se determinó que el que usa cortes histológicos de riñón de ratón es el más eficiente y por lo tanto podría ser una herramienta útil como método tamiz en el diagnóstico de CBP.

controls sera were from patients who had no history of liver disease and had negative results for AMA (index  $\leq 0.90$  IU/mL).

Of the three substrates tested, the based on BHK -21 cell line were shown to have limited usefulness, efficiency values of 56%, sensitivity 48 %, specificity of 64 % and Kappa concordance index of 0.12 (low) meade on the results of the Standard Gold Test (ELISA -AMA). For Hep-2 was moderate agreement (Kappa = 0.6) versus the Gold standard, we obtained 100% of specificity, sensitivity = 60% and 80% of efficiency. Histological mouse kidney showed a sensitivity, specificity and efficiency of 92 %, results also showed better agreement with the ELISA method (Kappa = 0.84). Of the three methods of immunofluorescence evaluated it was determined that histological mouse kidney is the most efficient substrate and therefore could be useful as a screening test for diagnosing of CBP.

### **PALABRAS CLAVE**

Cirrosis Biliar Primaria (CBP), Anticuerpos Antimitocondriales (AMA), Inmunofluorescencia Indirecta (IFI).

### **KEY WORDS**

Primary Biliary Cirrhosis (PBC), anti-mitochondrial antibodies (AMA), indirect immunofluorescence (IIF).

## **INTRODUCCIÓN**

La CBP definida así por Ahrens y Payne en 1950, es una enfermedad hepática crónica progresivamente colestásica, caracterizada por la inflamación y destrucción de los conductos biliares interlobulares y septales mediado por linfocitos T que culmina en una insuficiencia hepática. Se asume que es una enfermedad autoinmune debido a que comúnmente va asociada a acidosis tubular renal, vitíligo, tiroiditis de Hashimoto, síndrome de Sjögren, fenómeno de Raynaud, síndrome de CREST, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico y deficiencia en la función de linfocitos T supresores. (Zumueta & Navarrete, 2008).

Sus principales manifestaciones clínicas son fatiga, prurito, ictericia, presencia de xantomas, xantelasmas y consecuencias de mala absorción intestinal, tales como deficiencia de vitaminas y osteoporosis (CBP1). La CBP afecta más a mujeres entre los 30 y 60 años de edad, la relación de afectación hombre mujer es de 9 a 1. También, se ha determinado que existe asociación genética con el HLA-DR8. (Idrovo, 2007).

Un marcador serológico característico de la enfermedad es la presencia de AMA, siendo el blanco antigénico la proteína M2 de la membrana interna de la mitocondria (componente E2 de la piruvato deshidrogenasa), otras proteínas antigénicas mitocondriales como M4, M8 y M9 están involucradas en menor proporción. Los AMA se encuentran presentes en el 90% de los pacientes con CBP, y en el 30% de los casos pueden estar acompañados por patrón fluorescente citoplasmático y/o patrón periférico en la prueba de anticuerpos antinucleares. (Bruguera & Ichiyanagui, 2008). Los AMA en menor frecuencia, también pueden encontrarse en enfermedades hepáticas inducidas por drogas, sífilis, tuberculosis y otras enfermedades autoinmunes hepáticas. (O'Brien, Jordan, Guindi, Hans & Dienes, 2009).

El diagnóstico serológico de CBP se basa en IFI y ELISA. La IFI usa como sustrato cortes histológicos de hígado, riñón o estómago de ratón o rata y la línea celular Hep-2. Los test de ELISA usan como sustrato antígenos del complejo piruvato deshidrogenasa obtenido de corazón bovino o porcino (Dahnrich, Pares, Llorens, Caballeria, Wolfgang & Probst, 2009).

Una ventaja característica de la prueba de IFI es que permite evaluar al mismo tiempo varios tipos de proteínas antigénicas en un mismo sustrato (Ejemplos: Sp100, Gp210, LB2, LKM1, LC1, SLA, M1 – M9) lo que la hace una prueba muy sensible, en cambio la prueba de ELISA utiliza antígenos purificados para un solo marcador de laboratorio lo que le da característica de mayor especificidad. En el test de ELISA una muestra que contenga anticuerpos de alta afinidad en baja concentración, puede presentar la misma densidad óptica que una muestra con anticuerpos de baja afinidad pero con alta concentración por lo tanto no proporciona información cuantitativa como ocurre con la técnica de IFI, en la que es posible determinar mediante una serie de diluciones el máximo título de anticuerpos presentes en la muestra de un determinado paciente (Cortés & Mancera, 2009).

