



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN  
SECRETARÍA DE SALUD  
INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA

SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE LA PRUEBA DE ELISA PARA  
DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ANTICARDIOLIPINA EN EL  
DIAGNOSTICO DE SÍNDROME ANTIFOSFOLIPIDO

TRABAJO DE FIN DE CURSO  
PARA OBTENER EL DIPLOMA DE  
ESPECIALISTA EN:  
**PEDIATRÍA**  
PRESENTA:  
**DRA. ADRIANA MUÑOZ RODRÍGUEZ**

TUTOR DE TESIS:  
DR. FRANCISCO ESPINOSA ROSALES  
COTUTORES:  
M. EN C. CHIHARU MURATA  
QFB. ANGELICA PLAZA GONZALEZ



MÉXICO, D.F.

2008

**SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE LA PRUEBA DE ELISA  
PARA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ANTICARDIOLIPINA EN EL  
DIAGNOSTICO DE SÍNDROME ANTIFOSFOLIPIDO.**



**DR. GUILLERMO SOLOMON SANTIBANEZ  
PROFESOR TITULAR DEL CURSO**



**DR. JOSE N. REYNES MANZUR  
DIRECTOR DE ENSEÑANZA**



**DRA. MIRELLA VAZQUEZ RIVERA  
JEFE DEL DEPARTAMENTO DE ENSEÑANZA DE PRE Y POSGRADO**



**DR. FRANCISCO ESPINOSA ROSALES  
TUTOR DE TESIS**



**M. EN C. CHIHARU MURATA  
CO-TUTOR**



**QFB. ANGELICA PLAZA GONZALEZ  
CO-TUTOR**

**CONTENIDO:**

<b>I.</b>	<b>RESUMEN</b>	2
<b>II.</b>	<b>MARCO TEORICO.</b>	4
<b>III.</b>	<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	17
<b>IV.</b>	<b>PREGUNTAS DE INVESTIGACION</b>	18
<b>V.</b>	<b>JUSTIFICACION</b>	19
<b>VI.</b>	<b>OBJETIVOS</b>	20
<b>VII.</b>	<b>HIPOTESIS</b>	21
<b>VIII.</b>	<b>MATERIAL Y MÉTODOS.</b>	22
	Criterios de inclusión y exclusión	22
	Clasificación del estudio	22
	Descripción general del estudio	22
	Variables	23
	Descripción del estudio	26
	Recursos	27
	Aspectos éticos y consentimiento informado	27
<b>IX.</b>	<b>ANÁLISIS ESTADÍSTICO E INTERPRETACION DE DATOS</b>	28
<b>X.</b>	<b>RESULTADOS.</b>	30
<b>XI.</b>	<b>DISCUSION.</b>	35
<b>XII.</b>	<b>ANEXOS.</b>	38
	1.1 Tablas y cuadros	38
	1.2 Figuras y gráficos	44
	2. Hoja de recolección de datos	52
	3. Prueba de Quanta lite	54
	4. Definiciones operacionales	56
	5. Arbol de partición	59
<b>XIII.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA.</b>	61

**SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE LA PRUEBA DE ELISA PARA DETECCION  
DE ANTICUERPOS ANTICARDIOLIPINA EN EL DIAGNOSTICO DE SINDROME  
ANTIFOSFOLIPIDO.**

**Adriana Muñoz Rodríguez<sup>\*</sup>, Dr. Francisco Espinosa Rosales<sup>\*\*</sup>, M. en C. Chiharu  
Murata<sup>\*\*\*</sup>, QFB. Angélica Plaza González<sup>\*\*\*\*</sup>.**

\*Médico Residente de Pediatría médica, \*\*Jefe y Médico Adscrito del Servicio de  
Inmunología Clínica Pediátrica, \*\*\*Maestro en Ciencias, \*\*\*\*QFB laboratorio de  
Inmunología. Instituto Nacional de Pediatría, México D. F.

**I. RESUMEN:**

Los anticuerpos anticardiolipina (AcACL), están implicados en la patogénesis del síndrome antifosfolípido (SAF), ya que en los pacientes en quienes se detectan, tienen mayor riesgo de presentar eventos trombóticos. Por esto su determinación es útil para el diagnóstico de SAF. **Objetivo:** Determinar la utilidad del método ELISA para AcACL en el diagnóstico de SAF. **Métodos:** Realizamos un estudio de utilidad diagnóstica de la prueba de ELISA para AcACL de manera retrospectiva, transversal y descriptiva en pacientes menores de 18 años con sospecha de SAF atendidos en el Instituto Nacional de Pediatría basándonos en los expedientes clínicos y resultados de laboratorio. **Análisis estadístico:** Determinamos la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo de la prueba de ELISA para AcACL. Analizamos su asociación con las manifestaciones clínicas. Propusimos puntos de corte óptimos para la prueba por curva ROC y árbol de partición. **Resultados:** Corroboramos que la población femenina es la más afectada 3.9:1, incrementando su incidencia conforme a mayor edad y títulos de AcACL. La trombocitopenia fue la presentación clínica más frecuente asociándose a títulos elevados de AcACL. Obtuvimos en

la prueba polivalente de AcACL a punto de corte de 0.5 u (unidades de ACL/ml) una especificidad del 62%, elevándose a 77% a un punto de corte de 0.64 u. **Discusión:** Proponemos elevar el punto de corte a 0.64 u para mejorar la especificidad de la prueba. Habrá que realizar estudios posteriores de manera longitudinal con mayor población para analizar la relevancia de las subunidades de AcACL.

