



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO

INFORME DE INVESTIGACIÓN SOBRE:

“NIVELES SÉRICOS DE AUTOANTICUERPOS ANTI- CITOPLASMA DE NEUTRÓFILOS EN SUJETOS PEDIÁTRICOS CON LOS TRASTORNOS DEL ESPECTRO AUTISTA Y SU RELACIÓN CON LOS NIVELES SÉRICOS MATERNOS”

Requisito previo para optar por el Título de Licenciada en Laboratorio Clínico

Autora: Capuz Guananga, Nancy del Pilar.

Tutor: Bqf. Mg. Ramos Ramírez, Martha Cecilia.

Ambato – Ecuador

Marzo, 2018

APROBACIÓN DEL TUTOR

En calidad de Tutor del proyecto de investigación sobre el tema: **“NIVELES SÉRICOS DE AUTOANTICUERPOS ANTI- CITOPLASMA DE NEUTRÓFILOS EN SUJETOS PEDIÁTRICOS CON LOS TRASTORNOS DEL ESPECTRO AUTISTA Y SU RELACIÓN CON LOS NIVELES SÉRICOS MATERNOS”**, de Nancy del Pilar Capuz Guananga estudiante de la Carrera de laboratorio Clínico, considero que reúne los requisitos y méritos suficientes para ser sometido a la evaluación del jurado examinador designado por H. Consejo Directivo de la Facultad de Ciencias de la Salud.

Ambato, Diciembre 2017

LA TUTORA

.....
Bqf. Mg. Ramos Ramírez, Martha Cecilia.

AUTORÍA DEL TRABAJO DE GRADO

Los criterios emitidos en el Trabajo de Investigación “**NIVELES SÉRICOS DE AUTOANTICUERPOS ANTI- CITOPLASMA DE NEUTRÓFILOS EN SUJETOS PEDIÁTRICOS CON LOS TRASTORNOS DEL ESPECTRO AUTISTA Y SU RELACIÓN CON LOS NIVELES SÉRICOS MATERNOS**”, como también los contenidos, ideas, análisis, conclusiones son de exclusiva responsabilidad de mi persona, como autora de este trabajo de grado.

Ambato, Diciembre 2017

LA AUTORA

.....
Capuz Guananga, Nancy del Pilar.

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este Proyecto de Investigación o parte de él un documento disponible para su lectura, consulta y proceso de investigación.

Cedo los derechos en línea patrimoniales de mi proyecto con fines de difusión pública; además apruebo la reproducción; además apruebo la reproducción de este trabajo, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice mis derechos de autora.

Ambato, Diciembre 2017

.....
Capuz Guananga, Nancy del Pilar.

APROBACIÓN DEL JURADO EXAMINADOR

Los miembros del Tribunal Examinador aprueban el Informe de Investigación, sobre el tema: **“NIVELES SÉRICOS DE AUTOANTICUERPOS ANTI- CITOPLASMA DE NEUTRÓFILOS EN SUJETOS PEDIÁTRICOS CON LOS TRASTORNOS DEL ESPECTRO AUTISTA Y SU RELACIÓN CON LOS NIVELES SÉRICOS MATERNOs”** de Capuz Guananga Nancy del Pilar estudiante de la Carrera de Laboratorio Clínico.

Ambato, Marzo del 2018

Para constancia firman

.....
PRESIDENTE/A

.....
1er VOCAL

.....
2do VOCAL

DEDICATORIA

Dedico este Proyecto de Investigación a Cesar y Blanca mis padres por su amor, su comprensión, su paciencia, su apoyo incondicional, y por ser el pilar fundamental en mi educación, a mis hermanos Gustavo y Miguel por estar siempre junto a mí, por sus deseos de superación, a Dios por todas las bendiciones, a la memoria de mi madre Laura que desde el cielo siempre me bendice.

Es por ello que este nuevo logro en mi vida va dedicado a ustedes los quiero mucho.

Nancy Capuz

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios por haberme dado la vida, y por regalarme una familia maravillosa, a mi madre que desde el cielo siempre me regala sus bendiciones, a mis padres quienes se han sacrificado con arduas horas de trabajo pesado, con el propósito de que su hija estudie, a mis hermanos por brindarme su confianza, su apoyo moral e incondicional gracias por ayudarme a cumplir con esta meta importante en mi vida y la de mi familia.

A mis amigas y compañeros por formar parte de mi vida universitaria, y compartir bonitas experiencias siempre los llevare en mi corazón.

A la Universidad Técnica de Ambato, Facultad Ciencias de la Salud, Carrera de Laboratorio Clínico por abrirme las puertas y haberme dado la oportunidad de formarme como futura profesional.

A mi tutora la Bqf. Mg. Martha Cecilia Ramos Ramírez por brindarme su ayuda y su apoyo para poder culminar con éxito esta meta propuesta en mi vida.

Quiero agradecer al MSc. Neomar Semprúm - Hernández por darme la iniciativa para realizar este proyecto de investigación.

Nancy Capuz

ÍNDICE GENERAL

PORTADA.....	i
APROBACIÓN DEL TUTOR.....	1
AUTORÍA DEL TRABAJO DE GRADO	2
DERECHOS DE AUTOR	3
APROBACIÓN DEL JURADO EXAMINADOR.....	4
DEDICATORIA	5
AGRADECIMIENTO	6
ÍNDICE GENERAL	7
ÍNDICE DE CUADROS.....	11
ÍNDICE DE GRÁFICOS	12
RESUMEN.....	13
SUMMARY	14
INTRODUCCIÓN	14
CAPÍTULO I.....	16
EL PROBLEMA.....	16
1.1 TEMA.....	16
1.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	16
1.2.1 CONTEXTO	16
1.2.2 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA.....	17
1.3 JUSTIFICACIÓN.....	18
1.4 OBJETIVOS.....	19
1.4.1 OBJETIVO GENERAL:.....	19

1.4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS:.....	19
	CAPÍTULO II	20
	MARCO TEÓRICO.....	20
2.1	ESTADO DEL ARTE.....	20
2.2	FUNDAMENTO TEÓRICO	23
2.2.1	INMUNIDAD	23
2.2.1.1	CLASIFICACIÓN DE INMUNIDAD:	23
2.2.1.2	INMUNIDAD INNATA.....	23
	INMUNIDAD ADQUIRIDA	24
2.2.2	AUTOINMUNIDAD.....	25
2.2.3	SÍNDROME ANTICITOPLASMA DE NEUTRÓFILOS	26
2.2.4	MADRES CON SÍNDROME ANTICITOPLASMA DE NEUTRÓFILOS	27
2.2.5	TRASTORNOS DEL ESPECTRO AUTISTA (TEA).....	28
2.2.6	GASTROENTEROLOGÍA EN LOS TRASTORNOS DEL ESPECTRO AUTISTA.....	29
2.2.7	DETERMINACIÓN DE AUTOANTICUERPOS ANTI- CITOPLASMA DE NEUTRÓFILOS EN TEA.	30
2.3	SEÑALAMIENTO DE VARIABLES.....	31
2.4.1	VARIABLE DEPENDIENTE	31
2.4.2	VARIABLE INDEPENDIENTE.....	31
	CAPÍTULO III.....	32
	MARCO METODOLÓGICO.....	32
3.1	NIVEL Y TIPO DE INVESTIGACIÓN	32
3.2	SELECCIÓN DEL ÁREA O ÁMBITO DE ESTUDIO.....	33
3.3	POBLACIÓN.....	33

3.4 CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN.....	34
3.5 DISEÑO MUESTRAL	34
3.6 OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES	35
3.7 DESCRIPCIÓN DE LA INTERVENCIÓN Y PROCEDIMIENTOS PARA LA RECOLECCIÓN DE INFORMACIÓN	37
DETERMINACIÓN DE AUTOANTICUERPOS ANTI- CITOPLASMA DE NEUTRÓFILOS (ANCA) MPO Y PR3 CASA COMERCIAL AESKULISA.....	40
3.8 ASPECTOS ÉTICOS	44
CAPÍTULO IV	46
ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	46
4.1 ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DE LABORATORIO CLÍNICO.....	46
4.1.1 Cumpliendo con el primer objetivo específico.- estadísticos descriptivos de los niveles de Estadísticos descriptivos de los niveles de anti -Proteinasa 3, y anti- Mieloperoxidasa en niños con tea y niños con desarrollo típico.	46
4.1.2 Cumpliendo con el segundo objetivo específico.-estadísticos descriptivos de los niveles de anti -Proteinasa 3, y anti- Mieloperoxidasa en las madres de niños con tea y madres de niños con desarrollo típico.....	49
4.1.3 Cumpliendo con el tercer objetivo específico.-sobre la correlación de los niveles de autoanticuerpos circulantes anti-citoplasma de neutrófilos en sujetos pediátricos con TEA y DT, con los niveles séricos maternos anti-citoplasma de neutrófilos, tenemos el siguiente resultado:	52
4.2 VERIFICACIÓN DE LA HIPÓTESIS	53
4.3.1 PLANTEO DE LA HIPÓTESIS.....	53
4.3.2 ESTIMADOR ESTADÍSTICO	54
4.3.3 NIVEL DE SIGNIFICACIÓN.....	54
4.3.4 CÁLCULO DE LA PRUEBA ESTADÍSTICA CÁLCULO DEL ESTIMADOR ESTADÍSTICO T student.	55

CAPÍTULO V.....	57
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	57
5.1 CONCLUSIONES	57
5.2 RECOMENDACIONES.....	58
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59
BIBLIOGRAFÍA	59
ANEXOS	65

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro N° 1: Métodos para determinación de ANCA.....	30
Cuadro N° 2 Variable Independiente: Niveles Séricos Maternos de autoanticuerpos anti-Citoplasma de Neutrófilos.	35
Cuadro N° 3 Variable Dependiente: Niveles séricos de autoanticuerpos anti- Citoplasma de Neutrófilos en sujetos pediátricos con TEA.....	36
Cuadro N° 4 Procedimiento de pipeteo.	43
Cuadro N° 5 Valores de referencia.....	44
Cuadro N° 6 Datos técnicos	44
Cuadro N° 7 Valores de anti- Proteinasa 3 y anti- Mieloperoxidasa en sujetos pediátricos con TEA y sujetos pediátricos con desarrollo típico.....	46
Cuadro N° 8 Valores de anti- Proteinasa 3 y anti- Mieloperoxidasa en las madres de los sujetos pediátricos con TEA y sujetos pediátricos con desarrollo típico.	49
Cuadro N° 9 Correlación de los niveles de autoanticuerpos circulantes anti-citoplasma de neutrófilos en sujetos pediátricos con TEA y DT, con los niveles séricos maternos.....	52
Cuadro N° 10 Tabla de Muestras única de PR3 y MPO, estimador estadístico t student.	55

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico N° 1 Resultados obtenidos del análisis de los niveles séricos de autoanticuerpos anti-citoplasma de neutrófilo (PR3) en las muestras investigadas de niños TEA y desarrollo típico.....	47
Gráfico N° 2 Resultados obtenidos del análisis de los niveles séricos de autoanticuerpos anti-citoplasma de neutrófilo (MPO) en las muestras investigadas de niños TEA y desarrollo típico.....	48
Gráfico N° 3 Resultados obtenidos del análisis de los niveles séricos de autoanticuerpos anti-citoplasma de neutrófilo (PR3) en las muestras investigadas de las madres de los niños TEA y desarrollo típico.	50
Gráfico N° 4 Resultados obtenidos del análisis de los niveles séricos de autoanticuerpos anti-citoplasma de neutrófilo (MPO) en las muestras investigadas de las madres de los niños TEA y desarrollo típico.	51

“NIVELES SÉRICOS DE AUTOANTICUERPOS ANTI- CITOPLASMA DE NEUTRÓFILOS EN SUJETOS PEDIÁTRICOS CON LOS TRASTORNOS DEL ESPECTRO AUTISTA Y SU RELACIÓN CON LOS NIVELES SÉRICOS MATERNOs”

Autora: Capuz Guananga, Nancy del Pilar.

Tutora: Bqf. Ramos Ramírez, Martha Cecilia.

Fecha: Diciembre del 2017

RESUMEN

El presente proyecto de investigación se lo realizo con el objetivo de determinar los niveles séricos de autoanticuerpos anti- citoplasma de neutrófilos en sujetos pediátricos con los trastornos del espectro autista (TEA) y su relación con los niveles séricos maternos en pacientes que asisten a la fundación APADA ECUADOR, la finalidad fue relacionar si las madres con valores elevados de anti- citoplasma de neutrófilos influyeron en que sus hijos presenten TEA. Se realizó una asociación de variables en la cual se contó con la participación de 30 sujetos pediátricos con TEA con sus Madres y 10 sujetos pediátricos controles con sus madres dando una totalidad de 80 pacientes en estudio. Se les realizo a los pacientes la extracción de sangre para el respectivo análisis de laboratorio.

Como resultado de la determinación de los niveles séricos de autoanticuerpos anti- citoplasma de neutrófilos de las 80 muestras se obtuvo que el 99% de los pacientes presentan valores normales de < 12 U/ml, mientras que el 1 % correspondiente al rango intermedio de 12- 18 U/ml MPO, aquí se observa que no hay valores positivos y de los mismos 80 pacientes el 91% de los resultados están dentro del valor normal < 12 U/ml y el 9% están dentro del rango indeterminado (PR3), aquí se observa que no hay valores positivos.

La comprobación de la hipótesis se realizó a través de la prueba estadística conocido como T Student y al comparar el resultado del T Student calculado basada en su margen de error es de $= 0,05 < T$ Student calculada en ambas variables objeto de estudio dio un valor mayor a 0,05. Se rechazó la hipótesis alternativa y se acepta a la hipótesis Nula que menciona: “Los niveles séricos de autoanticuerpos anti- citoplasma de neutrófilos en sujetos pediátricos con los Trastornos del Espectro Autista no tienen relación con los niveles séricos maternos”.

PALABRAS CLAVES: AUTISTAS, AUTOANTICUERPOS ANTI- CITOPLASMA DE NEUTRÓFILOS.

TECHNICAL UNIVERSITY OF AMBATO
FACULTY OF HEALTH SCIENCES
CLINICAL LABORATORY CAREER

**"SERUM LEVELS OF ANTI-CYTOPLASM NEUTROPHILS
AUTOANTIBODIES IN PEDIATRIC SUBJECTS WITH DISORDERS OF THE
AUTISTA SPECTRUM AND ITS RELATIONSHIP WITH MATERNAL SERUM
LEVELS"**

Author: Capuz Guananga, Nancy del Pilar.

Tutor: Bqf. Ramos Ramírez, Martha Cecilia.

Date: December 2017

SUMMARY

This research project was carried out with the objective of determining serum levels of neutrophil cytoplasmic autoantibodies in pediatric subjects with autism spectrum disorders (ASD) and its relationship with maternal serum levels in patients attending the foundation. APADA ECUADOR, the purpose was to relate if mothers with high neutrophil cytoplasmic values influenced their children to present ASD. An association of variables was carried out in which 30 pediatric subjects with ASD were involved with their mothers and 10 pediatric control subjects with their mothers giving a total of 80 patients under study.

The patients were given the blood extraction for the respective laboratory analysis. As a result of the determination of the serum levels of neutrophil cytoplasmic autoantibodies in the 80 samples, it was found that 99% of the patients presented normal values of <12 U / ml, while the 1% corresponding to the intermediate range of 12 - 18 U / ml MPO, here it is observed that there are no positive values and of the same 80 patients 91% of the results are within the normal value <12 U / ml and 9% are within the indeterminate range (PR3), here it is observed that there are no positive values.

The test of the hypothesis was made through the statistical test known as Student's T and when comparing the result of the Student T calculated based on its margin of error is $= 0.05 < T$ Student calculated in both variables object of study gave a value greater than 0.05. The alternative hypothesis was rejected and the Null hypothesis is accepted, which states: "Serum levels of neutrophil cytoplasmic autoantibodies in pediatric subjects with Autistic Spectrum Disorders are not related to maternal serum levels."

KEY WORDS: AUTISTS, ANTI-CYTOPLASM NEUTRÓFILOS
AUTOANTIBODIES.

INTRODUCCIÓN

El trastorno del espectro autista (TEA) es un trastorno del neurodesarrollo altamente heterogéneo caracterizado por la afectación de dos áreas del desarrollo: socio-comunicacional y un repertorio notablemente restringido de actividades en intereses. Afecta a uno de cada 68 nacimientos con gran aumento paulatino. Es alarmante que, en la mayoría de los casos, las causas de TEA sean desconocidas, pero cada vez es más aceptado que no se define simplemente como un trastorno del comportamiento sino más bien como un trastorno biológico altamente complejo y heterogéneo.

En Ecuador, la investigación en cuanto a los autoanticuerpos anti- citoplasma de neutrófilos en torno a los sujetos pediátricos con TEA no está muy desarrollado.

El presente estudio tiene como objetivo la determinación de niveles séricos de autoanticuerpos anti- citoplasma de neutrófilos en sujetos pediátricos con los Trastornos del Espectro Autista y su relación con los niveles séricos maternos. Es de gran importancia conocer que mediante esta investigación podremos conocer si existen madres que puedan tener uno de estos anticuerpos y que los mismos sean los causantes para que tuvieran niños con (TEA).

Se realizó la determinación de los niveles séricos de autoanticuerpos anti- citoplasma de neutrófilos en los 30 sujetos pediátricos con los Trastornos del Espectro Autista con sus madres y los 10 sujetos pediátricos controles con sus madres dando una totalidad de 80 pacientes, para observar cómo se encuentran los niveles de dichas enzimas como es la mieloperoxidasa (MPO) y la proteinasa 3(PR3), se obtuvo como resultado que los niveles de MPO y PR3 están dentro de los valores normales tanto en las madres como en los niños por lo tanto no se puede encontrar una relación con los niveles séricos maternos y aceptando la hipótesis nula.

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA

1.1 TEMA

Niveles séricos de autoanticuerpos anti- citoplasma de neutrófilos en sujetos pediátricos con los Trastornos del Espectro Autista y su relación con los niveles séricos maternos.

1.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.2.1 CONTEXTO

El trastorno del espectro autista (TEA) es una serie de desórdenes del neurodesarrollo que es caracterizado por el déficit del lenguaje, dificultad en la comunicación e interacción social. Debido a que estas afectaciones reflejan una problemática en diversos aspectos del desarrollo infantil. Los TEA en si engloban al autismo, al síndrome de Asperger y al trastorno desintegrativo infantil. (1) Este trastorno en si afecta la salud de las personas y no permite que estas desarrollen sus actividades con normalidad. Los anticuerpos frente al citoplasma de los neutrófilos (ANCA) son un grupo de autoanticuerpos dirigidos frente a constituyentes citoplasmáticos de los neutrófilos y de los monocitos (1-4). Los ANCA se asocian a la granulomatosis de Wegener (GW), la poliangeítis microscópica (PAM) y el síndrome de Churg-Strauss (SCS), que se agrupan bajo la denominación de vasculitis sistémicas de pequeño vaso asociadas a ANCA (26). También se ha descrito la positividad de los ANCA en la glomerulonefritis rápidamente progresiva (GNRP) pauci-inmune, en una gran variedad de enfermedades de naturaleza autoinmune, como el lupus eritematoso sistémico (LES), la artritis reumatoide, la esclerodermia, el síndrome de Sjögren, la polimiositis/dermatomiositis, la artritis crónica juvenil, la artritis reactiva, la enfermedad inflamatoria intestinal crónica, la colangitis esclerosante primaria y la hepatitis autoinmune tipo I, y en ciertas infecciones (27).