Entre los años 2008 y 2009, en el laboratorio de Histocompatibilidad e Inmunogenética del Instituto SELADIS, se ha observado que existieron 162 solicitudes de determinación de AMA, de las 162, 49 dieron reactivas para AMA. Para hacer un buen diagnóstico y seguimiento de este tipo de enfermedad se requiere de métodos de diagnóstico comerciales u optimizados y validados de alta sensibilidad y especificidad diagnóstica. El conocimiento de estos aspectos hace que exista la garantía en que el diagnóstico de laboratorio por un determinado método sea eficiente y confiable. Por lo antes mencionado, en el presente trabajo se evalúan tres sustratos (cortes histológicos de riñón de ratón, línea células Hep-2 y línea celular BHK-21) de la prueba de IFI para el diagnóstico de CBP que mide AMA con el fin de determinar cual sustrato es el más sensible, específico, eficiente y que tiene mejor concordancia con la prueba de ELISA que mide AMA.

## MATERIALES Y MÉTODOS

---

### Población en estudio

Las muestras utilizadas en este estudio provenían de pacientes que asistieron al instituto SELADIS durante abril de 2008 a mayo de 2009. Las muestras de panel de sueros positivos provenían de pacientes con diagnóstico clínico de CBP con serología negativa para hepatitis virales y que habían dado resultados de ELISA (Trinity Biotech) para AMA positivos (índice de la muestra  $\geq 1,10$  UI/mL). Las muestras del panel de sueros negativos eran sueros de pacientes aparentemente sanos sin antecedentes de enfermedad hepática (resultados de transaminasas, fosfatasa alcalina y bilirrubinas normales, serología para virus de hepatitis negativa y resultados de ELISA para AMA negativo (índice  $<0,90$  UI/mL). Cada uno de los paneles de sueros estaban constituidos por 25 muestras. Todos los pacientes de quienes se utilizó los sueros para construir los paneles de sueros positivos y negativos dieron su consentimiento para que su muestra sea utilizada en el presente estudio.

### Análisis de datos

Todos los datos del presente estudio fueron realizados con ayuda de la base de datos Excel 2007, se utilizaron los indicadores estadísticos para validaciones como el índice de Kappa y la prueba de Mac Nemar (López de Ullibarri & Cura, 2008).

### Preparación de improntas

#### Improntas con el sustrato de células BHK- 21

Todo este procedimiento se llevó a cabo en campana de flujo laminar (Gelaire) y se trabajó con material nuevo y estéril.

Se descongeló una alícuota de células guardadas en nitrógeno líquido y de éste se trasvasó a un tubo falcon de 15 ml y se añadió 3 ml de RPMI 1640 luego se centrifugó a 2500 rpm por 5 min, cumplido este tiempo se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet el 1 ml de RPMI 1640 suplementado (10% de Suero Fetal Bobino (SFB) suplementado, antibióticos (gentamicina y estreptomycin), luego se transfirió a una caja de cultivo celular de 25 cm<sup>2</sup> y se incubó durante una semana a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> y 90% humedad relativa.

Una vez que la placa se encontraba en confluencia se vercenizó durante 10 min a 37°C para que se desprendan todas las células las células adheridas en la base de la caja de cultivo, las células vez despegadas se colocaron en tubo falcon de 15 ml y se centrifugaron a 1500 rpm por 5 min. Se eliminó el sobrenadante, se resuspendió el pellet en 1 ml de RPMI 1640 suplementado y se ajustó la concentración celular a  $2,5 \times 10^6$  células/mL. En portaobjetos de 12 pozos (MP Biomedicals, USA) se prepararon improntas colocando 8  $\mu$ L de las células ajustadas a cada pocillo. Se centrifugó las improntas a 1000 rpm por 3 min y se envolvieron las improntas con parafilm (3M), para la conservación de las mismas se llevaron a 4°C por 30 min y luego se conservaron a -20°C hasta su utilización.