## **II. MARCO TEORICO:**

### **A) ANTECEDENTES:**

El síndrome antifosfolípido (SAF) se caracteriza por la asociación entre trombosis arterial o venosa con abortos recurrentes, trombocitopenia o trastornos neurológicos en presencia de anticuerpos antifosfolípidos (AFL) circulantes, ya sean estos anticuerpos anticardiolipina (ACL), Anticoagulante lúpico (AL) o anti- $\beta$ 2 glicoproteína I ( $\beta$ 2GPI). <sup>(1)</sup>

Los fenómenos trombóticos en niños son raros ya que no presentan los mismos factores de riesgo que tienen los adultos, por tal motivo se puede esperar una mayor incidencia de SAF en pacientes pediátricos que han presentado algún fenómeno trombótico. La edad de mayor incidencia se reporta de los 8 a los 16 años, existiendo dentro de su etiopatogenia, una asociación con el complejo mayor de histocompatibilidad, involucrando el HLA-DR7 y el DR4 (los cuales se encuentran codificados en el gen DRB1, relacionado al gen DRB4 alterado en su alelo DRw53), que confieren una predisposición para positivar los AcACL. De forma contraria, se ha visto que existe una asociación negativa con el HLA-DR3. <sup>(2)</sup>

Existen 2 grupos de SAF: El primario, en el cual no existe antecedente de enfermedad autoinmune previa; y el secundario, el cual cursa con SAF y una enfermedad autoinmune (en su gran mayoría lupus eritematoso sistémico (LES)).

## **B) EN QUIEN DEBE BUSCARSE SINDROME ANTIFOSFOLIPIDO**

Se debe buscar SAF en pacientes con el antecedente de trombosis, en especial si padecen LES (ya que presentan AL en 61% y ACL en un 52%); así como embarazadas con fenómenos trombóticos o abortos recurrentes (el 48% presenta AL o ACL). Otras enfermedades que cursan con anticuerpos positivos son el cáncer (19%), el alcoholismo (11%), la aterosclerosis grave (6%), y la presencia de úlceras en piernas (6%).<sup>(3)</sup>

El riesgo de presentar SAF en personas asintomáticas con anticuerpos positivos es del 2.5%. En niños se han encontrado anticuerpos positivos de manera transitoria ante una lesión endotelial, sin evidencia de que presenten mayor incidencia de fenómenos trombóticos ni de enfermedades autoinmunes<sup>(4)</sup>

## **C) CUADRO CLINICO**

Puede afectar a cualquier órgano. La trombosis venosa profunda es la manifestación más frecuente en el 29-55%, presentando embolia pulmonar la mitad de estos. La trombosis arterial es menos frecuente manifestándose como isquemia, infarto cerebral, coronario, subclavio, renal o retiniano.<sup>(5)</sup>

Otras manifestaciones del SAF incluyen trombocitopenia del 40-50%, anemia hemolítica del 14-23% y lívido reticularis del 11-22%. En ocasiones, pueden presentar afección renal aunque esta se relaciona mas a LES siendo la hipertensión arterial, el principal síntoma.

En un estudio se observó que los sitios de trombosis más frecuentes en niños fueron los siguientes:<sup>(1)</sup>

---

Tejido vascular afectado	Manifestación clínica
--------------------------	-----------------------

---

#### Tejido venoso

---

Extremidades	Trombosis venosa profunda, trombosis superficial.
Venas de grande calibre	Trombosis de vena cava superior o inferior
Pulmones	Tromboembolia pulmonar o hipertensión pulmonar
Piel	Livedo reticularis
Cerebro	Trombosis de seno venoso profundo
Glándula adrenal	Enfermedad de Addison
Hígado	Budd-Chiari, hepatomegalia o elevación de enzimas
Ojos	Trombosis de vena retiniana

---

#### Tejido arterial

---

Cerebro	Infarto, ataque isquémico transitorio
Riñón	Trombosis arteria renal y microangiopatía renal trombótica
Extremidades	Isquemia y gangrena
Corazón	Infarto al miocardio
Hígado	Infarto hepático
Intestino	Trombosis arterial mesentérica
Médula Espinal	Mielitis transversa

---

## **D) CRITERIOS PARA DIAGNOSTICO**

### CRITERIOS CLINICOS<sup>(6)</sup>.

1. **Trombosis vascular:** Uno o más episodios de trombosis arterial, venosa o de pequeños vasos en un tejido u órgano. La trombosis debe ser confirmada por imagen, estudio doppler o por histopatología; con excepción de la trombosis venosa superficial. En el resultado histopatológico no debe de existir reacción inflamatoria.
2. **Embarazo mórbido:**
  - a. Una o más muertes inexplicables de fetos normales (por USG o examen directo) a partir de la 10ª semana de edad gestacional.
  - b. Uno o más nacimientos prematuros, morfológicamente normales a las 34 semanas de gestación secundario a pre-eclampsia o insuficiencia placentaria.
  - c. 3 o más abortos espontáneos antes de las 10 semanas de gestación descartando causas hormonales o cromosómicas.

## CRITERIOS DE LABORATORIO

1. **IgM o IgG de ACL** en títulos medios o altos en 2 o más ocasiones con 6 semanas de diferencia, por ELISA para ACL dependiente de  $\beta$ 2GPI. <sup>(6)</sup>.