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) explica que a nivel mundial 1 de cada 160 niños presentan TEA. Esta estimación representa una cifra media, pues la prevalencia observada varía considerablemente entre los distintos estudios. Los TEA aparecen en la infancia y tienden a persistir hasta la adolescencia y la edad adulta, en la mayoría de los casos las manifestaciones se dan en los primeros 5 años de vida. (2)

A nivel de Latinoamérica específicamente en Estados Unidos 1 de cada 68 niños tienen TEA. En la mayoría de estos casos la causa de TEA es desconocida, pero cada vez más aceptada que hasta ya se la define como un trastorno biológico altamente complejo y heterogéneo. (3) La fisiopatología de los TEA debido a todos los procesos genéticos, ambientales, metabólicos, neurológicos e inmunológicos involucrados. (3)

En el Ecuador, no contamos con datos certeros a cerca de la prevalencia de TEA ni mucho menos de casos de madres que tengan (ANCA) positivos y que estos sean los causantes de TEA. A partir de estadísticas de la ONU, la fundación Mykah, organización dedicada a la atención de personas autistas, aplico el promedio estándar internacional de 1% e hizo una estimación según la cual nos explica que en el país hay 150 000 personar con TEA (3). En cambio la fundación 'Entra a Mi Mundo', estima que en el Ecuador cerca de 180 mil niños padecen de este síndrome. Su directora, Ligia Noboa, explica que si bien existen diferentes rangos, todos pueden revertidos en un 90%. "No es que todos pueden revertir de la misma manera, pero pueden conseguir mucha independendencia y autonomía". (4)

1.2.2 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

¿Los niveles séricos de autoanticuerpos anti- citoplasma de neutrófilos de sujetos pediátricos con los Trastornos del Espectro Autista tienen relación con los niveles séricos maternos en pacientes de la fundación APADA ECUADOR (Quito-Riobamba)?

1.3 JUSTIFICACIÓN

El autismo es un trastorno del neurodesarrollo caracterizado por deficiencias en la comunicación y habilidades sociales, es alarmante que, en la mayoría de los casos, las causas de TEA sean desconocidas, pero cada vez es más aceptado que no se define simplemente como un trastorno del comportamiento sino más bien como un trastorno biológico altamente complejo y heterogéneo. En la etiología de los TEA se han involucrado diferentes factores biológicos, entre los cuales se han incluido factores genéticos, enfermedades infecciosas y complicaciones prenatales, perinatales y neonatales, así como alteraciones metabólicas y bioquímicas. Por lo tanto, en el estudio de las causas del autismo, se han desarrollado varias teorías que tratan de explicar el origen de los TEA, en la actualidad se considera que su etiología es multifactorial y que pueden existir subgrupos clínicos y que pueda deberse a procesos autoinmunitarios.

En el Ecuador según la organización mundial de la salud se estima que en el año 2016 existen 1258 pacientes con diagnóstico de autismo, así como también no se han encontrado estudios en esta población por lo cual será una investigación que creará un gran impacto sobre la sociedad ecuatoriana, por la falta de conocimiento sobre esta patología motivo por el cual se han generado algunos inconvenientes como rechazo y exclusión de los niños con TEA. (2) Los niños de la fundación APADA ECUADOR de las ciudades de Quito y Riobamba serían los beneficiarios de este estudio porque se realizó las determinaciones de autoanticuerpos anti- citoplasma de neutrófilos tanto en niños con TEA como en sus madres de forma gratuita para la presente investigación.

La importancia de realizar esta investigación es debido a un número significativo de niños con autismo que pueden tener ANCA (anti-MPO y anti-PR3), por lo cual se planteó la hipótesis de que podría existir alguna relación con los niveles séricos maternos, debido a un número significativo de casos de autismo podrían ser causado por la producción por parte de la madre de anticuerpos que reaccionarían contra antígenos del cerebro del feto en desarrollo durante el embarazo, generando esto un nuevo factor inmunogenético predisponente como potencial marcador biológico de niños con los TEA. (25)

La factibilidad de este proyecto se dio gracias a la colaboración de la fundación APADA, al Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Técnica de Ambato que nos brindó la facilidad de realizar los análisis de las muestras sanguíneas y en si a todas las autoridades de la carrera de laboratorio clínico por el apoyo brindado en la realización de este proyecto, siendo en si los beneficiarios todos los niños con TEA y sus madres por la gratuidad de los exámenes realizados.

1.4 OBJETIVOS

1.4.1 OBJETIVO GENERAL:

Analizar los niveles séricos de autoanticuerpos anti- citoplasma de neutrófilos en sujetos pediátricos con los Trastornos del Espectro Autista y su relación con los niveles séricos maternos.

1.4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Determinar los niveles séricos de autoanticuerpos circulantes anti- citoplasma de neutrófilos (anti-ANCA) tipo IgG (anti -Proteinasa 3, anti- Mieloperoxidasa) en sujetos pediátricos mayores a 3 años con los Trastornos del Espectro Autista (TEA) y sujetos con desarrollo típico (DT).
- Identificar los niveles séricos de autoanticuerpos circulantes anti-ANCA (anti - Proteinasa 3, anti- Mieloperoxidasa) en las madres de los sujetos pediátricos con los TEA y DT.
- Correlacionar los niveles séricos de autoanticuerpos circulantes anti- citoplasma de neutrófilos en sujetos pediátricos con los TEA y DT con los niveles séricos maternos Anti- ANCA.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 ESTADO DEL ARTE

Goitybell Martínez, Suchiquil Velázquez, Vicky Sánchez, María Ramos y Lisset Fuentes, miembros del Laboratorio de Inmunología del Centro Nacional de Genética Médica de la Habana Cuba, (2013), realizaron una investigación sobre **“ANTICUERPOS CONTRA EL CITOPLASMA DEL NEUTRÓFILO POSITIVIDAD Y CORRELACIÓN CLÍNICA”**, cuyo objetivo fue Determinar la positividad y la correlación clínica de los anticuerpos contra el citoplasma del neutrófilo (ANCA), teniendo en cuenta la interferencia de los anticuerpos antinucleares (ANA), se realizó un estudio prospectivo en el Laboratorio de Inmunología del Centro Nacional de Genética Médica de la Habana Cuba durante un año. Se incluyó a 267 pacientes con indicaciones de ANCA. Las determinaciones de ANCA a diferentes puntos de corte y de ANA se realizaron mediante inmunofluorescencia indirecta. Los anticuerpos anti-proteinasa 3 y anti-mieloperoxidasa fueron determinados mediante ELISA. Los resultados obtenidos del estudio mostraron que la mayor positividad de ANCA fue vista en pacientes con vasculitis asociadas a ANCA, artritis reumatoidea y lupus eritematoso sistémico. Fue superior la presencia de ANCA sin especificidad por la proteinasa 3 o la mieloperoxidasa en pacientes con ANA y se observó poca relación entre el patrón perinuclear confirmando en formalina y la presencia de anticuerpos frente a la mieloperoxidasa. Los mayores valores de sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de la vasculitis se alcanzaron para la determinación de ANCA mediante inmunofluorescencia indirecta a un valor de corte de 1/80 y confirmando la especificidad antigénica mediante ELISA. (5)

En conclusión los ANCA pueden estar presentes en un amplio número de enfermedades asociadas a estados inflamatorios y autoinmunes en la población estudiada. Su determinación mediante inmunofluorescencia indirecta seguido de la determinación mediante ELISA tiene gran valor para el diagnóstico de las vasculitis, y que la

determinación de anticuerpos antimieloperoxidasa tiene mayor utilidad que el ensayo en láminas de formalina cuando hay ANA. (5)

En otro estudio denominado **“UTILIDAD CLÍNICA DE LOS ANTICUERPOS ANTICITOPLASMA DE NEUTRÓFILOS EN LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO JUVENIL”**, publicado en el año 2013, realizado por los autores Antonio Cardinalli, Alejandra Ginaca, Graciela Espada, María Cristina Pizzimenti, María Emilia Rivas, Lina Leggire, Gloria Griemberg, realizado en el Laboratorio de Inmunología Clínica, Departamento de Bioquímica Clínica de la Facultad de Farmacia y Bioquímica y el Laboratorio de Inmunología y Servicio de Reumatología del Hospital de Niños de la CABA Argentina, este estudio tiene como objetivos determinar: a) la frecuencia de ANCA en lupus eritematoso sistémico juvenil (LES), evitando por absorción las imágenes interferentes de ANA, b) las especificidades antigénicas de los ANCA y c) la asociación de ANCA con el grado de actividad de la enfermedad y con las diferentes manifestaciones clínicas. Para lo cual contaron con un grupo de 51 pacientes de media edad de los 6-14 años con LES juvenil. La actividad clínica se evaluaron utilizando el índice de actividad para LES (SLEDAI). Los ANCA fueron detectados por inmunofluorescencia indirecta (IFI) y los antígenos asociados a ANCA, por intermedio de un inmunoensayo lineal cualitativo desarrollado (LIA-Blot). La prevalencia de pANCA y aANCA fue de un 9,8% (5/51) y 5.9%(3/51) respectivamente, y la frecuencia detectada por LIA-Blot para antimieloperoxidasa (aMPO) fue 9,8% (5/51) y para antilactoferrina (aLf) 13,7% (7/51). En ningún suero se detectó cANCA, ni anti proteinasa 3 (aPR3) o antielastasa (aHLE). (6)

En conclusión se han hallado correlación significativa solamente con la presencia de compromiso renal severo y se necesitaran otros estudios con mayor número de pacientes para evaluar asociaciones clínicas deferentes a la glomerulonefritis. (6)

Amory Meltzer y Judy Van de Water, miembros de la División de Reumatología / Alergia e Inmunología Clínica, Departamento de Medicina Interna, Universidad de California, Davis, CA, EE.UU. (2016), realizan una investigación titulada **“EL PAPEL DEL SISTEMA INMUNE EN EL TRASTORNO DEL ESPECTRO AUTISTA”**, cuyo objetivo fue la identificación de genes asociados con el autismo, la participación inmune en TEA, a saber, la disfunción en el prenatal y el período posnatal. Los investigadores explican que dentro de las últimas dos décadas la disfunción inmune es un factor de riesgo viables que contribuyen a los déficits del desarrollo neurológico observados en los trastornos del espectro autista (TEA). Además, es la heterogeneidad dentro de este trastorno que ha sacado a la luz gran parte del pensamiento actual en relación con los subfenotipos dentro de ASD y cómo el sistema inmune se asocia con estas distinciones. Esta revisión se centró en los dos ejes principales de la participación inmune en TEA, a saber, la disfunción en el prenatal y el período posnatal. Del mismo modo en el estudio realizado, encuentran la presencia de autoanticuerpos anti-cerebrales derivados de la madre se encuentra en ~ 20% de las madres cuyos niños están en riesgo de desarrollar autismo ha definido un subfenotipo adicional de ASD. El entorno postnatal, por otra parte, se caracteriza por perfiles relacionados pero distintos de desregulación inmune, la inflamación, y autoanticuerpos endógenos que todo persiste en el individuo afectado. Una definición más precisa del papel de la desregulación inmune en ASD por lo tanto requiere una comprensión más profunda de la interacción entre ambos sistemas inmunes madre y el niño, y el papel que tienen en el diagnóstico y el tratamiento. (7)

2.2 FUNDAMENTO TEÓRICO

2.2.1 INMUNIDAD

La inmunidad, entendida así como mecanismo de defensa, que involucra tanto a Patógenos externos o patógenos que incluso existen en nuestro cuerpo y causan enfermedades que hasta en ocasiones provocan la muerte; para defenderlo existe el sistema inmune el cual está formado por un conjunto de tejidos y moléculas que cumple la función de proteger al organismo. Este sistema posee dos tipos de células los linfocitos T y B además de otras células y moléculas, los cuales son responsables de asegurar la supervivencia de los seres humanos. Este evento genético radica en la elección al azar de algunos genes para que estos produzcan una gran cantidad de células de defensa. (7) (8)

2.2.1.1 CLASIFICACIÓN DE INMUNIDAD:

- Inmunidad Innata
- Inmunidad Adquirida

2.2.1.2.1 INMUNIDAD INNATA

También conocida como inespecífica o natural , es considerada como la protección inicial frente a las infecciones que se producen, está presente en los sujetos sanos lista para hacer frente a los microorganismos patógenos. (9)

Se adquiere por medios biológicos o de la madre. Es una línea de defensa que nos permite controlar, en la gran mayoría de los casos, a gérmenes patógenos, en este tipo de inmunidad la respuesta es rápida y local. (9)

Los tipos de células que intervienen en esta inmunidad son:

Los fagocitos: estos se encargan de fagocitar a los agentes infecciosos que han logrado atravesar las superficies epiteliales.

La natural killer o asesinas naturales: es un tipo específico de leucocitos que son activados por interferones en respuesta a virus o a otras citosinas.

2.2.1.2.2 INMUNIDAD ADQUIRIDA

Se la conoce también como inmunidad específica o adaptativa, se desarrolla de forma más lenta y brinda una respuesta más especializada y eficaz hacia el ataque de los microorganismos patógenos. Presenta una memoria inmunológica específica, que evita una segunda infección. En este caso la respuesta es mayor que a la respuesta que da la inmunidad innata. (9)

Tipos de inmunidad adquirida

Inmunidad Celular

Este tipo de inmunidad está formada por los linfocitos T y destruyen patógenos intracelulares. (9)

Ejemplos:

- Virus
- Bacterias
- Paracitos intracelulares

Inmunidad Humoral

Formada por proteínas llamadas anticuerpos que producen a los linfocitos B, estos anticuerpos se encuentran en una activa circulación en las mucosas y en la sangre donde eliminan microorganismos ajenos, antes de que estos colonicen. (10)

2.2.2 AUTOINMUNIDAD

Autoinmunidad se conoce como la consecuencia de una activación del sistema inmune que ataca por error a sí mismo. Esta descripción de la presencia de autoantígenos, autoanticuerpos y células T autorreactivas, también se encuentran dentro del concepto de autoinmunidad, el cual lleva a la connotación de una respuesta inmune de tipo adquirida.(11)

Las enfermedades autoinmunes son consideradas como afecciones crónicas que tienen su inicio por la pérdida de tolerancia inmunológica a autoantígenos, patología que produce daño a tejidos y órganos debido a la respuesta de los auto-antígenos que atacan por error a los antígenos propios, produciendo así la muerte celular.(11) Estas enfermedades han creado un impacto significativo y desfavorable en la calidad de vida de las personas que la padecen así como también en sus familiares.

Un anticuerpo es una proteína que produce nuestro organismo como defensa contra una sustancia extraña llamada antígeno. El organismo reconoce algo ajeno, puede ser procedente de una bacteria, un trasplante, un virus y sintetiza anticuerpos. Los anticuerpos reconocen específicamente los antígenos, se unen a ellos y luego células de nuestro cuerpo reconocen los complejos antígeno-anticuerpo y los destruyen. A veces el organismo se equivoca y genera anticuerpos contra antígenos propios, se llaman autoanticuerpos y esto produce lo que se llaman enfermedades autoinmunes, algunas de las cuales son muy graves. Un número significativo de casos de autismo podría ser causado por la producción por parte de la madre de anticuerpos que reaccionarían contra antígenos del cerebro del feto en desarrollo durante el embarazo. A la cual se denomina en inglés “MAR-autism” o autismo Relacionado con Autoanticuerpos Maternos”. (12)

2.2.3 SÍNDROME ANTICITOPLASMA DE NEUTRÓFILOS

Los anticuerpos anticitoplasma de neutrófilos (ANCA) son autoanticuerpos producidos por el sistema inmune del organismo dirigidos erróneamente contra proteínas de los neutrófilos (tipo de leucocito). La prueba ANCA detecta y mide la cantidad de estos autoanticuerpos en sangre. Los autoanticuerpos dirigidos contra las proteínas mieloperoxidasa (MPO) y proteinasa 3 (PR3) constituyen dos de los tipos más comunes de ANCA. (13)

Los anticuerpos anticitoplasma de neutrófilos fueron detectados por primera vez en 1982, que en sí fueron asociados a una la glomerulonefritis y enfermedades sistémicas. Los ANCA son anticuerpos contra los gránulos primarios y secundarios del citoplasma de los neutrófilos y de los lisosomas de los monocitos. Se encuentran involucrados en la patogénesis de las diferentes formas de vasculitis autoinmunes y son marcadores serológicos muy útiles para el diagnóstico y control evolutivo de determinadas formas de vasculitis sistémicas. Están relacionados con insuficiencia renal en el lupus eritematoso sistémico (LES) pediátrico no así en la artritis reumatoidea (AR). También se encuentra ANCA en los pacientes con glomerulopatías (sin evidencia de vasculitis), glomerulopatía diabética, glomerulopatía IgA membrana proliferativa, glomerulopatía mesangial, glomerulopatía membranosa, nefrosclerosis, esclerosis focal y segmentaria.(14)

Anticuerpos citoplasmáticos anti-neutrófilos (ANCA) son marcadores valiosos de laboratorio utilizados para el diagnóstico de tipos bien definidos de vasculitis de vasos pequeños, incluyendo Granulomatosis de Wegener (GPA) y poliangeítis microscópica (MPA). De acuerdo con el consenso internacional 1999 en las pruebas de ANCA, inmunofluorescencia indirecta (IIF) se debe utilizar para la detección de ANCA, y muestras que contienen ANCA entonces debe ser probado por inmunoensayos para la proteinasa 3 (PR3) -ANCA y mieloperoxidasa (MPO) -ANCA. La distinción entre PR3-ANCA y MPO-ANCA tiene importantes implicaciones clínicas y patogénicas. Como inmunoensayos confiables para PR3-ANCA y MPO-ANCA se han vuelto

ampliamente disponibles, hay un creciente consenso internacional en que los inmunoensayos de alta calidad son el método preferido de detección para el diagnóstico de la vasculitis asociada a ANCA.

2.2.3.1 Anticuerpos anti- Proteinasa 3

Los anticuerpos contra proteinasa 3 (PR3) pertenecen al grupo de los anticuerpos anticitoplasma del neutrófilo (ANCA) los cuales se dirigen contra componentes citoplasmáticos de los granulocitos del neutrófilo y monocitos.

La PR3 es una serin proteasa de los gránulos azurófilos (lisosomas) de los neutrófilos con un peso molecular de 29 kDa. La proteína catiónica tiene una actividad proteolítica hacia la elastina, hemoglobina y el colágeno VII.

2.2.3.2 Anticuerpos anti- Mieloperoxidasa 3

Los anticuerpos contra mieloperoxidasa (MPO) pertenecen al grupo de los anticuerpos anticitoplasma del neutrófilo (ANCA) los cuales se dirigen contra componentes citoplasmáticos de los granulocitos del neutrófilo y monocitos.

La MPO es un enzima de los gránulos primarios de los neutrófilos con un peso molecular de aproximadamente 140 kDa.

2.2.4 MADRES CON SÍNDROME ANTICITOPLASMA DE NEUTRÓFILOS

La presencia de alteraciones en el neurodesarrollo como los Trastornos del Espectro Autista parece ser más importante en estos niños, aunque también existen otras complicaciones como infecciones, hiperactividad, trastorno de alimentación con retraso del lenguaje e hipotonía axial con retraso psicomotor, todas las patologías mencionadas se quieren relacionar con los niveles de anticitoplasma de neutrófilos de las madres.(15)

Las enfermedades reumáticas afectan a menudo a mujeres en edad reproductiva, cuando el embarazo es un evento esperado. Durante años, se ha aconsejado a mujeres con

enfermedades sistémicas autoinmunes potencialmente graves el no quedar embarazadas por las posibles complicaciones que pueda existir. (16)

2.2.5 TRASTORNOS DEL ESPECTRO AUTISTA (TEA).

El autismo fue descrito por primera vez como trastornos autistas del contacto afectivo, el concepto ha evolucionado hasta en la actualidad denominarse Trastornos del Espectro Autista (TEA) estos se caracterizan por alteraciones en dos grandes esferas según el Manual Diagnóstico y Estadístico de Enfermedades Mentales, en la primera se encuentran las deficiencias persistentes en la comunicación e interacción social, en la segunda están los patrones restrictivos y repetitivos de comportamiento, intereses o actividades; estos síntomas están presentes desde la primera infancia y limitan o impiden en funcionamiento cotidiano estándar. (17)

Etimológicamente el término autismo viene de la palabra griega *eaftismos*, que significa “encerrado en uno mismo” el término se introdujo en el campo de la psicopatología a través de la obra del psiquiatra suizo Eugen Bleuler denominada: *Dementia Praecox or the Group of Schizophrenias*.(17)

El autismo actualmente ya no es considerado como una enfermedad sino un síndrome clínico, presente desde los primeros meses de vida del bebe y que incluye alteraciones en conducta, comunicación verbal y no verbal e interacción social y emocional anómala.(18)

Diagnóstico TEA DSM5TR

Según el criterio del DSM-V(23) , el diagnóstico para TEA es el siguiente:

“A Deficiencias persistentes en la comunicación social y en la interacción social en diversos contextos, manifestado por lo siguiente:

1. Las deficiencias en la reciprocidad socioemocional varían, por ejemplo, desde un acercamiento social anormal y fracaso de la conversación normal en ambos sentidos,

pasando por la disminución en intereses, emociones o afectos compartidos hasta el fracaso en iniciar o responder a interacciones sociales (23).