## **Improntas con el sustrato cortes histológicos de riñón de ratón**

Se extrajeron riñones de 25 ratones (Swiss albinos) de 28 semanas con peso promedio de 20 g +/- 2 g, los cuales fueron donados por el bioterio de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas. Se lavó los riñones con buffer salino de fosfatos (PBS) constituido de Fosfato de sodio 112,5 mmol/L, fosfato de potasio 30mmol/L, cloruro sódico 1,15 mol/L, azida de sodio 0,95 g/L pH 7,5. Luego, los riñones se colocaron en una caja Petri que contenía carboximetil celulosa de sodio (Sigma Aldrich) al 4% y se llevó a congelación a -20°C hasta el momento de su utilización. Para realizar los cortes criostáticos se prepararon tacos con los riñones embalsados en carboximetil celulosa de sodio al 4%. Los cortes se realizaron a congelación utilizando un criostato (LEYCA) a -27°C, se colocó cuatro cortes de riñón por cada lámina de portaobjetos. Los cortes realizados tenían diámetro promedio de 5 mm y 5 µm de espesor.

### **Preparación del conjugado fluorescente**

Para determinar el título óptimo del conjugado fluorescente (anti gammaglobulina humana IgG e IgM marcada con tioisocianato de fluoresceína) se prepararon las diluciones (1/100, 1/150, 1/200 y 1/300) con diluyente del conjugado (50 µL de azul de Evans 0,4 % en 3,5 ml de PBS).

### **Titulación del conjugado fluorescente para la prueba de "IFI que usa como sustrato cortes histológicos de riñón de ratón y línea células BHK-21.**

Para la titulación del conjugado fluorescente se utilizó controles positivos y negativos para AMA provenientes de la casa comercial Orgentec, Alemania.

Se fijaron las improntas con acetona p.a. fría (-20°C) por 8 min, se hidrataron por 10 min en una jarra Koplín conteniendo PBS (10x) pH 7,2. Se realizaron diluciones (1/10, 1/20 y 1/40) de los sueros control positivo y negativo. Luego, se sembró 40 µL de las diluciones de sueros, se incubó por 30 min a temperatura ambiente (TªA) y en cámara húmeda para evitar la desecación de los cortes histológicos o de las células fijadas. Se lavaron las improntas por 10 min en PBS y en agitación continua. Las improntas fueron secadas con papel absorbente y fueron colocadas nuevamente en cámara húmeda. Se colocó 25 µL de las diluciones a evaluar del conjugado fluorescente (1/100, 1/150, 1/200 y 1/300). Se incubó en oscuridad por 30 min a TªA. Cumplido este tiempo, se realizó el proceso de lavado y secado antes descrito. Se agregó la solución de montaje (Mowiol 12%, Glicerol 30%, Tris 20 mmol/L, azida de sodio 0,95 g/L) y se colocó un cubreobjetos sobre cada portaobjeto para evitar la desecación de las improntas. Finalmente se leyeron las placas en microscopio UV con aumento 40X.

### **Inmunofluorescencia indirecta (IFI)**

La prueba de IFI con células Hep-2, se realizó según las instrucciones del fabricante del kit comercial (The Binding Site, UK). Brevemente: se realizaron diluciones 1/40, 1/80 y 1/160 de los paneles de sueros y de sueros controles.

Se incubó 30 minutos a T<sup>o</sup>A. Se lavaron por 10 min y secaron las placas correspondientes, se añadió conjugado e incubó en oscuridad por 30 minutos, luego se lavaron y secaron nuevamente las improntas y se colocó el medio de montaje. Las placas en microscopio UV con aumento 40X.

Para la realización de las pruebas de IFI con células BHK-21 y cortes histológicos se siguió el protocolo descrito en la titulación del conjugado, con la salvedad que se utilizó el título óptimo del conjugado para cada sustrato. Con todos los sustratos evaluados se utilizó simultáneamente un control positivo y negativo (Orgentec). El control positivo de AMA debía producir un patrón citoplasmático color verde manzana con intensidad (++) desde la dilución 1/40. El control negativo no debía emitir fluorescencia a la dilución 1/10 en las células renales o 1/40 en las líneas celulares. (Binding Site, 2011).

Para interpretación de resultados de las pruebas de IFI, se consideraron muestras negativas cuando existía ausencia de fluorescencia verde manzana en citoplasma. Una muestra fue considerada positiva si la coloración del citoplasma era mayor al control negativo. (Fig. 1).

Para fines del estudio se consideró como estándar de oro al Kit de ELISA que mide anticuerpos contra el antígeno M2 mitocondrial marca Trinity Biotech, el cual reporta una sensibilidad 91 % de y especificidad de 100%. (Jones & Metcalf, 2008).