Escalante<sup>(7)</sup> define dichos títulos en cuanto al tipo de Inmunoglobulina (Ig) en tanto que Roubey<sup>(8)</sup> solo define los títulos de IgG de la siguiente manera:

<b>Escalante</b>	Negativo	Bajos	Medios	Altos
IgG ACL	<20	21-30	31-70	>70
IgM ACL	<11	12-20	21-35	>35
IgA ACL	<22	23-35	36-60	>60

<b>Roubey</b>	Negativo	Bajo	Moderado	Alto
IgG ACL	<10	10-19	20-80	>80

2. **Anticoagulante lúpico** presente en plasma en 2 o más ocasiones con 6 semanas de diferencia de acuerdo a las guías de la Sociedad Internacional en trombosis y hemostasis<sup>(6)</sup>.
  - a. Coagulación prolongada dependiente de fosfolípido demostrada en una prueba de detección
  - b. Falla para corregir tiempos de coagulación con plasma
  - c. Acortamiento del tiempo de coagulación al agregar fosfolípido
  - d. Al excluir otras coagulopatías.

El diagnóstico definitivo de SAF requiere la presencia de por lo menos uno de los criterios clínicos y uno de los criterios de laboratorio. Sin embargo estos criterios son para población adulta y no han sido evaluados en niños, lo que provoca un fracaso en el diagnóstico en pacientes pediátricos con sospecha de SAF primario <sup>(9,5,6)</sup>.

## **E. CLASIFICACION EN BASE A LOS CRITERIOS:**

### **SAF DEFINIDO:**

Dos o más de los siguientes criterios:

- a) Pérdida fetal recurrente, b) Trombosis venosa, c) Trombosis arterial, d) Ulceras en piernas, e) Livedo reticularis, f) Anemia hemolítica, g) Trombocitopenia,
- b) Niveles elevados de antifosfolípidos (IgG ó IgM >5 DS). <sup>(6)</sup>.

### **SAF PROBABLE:**

- a) Dos o más manifestaciones clínicas,
- b) Niveles elevados de aPL (IgG ó IgM >2 DS)<sup>(6)</sup>.

## **F) ANTICUERPOS ANTIFOSFOLIPIDO**

El SAF se caracteriza por la presencia de anticuerpos que se unen a fosfolípidos y proteínas de la coagulación, llamados anticuerpos antifosfolípidos, como lo son el anticoagulante lúpico, los AcACL y el anti-  $\beta$ 2GPI.

El primer anticuerpo antifosfolípido encontrado, fue un anticuerpo que fija el complemento y reacciona con extracto de corazón bovino.

Este anticuerpo, se detectó en un inicio en pacientes con sífilis, y se le llamó ACL (que es un fosfolípido mitocondrial). En un inicio se detectaba mediante la prueba de VDRL, pero en 1983 se desarrolló un inmunoensayo más sensible. Sin embargo, a principios de la década de los 90's, se encontró que para la unión del autoanticuerpo con la cardiolipina, se requería en el plasma la presencia de la proteína  $\beta$ 2GPI unida a la cardiolipina.<sup>(10)</sup> La  $\beta$ 2GPI, actúa como un anticoagulante natural cuya deficiencia no confiere riesgo de trombosis ni limita en un pequeño porcentaje, la unión de proteínas a fosfolípidos.

Estos autoanticuerpos, se unen a fosfolípidos de membrana, como respuesta a una lesión endotelial o por expresión de sus blancos de membrana. La unión de autoanticuerpos induce la activación de la membrana endotelial por moléculas de adhesión, citoquinas y prostaciclina. Los AFL reconocen a la  $\beta$ 2GPI que se encuentra en el endotelio (endotelio-2 GPI) o bien presenta reacción cruzada con proteínas liberadas ante una lesión endotelial por oxidación (que se produce ante la oxidación de las LDL), activando los macrófagos que producen el daño endotelial.<sup>(11)</sup>

Además, en el desarrollo de estos eventos, se presenta alguna de las siguientes: (1) deficiencia de proteína S adquirida, (2) mayor resistencia general de proteína C activa, (3) mayor nivel en el factor del tejido o actividad, o (4) incremento en la activación de protrombina. Todo esto contribuye al desarrollo de trombosis.

Existen polimorfismos que contribuyen al desarrollo de trombosis, así como otros que confieren protección contra la penetrancia protrombótica, como lo es el gen promotor de factor tisular (que disminuye el factor tisular de plasma) así como una mutación del gen del factor XIII que confiere protección miocárdica.<sup>(3)</sup>

Los AFL, son herramientas clave para el diagnóstico, sin embargo existen anticuerpos que pueden asociarse con procesos infecciosos o neoplásicos pudiendo resultar en falsos positivos.<sup>(3)</sup>

Aún no se ha logrado la identificación de anticuerpos patológicos específicos para un epítipo, que predigan por ejemplo, el riesgo de trombosis. Sin embargo, la gran mayoría de los anticuerpos, están dirigidos contra epítopes directos de la  $\beta$ 2GPI o protrombina<sup>(3)</sup> Los anticuerpos requieren de blancos específicos para realizar su función los cuáles se han tratado de identificar por laboratorio resultando en procesos muy complicados por el manejo que requieren in vitro, de manera que la detección de AFL sigue siendo la clave para el diagnóstico. Existen AFL no patogénicos que circulan como anticuerpos naturales y presentan distinta especificidad ante la invasión de las membranas vasculares por virus u otros patógenos, como es el caso del anticuerpo asociado a Sífilis o HIV que no confieren riesgo de trombosis.<sup>(3)</sup>

Los anticuerpos anticoagulantes lúpicos, se identifican por ensayos de coagulación en los cuales el tiempo de formación del trombo está prolongado. En contraste, la unión de cardiolipina o  $\beta$ 2GPI es detectada por ELISA, midiendo la reactividad inmunológica a un fosfolípido (cardiolipina) o a una proteína de unión a fosfolípido ( $\beta$ 2GPI).

