

RECOMENDACIONES DEL GEAI SOBRE LA DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS ASOCIADOS A HEPATOPATÍAS AUTOINMUNITARIAS

M^a Rosa Julia, Estibaliz Ruiz, Odette Viñas

Aunque las hepatopatías autoinmunitarias son enfermedades graves, no es infrecuente que el diagnóstico tarde meses o años desde los primeros síntomas o incluso se plantee de forma incidental tras la detección de una elevación de enzimas hepáticas en una analítica para el estudio de otras patologías. En este contexto, el papel de los autoanticuerpos (Ac) es fundamental. Por lo tanto, se recomienda que se descarten estas hepatopatías en los pacientes para los que no se identifique un diagnóstico alternativo claro.

AUTOANTICUERPOS ASOCIADOS A COLANGITIS BILIAR PRIMARIA (CBP)

1. Anticuerpos antinucleares (ANA)

Tanto la Asociación europea de hepatología : “European Association for the Study of the Liver” (EASL), como la americana: “American College of Gastroenterology”, recomiendan, para el diagnóstico de Colangitis Biliar Primaria (CBP), la determinación de Ac anti-Sp100 y gp-210 y/o sus correspondientes patrones de inmunofluorescencia indirecta (IFI): múltiples puntos nucleares y membrana nuclear granular, códigos AC-6 y AC-12, respectivamente, de la nomenclatura ICAP (EASL. *J Hepatol* 2017; 67:145-172, Younossi ZM et al. *Am J Gastroenterol* 2019;114:48-63). Su determinación es especialmente relevante para los casos de sospecha de CBP en ausencia de antimitocondriales (AMA) de tipo M2 (ver siguiente apartado). Los Ac anti-gp210 se consideran altamente específicos de CBP mientras que los anti-Sp100 presentan una especificidad menor y pueden encontrarse con mayor frecuencia que los primeros en otros procesos autoinmunitarios e infecciosos (Nakamura M. *Semin Liver Dis* 2014;34:334-340).

La técnica de IFI sobre células HEp-2 presenta, para estos antígenos, mayor sensibilidad que la realizada sobre triple tejido de rata (TTR). Por otro lado, las técnicas antígeno-específicas (TAS), como dot-blot y ELISA, presentan mayor sensibilidad que la IFI (O. Viñas et al. Taller 2020 de Autoinmunidad. Hepatopatías autoinmunitarias. *Inmunología* 2020; 39:20-23). Por tanto se recomienda para el diagnóstico inmunológico de CBP:

- Realizar IFI sobre células HEp-2, además de IFI sobre TTR, para el cribado de ANA. Especial interés tiene la detección de Ac con patrón AC-6 o AC-12 de la nomenclatura ICAP.
- Realizar paralelamente TAS para la determinación de Ac anti-gp210 y Sp100.
- Los títulos de estos Ac no son útiles para seguimiento por lo que puede hacerse una estimación de los mismos sin llegar al título final.

2. Anticuerpos antimitocondriales (AMA)

Los AMA específicamente asociados a CBP son los del tipo M2, dirigidos contra distintas subunidades de los complejos 2-oxoácido-deshidrogenasas (DH): E2 de los complejos Piruvato (PDC), Oxoglutarato (OGDC) o oxoácidos-DH de cadena ramificada “branched” (BCOADC). También pueden ir dirigidos contra la subunidades E1 o la proteína ligando de E3 o proteína X (E3BP) del PDC. (*Expert Rev Mol Diagn* 2016; 16:697-705). Algunos otros tipos de AMA, como los M4, M8 y M9, pueden también asociarse a CBP pero no son tan específicos como los M2 ni se dispone de técnicas comerciales para detectarlos. En otros casos de AMA, como en los M1, M5, M6 o M7 no existe asociación con CBP (Sebode M et al. *Front Immunol.* 2018;91–12).