## RESULTADOS

---

Al hacer el análisis previo de los pacientes que asistían al servicio de laboratorio se determinó que de todas las pruebas solicitadas para la detección de enfermedades autoinmunes durante dos gestiones (2008 y 2009) se solicitaba la determinación de AMA (ELISA) un 7% de los casos, siendo 69 solicitudes el 2008 y 93 el 2009, teniendo un total de 162 casos presuntivos de Cirrosis Biliar Primaria en las dos gestiones. De las 162 muestras 49 fueron conformadas como reactivas para AMA. Se observó que la mayoría de los pacientes diagnosticados como AMA reactivos eran mujeres (80%). En el panel de sueros positivos se contemplaron sueros de 20 mujeres y 5 varones. El promedio de edad de los pacientes cuyas muestras fueron incluidas en el presente estudio era de 46 años, con valores extremos de 22 y 77 años.

En el proceso de titulación se realizaron diluciones: 1/10, 1/20 y 1/40 de los controles positivos y negativos. Luego se evaluó el título óptimo al cual podía ser utilizado el conjugado. Se evaluó a diluciones de 1/100, 1/150, 1/200 y 1/300. Este experimento se hizo por triplicado y como resultado se observó que a la dilución 1/150 se obtenían resultados Verdaderos Positivos (VP) y Verdaderos Negativos (VN) de los sueros controles comerciales.

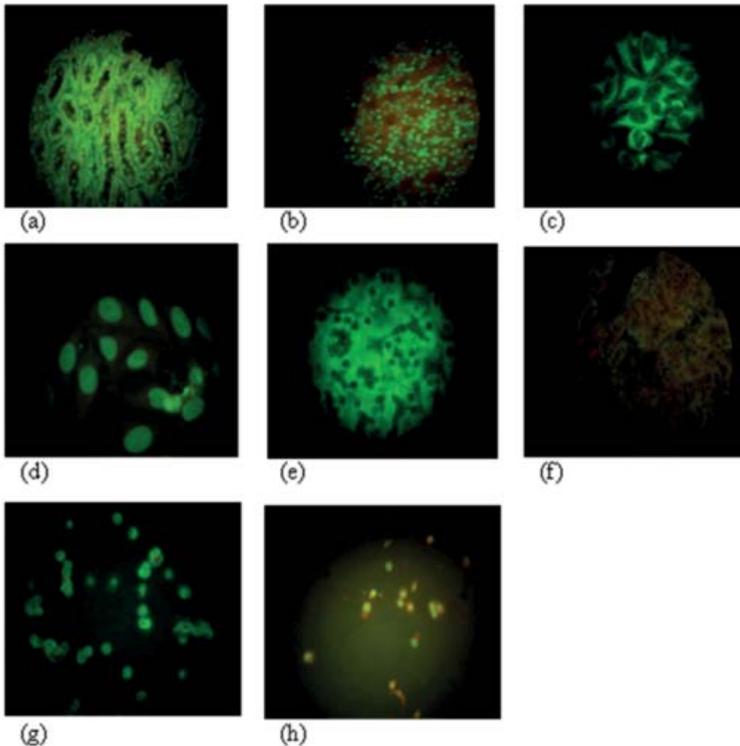
Tabla 1

Titulación del conjugado (antigamaglobulinahumana-FITC IgG, Ig M) a diferentes diluciones, observando patrón citoplasmático negativo Pc (-), patrón citoplasmático positivo fluorescente Pc (+) de los controles a diferentes diluciones.

Diluciones del conjugado	Controles (+) y (-)	Dilución 1/10	Dilución 1/20	Dilución 1/40
1/100	Positivo	Pc(+)	Pc(+)	Pc(+)
	Negativo	Pc(-)	Pc(-)	Pc(-)
1/150	Positivo	Pc(+)	Pc(+)	Pc(+)
	Negativo	Pc(-)	Pc(-)	Pc(-)
1/200	Positivo	Pc(+)	Pc(+/-)	Pc(-)
	Negativo	Pc(-)	Pc(-)	Pc(-)
1/300	Positivo	Pc(+/-)	Pc(-)	Pc(-)
	Negativo	Pc(-)	Pc(-)	Pc(-)

Figura 1

Patrones fluorescentes obtenidos con los diferentes sustratos evaluados (40X). (a y b) Cortes histológicos de riñón de ratón, (a) patrón citoplasmático positivo y (b) patrón citoplasmático (negativo), la fluorescencia observada indica un patrón nuclear difuso característico de los anticuerpos antinucleares (AAN) que usualmente son interferentes en las pruebas de IFI. (c y d) Línea celular Hep-2, (c) patrón citoplasmático y (d) patrón citoplasmático, la fluorescencia observada corresponde al patrón difuso de ANN. (e y f) Patrones fluorescentes observados en un kit comercial "The Binding Site, UK, (f) patrón citoplasmático positivo (f) patrón citoplasmático negativo. (g y h) Línea celular BHK-21, (g) patrón citoplasmático positivo y (h) patrón citoplasmático negativo.