Los AFL, contribuyen a la anticoagulación así como procoagulantes.

Las pruebas para su diagnóstico son las siguientes:

1. Tiempo parcial de tromboplastina activado. Éste presenta dos pasos dependientes de fosfolípido, que son la conversión del factor X a Xa y la conversión de protrombina a trombina, presenta una sensibilidad del 50% por lo que resulta un método de detección apropiado mas no tan sensible para diagnóstico.
2. Tiempo modificado de Veneno Viperino Russell. Es dependiente de factor V y X pudiendo usarse como prueba de detección inicial, siendo resistente a la deficiencia de factores. Activa al factor X, la Textarina, el Taipan y el veneno Ecarino activan directamente la protrombina requiriendo de la presencia de fosfolípidos y Calcio.<sup>(12)</sup>
3. Tiempo de coagulación kaolin. El kaolín actúa activando la superficie de fosfolípido, sin embargo no tiene la sensibilidad del TTPa
4. Prueba de Inhibición de tromboplastina tisular.<sup>(12)</sup>

A pesar de los meritorios esfuerzos internacionales por generalizar la prueba ELISA, la detección de los AFL no está bien estandarizada, ya que exhiben un espectro amplio que reconoce diversos fosfolípidos o proteínas de unión a fosfolípidos.<sup>(3)</sup>

En la detección de ACL, el método más efectivo es el ELISA, que realiza la cuantificación de títulos de anticuerpos y la determinación del isotipo del mismo (IgA, IgM o IgG).

El primer paso del ELISA, consiste en la aplicación de fosfolípido cargado negativamente (cardiolipina) o fosfatidilserina. Este se agrega a suero bovino o albúmina bovina y se aplica el suero del paciente (que debe contener la  $\beta$ 2GPI) y luego se incuba, aplicándose los Ac anti-IgG y anti-IgM. Por último se agrega una enzima que ante la reacción, cambia de color, de modo que puede ser interpretada. <sup>(12, 8).</sup>

El kit de ELISA "QUANTA lite" es un kit comercial, trabajado y valorado en el INP, desde mayo de 1997 cuya descripción se da en la sección de anexos.

### SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD

El diagnóstico de SAF, debe realizarse mediante la asociación de riesgos trombóticos y anticuerpos ACL u otros antifosfolípidos, especialmente si se combinan con prueba positiva para anticoagulante lúpico. Se ha visto que en ciertos estudios, hasta un 83.9% de los pacientes con SAF, pueden presentar anticuerpos de anticardiolipina. Se refiere que presenta mas sensibilidad que los demás AFL, siendo a su vez la menos costosa.<sup>(3)</sup> En cuanto a su especificidad se ha visto que aumenta con títulos mayores de IgG (por arriba de 65) en comparación con IgM o IgA.<sup>(7)</sup> sin embargo cabe recordar que requiere de la  $\beta$ 2GPI para aumentar su especificidad y no unirse a otras proteínas como es el caso de Sífilis. Cuando se cuenta con Inmunoensayo anti- $\beta$ 2GPI, parece que mejora la sensibilidad en búsqueda de casos nuevos pero no comparado con los ACL.<sup>(3)</sup> Cuando se encuentran en títulos medio altos, los ACL correlacionan de igual manera en cuanto a especificidad para trombosis en comparación con los anti- $\beta$ 2GPI. <sup>(3)</sup>

Escalante<sup>7</sup> encontró en cuanto a sensibilidad y especificidad de los anticuerpos ACL lo siguiente:

	IgG	IgM	IgA
Sensibilidad	83	35	26
Especificidad	61	85	92

En dicha tabla, observamos una mayor sensibilidad con la IgG

Heather en su estudio del SAF primario, estudió otros AFL como el anticuerpo antifosfolípido (aPL) (una combinación de fosfolípidos, en especial fosfatidilserina), la  $\beta$ 2GPI y el anticoagulante lúpico (LAC) citando tanto su sensibilidad como su especificidad conforme a títulos de IgG e IgM. Cuyos resultados incluyo a continuación:

	APL %	$\beta$ 2GPI %	LAC %
Sensibilidad	54	42	61
Especificidad	71	84	72

Existen otras pruebas que pueden realizarse como los anticuerpos anti-fosfatidilserina o anti-fosfatidiletanolamina, sin embargo existen estudios que no corroboran un aumento en la sensibilidad para el diagnóstico de SAF. <sup>(13)</sup>

En pacientes en quienes se sospecha SAF, y en quienes tienen una prueba previa negativa, debe de usarse 3 pruebas como la de la antifosfatidilserina y anti-fosfatidiletanolamina o bien anticoagulante lúpico, (la sensibilidad puede ser incrementada usando diferentes pruebas de anticoagulante lúpico, incluido el KCT) para su búsqueda. Pueden realizarse anticuerpos anti-protrombina, proteína S y anexina V debido a su fuerte asociación con fenómenos trombóticos, siendo un tanto más específicos. <sup>(5)</sup>