Para el cribado de AMA M2 se recomienda la IFI sobre TTR. Se observa en estos substratos tinción granular citoplásmica de hepatocitos y células parietales gástricas (CPG) y de todos los túbulos renales, pero más intensa en los distales. Por IFI sobre células HEp-2 los AMA dan un patrón citoplásmico reticular (AC-21 de la nomenclatura ICAP), sin embargo, no se puede diferenciar el subtipo M2. Además, otros Ac citoplásmicos pueden también dar este patrón y en ocasiones puede ser problemática la distinción entre AC-21 y el patrón citoplásmico granular fino AC-20. En algunos pacientes positivos para AMA-M2 puede observarse el patrón AC-21 en HEp-2 con negatividad en TTR y viceversa. Las TAS pueden ser también algo más sensibles que la IFI para la detección de los AMA-M2 (Han E et al. *Clin Chim Acta* 2017; 464:113-117).

Por todo ello se recomienda para el diagnóstico inmunológico de CBP:

- Realizar cribado por IFI de los AMA-M2 en TTR (dilución basal $\leq 1/80$) y del patrón AC-21 en células HEp-2 (dilución basal $\leq 1/160$).
- El patrón de AMA sobre TTR es importante informarlo como M2, si éste es el detectado. El resto de patrones pueden informarse como atípicos o diferentes de M2 y no asociados específicamente a CBP.
- Es importante realizar paralelamente TAS, que permitan la detección de las subunidades E2 de PDC, OGDC, BODC y E1 y E3BP de PDC. Las dos últimas especificidades se pueden incluir utilizando PDC nativa.
- En algunos casos de anti-BCOADC la utilización separada de las subunidades E2 puede incrementar discretamente la sensibilidad.
- En los casos de Ac AMA-M2 positivos en TTR, que darán tinción en las CPG, el resultado de Ac anti-CPG mediante IFI no debería informarse, anotando, por ejemplo, “No evaluable” o “No valorable”. En estos casos, si existe sospecha de gastritis autoinmunitaria, debería realizarse el estudio de Ac anti-CPG mediante TAS para Ac anti-ATPasa gástrica.
- Los títulos de AMA-M2 no son útiles para seguimiento de la actividad clínica en CBP.

AUTOANTICUERPOS ASOCIADOS A HEPATITIS AUTOINMUNITARIA (HAI)

Diferentes Ac están incluidos en los criterios diagnósticos de la Hepatitis Autoinmunitaria (HAI) (ver Tabla 1).

Tabla 1: Valor de los Ac en los diferentes criterios de puntuación diagnóstica.

Valor de los Ac en el sistema original de puntuación diagnóstica para HAI (1993)	Valor de los Ac en el sistema de puntuación diagnóstica para HAI revisado (1999)	Valor de los Ac en el sistema de puntuación diagnóstica para HAI simplificado (2008)	Valor de los Ac en el sistema de puntuación diagnóstica para HAI simplificado - Actualización (J Hepatol 2021; 74:312-320)
ANA, ML o LKM-1	ANA, ML o LKM-1	ANA, ML	ANA, ML
• >1:80 +3	• >1:80 +3	• ≥1:40 +1	• Positivo +1
• 1:80 +2	• 1:80 +2	LKM-1	• Positivo Intenso +2
• 1:40 +1	• 1:40 +1	• ≥1:40 +2	LKM
• <1:40 0	• <1:40 0	SLA positivo +2	• ≥1:40 +2
AMA positivo -2	AMA positivo -4		SLA positivo +2
SLA, ASGPR positivo si ANA, ML o LKM-1 negativo +2			