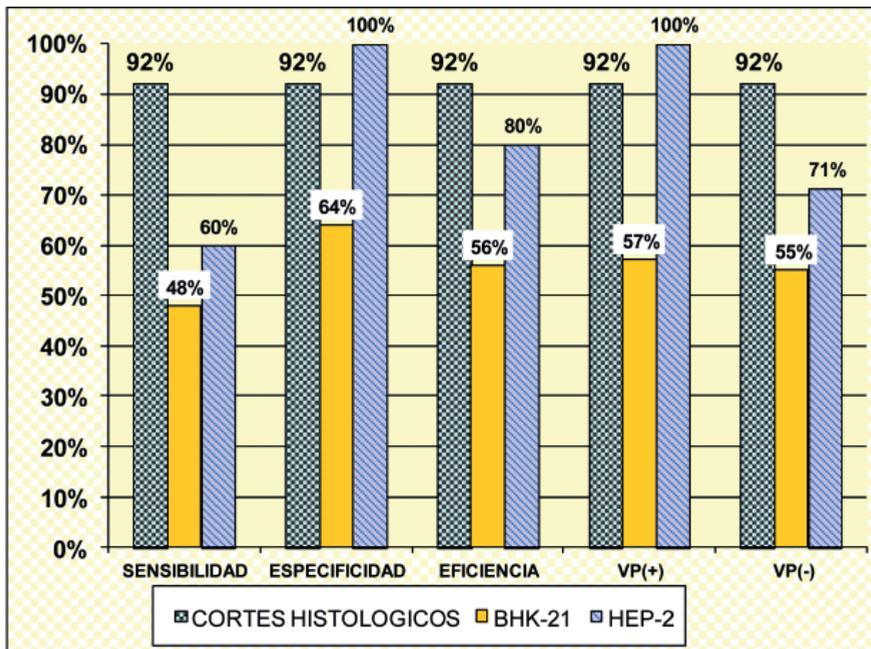


## Evaluación de los resultados del test diagnóstico en los tres sustratos evaluados

Al evaluar al sensibilidad, especificidad, valores predictivos positivos y negativos y la eficiencia de los tres sustratos evaluados se observó que la línea celular BHK-21 es el sustrato menos eficiente, El sustrato células Hep-2 mostró tener mayor especificidad, menor sensibilidad y por lo tanto menor eficiencia que el sustrato cortes histológicos. Los resultados claramente muestran que el sustrato cortes histológicos es el método más eficiente para el diagnóstico por IFI para CBP.

Figura 2

Comparación de la sensibilidad, especificidad, eficiencia, valores predictivos positivo y negativo obtenido en cada uno de los sustratos evaluados para la detección de AMA por IFI. El sustrato cortes histológicos muestra ser el más eficiente de los tres métodos evaluados.



## Determinación de concordancias de diferentes sustratos empleados para AMA IFI frente resultados hallados por ELISA

Las pruebas de concordancia utilizadas fueron: Índice de Kappa y la Prueba de Mc Nemar para dos pruebas relacionadas (apareadas). Los resultados de las distintas pruebas de concordancia ( $p \leq 0,05$ ) para los diferentes sustratos versus el método de ELISA que mide anticuerpos anti antígeno M2 mitocondrial (Gold Standard). El valor crítico esperado en el test de Mc Nemar era de 3,84 ( $p \leq 0,05$ ).

Los cortes histológicos mostraron un índice Kappa de 0,84 que según la escala del índice corresponde a una concordancia muy buena con los resul-

tados obtenidos por el método de ELISA. La prueba de Mc Nemar presentó un resultado de 0,25.

La línea celular BHK-21 presentó un índice Kappa de 0,12 (concordancia deficiente) con los resultados obtenidos por el método de ELISA. La prueba de Mc Nemar mostro mostró un valor de 1,13.

La línea celular Hep-2 presentó un índice de kappa de 0,6 (concordancia moderada) frente a los resultados obtenidos por el método de ELISA. El valor de Mc Nemar fue de 12,1.