2. Las deficiencias en las conductas comunicativas no verbales utilizadas en la interacción social varían, por ejemplo, desde una comunicación verbal y no verbal poco integrada, pasando por anomalías del contacto visual y del lenguaje corporal o deficiencias de la comprensión y el uso de gestos, hasta una falta total de expresión facial y de comunicación no verbal (23).

3. Las deficiencias en el desarrollo, mantenimiento y comprensión de las relaciones varían, por ejemplo, desde dificultades para ajustar el comportamiento en diversos contextos sociales, pasando por dificultades para combatir juegos imaginativos o para hacer amigos, hasta la ausencia de interés por otras personas(23).

2.2.6 GASTROENTEROLOGÍA EN LOS TRASTORNOS DEL ESPECTRO AUTISTA.

2.2.6.1 Eje Cerebro-Intestino-Microbiota

La microbiota gastrointestinal y sus metabolitos se vinculan directamente con la modulación de la función gastrointestinal, alterando la permeabilidad intestinal, la función inmune de la mucosa, (19) motilidad intestinal, (20) la sensibilidad y la actividad del sistema nervioso entérico, (21) es por ello que el sistema gastrointestinal posee una comunicación bidireccional con el encéfalo, a través del sistema nervioso autónomo y el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal.

2.2.6.2. Alteraciones Gastrointestinales y los Trastornos del Espectro Autista

Los individuos con TEA presentan una serie de comorbilidades, entre las que destacan aquellas de tipo gastrointestinal en donde manifiestan signos y síntomas como: diarrea, constipación, náuseas, vómitos, dolor abdominal, disminución del apetito, regurgitación,

dificultad para defecar, distensión abdominal, incontinencia, pujo, tenesmo, flatulencias, entre otras. (22)

2.2.7 DETERMINACIÓN DE AUTOANTICUERPOS ANTI- CITOPLASMA DE NEUTRÓFILOS EN TEA.

Los anticuerpos anticitoplasma de neutrófilos (ANCA) son un grupo de autoanticuerpos, principalmente de tipo IgG, dirigidos contra antígenos que se encuentran presentes en el citoplasma de los granulocitos neutrófilos (el tipo más común de leucocito) y contra el citoplasma de monocitos. Se pueden detectar por medio de un análisis sanguíneo en un gran número de enfermedades autoinmunes, pero se encuentran particularmente asociados a la vasculitis sistémica, también llamada vasculitis asociada a ANCA.

En cuanto a los anticuerpos anticitoplasma de neutrófilos en pacientes con TEA no se han encontrado estudios referentes.

2.2.8.1 METODOS QUE SE PUEDEN UTILIZAR PARA LA DETERMINACIÓN DE ANTI- MPO Y PR3.

Cuadro N° 1: Métodos para determinación de ANCA.

MÉTODO	SENSIBILIDAD	ESPECIFICIDAD
IFI	86%	18%
ELISA	54%	82%
IFI + ELISA	86%	23%

Fuente: reumatología clínica

2.3 SEÑALAMIENTO DE VARIABLES

2.4.1 VARIABLE DEPENDIENTE

Sujetos pediátricos con TEA.

2.4.2 VARIABLE INDEPENDIENTE

Niveles Séricos Maternos de autoanticuerpos anti- Citoplasma de Neutrófilos.

CAPÍTULO III

MARCO METODOLÓGICO

3.1 NIVEL Y TIPO DE INVESTIGACIÓN

El presente proyecto de investigación se basa en el siguiente enfoque:

Cuantitativa: puesto que se realizó la determinación de los niveles séricos de autoanticuerpo anti-Citoplasma de neutrófilo en niños con TEA y su relación con los niveles séricos maternos mediante Elisa que ha sido el método establecido para la determinación de los ANCAs, en sueros, se obtuvo resultados medibles que fueron procesados estadísticamente. Siendo esta una investigación que se centra más en el conteo y clasificación de características y en la construcción de modelos estadísticos así como también en cifras para explicar lo que se observa. (24)

MODALIDAD DE INVESTIGACIÓN

El proyecto de investigación presenta las siguientes modalidades.

Investigación de campo: es un estudio sistemático de los hechos en el lugar en el cual se producen, existe contacto de manera directa con la realidad para conseguir información en relación a los objetivos planteados, por lo tanto se realizó una encuesta a las madres de los niños con TEA pudiendo así sacar una historia clínica de los mismos, para poder conocer sobre la sintomatología que presentan los pacientes miembros de la fundación APADA ECUADOR , los mismos que asistieron a la toma de muestra para la investigación.

De Laboratorio: Porque se realizaron las determinaciones de anti-mieloperoxidasa y anti-proteinasa 3 en el laboratorio Biología Molecular de la Universidad Técnica de Ambato con el equipo Victo X3 utilizando el método Elisa.

Bibliográfico: Porque la investigación se basó en información científica de libros, revistas y artículos científicos.

Asociación de Variables: puesto que nos permite evaluar la relación que existe entre la Variable Independiente (Niveles Séricos Maternos de autoanticuerpos anti- Citoplasma de Neutrófilos) con la Variable Dependiente (Sujetos pediátricos con TEA).

3.2 SELECCIÓN DEL ÁREA O ÁMBITO DE ESTUDIO

DELIMITACIÓN ESPACIAL: se realizó el estudio en la población conformada con sujetos pediátricos que presenten TEA, sus madres en la fundación APADA ECUADOR en las ciudades de (Quito-Riobamba) y sujetos pediátricos sanos sin antecedentes neuropsicológicos ni psiquiátricos provenientes de las consultas de niños sanos de diversas localidades. La realización de los exámenes se los realizo en el laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Técnica de Ambato.

DELIMITACIÓN TEMPORAL: el trabajo de investigación lo desarrolle en el periodo académico Abril – Septiembre 2017.

3.3 POBLACIÓN

Todos los participantes con los que se trabajó fueron contactados a través de la fundación APADA ECUADOR en las ciudades de Quito y Riobamba. Se les solicito a todos los padres/madres/representantes la firma del consentimiento libre informado y asentimiento informado, así como una historia clínica bien detallada (Anexo 1). La población de estudio está comprendida con edades entre los 3 hasta los 17 años y estaban diagnosticados con TEA bajo el diagnóstico DSM-5.

Se cuenta una muestra de 80 pacientes distribuidos de la siguiente manera:

- 30 sujetos pediátricos diagnosticados con TEA y sus madres.
- 10 sujetos pediátricos con desarrollo típico y sus madres.

3.4 CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN

Criterios de inclusión: la investigación se realizó a los pacientes que cumplieron con los siguientes criterios.

- Madres que firmen el consentimiento informado.
- Sujetos pediátricos (3-17 años) diagnosticados con TEA.
- Sujetos pediátricos con desarrollo típico (neurotípicos, controles) que siendo evaluados por psicología clínica, no presenten alteraciones de orden neuropsicológicas ni psiquiátricas

Criterios de exclusión: la investigación no se realizó a los pacientes que no cumplieron con los siguientes criterios.

- Todo individuo sujeto a estudio que haya recibido tratamiento antimicrobiano y antiinflamatorio como: antibiótico, anti fúngicos, antivirales, antiparasitarios, AINES y esteroides tres (3) meses previos a la toma de muestra.
- Sujetos pediátricos con desarrollo típico (neurotípicos, controles) que siendo evaluados por psicología clínica, no presenten alteraciones de orden neuropsicológicas ni psiquiátricas.

3.5 DISEÑO MUESTRAL

TAMAÑO DE LA MUESTRA:

Se cuenta una muestra de 80 pacientes distribuidos de la siguiente manera:

- 30 sujetos pediátricos diagnosticados con TEA y sus madres.
- 10 sujetos pediátricos con desarrollo típico y sus madres.

Pacientes a los cuales se les realizó los exámenes de laboratorio, y afirmaron su participación con el Consentimiento Informado.

3.6 OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

Cuadro N° 2 Variable Independiente: Niveles Séricos Maternos de autoanticuerpos anti- Citoplasma de Neutrófilos.

CONCEPTUALIZACIÓN	CATEGORÍAS	INDICADOR	ÍTEMS	TÉCNICAS	INSTRUMENTOS
Los anticuerpos anticitoplasma de neutrófilos (ANCA) son un grupo de autoanticuerpos, principalmente de tipo IgG, dirigidos contra antígenos que se encuentran presentes en el citoplasma de los granulocitos neutrófilos (el tipo más común de leucocito) y contra el citoplasma de monocitos.	-Inmunidad	- Inmunidad innata - Inmunidad adquirida	¿Qué sucede cuando las defensas bajan?	Pruebas de laboratorio	Ficha Resultados
	- Síndrome anti - citoplasma de neutrófilos	-Niveles elevados de (ANCA).	¿Qué sucede con niveles de ANCA elevados?	Entrevista a la madre	Cuestionario
Los anticuerpos evaluados en el síndrome anti-citoplasmáticos de neutrófilos son: Proteinasa 3 (PR3) Mieloperoxidasa (MPO)	-Madres con síndrome anticuerpos anticitoplasma de neutrófilos (ANCA)	-anti -Proteinasa 3 (PR3) anti- Mieloperoxidasa (MPO)	¿Qué exámenes de sangre se realiza para determinar el síndrome anti-citoplasma de neutrófilos?	Examen diagnóstico de Síndrome antifosfolipídico.	Fichas Resultados

Elaborado por: Nancy Del Pilar Capuz Guananga.

Cuadro N° 3 Variable Dependiente: Sujetos pediátricos con TEA.

CONCEPTUALIZACIÓN	CATEGORÍAS	INDICADOR	ÍTEMS	TÉCNICAS	INSTRUMENTOS
El trastorno del espectro autista (TEA) es una serie de desórdenes del neurodesarrollo que es caracterizado por el déficit del lenguaje, dificultad en la comunicación e interacción social.	- TEA -Determinación de autoanticuerpos anti- citoplasma de neutrófilos (ANCA) en sujetos pediátricos con TEA.	Síndrome Clínico anti -Proteinasa 3, anti Mieloperoxidasa	¿Qué síntomas o signos presentan las personas con TEA? ¿Cuál es el valor de anti- citoplasma de neutrófilos que se considera como positivo?	Manual Examen de Laboratorio	Manual Cuestionario Resultados

Elaborado por: Nancy Del Pilar Capuz Guananga.

3.7 DESCRIPCIÓN DE LA INTERVENCIÓN Y PROCEDIMIENTOS PARA LA RECOLECCIÓN DE INFORMACIÓN

La presente investigación se realizó en los pacientes con TEA que acudieron a la fundación APADA ECUADOR en el periodo Abril – Septiembre 2017, el análisis de las muestras recolectadas se llevaron a cabo en el Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Técnica de Ambato durante el mes de Septiembre del 2017.

Para la realización de este proyecto de investigación se procedió de la siguiente manera:

- Se verifico los recursos económicos y humanos que me facilite la realización del presente proyecto de investigación.
- Se localizó a la directora de la fundación APADA ECUADOR para explicarle acerca del trabajo de investigación y para pedir su respectivo consentimiento.
- Posterior a la aceptación de la directora se procedió a brindar la información respectiva a las madres de los pacientes participantes en esta investigación bajo los criterios de inclusión y exclusión, en donde se firmó un consentimiento informado para la autorización del desarrollo del presente proyecto y se recolecto datos importantes mediante una pequeña Historia Clínica acorde a la investigación y las madres de los participantes la respondieron por escrito.
- Se realizó la toma de muestra a todos los pacientes participantes.
- Se presentó el oficio a la encargada del Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Técnica de Ambato para que autorice la utilización del laboratorio para la realización de los análisis de las muestras el 11 y 12 de Septiembre del 2017.
- Se realizó el análisis de las muestras para determinar si los niveles séricos de autoanticuerpos anti- citoplasma de neutrófilos en niños con TEA tienen relación con los niveles séricos maternos.
- Se registraron todos los datos y resultados de las muestras.

Análisis de muestras sanguíneas

A través de una toma de muestra de sangre de los pacientes por venopunción en un tubo tapa roja sin anticoagulante, y luego de su debido proceso, se obtuvo suero sanguíneo con lo cual se realizó los análisis.

MATERIALES Y EQUIPOS

Normas de Bioseguridad

- **EPP** (Mandil, Guantes, Zapatos, Mascarilla, Jeringas, Curitas).

Materiales para la extracción de muestra de sangre

- Torniquete
- Torundas de algodón
- Alcohol antiséptico
- Cápsula para vacutainer
- Aguja vacuette
- Apósitos
- Tubos tapa roja
- Curitas para niños

Material biológico

- Muestras de sangre (suero).

Equipos y materiales de laboratorio

- Centrifuga
- Cronómetro
- Gradilla
- Pinza
- Tubos eppendorf

- Pipetas automáticas de 100 y 300 uL
- Lector de microplaca multidetectores – VICTOR™ X5

Reactivos

- Kit de reactivo de MPO AESKULISA.
- Kit de reactivo de PR3 sensitive AESKULISA.

MÉTODOS

Procedimiento para la toma de muestra sanguínea

- Colocar al paciente lo más cómodo posible para la extracción de sangre.
- Preparar los materiales necesarios.
- Rotular los tubos con el nombre del paciente y código asignado.
- Explicar a la madre del paciente el proceso que se va a realizar y con la ayuda de ella poder obtener la muestra.
- Identificar el área de punción: inspeccionamos y seleccionamos una vena, el brazo del paciente debe estar estirado.
- Colocar el torniquete y pedir que haga puño.
- Desinfectar el área de punción con alcohol al 70%.
- Realizar la punción: utilizar el pulgar de la mano libre para tensar la piel y mantener la vena en posición, advertir al paciente y puncionar la vena en un ángulo de 10 a 20 grados con el bisel de la aguja hacia arriba, recolectamos la muestra de sangre en el tubo tapa roja, soltar el torniquete, pedir al paciente que relaje el puño y mientras retiramos la aguja hay que colocar un algodón haciendo presión en el lugar de la punción.
- Colocar un apósito.

Después de recolectar las muestras de sangre se procedió a transportarlas a un lugar adecuado para su centrifugación a 3000 rpm durante 10 minutos para obtener el suero que es con lo que vamos a trabajar, y ser analizados en el Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Técnica de Ambato para el cual se utilizó los Kit de

reactivo de MPO AESKULISA y Kit de reactivo de PR3 sensitive AESKULISA para sus respectivos análisis.

DETERMINACIÓN DE AUTOANTICUERPOS ANTI- CITOPLASMA DE NEUTRÓFILOS (ANCA) MPO Y PR3 CASA COMERCIAL AESKULISA.

Utilización MPO

Es una enzimoimmunoensayo en fase sólida que emplea mieloperoxidasa nativa elevadamente purificada a partir de células polimorfonucleares de sangre periférica humana para la detección cuantitativa de anticuerpos contra MPO en suero humano. Los anticuerpos anti- MPO reconocen epitopos conformacionales específicos en la MPO nativa.

Utilización PR3 sensitive

Es una enzimoimmunoensayo en fase sólida que emplea proteinasa 3 humana nativa elevadamente purificada a partir de granulocitos de neutrófilo humano para la detección cuantitativa de anticuerpos contra proteinasa 3 en suero humano. Los anticuerpos anti- PR3 reconocen específicamente epitopos conformacionales solamente accesibles en la PR3nativa.

Principio del test

Las muestras de suero diluidas 1:101 se incuban en la microplaca revestida con el antígeno específico. Los anticuerpos de los pacientes, si están presentes en la muestra, se unen al antígeno. La fracción no unida es eliminada con el lavado en el paso siguiente. Después, las inmunoglobulinas anti- humana conjugada con peroxidasa (conjugado) se incuban y reaccionan con el complejo antígeno- anticuerpo de las muestras dentro de la microplaca. El conjugado no unido es retirado a través del lavado en el paso siguiente. La adición del sustrato – TMB genera una reacción colorimétrica (azul) enzimática que se detiene a través de ácido diluido (el color cambia a amarillo). La intensidad del color a partir del cromógeno depende de la cantidad de conjugado unida al complejo antígeno-

anticuerpo y es proporcional a la concentración inicial de los respectivos anticuerpos en la muestra del paciente.

Almacenamiento y Caducidad

Guarde todos los reactivos y la microplaca a 2-8°C/35-46°F, en sus envases originales. Una vez preparadas, las soluciones reconstituidas son estables durante 1 mes a 2-8°C/35-46°F, por lo menos. Los reactivos y la microplaca deben ser utilizados solamente dentro del margen de caducidad indicado en cada componente. Evite la exposición de la solución TMB a la luz intensa. Guarde las microplacas en su sobre correspondiente, incluyendo el desecante, y séllelo bien.

Toma, manipulación y almacenamiento de las muestras

No utilice muestras ictericas, lipémicas, hemolizadas o contaminadas por bacterias. Los sueros con partículas deben ser purificados por centrifugación a baja velocidad (<1000 x g). Las muestras de sangre deben ser recogidas en tubos limpios, secos y vacíos. Tras la separación, las muestras de plasma han de utilizarse durante las primeras 8 horas y conservarse herméticamente cerradas a 2-8°C/35-46°F hasta 48 horas o congeladas a -20°C/-4°F durante periodos más prolongados.

Diluya los reactivos concentrados:

- Diluya el tampón de muestra concentrado a 1:5 con agua destilada (p.e. 20 ml en 80 ml)
- Diluya el tampón de lavado concentrado a 1:50 con agua destilada (p.e. 20 ml en 980 ml).
- A fin de evitar errores, es aconsejable marcar las tapas de los distintos calibradores.

Muestras:

Diluya las muestras de suero a 1:101 con tampón de muestra (1x) p.e. 1000 µl tampón de muestra (1x) + 10 µl suero. Mezcle bien la dilución.

Lavado:

Prepare 20 ml de tampón de lavado diluido (1x) para 8 pocillos o 200 ml para 96 pocillos p.e. 4 ml de concentrado en 196 ml de agua destilada.

Lavado automático:

Tenga en cuenta los volúmenes de exceso requeridos para purgar el instrumento y el volumen muerto en el dispensador del aparato.

Lavado manual:

Descarte el líquido de los pocillos invirtiendo la placa. Golpee vigorosamente el marco con los micropocillos sobre papel absorbente limpio manteniendo la placa invertida. Dispense 300 µl de tampón de lavado diluido dentro de cada pocillo y espere 20 segundos. Repita el procedimiento entero dos veces más.

PROCEDIMIENTO

Cuadro N° 4: Procedimiento de pipeteo.

1	Pipetee en los pocillos designados 100 µl de: Calibradores (CAL.A a CAL.F) para interp. CUANTITATIVA.
2	Incube durante 30 minutos a 20-32°C/68-89,6°F.
3	Lave tres veces con 300 µl de tampón de lavado (diluido al 1:50).
4	Pipetee 100 µl de conjugado en cada pocillo.
5	Incube durante 30 minutos a 20-32°C/68-89,6°F.
6	Lave tres veces con 300 µl de tampón de lavado (diluido al 1:50).
7	Pipetee 100 µl de sustrato TMB en cada pocillo.
8	Incube durante 30 minutos a 20-32°C/68-89,6°F y evite que reciba luz intensa.
9	Pipetee 100 µl de solución de paro en cada pocillo siguiendo el mismo orden que al pipetear el sustrato.
10	Incube durante 5 minutos como mínimo.
11	Agite la placa suavemente durante 5 seg.
12	Lea la absorbancia a 450 nm (se recomienda 450/620 nm) durante los 30 minutos siguientes.