En un seguimiento de 4 años con 321 mujeres sanas con anticuerpos antifosfolípidos, se vio que las pacientes con IgM o bajo nivel de anticuerpos IgG ACL no tenían riesgo de desórdenes relacionados con antifosfolípidos. Sin embargo, las pacientes que presentan títulos altos de IgG (mayor 65) deben ser reevaluadas si desarrollan nuevos o recurrentes síntomas clínicos que sugieran SAF. <sup>(3)</sup>

## **G) DIAGNOSTICO DIFERENCIAL**

En caso de trombosis, deben disminuirse los factores procoagulantes como son la presencia de éstasis, lesión vascular y uso de anticonceptivos. Existen entidades que se asocian al SAF como el síndrome nefrótico, valvulopatías, síndrome urémico hemolítico, púrpura trombocitopénica trombótica o microangiopatía trombótica.

Existen entidades que se asocian a la presencia de AFL como son la endocarditis, enfermedades autoinmunes como LES, Artritis reumatoide, Sjögren, Behcet, psoriasis, anemia hemolítica, Guillian Barre; infecciones como malaria, varicela, hepatitis, sífilis, tuberculosis, y entidades como linfoma, o relacionadas con fármacos que elevan a su vez títulos de AFL, por lo cual deben de incluirse en el diagnóstico diferencial.<sup>(14, 15)</sup>

## **H) SINDROME ANTIFOSFOLIPIDO CATASTROFICO**

En esta entidad, se encuentran involucrados múltiples órganos, recibiendo el nombre de tormenta trombótica o catastrófica. Tiene una incidencia de 0.8%, y se diagnostica cuando se encuentran involucrados 3 o mas órganos con afección microangiopática trombótica aguda (de pequeño calibre). 50% se encuentra en los riñones, pulmones, SNC, corazón y piel pudiéndose complicar con CID en el 25% de los casos. Por laboratorio, se caracteriza por prolongación de TP y TTP, niveles bajos de fibrinógeno, proteína C, antitrombina III, así como elevación de dímeros. La mortalidad alcanza a 50% de los afectados.<sup>(9)</sup>

## **I) MANIFESTACIONES OBSTETRICAS**

El riesgo de pérdida gestacional durante el embarazo es mayor a partir de la 10a semana de gestación, comprobándose un mayor riesgo de tener un producto prematuro secundario a complicaciones como hipertensión arterial sistémica o insuficiencia útero-placentaria. <sup>(9)</sup>

No se ha comprobado que los anticuerpos antifosfolípidos tengan valor predictivo para el número de nacimientos bien logrados, tiempo gestacional, o peso de la mujer.

## **J) TRATAMIENTO**

Consiste en dar profilaxis y tratamiento de la microangiopatía trombótica. La completa anticoagulación es la meta del tratamiento del SAF en pacientes con manifestaciones trombóticas. Una vez que el resultado de un paciente es positivo, El tratamiento inicial se da con heparina (5,000 UI de heparina, 2 veces al día) o heparina de bajo peso molecular seguida por warfarina, con el fin de disminuir la recurrencia de trombosis arterial y venosa. Debe mantenerse una dosis que asegure un INR arriba de 2-2.9. El uso de warfarina reduce significativamente la tasa de recurrencia de trombosis, la cual en 8 años puede ser hasta 0%, siendo que si se suspende aumenta al 50% en 2 años. <sup>(5)</sup>

No ha sido concluyente que el ASA a bajas dosis prevenga la trombosis recurrente, sin embargo se recomienda su uso agregado a Warfarina. La dosis debe ser de 325 mg/día para disminuir el riesgo de trombosis, existen estudios en los cuales se refiere que no confiere protección en hombres con trombosis profunda ni TEP, únicamente se ha visto protección en mujeres con pérdidas fetales previas. Con el uso de hidroxiclороquina se ha visto protección contra trombosis en pacientes con LES y SAF secundario. <sup>(5,9)</sup>

El síndrome catastrófico debe manejarse con anticoagulantes, siendo en estos casos en donde se encuentra en estudio el uso de plasmaféresis. <sup>(9)</sup>

### **III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:**

En el SAF la presencia de trombosis es la manifestación clínica característica, sin embargo a nivel molecular intervienen varios tipos de anticuerpos lo cual hace difícil la identificación de uno específico para la enfermedad. Existen otros factores que alteran la presencia de estos anticuerpos como son las infecciones o las neoplasias que pueden dar falsos positivos.<sup>(3)</sup> Otro factor a considerar es la edad y población estudiada, ante lo cual hay poco descrito tanto de la presencia de estos anticuerpos y de su manifestación clínica en población pediátrica mexicana.

En el Instituto Nacional de Pediatría se realiza la identificación de algunos de estos anticuerpos entre ellos los AcACL que por lo reportado en la literatura es más sensible y su proceso es menos costoso.<sup>(3)</sup>

#### **IV. PREGUNTAS DE INVESTIGACION:**

¿Cuál es la sensibilidad y especificidad de la prueba de ELISA usada en el laboratorio de inmunología para la detección de anticuerpos ACL en el diagnóstico de SAF en pacientes del Instituto Nacional de Pediatría?