Tabla 2

Resultados e interpretación de las concordancias y correlaciones obtenidas por los 3 sustratos para AMA, frente al método de ELISA (TRINITY BIOTECH) para AMA

MÉTODO SEROLÓGICO	ÍNDICE DE KAPPA	INTERPRETACIÓN "Índice de Kappa"	PRUEBA DE MAC NEMAR
CORTES HISTOLÓGICOS	0,84	Concordancia muy buena	0,25
LÍNEA CELULAR BHK-21	0,12	Concordancia deficiente	1,13
LÍNEA CELULAR Hep-2	0,60	Concordancia moderada	12,1

Debido a que los cortes histológicos mostraron ser el método de IFI más eficiente para el diagnóstico de CBP por IFI, se compararon los resultados frente un método comercial de IFI para AMA. El índice Kappa encontrado fue de 0,66 (concordancia muy buena). La prueba de Mc Nemar presentó un valor de 1,33.

## DISCUSIÓN

Al analizar los casos positivos para CBP en nuestro laboratorio, determinamos que el 80% de los casos afecta a mujeres, siendo la relación mujer / hombre 4:1 estos hallazgos son similares a los reportados por: Abarca, Peña Herrera & Garces (2006) donde determinan la Etiología, sobrevida, complicaciones y mortalidad en cirrosis hepática en el Ecuador evidenciando una relación mujer / hombre de 2,4:1; también Cedeño & Medina (2008) determinan que el 90% de las mujeres son afectadas por esta enfermedad.. De las 25 muestras positivas que se emplearon en este estudio 20 provenían de mujeres. Valera, Smok & Poniachik (2007) en el estudio que realizaron en el Hospital Clínico de la Universidad de Chile y en la Clínica las Condes de Chile en 115 pacientes, mostraron que 110 eran mujeres lo que equivalía al 96% hallando una relación de afectación mujer/hombre de 9:1, se conoce que los factores hormonales son uno de los factores predisponentes a enfermedades autoinmunes. (Rojas, 2007, p. 324).

En el presente estudio determinamos que la edad en la que se presentan mayormente casos de CBP es de 45 años. Datos similares fueron reportados por Dávalo, Román & Bustios (2007) en un estudio de Hepatitis autoinmune en el cual incluían a la CBP mas sus formas clínicas y factores relacionados con la respuesta al tratamiento mostrando rango de edades de afectación frecuentes desde 48 a 59 años, una posible explicación a este fenómeno es que

a esta edad el timo ha perdido en gran parte su capacidad para destruir por selección negativa a los linfocitos T autorreactivos, lo cual es un factor predisponente a enfermedad autoinmune.

Hacer un buen diagnóstico clínico y laboratorial para este y otro tipo de enfermedades autoinmunes es vital, principalmente debido al carácter invalidante en el paciente o al hecho de que puedan poner en riesgo la vida del paciente en otros casos. En este último aspecto Jones & Metcalf (2008) determinaron que los pacientes con CBP en estadio III /IV de la enfermedad tienen mayor mortalidad (43.6%) que la población normal. Por tanto, en caso de un diagnóstico laboratorial de CBP se debe contar con una prueba de mayor eficiencia posible. En nuestra experiencia observamos que utilizando sustratos ya sean, líneas celulares (BHK- 21, Hep-2) o cortes criostáticos de tejidos (hígado o riñón de ratón) se puede evidenciar fluorescencia a nivel del citoplasma celular lo cual está directamente relacionada a enfermedades hepáticas de tipo inmunológico, infecciones virales u otras autoinmunes extrahepáticas, etc. (Almeida et al., 2008).

De los tres sustratos evaluados determinamos que los basados en líneas celulares tienen utilidad limitada, especialmente los que utilizan la línea celular BHK-21 que tienen una eficiencia del 56%, sensibilidad del 48% y especificidad de 64%. Si bien este sustrato es considerado bueno para determinar anticuerpos antinucleares. (Sosa & Sánchez, 2007) no lo es para el diagnóstico de CBP ya que tiene una concordancia baja con la prueba Gold estándar evaluada (ELISA-AMA). No existen reportes en la bibliografía acerca de la presencia o ausencia de estos antígenos mitocondriales en la línea celular BHK-21.