Fuente: CASA COMERCIAL AESKULISA.

Interpretación Cuantitativa

Para una interpretación cuantitativa establezca la curva standard trazando la densidad óptica (DO) de cada calibrador (eje y) con respecto a los correspondientes valores de concentración en U/ml (eje x). Para unos mejores resultados recomendamos coordenadas log/lin y un ajuste a 4-PL. Partiendo de la DO de cada muestra, lea la correspondiente concentración de anticuerpo expresada en U/ml.

Cuadro N° 5 : Valores de referencia

RANGO NORMAL	INDETERMINADO	RESULTADOS POSITIVOS
< 12 U/ml	12 - 18 U/ml	>18 U/ml

Fuente: CASA COMERCIAL AESKULISA.

DATOS TÉCNICOS

Cuadro N° 6 : Datos técnicos

Muestra	Suero
Volumen de muestra	10 µl de muestra diluida a 1:101 con tampón de muestra 1x
Tiempo total de incubación	90 minutos a temperatura 20-32°C/68-89,6°F
Rango de calibración	0-300 U/ml
Sensibilidad analítica	1,38 U/ml
Almacenamiento	a 2-8°C/35-46°F utilice solo los viales originales
Número de determinaciones	96 tests

Fuente: CASA COMERCIAL AESKULISA.

Calibración

Debido a la no existencia de una calibración de referencia internacional, este ensayo está calibrado en unidades arbitrarias (U/ml).

3.8 ASPECTOS ÉTICOS

A las madres de los pacientes que participaron en el proyecto de investigación se les explico el objetivo del estudio y para afirmar su participación se hizo firmar un Consentimiento Informado, el cual nos permite realizar a los pacientes el respectivo análisis de laboratorio como es la determinación de los niveles séricos de autoanticuerpos anti- citoplasma de neutrófilos en niños con TEA y sus respectivas madres, así como también a los niños sanos y sus madres. Los resultados obtenidos fueron manejados con confidencialidad y fueron entregados a la representante de la

fundación participante, beneficiando de esta manera a los pacientes participantes en este estudio.

Los 4 principios de bioética se mencionan lo siguiente:

- **Respeto de autonomía:** este principio indica el respeto por la autonomía del paciente exige a los profesionales a revelar información, asegurar la comprensión, la voluntad y a potenciar la participación del paciente en la toma de decisiones. Tomando en cuenta las reglas para tratar a las personas de forma autónoma, como son: decir la verdad, respetar la privacidad, proteger la confidencialidad de la información, obtener un consentimiento para las intervenciones a pacientes.
- **No – maleficencia:** este principio se refiere a la obligación de no causar daño intencionalmente. Teniendo en cuenta las siguientes reglas como son: no matar, no causar dolor o sufrimiento, no ofender, no privar a otro de aquellos que aprecian la vida.
- **Beneficencia:** este principio está basado en prevenir y eliminar el daño, hacer el bien a otros, hace referencia a actos de buena voluntad, amabilidad, caridad, amor o humanidad es decir ayudando y rescatando a personas en peligro.
- **Justicia:** Norman Daniels nos dice que hay un conflicto de intereses entre los que precisan servicios de salud y quienes soportan sus gastos, se piensa que los cuidados de la salud deben distribuirse igualitariamente que otros bienes.

CAPÍTULO IV

ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En el presente capítulo se realizaron análisis de autoanticuerpos anti- citoplasma de neutrófilos (anti -Proteinasa 3, anti- Mieloperoxidasa) a los pacientes de la fundación APADA ECUADOR que asistieron a la toma de muestras en el Período Abril - Septiembre 2017. Por lo cual los resultados se encuentran representados en cuadros estadísticos.

4.1 ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DE LABORATORIO CLÍNICO

4.1.1 Cumpliendo con el primer objetivo específico.- estadísticos descriptivos de los niveles de anti -Proteinasa 3, y anti- Mieloperoxidasa en niños con tea y niños con desarrollo típico.

Cuadro N° 7: Valores de anti- Proteinasa 3 y anti- Mieloperoxidasa en sujetos pediátricos con TEA y sujetos pediátricos con desarrollo típico.

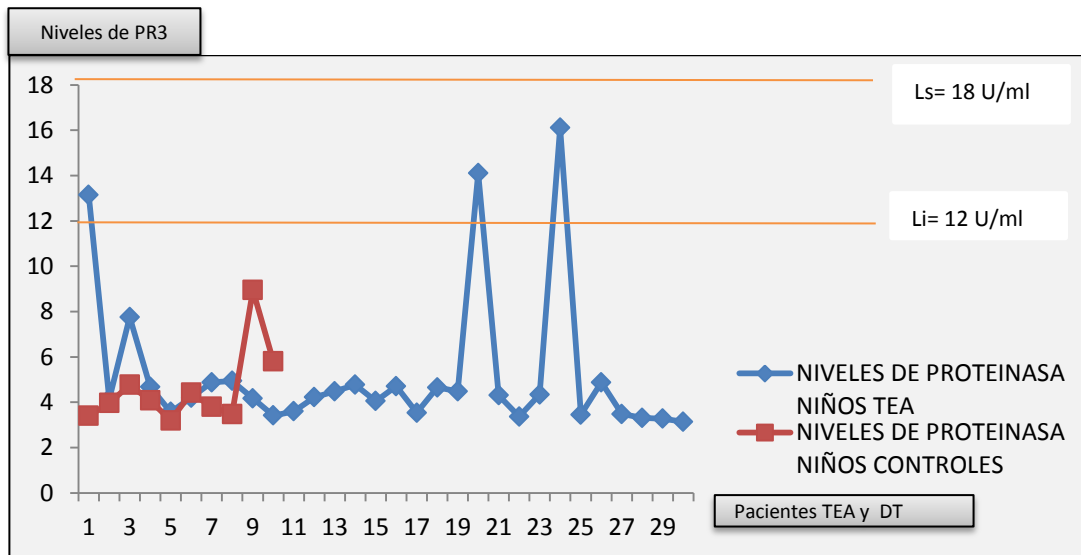
Estadísticos descriptivos					
	N	Mínimo	Máximo	Media	Desviación estándar
PN.TEA	30	3,14	16,11	5,2393	3,26574
PN.CONTROL	10	3,20	8,95	4,5870	1,71217
MN.TEA	30	1,01	9,70	2,8857	2,29818
MN.CONTROL	10	1,15	2,40	1,6640	,39981
N válido (por lista)	10				

Fuente: Análisis de Laboratorio Clínico. **Elaborado por:** Nancy del Pilar Capuz Guananga.

Análisis: En relación a la cuantificación de los valores de anti- Proteinasa 3 en niños con TEA tenemos una media de $5,2393 \pm 3,26574$, con un valor mínimo de 3,14 y un máximo de 16,11; valores de anti-Proteinasa 3 en niños con desarrollo típico tenemos una media de $4,5870 \pm 1,71217$, con un valor mínimo de 3,20 y un máximo de 8,95 en

cuanto a los valores de anti- Mieloperoxidasa en niños con TEA tenemos una media de $2,8857 \pm 2,29818$, con un valor mínimo de 1,01 y un máximo de 9,70; y anti- Mieloperoxidasa en niños con desarrollo típico tenemos una media de $1,6640 \pm ,39981$ con un valor mínimo de 1,15 y un máximo de 2,40. Los siguientes datos se encuentran dentro de los rangos normales ya que solo esos son considerados y están representados en el siguiente cuadro. (Anexo 3)

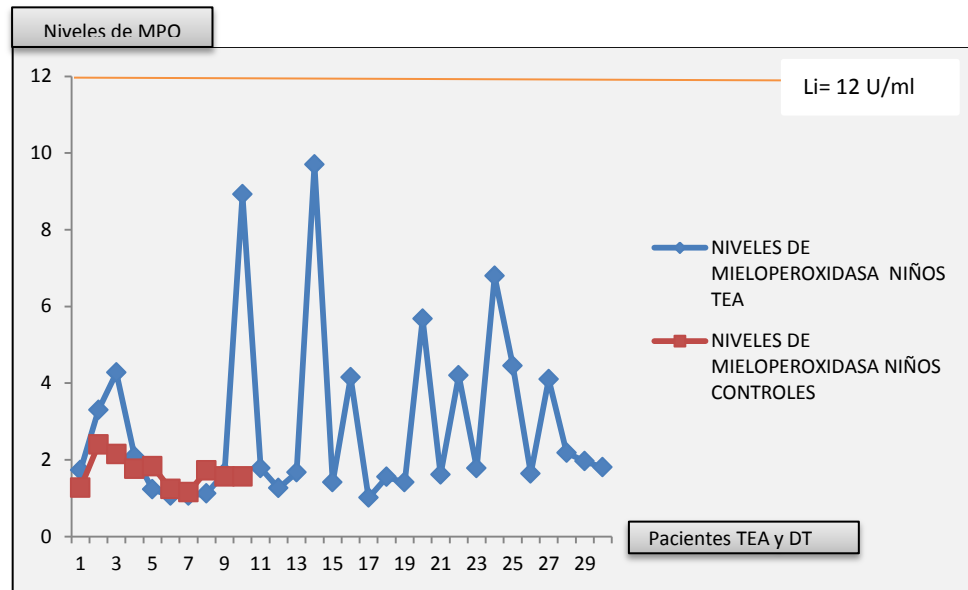
Gráfico N° 1 Resultados obtenidos del análisis de los niveles séricos de autoanticuerpos anti-citoplasma de neutrófilo (PR3) en las muestras investigadas de niños TEA y desarrollo típico.



Fuente: Análisis de Laboratorio Clínico. **Elaborado por:** Nancy del Pilar Capuz Guananga.

Interpretación de resultados De acuerdo a los análisis realizados de anti- Proteinasa 3 en niños con TEA, tenemos que el 10% están en los rangos indeterminados de 12- 18 U/ml, y el 90% se encuentra en los rangos normales de < 12 U/ml, en cuanto a los análisis realizados sobre anti- Proteinasa 3 en los niños con desarrollo típico tenemos que el 100% presentan valores normales de < 12 U/ml. Las concentraciones de estos anticuerpos cuando se presentan en concentraciones bajas no tienen importancia clínica, solo se considera los valores elevados.

Gráfico N° 2 Resultados obtenidos del análisis de los niveles séricos de autoanticuerpos anti-citoplasma de neutrófilo (MPO) en las muestras investigadas de niños TEA y desarrollo típico.



Fuente: Análisis de Laboratorio Clínico. **Elaborado por:** Nancy del Pilar Capuz Guananga.

Interpretación de resultados De acuerdo a los análisis realizados de anti-Mieloperoxidasa en niños con TEA, tenemos que el 100% está en los rangos normales de < 12 U/ml, en cuanto a los análisis realizados sobre anti- Mieloperoxidasa en los niños con desarrollo típico tenemos que el 100% también presentan valores normales < 12 U/ml. Las concentraciones de estos anticuerpos cuando se presentan en concentraciones bajas no tienen importancia clínica, solo se considera los valores elevados. (Anexo 3)

4.1.2 Cumpliendo con el segundo objetivo específico.-estadísticos descriptivos de los niveles de anti -Proteinas 3, y anti- Mieloperoxidasa en las madres de niños con TEA y madres de niños con desarrollo típico.

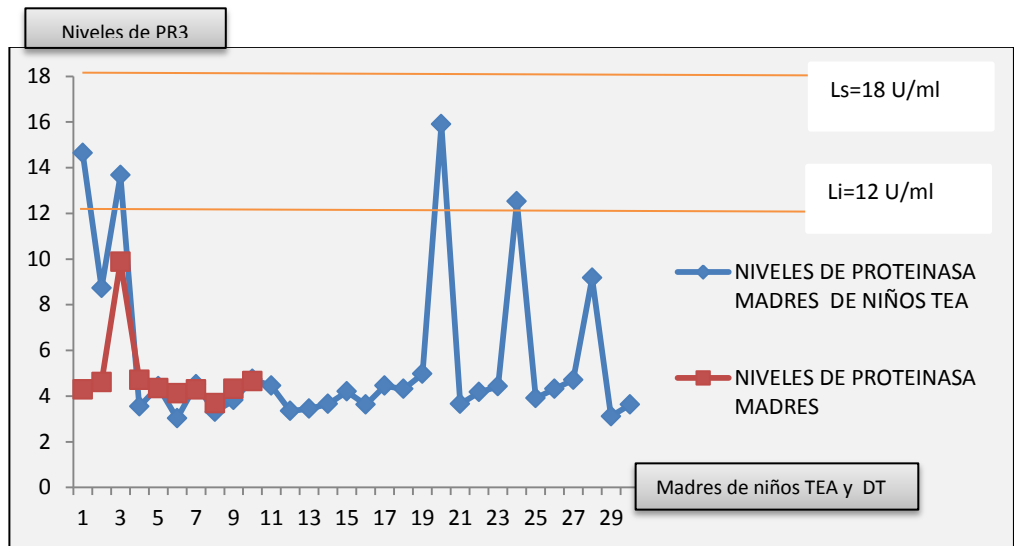
Cuadro N° 8 Valores de anti- Proteinas 3 y anti- Mieloperoxidasa en las madres de los sujetos pediátricos con TEA y sujetos pediátricos con desarrollo típico.

Estadísticos descriptivos					
	N	Mínimo	Máximo	Media	Desviación estándar
PM.TEA	30	3,02	15,90	5,6777	3,67943
PM.CONTROL	10	3,68	9,88	4,8840	1,78043
MM.TEA	30	1,26	12,90	3,2923	2,81649
MM.CONTROL	10	1,21	2,46	1,8690	,38794
N válido (por lista)	10				

Fuente: Análisis de Laboratorio Clínico. **Elaborado por:** Nancy del Pilar Capuz Guananga.

Análisis: En relación a la cuantificación de los valores de anti- Proteinas 3 en las madres de los niños TEA tenemos una media de $5,6777 \pm 3,67943$, con un valor mínimo de 3,02 y un máximo de 15,90; valores de anti-Proteinas 3 en las madres de los niños con desarrollo típico tenemos una media de $4,8840 \pm 1,78043$, con un valor mínimo de 3,68 y un máximo de 9,88 en cuanto a los valores de anti- Mieloperoxidasa en las madres de los niños TEA tenemos una media de $3,2923 \pm 2,81649$, con un valor mínimo de 1,26 y un máximo de 12,90; y anti- Mieloperoxidasa en las madres de los niños con desarrollo típico tenemos una media de $1,8690 \pm ,38794$ con un valor mínimo de 1,21 y un máximo de 2,46. Los siguientes datos de cada una de las medias están dentro de los rangos normales de Proteinas 3 y están representados en el siguiente cuadro. (ANEXO3)

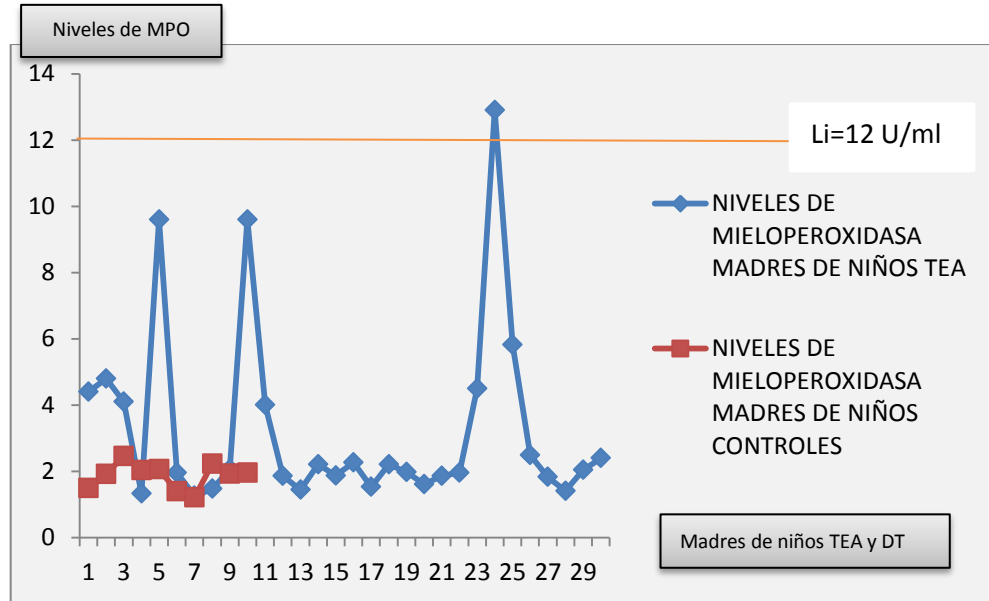
Gráfico N° 3 Resultados obtenidos del análisis de los niveles séricos de autoanticuerpos anti-citoplasma de neutrófilo (PR3) en las muestras investigadas de las madres de los niños TEA y desarrollo típico.



Fuente: Análisis de Laboratorio Clínico. **Elaborado por:** Nancy del Pilar Capuz Guananga.

Interpretación de resultados De acuerdo a los análisis realizados de anti- Proteinasa 3 en las madres de los niños con TEA, tenemos que el 10% está en los rangos indeterminados de 12- 18 U/ml, y el 90% se encuentra en los rangos normales de < 12 U/ml, en cuanto a los análisis realizados sobre anti- Proteinasa 3 en las madres de los niños con desarrollo típico tenemos 100% presentan valores normales de < 12 U/ml. Las concentraciones de estos anticuerpos cuando se presentan en concentraciones bajas no tienen importancia clínica, solo se considera los valores elevados. (Anexo 3)

Gráfico N° 4 Resultados obtenidos del análisis de los niveles séricos de autoanticuerpos anti-citoplasma de neutrófilo (MPO) en las muestras investigadas de las madres de los niños TEA y desarrollo típico.



Fuente: Análisis de Laboratorio Clínico. **Elaborado por:** Nancy del Pilar Capuz Guananga.

Interpretación de resultados De acuerdo a los análisis realizados de anti-Mieloperoxidasa en las madres de los niños con TEA, tenemos que el 100% está en los rangos normales de < 12 U/ml, en cuanto a los análisis realizados sobre anti-Mieloperoxidasa en las madres de los niños con desarrollo típico tenemos 100% también presentan valores normales de < 12 U/ml. Las concentraciones de estos anticuerpos cuando se presentan en concentraciones bajas no tienen importancia clínica, solo se considera los valores elevados. (Anexo 3)

4.1.3 Cumpliendo con el tercer objetivo específico.-sobre la correlación de los niveles de autoanticuerpos circulantes anti-citoplasma de neutrófilos en sujetos pediátricos con TEA y DT, con los niveles séricos maternos anti-citoplasma de neutrófilos, tenemos el siguiente resultado:

Cuadro N° 9 Correlación de los niveles de autoanticuerpos circulantes anti-citoplasma de neutrófilos en sujetos pediátricos con TEA y DT, con los niveles séricos maternos.

Prueba de muestras emparejadas

	Diferencias emparejadas					t	gl	Sig. (bilateral)
	Media	Desviación estándar	Media de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia				
				Inferior	Superior			
Par 1 PNTEA - PMTEA	- ,43833	2,03914	,37229	-1,19976	,32309	-1,177	29	,249
Par 2 PNCONTROL – PMCONTROL	- ,29700	2,38785	,75510	-2,00516	1,41116	-,393	9	,703
Par 3 MNTEA - MMTEA	- ,40667	2,74164	,50055	-1,43041	,61708	-,812	29	,423
Par 4 MNCONTROL – MMCONTROL	- ,20500	,27216	,08607	-,39969	-,01031	-2,382	9	,041

Fuente: Análisis de Laboratorio Clínico. **Elaborado por:** Nancy del Pilar Capuz Guananga.