¿Existe asociación entre alguna de las manifestaciones clínicas del SAF y la presencia de alguno de los isotipos (IgM o IgG) de anticuerpos ACL?

¿Cuál es el punto de corte que nos ofrece mayor sensibilidad y especificidad de esta prueba para el diagnóstico de SAF en nuestra población hospitalaria?

## **V. JUSTIFICACION**

Con este trabajo de investigación, buscamos establecer cuáles son los puntos de corte que nos ofrezcan mayor sensibilidad y especificidad de la prueba utilizada para la determinación de anticuerpos ACL en nuestro hospital, ya que los valores reportados en la literatura de los métodos de detección de anticuerpos ACL para el diagnóstico de SAF son muy variados, debido a la falta de estandarización del método a nivel mundial y nacional, así como por grupos de edad. Con esto y con los recursos que disponemos buscamos encontrar los valores de corte que se aproximen más a la realidad de nuestra población pediátrica mexicana y así mejorar la certeza en el diagnóstico.

## **VI. OBJETIVOS:**

### **Objetivo general:**

Determinar la utilidad del método de ELISA para la determinación de anticuerpos ACL en su forma polivalente e isotipos IgM e IgG, para el diagnóstico de SAF en los pacientes atendidos en el INP.

### **Objetivos específicos:**

1. Determinar la sensibilidad, especificidad y valores predictivos positivo y negativo del método de ELISA para determinación de anticuerpos ACL polivalente, isotipo IgM e IgG para el diagnóstico de SAF.
2. Evaluar la asociación entre los diferentes isotipos de anticuerpos ACL y las manifestaciones clínicas.
3. Establecer el punto de corte donde el método ofrezca una mejor utilidad diagnóstica en nuestra población.

## **VII. HIPOTESIS:**

1. La prueba de ELISA para determinación de anticuerpos ACL tiene una sensibilidad mayor del 83% y especificidad mayor del 85% (tanto IgM como IgG de acuerdo a Escalante) para el diagnóstico de SAF en niños.
2. Existe asociación entre la presencia de manifestaciones clínicas (trombocitopenia, anemia hemolítica y trombosis) con la presencia de títulos elevados de anticuerpos ACL.
3. El punto de corte que ofrece una mayor sensibilidad y especificidad es  $\geq 0.5$  para AcACL polivalente y  $\geq 20$  unidades de subunidades GPL y MPL de AcACL

## **VIII. MATERIAL Y METODOS**

### **Criterios de inclusión.**

1. Todos los pacientes menores de 18 años de edad, que se les haya realizado la prueba de ELISA para detección de anticuerpos ACL.
2. Cualquier género.
3. Que el expediente clínico esté completo y disponible.
4. Periodo comprendido del 1º de mayo 2003 - 30 de junio 2004

### **Criterios de exclusión.**

1. Expedientes que estén incompletos.

### **Clasificación del estudio de investigación (tipo y diseño del estudio)**

Estudio de prueba diagnóstica, retrospectivo, transversal, descriptivo y observacional para la evaluación de una prueba para diagnóstico de SAF

### **Descripción general del estudio:**

Los expedientes de los pacientes del Instituto Nacional de Pediatría, que cumplieron los criterios de selección fueron revisados por un residente de Pediatría médica, quien confrontó los resultados de la prueba de ELISA recolectados de la libreta de laboratorio con el expediente clínico correspondiente bajo la tutoría del Jefe de servicio de Inmunología y con la colaboración de la química fármaco bióloga quien realiza las pruebas en el laboratorio. La información fue registrada en las hojas de recolección, y posteriormente se construyó la base de datos para llevar a cabo el análisis estadístico.

## **Variables:**

### **VARIABLES DE INTERES PARA LA CONTRASTACION DE HIPOTESIS**

Las variables usadas para obtener la sensibilidad y especificidad de la prueba de ELISA para determinación de anticuerpos ACL fueron las siguientes.

1. Variable independiente: presencia o no de anticuerpos ACL positivos (punto de corte para positivo  $\geq 0.5$  para polivalente y  $\geq 20$  para subunidades IgG e IgM) (nominal)
2. Variable dependiente: presencia o no de alguna manifestación clínica positiva (nominal)

Las variables que se usaron para valorar la asociación entre las manifestaciones clínicas (presencia de trombocitopenia, anemia hemolítica y trombosis) con la presencia de títulos elevados de anticuerpos ACL.

1. Variable independiente títulos polivalentes de anticuerpos ACL (continua)
2. Variable dependiente manifestación clínica (nominal) standard de oro

Las variables que se usaron para obtener el punto de corte que ofrece una mayor sensibilidad y especificidad en la polivalente y subunidades fueron:

1. Variable independiente títulos de polivalente y subunidades IgG e IgM (continua)
2. Variable dependiente la presencia de manifestación clínica positiva (nominal)

### **VARIABLES DEMOGRAFICAS**

- **Género:** Nominal, Masculino/femenino
- **Edad:** Continua, en años 0-18.9

**VARIABLES DE MANIFESTACIONES CLINICAS DE SAF (nominales: presente/ausente)**

Variable de SAF clínico positivo:

Diagnóstico clínico de SAF (nominal: positivo/negativo)

I. La presencia de uno o más episodios de trombosis arterial, venosa o de pequeños vasos dentro de cualquier órgano o tejido.