Un hallazgo interesante fue encontrar que con la línea celular Hep-2 pese a tener una concordancia moderada (según índice Kappa) frente al test de ELISA, mostró tener una especificidad del 100%, vale decir que si se utilizase este sustrato no se observase fluorescencia a nivel del citoplasma celular, se podría decir que el paciente no presenta la enfermedad pero aún así, es necesario utilizar una prueba más eficiente para confirmar lo antes mencionado. En cuanto a la sensibilidad de este sustrato no se observa una diferencia significativa con las células BHK-21.

Los cortes criostáticos de riñón de ratón mostraron ser los más eficientes con 92% de sensibilidad y especificidad del 92% respectivamente. Además mostraron emitir resultados de mayor concordancia con el método de ELISA-AMA (Kappa 0.84). En general se conoce que la sensibilidad y especificidad de los métodos de IFI para AMA son del 95% (Valera, Smok & Poniachik, 2007). Estos resultados nos muestran que el método IFI optimizado en el laboratorio de Histocompatibilidad e Inmunogenética del Instituto SELADIS es tan bueno como los métodos similares ofertados por las diferentes casas comerciales. Si bien existen diferencias a nivel de sensibilidad y la especificidad con el método de ELISA (método definitivo para diagnosticar CBP), la única o quizás la más importante ventaja que tiene el método de IFI frente al del método de ELISA es que no solo se limita a detectar el antígeno M-2 mitocondrial, sino que puede dar resultados positivos contra los antígenos M1 al M9. Orientando de esta manera al médico hacia el diagnóstico de enfermedades hepáticas autoinmunes, tipo I, II, III u otras autoinmunes no hepáticas e incluso casos de infecciones virales. (Meléndez & Dujarric, 2008). Otra ventaja no menos importante es, que el método optimizado hace más accesible la prueba a los pacientes debido a que el costo de reactivo por prueba

es de Bs. 13 frente a Bs. 45 del Kit de inmunofluorescencia y Bs. 31,50 del Kit de ELISA. El método optimizado también muestra desventajas, la primera es el consumo de tiempo (sacrificar al ratón, extracción y conservación de los riñones, las diluciones seriadas de muestras controles, los lavados, la lectura en el microscopio de fluorescencia). Por la experiencia propia, encontramos que se invierte de una hora a una hora y media más procesando las muestras por IFI que por ELISA. Además es importante recalcar que se necesita profesionales capacitados para hacer la lectura e interpretación de los patrones fluorescentes. Otro hallazgo importante encontrado fue que se pudo evidenciar diferentes patrones citoplasmáticos fluorescentes en un determinado sustrato.

Con los resultados obtenidos del presente estudio se logró determinar que de los tres sustratos evaluados, los cortes histológicos de riñón de ratón son el sustrato más eficiente y es el sustrato que tiene mejor concordancia con los resultados de la prueba de ELISA para el diagnóstico de CBP. Por otra parte, se determinó que existe una concordancia muy buena con los resultados de IFI de un kit comercial de similares características. El test diagnóstico empleado nos ha permitido validar el test de IFI que usa cortes histológicos como una prueba tamiz para el diagnóstico de CBP.