Análisis: En el análisis realizado sobre anti-Proteinasas3 en sujetos pediátricos con TEA con relación a los valores de sus madres existe una significancia del 5% , $P > 0.05 = 0.249$ es decir no hay diferencia significativa entre las pruebas de niños con respecto a madres, En el análisis realizado sobre anti-Proteinasas3 en sujetos pediátricos con desarrollo típico y en sus madres existe una significancia del 5% , $P > 0.05 = 0.703$ es decir no hay diferencia significativa entre las pruebas de niños con respecto a madres. En los resultados de los valores de anti-Mieloperoxidasa en sujetos pediátricos con TEA y sus madres existe una significancia del 5%, $P > 0.05 = 0.423$ es decir que si hay diferencia significativa entre las pruebas de niños con respecto a madres. En los valores de anti-Mieloperoxidasa en sujetos pediátricos con desarrollo típico y sus madres existe una

significancia del 5%, $P > 0.05 = 0.041$ es decir no hay diferencia significativa entre las pruebas de niños controles con respecto a sus madres, esto quiere decir que no hay ninguna correlación entre los niveles séricos de autoanticuerpos anti- citoplasma de neutrófilos de los niños TEA con los niveles séricos de sus madres.

4.2 VERIFICACIÓN DE LA HIPÓTESIS

En el proceso de verificación de la hipótesis se utilizó el estadígrafo de comparación de medias conocido como T de Student para muestras simples, en el Programa SPSS, debido a que se establece de manera independiente la relación entre cada una de las variables objeto de estudio, permitiendo la comparación a partir de la hipótesis que se quiere verificar, es decir se correlaciona las variables en estudio.

4.3.1 PLANTEO DE LA HIPÓTESIS

HIPÓTESIS ALTERNATIVA (H_1):

Los niveles séricos de autoanticuerpos anti- citoplasma de neutrófilos en sujetos pediátricos con los Trastornos del Espectro Autista tienen relación con los niveles séricos maternos.

HIPÓTESIS NULA (H_0):

Los niveles séricos de autoanticuerpos anti- citoplasma de neutrófilos en sujetos pediátricos con los Trastornos del Espectro Autista no tienen relación con los niveles séricos maternos.

4.3.2 ESTIMADOR ESTADÍSTICO

$$t = \frac{\overline{X}}{\frac{\sigma_X}{\sqrt{N-1}}}$$

Nomenclatura

\overline{X} = promedio de la diferencia

σ_X = desviación estándar del promedio de la diferencia

$\sqrt{N-1}$ = raíz cuadrado de n total de la población menos uno

t = t de Student

4.3.3 NIVEL DE SIGNIFICACIÓN

$$\alpha = 0,05$$

En el T Student, si existe concordancia entre las frecuencias observadas y las esperadas el estadístico tomará un valor igual a 0,00, en consecuencia, se rechazará la hipótesis nula. Por el contrario, si existe una gran discrepancia entre estas frecuencias el estadístico tomará un valor grande y se rechazara la hipótesis alterna.

4.3.4 CÁLCULO DE LA PRUEBA ESTADÍSTICA CÁLCULO DEL ESTIMADOR ESTADÍSTICO T student.

Cuadro N° 10 Tabla de Muestras única de PR3 y MPO, estimador estadístico t student.

		Media	N	Desviación estándar	Media de error estándar
Par 1	PNTEA	5,2393	30	3,26574	,59624
	PMTEA	5,6777	30	3,67943	,67177
Par 2	MNTEA	2,8857	30	2,29818	,41959
	MMTEA	3,2923	30	2,81649	,51422

		N	Correlación	Sig.
Par 1	PNTEA & PMTEA	30	,834	,000
Par 2	MNTEA & MMTEA	30	,440	,015

		Diferencias emparejadas				t	gl	Sig. (bilateral)	
		Media	Desviación estándar	Media de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia				
					Inferior				Superior
Par 1	PNTEA -	-	2,03914	,37229	-1,19976	,32309	-1,177	29	,249
		PMTEA							
Par 2	MNTEA -	-	2,74164	,50055	-1,43041	,61708	-,812	29	,423
		MMTEA							

Fuente: Análisis de Laboratorio Clínico **Elaborado por:** Nancy del Pilar Capuz Guananga.

ANÁLISIS

Para calcularla la T se realizó la matriz de tabulación cruzada de datos se toma en cuenta los resultados de los diferentes niveles séricos de autoanticuerpos anti- citoplasma de neutrófilos que presentaron los individuos objeto de estudio tanto niños TEA y sus madres, las mismas que nos permitieron determinar si hay o no relación entre las variables independiente y dependiente ya que se obtuvo una significancia mayor a 0,05 lo que me permitió .rechazar la hipótesis alternativa y comprobar la hipótesis nula que señala: “Los niveles séricos de autoanticuerpos anti- citoplasma de neutrófilos en sujetos pediátricos con los Trastornos del Espectro Autista no tienen relación con los niveles séricos maternos”.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 CONCLUSIONES

- A través de la utilización del métodos ensayo inmunoenzimático tipo ELISA de laboratorio, se pudo determinar los niveles séricos de autoanticuerpos anti-citoplasma de neutrófilos en sujetos pediátricos con los Trastornos del Espectro Autista y su relación con los niveles séricos maternos, en los 30 pacientes con TEA y 30 madres que acudieron a la Fundación APADA ECUADOR para la toma de muestras en las Ciudades de Quito y Riobamba, así como también las 10 muestras procedentes de los niños controles y sus madres, en su totalidad las 80 muestras fueron procesadas.
- Mediante la realización de los exámenes de laboratorio de igual manera se pudo identificar los niveles séricos de autoanticuerpos circulantes anti-ANCA (anti - Proteinasa 3, anti- Mieloperoxidasa) en las madres de los sujetos pediátricos con los TEA y DT obteniendo valores que se encuentran en los rangos normales de < 12 U/ml y rango intermedio de 12- 18 U/ml de cada una de las pruebas analizadas.
- Se correlacionó los niveles séricos de autoanticuerpos circulantes anti-citoplasma de neutrófilos en sujetos pediátricos con los TEA y DT con los niveles séricos maternos Anti- ANCA, mediante la realización del examen de laboratorio clínico, en el cual se determinó los niveles séricos de los anti-citoplasma de neutrófilos dándonos como resultados valores dentro de los rangos normales de las 80 muestras se obtuvo que el 99% de los pacientes presentan valores normales de < 12 U/ml, mientras que el 1 % correspondiente al rango intermedio de 12- 18 U/ml MPO y de los mismos 80 pacientes el 91% de los resultados están dentro del valor normal < 12 U/ml y el 9% están dentro del rango indeterminado (PR3), aquí se observa que no hay valores positivos para ANCA (PR3 y MPO) en las 30 muestras TEA por lo que podemos decir que no

tiene relación con los niveles séricos de sus madres, y en los niños controles de igual manera sus resultados están dentro de los valores normales, estudios realizados a madres con niños TEA a nivel inmunológico explica que los anticuerpos de la madre uniéndose a proteínas del cerebro fetal pueden generar distorsiones en la bioquímica y la función cerebral antes de que el niño nazca.(25) motivo por el cual se realizó esta investigación en esta población analizando los anticuerpos anti - citoplasma de neutrófilos para ver si las madres son las causantes de que sus niños hayan nacido con TEA.

5.2 RECOMENDACIONES

- Se les recomienda para nuevos estudios referentes con esta población aumentar el tamaño muestral con el fin de corroborar los resultados obtenidos dentro de esta investigación para así puedan desarrollar estudios más amplios en beneficio de la población.
- Se debería implementar más estudios en la población de niños TEA que sea en beneficio de los mismos y sin perjudicar su salud por lo que ellos son niños especiales.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BIBLIOGRAFÍA

1. American Psychiatric Association. Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales: DSM-5 [Internet]. 5° Edition. Editorial Médica Panamericana; 2014 [cited 2017 Jul 11]. 1000 p. Available from: <https://drive.google.com/file/d/0B0S7uYY8HM-zMllfVnV3Umw4SkE/view>.(23)
2. Beltrán Chaparro LV, Benavides P, López Rios J, Onatra Herrera W. trastorno autista . scielo. 2017 Julio - Diciembre; 17(1).
3. BRESNAHAN, M. et al. 2015. Association of Maternal Report of Infant and Toddler Gastrointestinal Symptoms With Autism, Evidence From a Prospective Birth Cohort. JAMA Psychiatry 72:466-474. (22)
4. Braunschweig D, Krakowiak P, Duncanson P, Boyce R, Hansen RL, Ashwood P, Hertz-Picciotto I, Pessah IN, Van de Water J. (2013) Autism-specific maternal autoantibodies recognize critical proteins in developing brain. Transl Psychiatry.3 e277.(25)
5. Comisión Científica L y A de MSM, Sociedad Médica de México., Academia de Medicina de México (1871-1887), Academia Nacional de Medicina de México. Gaceta médica de México. [Internet]. Vol. 141, Gaceta médica de México. Academia Nacional de Medicina; 2005 [cited 2017 Jul 4]. 143-147 p. Available from: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0016-38132005000200009 (18)
6. Camilleri M, Lasch K, Zhou, W. 2012. . Irritable bowel syndrome: methods, mechanisms, and pathophysiology. The confluence of increased permeability, inflammation, and pain in irritable bowel syndrome. 303(7):775–785.(19)

7. Cani, P.; Everard, A.; Duparc, T. 2013. Gut microbiota, enteroendocrine functions and metabolism. *Curr Opin Pharmacol* 13:935–940 (20)
8. Davies DJ, Moran JE, Niall JF, Ryan GB. Segmental necrotising glomerulonephritis with antineutrophil antibody: possible arbovirus aetiology? *BMJ* 2011; 285: 606.(26)
9. Francesc C. EL AITISMO: Aspectos descriptivo y terapéuticos. 2000;109. (17)
10. Goitybell, M. Torres B,Rangel S, Sanchez V, Ramos M, Fuentes L, Reumatologia Clinica. In Farreras R. Laboratorio de Inmunologia: elsivier 2014. (5)
11. Hsiao, McBride,S, Hsien, S.Sharon, G, Hyde , McCue, T, Codelli, J Chow, J Reisman, R, petrocino, P, Mazmanian, S. 2013 (3). The , Microbiota modulates gut .physiology and behavioral abnormalities associated with autism.*Cell* 155 (7): 1451-1463.(1)
12. Investigación Cuantitativa y Cualitativa. Diciembre 04, 2017 Obtenido de Explorable.com: <https://explorable.com/es/investigacion-cuantitativa-y-cualitativa>.(24)
13. Merkel PA, Polisson RP, Chang YC, Skates SJ, Niles JL. Prevalence of antineutrophil cytoplasmic antibodies in a large inception cohort of patients with connective tissue disease. *Ann Intern Med* 2012; 126: 866-73. (27)
14. Mekinian A, Lachassinne E, Nicaise-Roland P, Carbillon L, Motta M, Vicaut E, et al. European registry of babies born to mothers with antiphospholipid syndrome. *Ann Rheum Dis*. 2013;72(2):217–22. (15)
15. Parham P. Inmunología (4a. ed.). Editorial El Manual Moderno; 2015. 621 p. (8)
16. Ruiz-Irastorza G, Munther A. *Revista de American College of Rheumatology*. 2014 . (16)

17. Valdez-Morales E. et al. 2013. Sensitization of peripheral sensory nerves by mediators from colonic biopsies of diarrhea-predominant irritable bowel syndrome patients: a role for PAR2. *Am J Gastroenterol.* 108:1634–1643. (21)

LINCOGRAFÍA

1. Alberto CC. Autoinmunidad y autoinflamación. Acta Médica Colomb [Internet]. 2011 [cited 2017 Aug 2];36(1):78–84. Available from: <http://www.scielo.org.co/pdf/amc/v36n2/v36n2a05.pdf>. (11)
2. Cardinalli A, Ginaca A, Espada G, M Pizzimenti, Rivas M, Liggire L, Griemberg G. Inmunología. [Online].; 2013 [cited 2017 12 05. Available from: <http://www.scielo.org.ar/pdf/abcl/v47n1/v47n1a16.pdf>. (6)
3. Edmiston E, Ashwood P, De J Van. Author 's Accepted Manuscript and autism. Biol Psychiatry [Internet]. 2016; Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopsych.2016.08.031>. (3)
4. Ecuavisa. Autismo en el Ecuador.gop .ec 1014 [Online] [cited 2017 12 05. Available from: <http://www.ecuavisa.com/articulo/noticias/nacional/57224-se-estima-que-unos-180-mil-ninos-padecen-autismo-ecuador>. (4)
5. Flores L, Marco A. PubMed. [Online].; 2015 [cited 2017 12 05 . Available from: https://www.anmm.org.mx/GMM/2015/n2/GMM_151_2015_2_176-185.pdf. (6)
6. Ministerio de Salud Pública del Ecuador. instituciones.msp.gob.ec. [Online].; 2013 [cited 2016 05 14. Available from: http://instituciones.msp.gob.ec/documentos/Guias/Guia_de_trastornos_autistas_vos.pdf. (4)
7. Monserrat Sanz J, Gómez Lahoz AM, Sosa Reina MD, Prieto Martín A. Introducción al sistema inmune. Componentes celulares del sistema inmune innato. Med - Programa Form Médica Contin Acreditado [Online].; 2017 [cited 20171205. Available from: [http://kinghubna.Elsievr.com/retrieve/pii/S0304541216302311.es/exploracion_tratamiento/autismo\(ldh\)-4444-5.html](http://kinghubna.Elsievr.com/retrieve/pii/S0304541216302311.es/exploracion_tratamiento/autismo(ldh)-4444-5.html). (7) (10)

8. Neutrophil cytoplasmatic antibodies: a link between primary sclerosing cholangitis and ulcerative colitis. *Gastroenterology*, from: <https://www.infobioquimica.com/wrapper/CDInterpretacion/te/bc/058.htm> (14)
9. Organización Mundial de la Salud. [Online].; 2017 [cited 2017 05 14. Available from: [autismo /](#). (2)
10. Organización Mundial de la Salud. 2013. Autism spectrum disorders and other developmental disorders from raising awareness to building capacity. Ginebra Suiza. Disponible en: http://www.who.int/mental_health/maternal-child/autism_report/en/ Recuperado en: Mayo 2016.(4)
11. Torres García J, Agüero SD. Fosfolípidos: Propiedades y efectos sobre la salud. *Nutr Hosp* [Internet]. 2015 [cited 2017 Aug 7];31(1):76–83. Available from: <http://www.uss.cl/biblioteca/wp-content/uploads/2015/09/42.pdf> (13)

CITAS BIBLIOGRÁFICAS – BASE DE DATOS UTA

- **PROQUEST.** Células madre, nueva alternativa para tratar autismo. (2016, Mar 31). Notimex Retrieved from <https://search.proquest.com/docview/1777282167?accountid=36765>
- **PROQUEST.** Células madre, esperanza para tratar a pacientes con autismo. (2015, Jun 04). Notimex Retrieved from <https://search.proquest.com/docview/1686053839?accountid=36765>
- **PROQUEST.** Formisano, Yhara. Implicit Meaning Comprehension in Autism Spectrum Disorders [Internet]. Newcastle-upon-Tyne: Cambridge Scholars Publishing; 2015. [cited 2017 December 4]. Available from: ProQuest Ebook Central
- **PROQUEST.** Rivero PFP, Garrido L. Perfiles cognitivos en el Trastorno Autista de Alto Funcionamiento y el Síndrome de Asperger/Cognitive profiles on High Functioning Autistic Disorder and Asperger's Syndrome. Revista CES Psicología 2014 Jan;7(1):141-155
- **PROQUEST.** Yáñez Téllez, Ma. Guillermina. Neuropsicología de los trastornos del neurodesarrollo: diagnóstico evaluación e intervención [Internet]. México, D.F.: Editorial El Manual Moderno; 2016. [cited 2017 November 30]. Available from: ProQuest Ebook Central

ANEXOS

Anexo1.- APROBACIÓN DEL TEMA DE INVESTIGACIÓN

CONSEJO DIRECTIVO

FCS
FACULTAD DE CIENCIAS
DE LA SALUD

Resolución: CD-P-1582
Ambato, 05 de junio de 2017

Señorita
Capuz Guananga Nancy Del Pilar
ESTUDIANTE
Carrera de Laboratorio Clínico
Facultad de Ciencias de la Salud
Presente

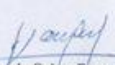
De mi consideración:


El H. Consejo Directivo de la Facultad de Ciencias de la Salud, en Sesión Ordinaria del 05 de junio de 2017, en conocimiento del oficio UTA-UAT-FCS-2017-0237-M, suscrito por el Dr. Mg. Jorge Morales Solís, Presidente, Unidad de Titulación, sugiriendo se apruebe el tema de investigación de la señorita estudiante de la Carrera de Laboratorio Clínico, al respecto.

CONSEJO DIRECTIVO, RESUELVE:


- **AUTORIZAR A LA SEÑORITA CAPUZ GUANANGA NANCY DEL PILAR, ESTUDIANTE DE LA CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO DEL CICLO ACADÉMICO MARZO- SEPTIEMBRE 2017, OPTAR POR LA MODALIDAD DE GRADUACIÓN PROYECTO DE INVESTIGACIÓN.**
- **APROBAR EL PLAN DE TRABAJO DE GRADUACIÓN O TITULACIÓN CON EL TEMA "NIVELES SÉRICOS DE AUTOANTICUERPOS ANTI-CITOPLASMA DE NEUTRÓFILOS EN SUJETOS PEDIÁTRICOS CON LOS TRASTORNOS DEL ESPECTRO AUTISTA Y SU RELACIÓN CON LOS NIVELES SÉRICOS MATERNOS", PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE LICENCIADA LABORATORIO CLÍNICO.**
- **DESIGNAR COMO TUTOR DEL TRABAJOS DE GRADUACIÓN O TITULACIÓN, AL LICENCIADO MSC. NEOMAR SEMPRÚN HERNÁNDEZ, QUIEN DEBERÁ PRESENTAR UN INFORME BIMENSUAL DE SU AVANCE Y UNO AL FINAL, DE CONFORMIDAD CON EL ART. 14 DEL REGLAMENTO DE GRADUACIÓN PARA OBTENER EL TÍTULO TERMINAL DE TERCER NIVEL DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO.**
- **AUTORIZAR A LA SEÑORITA ESTUDIANTE DE LA CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO LA ELABORACIÓN DEL TRABAJO DE GRADUACIÓN O TITULACIÓN EN LOS PLAZOS ESTABLECIDOS EN LA DISPOSICIÓN GENERAL, INCISO TERCERO Y CUARTO DEL REGLAMENTO DE REGIMEN ACADÉMICO.**

Aientamiento.


Dr. Marcelo Ochoa Egas
Presidente



C.C. **LCDO. MSC. NEOMAR SEMPRÚN HERNÁNDEZ; tutor (proyecto de investigación)**
Carpeta estudiantil
Anexo MO/SV oficio UTA-UAT-FCS-2017-00237-M (4 hojas)

 UNIVERSIDAD
TÉCNICA DE AMBATO Cda. Ingahurco Teléfono (03) 3 730 268 Ext. 5211
www.uta.edu.ec

Anexo 2.- CONSENTIMIENTO INFORMADO



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO



CONSENTIMIENTO INFORMADO

SE LE SOLICITA QUE LEA DETENIDAMENTE EL SIGUIENTE MATERIAL PARA QUE ESTÉ INFORMADO ACERCA DE LA NATURALEZA DE ESTA INVESTIGACIÓN Y DE LA FORMA EN QUE USTED PARTICIPARÁ EN ÉL, SI DIERA SU CONSENTIMIENTO PARA HACERLO. LA FIRMA DEL FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO INDICARÁ QUE USTED HA SIDO INFORMADO Y QUE ACEPTA PARTICIPAR EN EL ESTUDIO.

IDENTIFICACIÓN

Yo, _____, C.I.: _____, Edad: _____,
Domiciliado en _____, Nacionalidad
_____, Estado Civil: _____, telf. hab. _____, telf. cel.
_____. Siendo mayor de 18 años y en pleno uso de mis facultades y sin que medie coacción ni violencia alguna, en completo conocimiento de la naturaleza, forma, duración, propósito, inconvenientes y riesgos relacionados con el estudio; en calidad de representante legal del niño(a) _____ nacido(a) el ____/____/____.

DECLARO MEDIANTE LA PRESENTE

Haber sido informado de manera clara y sencilla por parte de los investigadores MSc. Neomar Semprún-Hernández y la Srta. Nancy del Pilar Capuz Guananga de todos los aspectos relacionados al proyecto.