1. Anticuerpos antinucleares (ANA)

Los ANA fueron los primeros Ac asociados a la HAI. A pesar de que producen un patrón claro y fácil de identificar (positivo o negativo) mediante IFI sobre TTR, particularmente en el hígado, en muchos laboratorios la identificación de los ANA se hace mediante IFI sobre células HEp-2 debido al mayor tamaño del núcleo de estas células y a su mayor sensibilidad. Estos Ac se encuentran presentes en la HAI tipo 1 (HAI1) y en el 50% de los casos están asociados a la presencia de Ac anti-músculo liso (ML)/F-Actina. En al menos el 30% de los ANA positivos se desconoce el antígeno diana (Beretta-Piccoli et al. Clin Rev Allergy Immunol 2021; Sep 7. doi: 10.1007/s12016-021-08888-9). Por otro lado, dentro de los criterios clasificatorios solo se tiene en cuenta la positividad del ANA (sobre TTR o células HEp-2) y no las especificidades antigénicas asociadas (Galaski et al. J Hepatol 2021; 74:312-320).

2. Anticuerpos anti-músculo liso (ML)/F-Actina

La presencia de Ac anti-ML dirigidos frente a diferentes componentes del citoesqueleto (actina, tubulina, vimentina, etc) puede ser detectada mediante IFI sobre TTR. No obstante, igual que ocurre en el caso de los AMA, es clave informar correctamente el patrón observado. La clasificación de Bottazzo et al (J Clin Pathol 1976; 29: 403–410) reconoce tres tipos de tinción sobre TTR y es el patrón VGT (de vasos, glomérulos y túbulos) el más específico del diagnóstico de HAI. Existen diferentes TAS para la detección de Ac anti-ML/F-Actina, que incluyen ensayos en fase sólida o IFI sobre células VSM. En relación a ésta última, presenta sensibilidad y especificidad variables que podrían depender de la experiencia en la lectura al microscopio.

En cuanto a las técnicas de dotblot, el valor diagnóstico es dependiente del fabricante. Por último, el ELISA más ampliamente utilizado presenta una muy buena sensibilidad y especificidad (O. Viñas et al. *Inmunología* 2020; 39:20-23).

3. Anticuerpos anti-LKM-1 y LC-1

Los Ac anti-LKM-1 y LC-1, ambos marcadores de HAI2, pueden ser detectados mediante IFI sobre TTR. No obstante, debido a que la presencia de Ac anti-LC-1 en ocasiones se acompaña de los Ac anti-LKM-1, la tinción característica de estos últimos (brillante en el citoplasma de los hepatocitos y mucho menos intenso en los túbulos proximales renales) puede enmascarar la tinción típica de los Ac anti-LC-1 (esta reactividad órgano-específica tiñe brillantemente el citoplasma de los hepatocitos, excepto los que rodean la zona centrolobulillar). Por todo ello, es recomendable confirmar la presencia de estas especificidades mediante TAS.

4. Anticuerpos anti-SLA

Los Ac anti-SLA, presentes en pacientes con HAI1 y 2, no son detectables por IFI. Por ello, en el cribado de Ac asociados a HAI debe incluirse una TAS para la detección de Ac anti-SLA.

5. Anticuerpos anti-citoplasma de neutrófilo (ANCA)

Dentro de los Ac no específicos asociados a HAI, se encuentran ciertos tipos de Ac anti-citoplasma de neutrófilo (ANCA). Se trata, en general, de ANCA atípicos o antinucleares de neutrófilo (ANNA) y en más raras ocasiones ANCA con patrón perinuclear (ANCAp) correspondientes a anti-mieloperoxidasa. Incluso, en casos aislados, están dirigidos contra proteinasa 3. Los ANCA son los únicos Ac mayoritariamente descritos en Colangitis Esclerosante Primaria. En ocasiones pueden ser el único marcador de HAI y es importante detectarlos, aunque su baja especificidad hace difícil su interpretación.