## REFERENCIAS

- Eduardo, Z., Villena, J., Navarrete, S., & Figueroa. (2008). Cirrosis Biliar Primaria Relación Clínico-Laboratorial y Patológica. *Enfermedades del Aparato Digestivo* 1 (4), 5-8. Recuperado de <http://www.cfnavarra.es/salud/anales/textos/vol26/n3/revis2a.html>
- Bruguera, M. (2009). Diagnóstico y tratamiento. *Enfermedades de las vías biliares Intrahepáticas distales en el adulto: colangitis y ductopenia*. *Med Clin (Barcelona)*, 107, 338-341. Recuperado de <http://www.donostiaospitalea.org/cats/cats-61.htm>
- Idrovo, C. (2007). Cirrosis Biliar Primaria. Tratamiento. Bogotá. Fundación Santa Fe. Madrid: Elsevier
- Ichiyanagui, C., & Rodriguez. (2008). Enfermedades hepáticas colestásicas. Departamento de Enfermedades del Aparato Digestivo. 1(4). Recuperado de <http://www.cfnavarra.es/salud/anales/textos/vol26/n3/revis2a.html>.
- Brien, C., Jordan, J., Maha, G., Hans, P., Dienes, J., & Heathcot, L. (2009) Term Follow-Up of Ant mitochondrial Antibody-Positive Autoimmune Hepatitis *Hepatology* 48(2), 550-556. Recuperado de <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/hep.22380/pdf>
- Dahnrich, C., Pares, A., Llorens, C., Rosemann, A., Wolfgang, S., & Vergani, D. (2009). Detecting Primary Biliary Cirrhosis-Specific Antimitochondrial Antibodies. *Clinical Chemistry* Stocker, 55:5, 978-985. Recuperado de [http://www.biomedexperts.com/Profile.bme/1655595/dimitrios\\_bogdanos](http://www.biomedexperts.com/Profile.bme/1655595/dimitrios_bogdanos)
- Cortés, L., & Mancera, L. (2008). Concordancia entre ELISA e IFI para la determinación de anticuerpos tipo IgG contra *Toxoplasma gondii*. Asociación Colombiana de Infectología. Recuperado de <http://www.aeped.es/protocolos/infectologia/index.htm>
- Ullibarri, L. (2008). Medidas de concordancia: el índice de Kappa The design and análisis of clinical experiments Galparosoro 6, 169-171. Recuperado de <http://www.fisterra.com/mbe/investiga/kappa/kappa2.pdf>
- Cura, E. (2004). Manual de procedimientos de Control de Calidad para los Laboratorios de Serología de los Bancos de Sangre. Washington, D.C: Organización Panamericana de la Salud.
- Binding Site. HEP-2 ANA / Substrate Slides. Inserto del Kit commercial.
- Trinity biotech. Captia TM Mitochondria Inserto del Kit commercial.
- Jones, D., & Metcal. (2008). Pronóstico de la Cirrosis Biliar Primaria. *Hepatology* 26, 1138-1142. Recuperado de <http://www.donostiaospitalea.org/cats/cats-61.htm>
- Abarca, J., Peñaherrera, V., & Garces, C. (2006). Etiología, sobrevida, complicaciones y Mortalidad en cirrosis hepática en el Ecuador. *Evaluación retrospectiva de 15 años En Latinoamérica* 1, 29-34.
- Cedeño, L., & Medina, J. (2008). Cirrosis Biliar Primaria. *Medisan*. Recuperado de [http://74.125.47.132/search?q=cache:xSGNf\\_1n07MJ:bvs.sld.cu/revistas/san/vol11\\_30\\_7/san12307.htm+cirrosis+biliar+primaria+en+mujeres](http://74.125.47.132/search?q=cache:xSGNf_1n07MJ:bvs.sld.cu/revistas/san/vol11_30_7/san12307.htm+cirrosis+biliar+primaria+en+mujeres).
- Valera, J.M., Smok G., & Poniachik, G. (2008). Cirrosis biliar primaria: ex-

- perencia de trece años en dos centros de referencia. *Rev Méd Chile* 4,469-474. Recuperado de [http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0034-98872006000400010&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0034-98872006000400010&script=sci_arttext)
- Rojas, W. (2004). *Inmunología*. 13ªed. Medellín Colombia. Corporación para investigaciones Biológicas p 324.
- Dávalo, M., Román, R., & Bustios, C. (2008). Hepatitis autoinmune: Formas clínicas y factores relacionados con la respuesta al tratamiento. *Gastroenterol.* 24: 305-313. Recuperado de <http://www.cfnavarr.es/salud/anales/textos/vol26/n3/revi2a.html>.
- Almeida, J. (2002). Anticuerpos anti-ribosomales como marcadores de actividad en el LES. *Anales de Medicina Interna*. Madrid.
- Porcel, J. (2007). Pruebas de laboratorio para el estudio de las enfermedades sistémicas autoinmunes. *Clínica-UNR.org*, Recuperado de [http://www.clinica-unr.org/Especiales/20/Especiales%20Laboratorio\\_Porcel.pdf](http://www.clinica-unr.org/Especiales/20/Especiales%20Laboratorio_Porcel.pdf)
- Harrison, (2007). *Criterios Diagnósticos De Hepatitis Autoinmune*. Manual of Medical Therapeutics.
- Sosa, L.F., & Sanchez, L. (2004). Validación de métodos serológicos que se emplean para el diagnóstico de enfermedades reumáticas definidas: Lupus eritematoso sistémico (LES). *Biofarbo*. 12, 15-19.
- Meléndez, M., & Dujarric, M. (2008). Evaluación de La Inmunohistoquímica para el Diagnóstico de las Enfermedades Autoinmunes. *Rev Cubana Invest Biomed* 23(3):133-8 Recuperado de [http://bvs.sld.cu/revistas/ibi/vol23\\_3\\_04/ibi01304.pdf](http://bvs.sld.cu/revistas/ibi/vol23_3_04/ibi01304.pdf).