Tener conocimiento claro que el objetivo de este estudio es analizar los niveles séricos de auto anticuerpos circulantes anti-citoplasma de neutrófilos (anti-ANCA) en sujetos pediátricos con TEA (Trastornos del espectro autista) y su relación con los niveles séricos maternos.

1. Que estoy de acuerdo en el uso, para fines de investigación, de los resultados obtenidos en el presente estudio.
2. Que mi participación en dicho estudio no implica riesgo ni inconveniente para la salud mía ni de mi representado.
3. Que bajo ningún concepto se me ha ofrecido ni pretendo recibir algún beneficio de tipo económico producto de los hallazgos que puedan producirse de dicha investigación.
4. Que los datos clínicos y experimentales obtenidos permanecerán confidenciales, a menos que sea solicitado por ley.

DECLARACION VOLUNTARIA

Luego de haber leído y comprendido la respuesta recibida a mis preguntas con respecto a este formato de consentimiento y por cuanto mi participación en este estudio es totalmente voluntaria acuerdo:

- a) La donación de manera voluntaria de dos (2) muestras de sangre, aceptando las condiciones estipuladas y autorizando al equipo de investigadores al referido estudio con las muestras biológicas de mi representado.
- b) Reservarme el derecho de revocar esta autorización así como mi participación en el proyecto, en cualquier momento, sin que ello conlleve algún tipo de consecuencia hacia mi persona y mi representado.

FIRMA DEL REPRESENTANTE

FIRMA DEL INVESTIGADOR

DECLARACION DEL INVESTIGADOR

Luego de haber explicado al voluntario la naturaleza del protocolo mencionado, certifico mediante la presente que a mi saber, el sujeto que firma este formulario de consentimiento comprende la naturaleza, requerimiento, riesgo y beneficio de la participación en este estudio. Ningún problema de índole médico, de idioma o instrucción ha impedido la clara comprensión de su compromiso con el estudio.

ANEXO 3: RESULTADOS DE LA DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES SÉRICOS DE AUTOANTICUERPOS ANTI-CITOPLASMA DE NEUTRÓFILO.

N°	NIVELES DE PROTEINASA SUJETOS PEDIATRICOS CON TEA	NIVELES DE PROTEINAS A MADRES DE SUJETOS PEDIATRICOS CON TEA	NIVELES DE PROTEINAS A SUJETOS PEDIATRICOS CON DESARROLLO TIPICO	NIVELES DE PROTEINAS A MADRES DE SUJETOS	NIVELES DE MIELOPEROXIDASA SUJETOS PEDIATRICOS CON TEA	NIVELES DE MIELOPEROXIDASA MADRES DE SUJETOS PEDIATRICOS CON TEA	NIVELES DE MIELOPEROXIDASA SUJETOS PEDIATRICOS CON DESARROLLO TIPICO	NIVELES DE MIELOPEROXIDASA MADRES SUJETOS PEDIATRICOS CON DESARROLLO TIPICO
1	13,14	14,64	3,4	4,28	1,73	4,4	1,27	1,49
2	4,14	8,73	3,97	4,6	3,3	4,8	2,4	1,92
3	7,76	13,67	4,77	9,88	4,27	4,1	2,15	2,46
4	4,68	3,54	4,08	4,71	2,09	1,33	1,76	2,03
5	3,57	4,42	3,2	4,34	1,23	9,6	1,83	2,06
6	4,2	3,02	4,42	4,11	1,06	1,96	1,24	1,4
7	4,88	4,51	3,8	4,28	1,06	1,26	1,15	1,21
8	4,94	3,31	3,48	3,68	1,12	1,47	1,72	2,23
9	4,17	3,82	8,95	4,31	1,66	2,06	1,56	1,93
10	3,42	4,74	5,8	4,65	8,92	9,6	1,56	1,96
11	3,6	4,45			1,78	4		
12	4,22	3,34			1,26	1,86		
13	4,48	3,45			1,67	1,44		
14	4,77	3,65			9,7	2,21		
15	4,05	4,2			1,41	1,87		
16	4,71	3,62			4,15	2,27		
17	3,54	4,45			1,01	1,53		
18	4,65	4,31			1,55	2,21		
19	4,48	4,97			1,41	1,98		
20	14,11	15,9			5,68	1,61		
21	4,31	3,65			1,61	1,86		
22	3,37	4,17			4,2	1,96		
23	4,34	4,42			1,78	4,5		
24	16,11	12,52			6,79	12,9		
25	3,45	3,91			4,45	5,82		
26	4,88	4,31			1,64	2,49		
27	3,48	4,71			4,1	1,83		
28	3,31	9,17			2,18	1,41		
29	3,28	3,11			1,96	2,04		
30	3,14	3,62			1,8	2,4		

ANEXO 4: CONSIDERACIONES ÉTICAS

Participación de seres humanos

Para la ejecución del presente proyecto de investigación se buscó una población conformada por niños pediátricos con TEA y sus madres así como también niños pediátricos controles y sus madres, a los cuales se les tomó una muestra para la determinación de los niveles séricos de autoanticuerpos anti- citoplasma de neutrófilos.

Proceso del consentimiento informado

- Se les brindo a las madres de los niños TEA y controles la información adecuada sobre el proyecto de investigación a realizarse.
- Se les pregunto a las madres si comprendieron toda la información proporcionada.
- Una vez aclarado las dudas sobre el estudio se procedió a la entrega del consentimiento y asentamiento informado.
- Las madres de familia procedieron a firmar libre y voluntariamente el consentimiento y asentamiento informado para su participación en el estudio.

Consecuencias de la participación en el estudio.

Beneficios: en la realización del proyecto de investigación los pacientes que acudieron miembros de la fundación APADA ECUADOR en las ciudades de Quito y Riobamba los mismos que fueron beneficiados por que los exámenes de laboratorio realizado no tuvo un valor a cancelar, este fue gratuito y los resultados serán entregados en sobre cerrado a la directora de la fundación para que posteriormente ella se los entregue a los pacientes.

Efectos adversos: por la edad y por ser niños especiales será un poco complicado realizar la extracción sanguínea, mismo que va a sentir un poco de dolor y adicionalmente se puede producir hematoma que con el pasar de los días desaparecerá.

Confidencialidad de la información

Luego de obtener los resultados del examen de laboratorio de cada uno de los pacientes, estos fueron manejados con absoluta confidencialidad y discreción por la parte investigadora.

ANEXO 5: AUTORIZACIÓN DE LA COORDINADORA PARA UTILIZAR EL LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO.

Ambato, 7 de septiembre de 2017


Bqf.
Martha Ramos
COORDINADORA DE LA LABORATORIO CLÍNICO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
Presente


De nuestras consideraciones:
Nosotros estudiante de Décimo semestre "U" de la Carrera de Laboratorio Clínico, nos dirigimos a usted de la manera más comedida para solicitarle se me permita utilizar el Laboratorio de Biología Molecular los días:

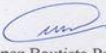
- Capuz Guananga Nancy del Pilar los días 11 y 12 de septiembre del presente año.
Examen de Anti -mieloperoxidasa y Anti - proteinasa 3
- Villacis Villacis Liliana Carolina los días 13 y 14 de septiembre del presente año
Examen Anticardiolipina y Anti - beta 2, Glicoproteína.
- López Bautista Paúl Santiago los días 15 y 18 de septiembre del presente año.
Examen Antigladina y Anti - CCP


Por la gentil atención a lo manifestado, nos suscribimos de Usted.

Atentamente


Capuz Guananga Nancy del Pilar
C.C. 1804247755


Villacis Villacis Liliana Carolina
C.C. 0503293227


López Bautista Paúl Santiago
C.C. 0503697930


UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
COORDINACIÓN LABORATORIO CLÍNICO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

Dr. Dione Jorjachs
Favor
wordina
lo p. Bautista

ANEXO 6: AMPLIACIÓN DE MÉTODOS Y PROCEDIMIENTOS.



AESKULISA[®]
THE DIAGNOSTIC TOOL THAT WORKS

**INSTRUCTION
MANUAL**

1 Utilización

AESKULISA MPO es un enzimoimmunoensayo en fase sólida que emplea mieloperoxidasa (MPO) nativa elevadamente purificada a partir de células polimorfonucleares de sangre periférica humana para la detección cuantitativa y cualitativa de anticuerpos contra MPO en suero humano. Los anticuerpos anti-MPO reconocen epítopos conformacionales específicos en la MPO nativa.

El ensayo es una herramienta para el diagnóstico de vasculitis sistémica autoinmune.

2 Aplicación clínica y principio del ensayo

Los anticuerpos contra mieloperoxidasa (MPO) pertenecen al grupo de los anticuerpos anti-citoplasma del neutrófilo (ANCA) los cuales se dirigen contra componentes citoplasmáticos de los granulocitos del neutrófilo y monocitos. El test de inmunofluorescencia indirecta en neutrófilos fijados en etanol ha sido el método establecido para la detección de los ANCAs. Era aparente que algunos ANCAs creaban un patrón de fluorescencia citoplasmática (de ahí llamado cANCA) mientras que otros creaban un patrón perinuclear (el pANCA). Debido a que ambos patrones pueden cubrir múltiples antígenos, la inmunofluorescencia no es adecuada para satisfacer un diagnóstico diferencial de vasculitis; de ahí que cada test de IFI deba ser verificado con tests ELISA específicos.

Mientras que la proteinasa 3 es el antígeno específico principal para cANCA, se identificó que el principal antígeno para pANCA es la MPO pero otros componentes celulares (p.ej. lactoferrina, catepsina G, elastasa) pueden causar tinción perinuclear.

La MPO es un enzima de los gránulos primarios de los neutrófilos con un peso molecular de aproximadamente 140 kDa. Su carga elevadamente negativa puede ser relevante para la localización en estructuras cargadas positivamente como la membrana nuclear y DNA, de ahí que sea responsable del patrón de tinción perinuclear de los anticuerpos anti-MPO en sueros de pacientes cuando se usan neutrófilos fijados en etanol en IFI.

Los ANCAs son marcadores importantes para el diagnóstico diferencial de la vasculitis autoinmune. Los anticuerpos contra MPO correlacionan con la vasculitis idiopática o asociada a glomerulonefritis crónica necrotizante y se encuentran frecuentemente en el 70% de los pacientes con poliangitis microscópica y el 5-50% de pacientes con el síndrome de Churg-Strauss.

Principio del test

Las muestras de suero diluidas 1:101 se incuban en la microplaca revestida con el antígeno específico. Los anticuerpos de los pacientes, si están presentes en la muestra, se unen al antígeno. La fracción no unida es eliminada por el lavado en el paso siguiente. Después, las inmunoglobulinas anti-humanas conjugadas con peroxidasa (conjugado) se incuban y reaccionan con el complejo antígeno-anticuerpo de las muestras dentro de la microplaca. El conjugado no unido es retirado a través del lavado en el paso siguiente. La adición del sustrato-TMB genera una reacción colorimétrica (azul) enzimática que se detiene a través de ácido diluido (el color cambia a amarillo). La intensidad de formación de color a partir del cromógeno depende de la cantidad de conjugado unido al complejo antígeno-anticuerpo y es proporcional a la concentración inicial de los respectivos anticuerpos en la muestra del paciente.



Product Ref.	3303
Product Desc.	MPO
Manual Rev. No.	003 : 2013-10-10

3 Contenido del equipo

PARA SER RECONSTITUIDO				
Artículo	Cantidad	Color del tapón	Color de la solución	Descripción/Contenido
Tampón de muestra (5x)	1 x 20 ml	Blanco	Amarillo	Concentrado 5 x Tris, Cloruro de sodio (NaCl), a búmerina de suero bovino (BSA, por sus siglas en inglés), azida sódica < 0,1 % (conservante)
Tampón de lavado (50x)	1 x 20 ml	Blanco	Verde	Concentrado 50 x Tris, Cloruro de sodio (NaCl), Tween 20, azida sódica < 0,1 % (conservante)
LISTO PARA EL USO				
Artículo	Cantidad	Color del tapón	Color de la solución	Descripción/Contenido
Control negativo	1 x 1,5 ml	Verde	Incoloro	Suero humano (diluido), albúmina de suero bovino (BSA), azida sódica < 0,1 % (conservante)
Control positivo	1 x 1,5 ml	Rojo	Amarillo	Suero humano (diluido), albúmina de suero bovino (BSA), azida sódica < 0,1 % (conservante)
Calibrador cut-off	1 x 1,5 ml	Azul	Amarillo	Suero humano (diluido), albúmina de suero bovino (BSA), azida sódica < 0,1 % (conservante)
Control positivo	1 x 1,5 ml	Rojo	Amarillo	Suero humano (diluido), albúmina de suero bovino (BSA), azida sódica < 0,1 % (conservante)
Calibrador cut-off	1 x 1,5 ml	Azul	Amarillo	Suero humano (diluido), albúmina de suero bovino (BSA), azida sódica < 0,1 % (conservante)
Calibradores	6 x 1,5 ml	Blanco	Amarillo *	Concentración de cada cal brador: 0, 3, 10, 30, 100, 300 U/ml. Suero humano (diluido), albúmina de suero bovino (BSA), azida sódica < 0,1 % (conservante)
Conjugado, IgG	1 x 15 ml	Azul	Azul	Contiene: Inmunoglobulinas anti-humanas conjugadas con peroxidasa de rábano picante, albúmina de suero bovino (BSA)
Substrato TMB	1 x 15 ml	Negro	Incoloro	Terametilbenzidina estabilizada y peróxido de hidrógeno (TMB/H ₂ O ₂)
Solución de paro	1 x 15 ml	Blanco	Incoloro	Ácido clorhídrico 1M
Placa Microtiter	12 x 8 tiras de pocillos	N/D	N/D	Con tiras rompibles de pocillos. Consulte el párrafo 1 para obtener información sobre revestimiento.
* La intensidad del color aumenta con la concentración				
MATERIAL NECESARIO PERO NO SUMINISTRADO				
Filtro de lectura de 450 nm para lector de tiras Microtiter y filtro de referencia recomendado de 620 nm (600-690 nm). Equipo de cristal (cilindro 100-1000 ml), tubos de ensayo para disoluciones. Mezclador espiral, pipetas de precisión (10, 100, 200, 500, 1000 µl) o pipeta múltiple ajustable (100-1000 µl). Dispositivo de lavado de la microplaca (pipeta de repetición o microcanal de 300 µl o sistema automatizado), papel absorbente. Nuestras pruebas se han diseñado para uso con agua destilada, de acuerdo con la definición de las farmacopeas de Estados Unidos (USP 26 - NF 21) y Europa (Eur.Ph. 4ª ed.).				

4 Almacenamiento y Caducidad

Guarde todos los reactivos y la microplaca a 2-8°C/35-46°F, en sus envases originales. Una vez preparadas, las soluciones reconstituidas son estables durante 1 mes a 2-8°C/35-46°F, por lo menos. Los reactivos y la microplaca deben ser utilizados solamente dentro del margen de caducidad indicado en cada componente. Evite la exposición de la solución TMB a la luz intensa. Guarde las microplacas en su sobre correspondiente, incluyendo el desecante, y séllelo bien.

	Product Ref.	3303
	Product Desc.	MPO
	Manual Rev. No.	003 : 2013-10-10

5 Precauciones

5.1 Datos de riesgo para la salud

ESTE PRODUCTO ES SOLO PARA EL USO EN DIAGNÓSTICO IN VITRO . Por lo tanto, solamente el personal formado y especialmente asesorado en los métodos de diagnóstico in vitro puede realizar el ensayo. Aunque este producto no se considera especialmente tóxico ni peligroso en las condiciones de uso previsto, siga estas recomendaciones para garantizar un nivel de seguridad óptimo:

Recomendaciones y precauciones

Este equipo contiene componentes potencialmente peligrosos. Aunque los reactivos del equipo no están clasificados como irritantes de los ojos y la piel, recomendamos evitar el contacto de los mismos con los ojos y con la piel y utilizar guantes desechables.

¡AVISO! Los calibradores, controles y agentes contienen ázida de sodio (NaN_3) como conservante. El NaN_3 puede ser tóxico si se ingiere o se absorbe por medio de la piel o de los ojos. El NaN_3 puede reaccionar con la fontanería de plomo y de cobre y formar ázida metálica muy explosiva. Al tirar tirarla, deje correr una gran cantidad de agua para evitar que la ázida tome consistencia. Por favor, consulte los procesos de descontaminación del CDC u otras directrices locales o nacionales.

No fume, coma o beba mientras manipule el equipo. No pipetee con la boca.

Todo el material de fuente humana utilizado en algunos reactivos de este equipo (por ejemplo controles, standards) ha sido analizado a través de métodos aprobados y ha resultado ser negativo para HbsAg, Hepatitis C y HIV 1. No obstante, ningún test puede completamente garantizar la ausencia de agentes virales en ese tipo de material. Por lo tanto, manipule los controles, standards y muestras de los pacientes como si se trataran de auténticos transmisores de enfermedades infecciosas y según los requerimientos de manipulación de su país.

Como se indica en la sección Contenido del equipo, el equipo contiene material de origen animal que debe manipularse de acuerdo con la normativa nacional.

5.2 Instrucciones generales para la utilización

En caso de que observe defectos o datos incorrectos en la información del producto, incluidas las etiquetas, póngase en contacto con el fabricante o proveedor del producto.

No mezcle o sustituya Control, Calibradores, Conjugado o microplacas de números de lote diferentes. Esto podría llevar a una variación de los resultados.

Deje que todos los componentes alcancen la temperatura (20-32°C/68-89,6°F) antes de utilizarlos. Agítelos bien y siga el esquema de incubación recomendado para una óptima realización del ensayo.

Incubación: Se recomienda realizar las pruebas a 30°C/86°F para sistemas automatizados.

No exponga nunca los componentes a temperaturas más altas de 37°C/ 98,6 °F.

Pipetee siempre la solución de substrato con puntas nuevas. Protega este reactivo de la luz. Nunca pipetee el conjugado con puntas previamente utilizadas con otros reactivos.

Un diagnóstico clínico definitivo no debe estar basado solamente en los resultados del ensayo realizado. Debe ser elaborado por el médico después de haber evaluado todos los hallazgos clínicos y de laboratorio. Es necesario verificar el diagnóstico por medio de distintos métodos.



Product Ref.	3303
Product Desc.	MPO
Manual Rev. No.	003 : 2013-10-10

6 Toma, manipulación y almacenamiento de las muestras

Utilice preferentemente muestras de suero recién extraídas. La extracción de sangre debe seguir los requerimientos de protocolo de su país.

No utilice muestras ictericas, lipémicas, hemolizadas o contaminadas por bacterias. Los sueros con partículas deben ser purificados por centrifugación a baja velocidad (<1000 x g). Las muestras de sangre deben ser recogidas en tubos limpios, secos y vacíos.

Tras la separación, las muestras de plasma han de utilizarse durante las primeras 8 horas y conservarse herméticamente cerradas a 2-8°C/35-46°F hasta 48 horas o congeladas a -20°C/-4°F durante periodos más prolongados

7 Procedimiento del ensayo

7.1 Preparativos antes de dispensar

Diluya los reactivos concentrados:

Diluya el tampón de muestra concentrado a 1:5 con agua destilada (p.e. 20 ml en 80 ml)

Diluya el tampón de lavado concentrado a 1:50 con agua destilada (p.e. 20 ml en 980 ml).

A fin de evitar errores, es aconsejable marcar las tapas de los distintos calibradores.

Muestras:

Diluya las muestras de suero a 1:101 con tampón de muestra (1x)

p.e. 1000 µl tampón de muestra (1x) + 10 µl suero. Mezcle bien la dilución.

Lavado:

Prepare 20 ml de tampón de lavado diluido (1x) para 8 pocillos o 200 ml para 96 pocillos p.e. 4 ml de concentrado en 196 ml de agua destilada.

Lavado automático:

Tenga en cuenta los volúmenes de exceso requeridos para purgar el instrumento y el volumen muerto en el dispensador del aparato.

Lavado manual:

Descarte el líquido de los pocillos invirtiendo la placa. Golpee vigorosamente el marco con los micropocillos sobre papel absorbente limpio manteniendo la placa invertida. Dispense 300 µl de tampón de lavado diluido dentro de cada pocillo y espere 20 segundos. Repita el procedimiento entero dos veces más.