1. Trombosis de arteria renal.
2. Infarto renal.
3. Microangiopatía trombótica renal.
4. Trombosis venosa de SNC.
5. Trombosis de senos venosos cerebrales.
6. Oclusión de arterias cerebrales (ataque isquémico transitorio e infarto).
7. Trombosis profunda de extremidades inferiores (venosa o arterial).
8. Isquemia o gangrena de extremidades.
9. Isquemia digital.
10. Úlceras.
11. Embolismo pulmonar.
12. Microtrombosis pulmonar (hemorragia alveolar).
13. Hipertensión pulmonar.
14. Trombosis de vena de retina.
15. Embolismo de venas hepáticas.
16. Infarto hepático.
17. Trombosis de arteria mesentérica.

18. Trombosis coronaria.
19. Infarto del miocardio.
20. Insuficiencia valvular mitral o aortica.

II. O por la presencia de:

1. Anemia hemolítica con Coombs positivo.
2. Trombocitopenia.
3. Enfermedad de Addison (infarto o hemorragia adrenal).
4. Sx. de Budd Chiari.
5. Mielopatía transversa.
6. Corea.
7. Livedo reticularis.
8. Alteraciones neuropsiquiátricas.
9. Necrosis avascular de hueso.
10. Migraña.

III. O datos de SAF catastrófico:

1. SAF catastrófico (Síndrome de dificultad respiratoria del adulto o en el niño con falla multiorgánica y oclusión vascular múltiple).

## **Descripción del estudio**

Durante la realización del estudio se llevaron a cabo los siguientes pasos:

1. De las libretas de concentración del laboratorio de Inmunología se obtuvo una relación de todos los pacientes que se sometieron a determinación de anticuerpos ACL mediante ELISA para diagnóstico de SAF, de los cuales algunos incluyeron isotipos IgM e IgG.
2. Se obtuvieron los resultados de cada una de las pruebas en forma polivalente así como en unidades MPL y GPL de anticuerpos ACL.
3. Posteriormente en el expediente clínico se obtuvo información sobre el cuadro clínico del paciente en el momento de la realización de la prueba diagnóstica, recolectando los datos sugestivos de SAF.
4. Se recabaron los resultados de laboratorio de cada una de las pruebas realizadas.
5. Se confirmó finalmente el diagnóstico de síndrome antifosfolípido.
6. Se vaciaron los datos clínicos y de laboratorio de cada paciente en una base de datos en el programa Excel para Windows 2003.
7. Los datos fueron analizados por medio del paquete estadístico JMP IN 5.1 de SAS Institute, Inc.
8. Los resultados son motivo de una tesis de especialidad en Pediatría médica.

**Recursos:****A) Humanos:**

Se realizará la recopilación de datos en un formato de recolección de información (ANEXO I) y posteriormente se capturarán en el programa Excel para Windows 2000 por la tesista.

**B) Materiales:**

Libretas de concentración del laboratorio de Inmunología y expedientes del archivo del Instituto Nacional de Pediatría.

**C) Financieros:**

No se requirieron recursos financieros, lo necesario se encontró disponible.

**Aspecto ético:**

Al tratarse de un estudio retrospectivo basado en los registros hospitalarios, la confidencialidad es el único aspecto ético pertinente el cual ha sido respetado desde el inicio del estudio.

**Carta de consentimiento informado:**

No se requirió.

## IX. ANÁLISIS ESTADÍSTICO E INTERPRETACIÓN DE LOS DATOS

### A) Tamaño de la muestra

Calculamos el tamaño de muestra para estimar la sensibilidad y especificidad de AcACL para el diagnóstico de SAF con la siguiente precisión, de acuerdo con la fórmula presentada por Ruiz A et al.<sup>17</sup>:

$$n = 4\pi_{\text{Disc}}(1 - \pi_{\text{Disc}})Z^2_{1-\alpha/2} / W_x^2$$

Donde,

$$\alpha = 0.05$$

$\pi_{\text{Disc}} = 0.3$  que sugerimos como probabilidad estimada de desacuerdo

$W_x = 0.1$  como la amplitud del intervalo de confianza

•  $Z = 1.96$ , para establecer la estimación por el intervalo de confianza de 95%

$$n = 4(0.3)(1 - 0.3) 1.96^2 / 0.1^2$$

$$n = 323$$

## B) Método estadístico

Se determinó la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo a partir de los datos organizados en la tabla de contingencia tanto para ACL polivalente y subclases.

	Estándar de oro positivo	Estándar de oro negativo
Prueba positiva	Verdaderos positivos (a)	Falsos positivos (b)
Prueba negativa	Falsos negativos (c)	Verdaderos negativos (d)

- a) La sensibilidad :  $a/(a+c)$
- b) La especificidad:  $d/(b+d)$ .
- c) El valor predictivo positivo:  $a/(a+b)$ .
- d) El valor predictivo negativo:  $d/(c+d)$ .