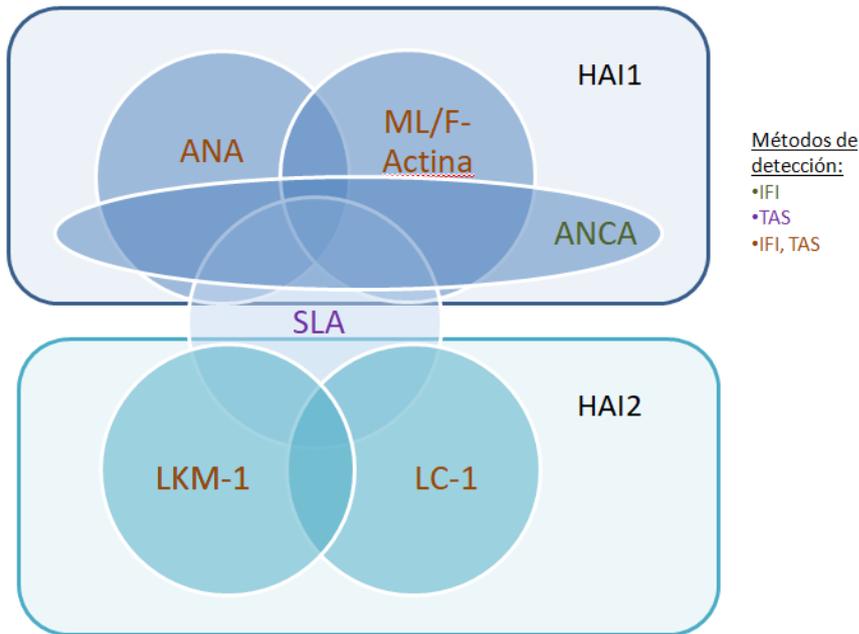


Figura 1: adaptada de Beretta-Piccoli et al. Clin Rev Allergy Immunol; 2021: Sep 7. doi: 10.1007/s12016-021-08888-9. Resumen de los principales autoanticuerpos asociados a Hepatitis autoinmunitarias y los métodos para su detección.

Por todo ello se recomienda para el diagnóstico inmunológico de HAI:

- Informar correctamente el patrón de Ac anti-músculo liso/F-Actina sobre TTR, teniendo en cuenta la clasificación de Bottazzo.
- Realizar TAS complementarias a los estudios de IFI sobre TTR, independientemente del resultados obtenido en la IFI (positivo o negativo) ya que presentan una buena sensibilidad y especificidad para todos los Ac mencionados y no son tan dependientes de la experiencia de quién observa. Es especialmente importante en:
 - Los casos de sospecha de HAI y marcadores negativos, por si pudiera tratarse de un caso de HAI con Ac anti-SLA.
 - Los casos de Ac anti-LKM-1 que pueden enmascarar la presencia de Ac anti-LC-1.
- En los casos de sospecha de HAI y marcadores negativos mediante IFI sobre TTR y TAS, realizar ANCA.

AUTOANTICUERPOS ASOCIADOS A COLAGITIS ESCLEROSANTE PRIMARIA (CEP)

Ver el apartado 5 de HAI (Anticuerpos anti-citoplasma de neutrófilo – ANCA).

AUTOANTICUERPOS ASOCIADOS A SOLAPAMIENTO DE HEPATOPATÍAS AUTOINMUNITARIAS

Las hepatopatías autoinmunitarias pueden presentarse con características clínicas de más de una entidad y en estos casos se asocian a Ac de ambas enfermedades. También se pueden identificar Ac de más de una hepatopatía en casos en los que clínicamente solo se detecta una.

CONCLUSIONES FINALES

En el caso de sospecha Hepatopatías Autoinmunitarias realizar:

- 1. Inmunofluorescencia indirecta (IFI) sobre Triple Tejido de Rata y también sobre células HEp-2 (ésta última al menos en el caso de Colangitis Biliar Primaria).**
- 2. Técnicas antígeno-específicas, como mínimo para detectar la presencia de Ac anti-SLA, debido a que no presenta patrón detectable por IFI, pero idealmente para confirmar o descartar la presencia de todos los Ac siempre que exista sospecha clínica.**
- 3. Estudio de Ac anti-citoplasma de neutrófilo mediante IFI, si hay sospecha de Hepatitis Autoinmunitaria o de Colangitis Esclerosante Primaria y el estudio realizado en los puntos 1 y 2 es negativo.**