Microplacas:

Calcule el número de pocillos necesarios para el ensayo. Saque los pocillos no utilizados del marco, póngalos de nuevo en la bolsa de plástico suministrada junto con el desecante y sellela bien (2-8°C/35-46°F).

7.2 Esquema de dispensación

Se sugiere dispensar los calibradores, controles y muestras como sigue:

Para una interpretación cuantitativa					Para una interpretación cualitativa				
	1	2	3	4...		1	2	3	4...
A	Cal A	Cal E	P1		A	NC	P2		
B	Cal A	Cal E	P1		B	NC	P2		
C	Cal B	Cal F	P2		C	CC	P3		
D	Cal B	Cal F	P2		D	CC	P3		
E	Cal C	PC	P3		E	PC	...		
F	Cal C	PC	P3		F	PC	...		
G	Cal D	NC	...		G	P1	...		
H	Cal D	NC	...		H	P1	...		

CalA: calibrator A

CalD: calibrator D

PC: positive control

P1: patient 1

CalB: calibrator B

CalE: calibrator E

NC: negative control

P2: patient 2



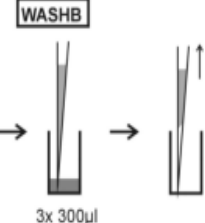
CalC: calibrator C

CalF: calibrator F

CC: cut-off calibrator

P3: patient 3

7.3 Esquema de trabajo

Paso	Descripción
1.	Asegúrese de que los preparativos del paso 7.1 (arriba) se han llevado a cabo antes del pipeteado.
2.	Siga los pasos descritos a continuación de acuerdo con los resultados de interpretación cuantitativa y cualitativa que se deseen obtener:
CONTROLES y MUESTRAS	
3.	 <p>Pipetee en los pocillos designados (tal como se describe en el capítulo 7.2) 100 µl de:</p> <ol style="list-style-type: none"> Calibradores (CAL.A a CAL.F) para interp. CUANTITATIVA o Calibrador cut-off (CC) para interp. CUALITATIVA y 100 µl de cada uno de los siguientes: <ul style="list-style-type: none"> Control negativo (CN) y control positivo (CP), y Suero diluido de los pacientes (P1, P2...)
4.	 <p>Incube durante 30 minutos a 20-32°C/68-89,6°F.</p>
5.	 <p>Lave tres veces con 300 µl de tampón de lavado (diluido al 1:50).</p>



Product Ref.	3303
Product Desc.	MPO
Manual Rev. No.	003 : 2013-10-10

CONJUGADO	
6.	<div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="margin-right: 20px;"> </div> <div> <p>Pipetee 100 µl de conjugado en cada pocillo.</p> </div> </div>
7.	<div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="margin-right: 20px;"> </div> <div> <p>Incube durante 30 minutos a 20-32°C/68-89,6°F.</p> </div> </div>
8.	<div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="margin-right: 20px;"> </div> <div> <p>Lave tres veces con 300 µl de tampón de lavado (diluido al 1:50).</p> </div> </div>
SUBSTRATO	
9.	<div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="margin-right: 20px;"> </div> <div> <p>Pipetee 100 µl de substrato TMB en cada pocillo.</p> </div> </div>
10.	<div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="margin-right: 20px;"> </div> <div> <p>Incube durante 30 minutos a 20-32°C/68-89,6°F y evite que reciba luz intensa.</p> </div> </div>
PARO	
11.	<div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="margin-right: 20px;"> </div> <div> <p>Pipetee 100 µl de solución de paro en cada pocillo siguiendo el mismo orden que al pipetear el substrato.</p> </div> </div>
12.	<div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="margin-right: 20px;"> </div> <div> <p>Incube durante 5 minutos como mínimo.</p> </div> </div>
13.	<p>Agite la placa suavemente durante 5 seg.</p>
14.	<div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="margin-right: 20px;"> </div> <div> <p>Lea la absorbancia a 450 nm (se recomienda 450/620 nm) durante los 30 minutos siguientes.</p> </div> </div>

8 Interpretación Cuantitativa y Cualitativa

Para una **interpretación cuantitativa** establezca la curva standard trazando la densidad óptica(DO) de cada calibrador (eje y) con respecto a los correspondientes valores de concentración en U/ml (eje x). Para unos mejores resultados recomendamos coordenadas log/lin y un ajuste a 4-PL. Partiendo de la DO de cada muestra, lea la correspondiente concentración de anticuerpo expresada en U/ml.

Rango Normal	Indeterminado	Resultados Positivos
< 12 U/ml	12 - 18 U/ml	>18 U/ml

Ejemplo de curva standard

NO utilice este ejemplo para interpretar el resultado del paciente

Calibradores IgG	DO 450/620 nm	CV % (Variación)
0 U/ml	0,055	0,1
3 U/ml	0,195	0,7
10 U/ml	0,400	2,4
30 U/ml	0,785	0,5
100 U/ml	1,440	1,7
300 U/ml	2,300	0,9

Ejemplo de cálculo

Paciente	Replicado (DO)	Media (DO)	Resultado (U/ml)
P 01	0,794/0,792	0,793	32,1
P 02	1,345/1,321	1,333	84,5

Las muestras que se encuentren por encima del rango máximo de calibrador se deberán especificar como >Máx. Será necesario diluirlas según se considere apropiado y repetir el ensayo. Las muestras que se encuentren por debajo del rango del calibrador deberán especificarse como < Mín.

Para conocer los datos específicos de lote, consulte el documento adjunto de control de calidad. Los laboratorios deberían realizar un Control de Calidad interno utilizando controles propios y/o un „pool“ de sueros interno tal y como contemplan las regulaciones nacionales.

Cada laboratorio debería establecer su rango normal propio basado en sus propias técnicas, controles, equipamiento y población según sus propios procedimientos establecidos.

En caso de que los valores de los controles no se ajusten a los criterios, el ensayo se considerará válido y deberá repetirse.

Será necesario realizar las siguientes comprobaciones de problemas técnicos: Fechas de caducidad de los reactivos (preparados), condiciones de almacenamiento, pipetas, dispositivos, fotómetro, condiciones de incubación y métodos de lavado.

Si al analizar los elementos se obtuvieron valores exagerados, se produjo algún tipo de desviación o los criterios de validación no se cumplieron por motivos inexplicables, póngase en contacto con el fabricante o el proveedor del producto.

Para la **interpretación cualitativa** lea la densidad óptica del calibrador cut-off y la de las muestras de los pacientes. Compare las DO de los pacientes con la DO del calibrador cut-off. Para la interpretación cualitativa, recomendamos que establezca un rango del 20% al rededor del valor del cut-off como zona indeterminada. Todas las muestras que tengan DO superior a este rango se consideran positivas y las muestras con valores de DO inferiores a este rango se consideran negativas.:

Negativo		DO paciente	<	0,8 x DO cut-off	
Indeterminado	0,8 x	DO cut-off	≤	DO paciente	≤ 1,2 x DO cut-off
Positivo		DO paciente	>	1,2 x OD cut-off	

9 Datos Técnicos

Muestra:	suero
Volumen de muestra:	10 µl de muestra diluida a 1:101 con tampón de muestra 1x
Tiempo total de incubación:	90 minutos a temperatura 20-32°C/68-89,6°F
Rango de calibración:	0-300 U/ml
Sensibilidad analítica:	1,47 U/ml
Almacenamiento:	a 2-8°C/35-46°F utilice solo los viales originales
Número de determinaciones:	96 tests

10 Datos de funcionamiento

10.1 Sensibilidad analítica

Los 60 análisis del tampón de muestra en AESKULISA MPO y los 8 análisis de 8 muestras de bajo negativo arrojaron un límite de detección de 1,47 U/ml.

10.2 Especificidad y Sensibilidad

Las microplacas se han revestido con mieloperoxidasa humana nativa. Los anticuerpos contra MPO se correlacionan con la glomerulonefritis rápidamente progresiva y necrotizante de origen idiopático o asociada con una vasculitis y se encuentran frecuentemente en alrededor del 60% de los pacientes con poliangeítis microscópica, en el 10-20% de pacientes con granulomatosis de Wegener y en el 30-50% de pacientes con el síndrome de Churg-Strauss.^{3,10}

Se analizaron 151 sueros de pacientes con granulomatosis de Wegener, poliangeítis microscópica y otras enfermedades autoinmunes en el AESKULISA MPO y en un dispositivo homologado; de estos, 79 sueros estaban dentro del rango del ensayo y se utilizaron para un estudio comparativo frente a un dispositivo homologado.

AESKULISA MPO	Dispositivo homologado				
		POS.	Equívocos	NEG.	Total
	POS.	39	4	0	43
	Neg.	0	7	29	36
	Total	39	11	29	79

		Índice de confianza del 95%
Porcentaje de coincidencia general*	94,9%	de 87,7% a 98,0%
Porcentaje de coincidencia positiva	100%	de 91,0% a 100%
Porcentaje de coincidencia negativa*	90,0%	de 77,0% a 96,0%

* Para este cálculo, un resultado equívoco del dispositivo homologado se ha considerado como negativo.

Para un estudio comparativo clínico, solo se consideraron como positivas para el cálculo de la sensibilidad/especificidad diagnóstica las muestras que claramente debían contener anticuerpos MPO (glomerulonefritis, poliangeítis microscópica); el resto de los diagnósticos, aun con una posible presencia de anticuerpos MPO, se consideraron "como si fueran negativos" (datos completos disponibles previa solicitud).



AESKULISA MPO	Diagnóstico			Total
	POS.	NEG.		
	32	6		38
	2	99		101
Total	34	105		139

		Índice de confianza del 95%
Porcentaje de coincidencia general*	94,2%	de 89,1% a 97,1%
Porcentaje de coincidencia positiva*	94,1%	de 80,9% a 98,4%
Porcentaje de coincidencia negativa*	94,3%	de 88,1% a 97,4%

* Solo se han considerado las muestras con enfermedades con una presencia clara de anticuerpos MPO.

Número de muestras con	AESKULISA MPO		
	POS.	NEG.	Total
Diagnóstico			
Pérdida de audición aguda	1	0	1
Enfermedad renal crónica	0	1	1
Churg-Strauss	0	2	2
EPOC	3	0	3
Enfermedad de Crohn	0	6	6
Endocarditis	0	1	1
Síndrome de Goodpasture	0	1	1
Sanos	1	0	1
VIH	0	1	1
Parálisis	0	1	1
Polimialgia reumática (vasculitis)	0	1	1
Artritis reactiva	0	21	21
Artritis reumatoide	0	1	1
LES	1	0	1
Colitis ulcerosa	0	6	6
Colitis ulcerosa (infección fúngica séptica)	0	1	1
Granulomatosis de Wegener	0	56	56
Glomerulonefritis (c-ANCA positivo)*	0	1	1
Glomerulonefritis*	2	0	2
Neurodegeneración asociada a la proteína de membrana mitocondrial*	30	0	30
Granulomatosis de Wegener/glomerulonefritis*	0	1	1
Total	38	101	139

 AESKU DIAGNOSTICS <small>THE DIAGNOSTIC TOOL THAT WORKS</small>	Product Ref.	3303
	Product Desc.	MPO
	Manual Rev. No.	003 : 2013-10-10

10.3 Linealidad

Se han analizado con este equipo sueros seleccionados y se encontró que debían diluirse linealmente. No obstante, debido a la naturaleza heterogénea de los autoanticuerpos humanos, pueden haber muestras que no sigan esta regla.

Muestra N°	Factor de dilución	concentración medida (U/ml)	concentración esperada (U/ml)	Recuperación (%) 90-110%
1	1 / 100	76,5	78,0	98,1
	1 / 200	37,3	39,0	95,6
	1 / 400	19,2	19,5	98,5
	1 / 800	9,4	9,8	95,9
2	1 / 100	32,8	33,0	99,4
	1 / 200	17,4	16,5	105,5
	1 / 400	9,0	8,3	108,4
	1 / 800	4,2	4,1	102,4
3	1 / 100	342,15	325	105,3
	1 / 200	177,5	162,5	109,2
	1 / 400	85,8	81,25	105,6
	1 / 800	42	40,625	103,4
4	1 / 100	235,5	252	93,5
	1 / 200	121,15	126	96,2
	1 / 400	60,3	63	95,7
	1 / 800	33,65	31,5	106,8

10.4 Precisión

Para determinar la precisión del ensayo, se valoró la variabilidad (intra e inter-ensayo) a través del análisis de su reproducibilidad en ocho muestras de suero. Estas muestras fueron seleccionadas para representar un rango por encima de la curva standard.

Intraensayo			Interensayo			Variabilidad lote a lote		
N.º de muestra	Media (U/ml)	CV (%)	N.º de muestra	Media (U/ml)	CV (%)	N.º de muestra	Media (U/ml)	CV (%)
1	6,2	14,3	1	6,2	14,4	1	6,2	12,7
2	7,1	10,6	2	7,1	10,8	2	7,0	10,8
3	10,1	9,0	3	10,1	8,8	3	10,1	8,8
4	14,6	9,4	4	14,6	9,3	4	14,3	9,2
5	25,9	8,0	5	28,9	7,7	5	25,6	6,5
6	38,6	1,6	6	38,6	1,7	6	32,7	3,7
7	78,5	2,5	7	78,5	3,0	8	162,3	7,4
8	173,9	5,7	8	173,9	5,8	9	53,5	8,2

10.5 Calibración

Debido a la no existencia de una calibración de referencia internacional, este ensayo está calibrado en unidades arbitrarias (U/ml).



1 Utilización

AESKULISA PR3 sensitive es un enzimoimmunoensayo en fase sólida que emplea proteinasa 3 humana nativa elevadamente purificada a partir de granulocitos de neutrófilo humano para la detección cuantitativa y cualitativa de anticuerpos contra proteinasa 3 en suero humano. Los anticuerpos anti-PR3 reconocen específicamente epítopos conformacionales solamente accesibles en la PR3 nativa.

El ensayo es una herramienta para el diagnóstico de vasculitis sistémica autoinmune.

2 Aplicación clínica y principio del ensayo

Los anticuerpos contra proteinasa 3 (PR3) pertenecen al grupo de los anticuerpos anti-citoplasma del neutrófilo (ANCA) los cuales se dirigen contra componentes citoplasmáticos de los granulocitos del neutrófilo y monocitos. El test de inmunofluorescencia indirecta en neutrófilos fijados en etanol ha sido el método establecido para la detección de los ANCA. Era aparente que algunos ANCA creaban un patrón de fluorescencia citoplasmático (de ahí llamado cANCA) mientras que otros creaban un patrón perinuclear (el pANCA). Debido a que ambos patrones pueden cubrir múltiples antígenos, la inmunofluorescencia no es adecuada para satisfacer un diagnóstico diferencial de vasculitis; de ahí que cada test de IFI deba ser verificado con tests ELISA específicos.

La PR3 es una serin proteasa de los gránulos azurófilos (lisosomas) de los neutrófilos con un peso molecular de 29 kDa. La proteína catiónica tiene una actividad proteolítica hacia la elastina, hemoglobina y el colágeno VII. Además, la PR3 promueve la activación de las plaquetas por la catepsina G e inactiva al inhibidor C1.

Los ANCA son importantes marcadores para el diagnóstico diferencial de la vasculitis autoinmune. Los autoanticuerpos contra PR3 son marcadores serológicos específicos para la granulomatosis de Wegener (GW). Aunque la etiología y patogénesis es aún oscura, se piensa que los autoanticuerpos contra PR3 juegan un papel activo en la patogénesis de la GW. Los títulos de anti-PR3 están fuertemente asociados con la actividad de la enfermedad e inhiben la actividad proteolítica de la PR3.

Principio del test

Las muestras de suero diluidas 1:101 se incuban en la microplaca revestida con el antígeno específico. Los anticuerpos de los pacientes, si están presentes en la muestra, se unen al antígeno. La fracción no unida es eliminada por el lavado en el paso siguiente. Después, las inmunoglobulinas anti-humanas conjugadas con peroxidasa (conjugado) se incuban y reaccionan con el complejo antígeno-anticuerpo de las muestras dentro de la microplaca. El conjugado no unido es retirado a través del lavado en el paso siguiente. La adición del substrato-TMB genera una reacción colorimétrica (azul) enzimática que se detiene a través de ácido diluido (el color cambia a amarillo). La intensidad de formación de color a partir del cromógeno depende de la cantidad de conjugado unida al complejo antígeno-anticuerpo y es proporcional a la concentración inicial de los respectivos anticuerpos en la muestra del paciente.

3 Contenido del equipo

PARA SER RECONSTITUIDO				
Artículo	Cantidad	Color del tapón	Color de la solución	Descripción/Contenido
Tampón de muestra (5x)	1 x 20 ml	Blanco	Amarillo	Concentrado 5 x Tris, Cloruro de sodio (NaCl), a búmina de suero bovino (BSA, por sus siglas en inglés), azida sódica < 0,1 % (conservante)
Tampón de lavado (50x)	1 x 20 ml	Blanco	Verde	Concentrado 50 x Tris, Cloruro de sodio (NaCl), Tween 20, azida sódica < 0,1 % (conservante)
LISTO PARA EL USO				
Artículo	Cantidad	Color del tapón	Color de la solución	Descripción/Contenido
Control negativo	1 x 1,5 ml	Verde	Incoloro	Suero humano (diluido), albúmina de suero bovino (BSA), azida sódica < 0,1 % (conservante)
Control positivo	1 x 1,5 ml	Rojo	Amarillo	Suero humano (diluido), albúmina de suero bovino (BSA), azida sódica < 0,1 % (conservante)
Calibrador cut-off	1 x 1,5 ml	Azul	Amarillo	Suero humano (diluido), albúmina de suero bovino (BSA), azida sódica < 0,1 % (conservante)
Calibradores	6 x 1,5 ml	Blanco	Amarillo *	Concentración de cada cal brador: 0, 3, 10, 30, 100, 300 U/ml. Suero humano (diluido), albúmina de suero bovino (BSA), azida sódica < 0,1 % (conservante)
Conjugado, IgG	1 x 15 ml	Azul	Azul	Contiene: Inmunoglobulinas anti-humanas conjugadas con peroxidasa de rábano picante, albúmina de suero bovino (BSA)
Substrato TMB	1 x 15 ml	Negro	Incoloro	Terametilbenzidina estabilizada y peróxido de hidrógeno (TMB/H ₂ O ₂)
Solución de paro	1 x 15 ml	Blanco	Incoloro	Ácido clorhídrico 1M
Placa Microtiter	12 x 8 tiras de pocillos	N/D	N/D	Con tiras rompibles de pocillos. Consulte el párrafo 1 para obtener información sobre revestimiento.
* La intensidad del color aumenta con la concentración				
MATERIAL NECESARIO PERO NO SUMINISTRADO				
Filtro de lectura de 450 nm para lector de tiras Microtiter y filtro de referencia recomendado de 620 nm (600-690 nm). Equipo de cristal (cilindro 100-1000 ml), tubos de ensayo para disoluciones. Mezclador espiral, pipetas de precisión (10, 100, 200, 500, 1000 µl) o pipeta múltiple ajustable (100-1000 µl). Dispositivo de lavado de la microplaca (pipeta de repetición o microcanal de 300 µl o sistema automatizado), papel absorbente. Nuestras pruebas se han diseñado para uso con agua destilada, de acuerdo con la definición de las farmacopeas de Estados Unidos (USP 26 - NF 21) y Europa (Eur.Ph. 4ª ed.).				

4 Almacenamiento y Caducidad

Guarde todos los reactivos y la microplaca a 2-8°C/35-46°F, en sus envases originales. Una vez preparadas, las soluciones reconstituidas son estables durante 1 mes a 2-8°C/35-46°F, por lo menos. Los reactivos y la microplaca deben ser utilizados solamente dentro del margen de caducidad indicado en cada componente. Evite la exposición de la solución TMB a la luz intensa. Guarde las microplacas en su sobre correspondiente, incluyendo el desecante. v séllelo bien.



Product Ref.	3302
Product Desc.	PR3 sensitive
Manual Rev. No.	003 : 2013-10-10

5 Precauciones

5.1 Datos de riesgo para la salud

ESTE PRODUCTO ES SOLO PARA EL USO EN DIAGNÓSTICO IN VITRO . Por lo tanto, solamente el personal formado y especialmente asesorado en los métodos de diagnóstico in vitro puede realizar el ensayo. Aunque este producto no se considera especialmente tóxico ni peligroso en las condiciones de uso previsto, siga estas recomendaciones para garantizar un nivel de seguridad óptimo:

Recomendaciones y precauciones

Este equipo contiene componentes potencialmente peligrosos. Aunque los reactivos del equipo no están clasificados como irritantes de los ojos y la piel, recomendamos evitar el contacto de los mismos con los ojos y con la piel y utilizar guantes desechables.

¡AVISO! Los calibradores, controles y agentes contienen ázida de sodio (NaN_3) como conservante. El NaN_3 puede ser tóxico si se ingiere o se absorbe por medio de la piel o de los ojos. El NaN_3 puede reaccionar con la fontanería de plomo y de cobre y formar ázida metálica muy explosiva. Al tirar tirarla, deje correr una gran cantidad de agua para evitar que la ázida tome consistencia. Por favor, consulte los procesos de descontaminación del CDC u otras directrices locales o nacionales.

No fume, coma o beba mientras manipule el equipo. No pipetee con la boca.

Todo el material de fuente humana utilizado en algunos reactivos de este equipo (por ejemplo controles, standards) ha sido analizado a través de métodos aprobados y ha resultado ser negativo para HbsAg, Hepatitis C y HIV 1. No obstante, ningún test puede completamente garantizar la ausencia de agentes virales en ese tipo de material. Por lo tanto, manipule los controles, standards y muestras de los pacientes como si se trataran de auténticos transmisores de enfermedades infecciosas y según los requerimientos de manipulación de su país.

Como se indica en la sección Contenido del equipo, el equipo contiene material de origen animal que debe manipularse de acuerdo con la normativa nacional.

5.2 Instrucciones generales para la utilización

En caso de que observe defectos o datos incorrectos en la información del producto, incluidas las etiquetas, póngase en contacto con el fabricante o proveedor del producto.

No mezcle o sustituya Control, Calibradores, Conjugado o microplacas de números de lote diferentes. Esto podría llevar a una variación de los resultados.

Deje que todos los componentes alcancen la temperatura (20-32°C/68-89,6°F) antes de utilizarlos. Agítelos bien y siga el esquema de incubación recomendado para una óptima realización del ensayo.

Incubación: Se recomienda realizar las pruebas a 30°C/86°F para sistemas automatizados.

No exponga nunca los componentes a temperaturas más altas de 37°C/ 98,6 °F.

Pipetee siempre la solución de substrato con puntas nuevas. Protega este reactivo de la luz. Nunca pipetee el conjugado con puntas previamente utilizadas con otros reactivos.

Un diagnóstico clínico definitivo no debe estar basado solamente en los resultados del ensayo realizado. Debe ser elaborado por el médico después de haber evaluado todos los hallazgos clínicos y de laboratorio. Es necesario verificar el diagnóstico por medio de distintos métodos.

6 Toma, manipulación y almacenamiento de las muestras

Utilice preferentemente muestras de suero recién extraídas. La extracción de sangre debe seguir los requerimientos de protocolo de su país.

No utilice muestras ictericas, lipémicas, hemolizadas o contaminadas por bacterias. Los sueros con partículas deben ser purificados por centrifugación a baja velocidad (<1000 x g). Las muestras de sangre deben ser recogidas en tubos limpios, secos y vacíos.

Tras la separación, las muestras de plasma han de utilizarse durante las primeras 8 horas y conservarse herméticamente cerradas a 2-8°C/35-46°F hasta 48 horas o congeladas a -20°C/-4°F durante periodos más prolongados

7 Procedimiento del ensayo

7.1 Preparativos antes de dispensar

Diluya los reactivos concentrados:

Diluya el tampón de muestra concentrado a 1:5 con agua destilada (p.e. 20 ml en 80 ml)

Diluya el tampón de lavado concentrado a 1:50 con agua destilada (p.e. 20 ml en 980 ml).

A fin de evitar errores, es aconsejable marcar las tapas de los distintos calibradores.

Muestras:

Diluya las muestras de suero a 1:101 con tampón de muestra (1x)

p.e. 1000 µl tampón de muestra (1x) + 10 µl suero. Mezcle bien la dilución.

Lavado:

Prepare 20 ml de tampón de lavado diluido (1x) para 8 pocillos o 200 ml para 96 pocillos p.e. 4 ml de concentrado en 196 ml de agua destilada.

Lavado automático:

Tenga en cuenta los volúmenes de exceso requeridos para purgar el instrumento y el volumen muerto en el dispensador del aparato.

Lavado manual:

Descarte el líquido de los pocillos invirtiendo la placa. Golpee vigorosamente el marco con los micropocillos sobre papel absorbente limpio manteniendo la placa invertida. Dispense 300 µl de tampón de lavado diluido dentro de cada pocillo y espere 20 segundos. Repita el procedimiento entero dos veces más.

Microplacas:

Calcule el número de pocillos necesarios para el ensayo. Saque los pocillos no utilizados del marco, póngalos de nuevo en la bolsa de plástico suministrada junto con el desecante y sellela bien (2-8°C/35-46°F).

7.2 Esquema de dispensación

Se sugiere dispensar los calibradores, controles y muestras como sigue:

Para una interpretación cuantitativa					Para una interpretación cualitativa				
	1	2	3	4...		1	2	3	4...
A	Cal A	Cal E	P1		A	NC	P2		
B	Cal A	Cal E	P1		B	NC	P2		
C	Cal B	Cal F	P2		C	CC	P3		
D	Cal B	Cal F	P2		D	CC	P3		
E	Cal C	PC	P3		E	PC	...		
F	Cal C	PC	P3		F	PC	...		
G	Cal D	NC	...		G	P1	...		
H	Cal D	NC	...		H	P1	...		

CalA: calibrator A

CalD: calibrator D

PC: positive control

P1: patient 1

CalB: calibrator B

CalE: calibrator E

NC: negative control

P2: patient 2


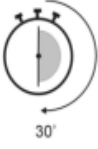
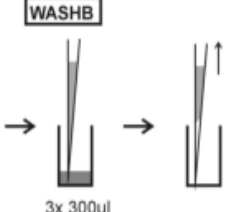
CalC: calibrator C

CalF: calibrator F


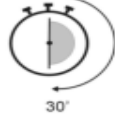
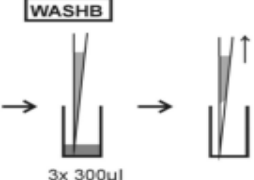

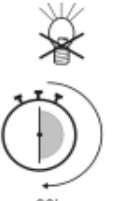
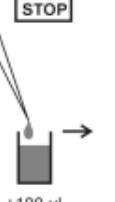

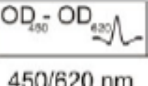
CC: cut-off calibrator

P3: patient 3

7.3 Esquema de trabajo

Paso	Descripción
1.	Asegúrese de que los preparativos del paso 7.1 (arriba) se han llevado a cabo antes del pipeteado.
2.	Siga los pasos descritos a continuación de acuerdo con los resultados de interpretación cuantitativa y cualitativa que se deseen obtener:
CONTROLES y MUESTRAS	
3.	 <p>Pipetee en los pocillos designados (tal como se describe en el capítulo 7.2) 100 µl de:</p> <ol style="list-style-type: none"> Calibradores (CAL.A a CAL.F) para interp. CUANTITATIVA o Calibrador cut-off (CC) para interp. CUALITATIVA y 100 µl de cada uno de los siguientes: <ul style="list-style-type: none"> Control negativo (CN) y control positivo (CP), y Suero diluido de los pacientes (P1, P2...)
4.	 <p>Incube durante 30 minutos a 20-32°C/68-89,6°F.</p>
5.	 <p>Lave tres veces con 300 µl de tampón de lavado (diluido al 1:50).</p>



CONJUGADO	
6.	 <p>Pipetee 100 µl de conjugado en cada pocillo.</p>
7.	 <p>Incube durante 30 minutos a 20-32°C/68-89,6°F.</p>
8.	 <p>Lave tres veces con 300 µl de tampón de lavado (diluido al 1:50).</p>
SUBSTRATO	
9.	 <p>Pipetee 100 µl de substrato TMB en cada pocillo.</p>
10.	 <p>Incube durante 30 minutos a 20-32°C/68-89,6°F y evite que reciba luz intensa.</p>
PARO	
11.	 <p>Pipetee 100 µl de solución de paro en cada pocillo siguiendo el mismo orden que al pipetear el substrato.</p>
12.	 <p>Incube durante 5 minutos como mínimo.</p>
13.	<p>Agite la placa suavemente durante 5 seg.</p>
14.	 <p>Lea la absorbancia a 450 nm (se recomienda 450/620 nm) durante los 30 minutos siguientes.</p>

8 Interpretación Cuantitativa y Cualitativa

Para una **interpretación cuantitativa** establezca la curva standard trazando la densidad óptica (DO) de cada calibrador (eje y) con respecto a los correspondientes valores de concentración en U/ml (eje x). Para unos mejores resultados recomendamos coordenadas log/lin y un ajuste a 4-PL. Partiendo de la DO de cada muestra, lea la correspondiente concentración de anticuerpo expresada en U/ml.

Rango Normal	Indeterminado	Resultados Positivos
< 12 U/ml	12 - 18 U/ml	>18 U/ml

Ejemplo de curva standard

NO utilice este ejemplo para interpretar el resultado del paciente

Calibradores IgG	DO 450/620 nm	CV % (Variación)
0 U/ml	0,040	0,7
3 U/ml	0,175	2,7
10 U/ml	0,350	1,8
30 U/ml	0,680	3,4
100 U/ml	1,220	0,4
300 U/ml	2,130	0,8

Ejemplo de cálculo

Paciente	Replicado (DO)	Media (DO)	Resultado (U/ml)
P 01	0,557/0,572	0,565	23,0
P 02	0,998/1,045	1,022	63,8

Las muestras que se encuentren por encima del rango máximo de calibrador se deberán especificar como >Máx. Será necesario diluirlas según se considere apropiado y repetir el ensayo. Las muestras que se encuentren por debajo del rango del calibrador deberán

especificarse como < Min.

Para conocer los datos específicos de lote, consulte el documento adjunto de control de calidad. Los laboratorios deberían realizar un Control de Calidad interno utilizando controles propios y/o un „pool“ de sueros interno tal y como contemplan las regulaciones nacionales.

Cada laboratorio debería establecer su rango normal propio basado en sus propias técnicas, controles, equipamiento y población según sus propios procedimientos establecidos.

En caso de que los valores de los controles no se ajusten a los criterios, el ensayo se considerará válido y deberá repetirse.

Será necesario realizar las siguientes comprobaciones de problemas técnicos: Fechas de caducidad de los reactivos (preparados), condiciones de almacenamiento, pipetas, dispositivos, fotómetro, condiciones de incubación y métodos de lavado.

Si al analizar los elementos se obtuvieron valores exagerados, se produjo algún tipo de desviación o los criterios de validación no se cumplieron por motivos inexplicables, póngase en contacto con el fabricante o el proveedor del producto.

Para la **interpretación cualitativa** lea la densidad óptica del calibrador cut-off y la de las muestras de los pacientes. Compare las DO de los pacientes con la DO del calibrador cut-off. Para la interpretación cualitativa, recomendamos que establezca un rango del 20% al rededor del valor del cut-off como zona indeterminada. Todas las muestras que tengan DO superior a este rango se consideran positivas y las muestras con valores de DO inferiores a este rango se consideran negativas.:

Negativo	DO paciente	<	0,8 x DO cut-off
Indeterminado	0,8 x DO paciente	≤	DO cut-off ≤ 1,2 x DO cut-off
Positivo	DO paciente	>	1,2 x OD cut-off

9 Datos Técnicos

Muestra:	suero
Volumen de muestra:	10 µl de muestra diluida a 1:101 con tampón de muestra 1x
Tiempo total de incubación:	90 minutos a temperatura 20-32°C/68-89,6°F
Rango de calibración:	0-300 U/ml
Sensibilidad analítica:	1,38 U/ml
Almacenamiento:	a 2-8°C/35-46°F utilice solo los viales originales
Número de determinaciones:	96 tests

10 Datos de funcionamiento

10.1 Sensibilidad analítica

Los 30 análisis del tampón de muestra en AESKULISA PR3 y los 8 análisis de 8 muestras de bajo negativo arrojaron un límite de detección de 1,38 U/ml.

10.2 Especificidad y Sensibilidad

Las placas microtituladoras se han revestido con **proteína 3 humana nativa elevadamente purificada** a partir de granulocitos de neutrófilo humano. No se han encontrado reactividades cruzadas con otros autoantígenos. La especificidad diagnóstica de los anticuerpos PR3 para la granulomatosis de Wegener activa es >95%.^{8,9} La sensibilidad diagnóstica de los anticuerpos PR3 para la granulomatosis de Wegener activa es del 70-80% y del 60% para la granulomatosis de Wegener limitada.*

Se analizaron 149 sueros de pacientes con granulomatosis de Wegener, poliangeítis microscópica y otras enfermedades autoinmunes en el AESKULISA PR3 y en un dispositivo homologado; de estos, 69 sueros estaban dentro del rango del ensayo y se utilizaron para un estudio comparativo frente a un dispositivo homologado.

		Dispositivo homologado			
AESKULISA PR3		POS.	Equívocos	NEG.	Total
	POS.	15	6	5	26
NEG.	0	4	39	43	
Total	15	10	44	69	

Porcentaje de coincidencia general*	84,1%	de 73,7% a 90,9%
Porcentaje de coincidencia positiva	100%	de 79,6% a 100%
Porcentaje de coincidencia negativa*	79,6%	de 67,1% a 88,2%

* Para este cálculo, un resultado equívoco del dispositivo homologado se ha considerado como negativo.

Para un estudio comparativo clínico, solo se consideraron como positivas las muestras de granulomatosis de Wegener para el cálculo de la sensibilidad/especificidad diagnóstica; el resto de los diagnósticos, aun con una posible presencia de anticuerpos PR3, se consideraron "como si fueran negativos" (datos completos disponibles previa solicitud).



AESKULISA PR3	Diagnóstico		
	POS.	NEG.	TOTAL
POS.	57	12	69
NEG.	0	70	70
TOTAL	57	82	139

		Indice de confianza del 95%
Porcentaje de coincidencia general	91,4%	de 85,5% a 95,0%
Sensibilidad diagnóstica	100%	de 93,7% a 100%
Especificidad diagnóstica	85,4%	de 76,1% a 91,4%

Número de muestras con	AESKULISA PR3		
	POS	neg	Total
Pérdida de audición aguda	1	0	1
Enfermedad renal crónica	1	0	1
Churg-Strauss	1	1	2
EPOC	0	3	3
Enfermedad de Crohn	0	6	6
Endocarditis	1	0	1
Glomerulonefritis	0	2	2
Síndrome de Goodpasture	1	0	1
Sanos	0	1	1
VIH	1	0	1
Neurodegeneración asociada a la proteína de membrana mitocondrial	0	30	30
Parálisis	1	0	1
Polimialgia reumática (vasculitis)	1	0	1
Artritis reactiva	0	21	21
Artritis reumatoide	1	0	1
LES	1	0	1
Colitis ulcerosa	0	6	6
Colitis ulcerosa, infección fungica séptica	1	0	1
Glomerulonefritis (c-ANCA pos.)	1	0	1
Granulomatosis de Wegener	56	0	56
Granulomatosis de Wegener/glomerulonefritis	1	0	1
Total	69	70	139



10.3 Linealidad

Se han analizado con este equipo sueros seleccionados y se encontró que debían diluirse linealmente. No obstante, debido a la naturaleza heterogénea de los autoanticuerpos humanos, pueden haber muestras que no sigan esta regla.

Muestra N°	Factor de dilución	concentración medida (U/ml)	concentración esperada (U/ml)	Recuperación (%)
1	1 / 100	102,0	105,0	97,1
	1 / 200	49,8	52,5	94,9
	1 / 400	25,8	26,3	98,1
	1 / 800	12,1	13,1	92,4
2	1 / 100	52,6	54,0	96,3
	1 / 200	25,8	27,0	95,5
	1 / 400	14,1	13,5	104,4
	1 / 800	7,3	6,8	107,4
3	1 / 100	278,4	261,8	106,3
	1 / 200	139,5	130,9	106,6
	1 / 400	64,2	65,4	98,2
	1 / 800	32,3	32,7	98,8
4	1 / 100	33,6	34,2	98,2
	1 / 200	16,0	17,1	93,6
	1 / 400	7,9	8,6	91,9
	1 / 800	4,2	4,3	97,7

10.4 Precisión

Para determinar la precisión del ensayo, se evaluó la variabilidad (intraensayo, interensayo y lote a lote) mediante el examen de su reproducibilidad en ocho muestras de suero seleccionadas para representar un rango sobre la curva estándar.

El rango aceptado para CV es del 10% para muestras positivas, del 15% alrededor del valor cut-off y del 20% para muestras negativas (N = 40/40/24).

Intraensayo			Interensayo			Variabilidad lote a lote		
N.º de muestra	Media (U/ml)	CV (%)	N.º de muestra	Media (U/ml)	CV (%)	N.º de muestra	Media (U/ml)	CV (%)
1	6.8	7.1	1	6.8	15.8	1	5.8	12.8
2	16.3	3.4	2	16.3	6.4	2	16.2	6.5
3	11.1	2.0	3	11.1	4.7	3	11.0	6.5
4	75.4	3.4	4	75.4	6.0	4	74.9	3.1
5	260.7	4.4	5	260.7	6.0	5	263.8	5.7
6	22.9	2.2	6	22.9	2.2	6	22.3	1.7
7	48.9	3.7	7	48.9	4.0	7	51.2	2.8
8	88.2	5.2	8	88.2	5.7	8	100.0	8.7

10.5 Calibración

Debido a la no existencia de una calibración de referencia internacional, este ensayo está calibrado en unidades arbitrarias (U/ml).

ANEXO 7: FOTOGRAFÍAS

TOMA DE MUESTRAS EN LA FUNDACIÓN APADA ECUADOR, PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS EN EL LABORATORIO CLÍNICO Y LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO.

Fotografía 1.- Información y extracción sanguínea a los pacientes de la fundación APADA ECUADOR.



Fotografía 2.- Centrifugación de las muestras.



Fotografía 3.- Separación de los sueros de los pacientes para su procesamiento.



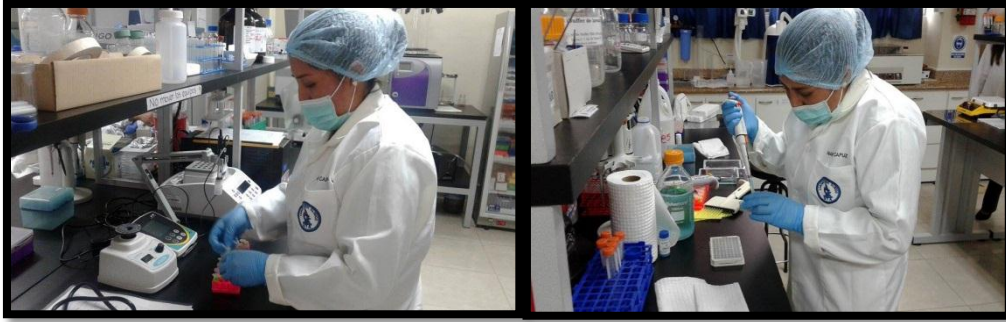
Fotografía 4.- Preparación de la dilución de las muestras de suero con tampón de muestra.



Fotografía 5.- Homogenización de muestras para su posterior análisis.



Fotografía 6.- Pipeteo de muestras en pacillos designados.



Fotografía 7.- Lavado de muestras con la solución de lavado.



Fotografía 8.- Lectura de muestras en el equipo Víctor X3.



Fotografía 11.- Grupo de niños TEA fundación APADA ECUADOR.