Una vez obtenido lo anterior se realizó por curva ROC el análisis del mejor valor de ACL (polivalente y subclases) obtenido con los niveles de referencia. Posteriormente se corroboraron los resultados mediante el análisis de regresión logística y árbol de partición

## **X. RESULTADOS**

1. Se revisó la libreta de pruebas de laboratorio de Inmunología del Instituto Nacional de Pediatría, obteniéndose un total de 423 pruebas de ELISA del 27 de mayo del 2003 al 07 de junio del 2004. Estas 423 pruebas corresponden a 217 pacientes de quienes se revisaron los expedientes excluyéndose un total de 57 debido a las condiciones del mismo (siendo que no estuviera disponible, completo o bien que no hubiera sido visto por el departamento de Inmunología). Del restante se obtuvieron en total 325 pruebas de ELISA para AcACL cumpliendo el tamaño de muestra calculado en 323 casos. Estas 325 pruebas corresponden a 160 pacientes, de los cuales 126 fueron mujeres (259 pruebas) y 34 hombres (66 pruebas).

Del total de pacientes, el rango de edad varió de los 6 meses hasta los 18 años, siendo la mediana de 14.0 con un rango intercuartil de 5.0, con un predominio de sexo femenino en 3.9:1.0. De estas 325 pruebas, 196 se encontraban catalogados como SAF al momento de revisar los expedientes, sin embargo algunos de ellos fueron solo por sospecha diagnóstica. El rango de AcACL varió en la prueba polivalente de 0.076-3.696 U/ml, siendo la mediana 0.459 y rango intercuartil de 0.440. (Figura 1)

2. Se confrontaron los datos obtenidos de pacientes con prueba polivalente de AcACL positiva y negativa (punto de corte 0.5) con aquellos pacientes con características clínicas presentes o ausentes, considerando al criterio clínico como Standard de oro. (Cuadro 1, Figura 2).

Se obtuvo una sensibilidad del 70%, especificidad del 62% con VPP 37%, VPN del 86%, Prevalencia: 24% y Exactitud: 0.63, LR+ =1.84, LR- =0.48 (likelihood ratio)

3. Posteriormente se analizaron cada una de las manifestaciones clínicas al momento de realizar la toma de la muestra para AcACL de cada paciente, encontrando que de los 325 pacientes, 79 presentaron manifestaciones clínicas positivas 24.3%. (Figura 3). De estos pacientes, 74 presentaron 1 sola manifestación clínica, 5 presentaron 2 características clínicas y 2 presentaron 3 características clínicas positivas. (Figura 4).

Las manifestaciones clínicas más frecuentes en orden progresivo fueron la presencia de trombocitopenia, anemia hemolítica y la oclusión de arterias cerebrales, sin embargo no en todos los casos tuvieron prueba positiva de ELISA para AcACL (Cuadro 2). No obstante se observó una asociación significativa entre los títulos de la prueba de ELISA para AcACL y la presencia de manifestaciones clínicas, lo cual nos comprueba que a mayor titulación de AcACL mayor es la probabilidad de presentar el cuadro clínico (Figura 5,6 y 7).

Al analizar a las subunidades IgM e IgG de AcACL encontramos estas pruebas en 76 pacientes de 325 (Esto es debido a que solo se realizan en pacientes con prueba polivalente positiva). De estos pacientes, 61 tuvieron IgM positiva y 27 tuvieron IgG positiva. Posteriormente se estudió la asociación de títulos de IgM e IgG de AcACL con el diagnóstico de SAF clínico y encontramos dos modelos de regresión logística significativos, lo cual corrobora que a mayor punto de corte de subunidades, mayor es la probabilidad de presentar la enfermedad (Figura 8 y 9).

Se observó la frecuencia de manifestaciones clínicas por cada subunidad de AcACL (cuadro 3), encontrando diferencia significativa en la presencia de trombocitopenia con mayor proporción para IgG positiva ( $p=0.0384$ ). En el resto de manifestaciones no se encontró diferencia significativa, sin embargo no es concluyente debido al reducido tamaño de muestra

4. Se obtuvo por curva ROC el valor de corte para AcACL polivalente con mayor sensibilidad y especificidad en 0.642 (Figura 10). Se calculó una sensibilidad de 57%, especificidad de 77%, VPP de 36%, VPN de 89%. Prevalencia: 24% y Exactitud: 0.60, LR+ =2.48, LR- =0.56 (Cuadro 4).

5. Se confrontaron los datos obtenidos de pacientes con subclases IgM de AcACL positiva y negativa con aquellos pacientes con características clínicas presentes o ausentes, considerando al criterio clínico como Standard de oro (Cuadro 5, Figura 11).

Se calculó una sensibilidad del 89%, especificidad del 24% con VPP de 39%, VPN de 80%, Prevalencia: 35% y Exactitud: 0.47, LR+ =1.17, LR- =0.46

6. Por curva ROC se obtuvo un valor de corte de mayor sensibilidad y especificidad para IgM AcACL en 45 (Figura 12, Cuadro 6)

Con este valor obtendríamos una sensibilidad de 81% y especificidad del 63%, con VPP del 55%, VPN del 86%, Prevalencia: 35% y Exactitud: 0.69, LR+ =2.19, LR- =0.30.

7. Se confrontaron los datos obtenidos de pacientes con subclases IgG de ACL positiva y negativa con aquellos pacientes con características clínicas presentes o ausentes, considerando al criterio clínico como Standard de oro (Cuadro 7, Figura 13).

Se calculó una sensibilidad del 59%, Especificidad del 77% con VPP 59%, VPN del 77%, Prevalencia: 35% y Exactitud: 0.71, LR+ =2.56, LR- =0.53.

8. Por curva ROC se obtuvo un valor de corte de mayor sensibilidad y especificidad siendo en 24 (Figura 14, Cuadro 8)

Con este valor propuesto, obtendríamos una sensibilidad del 56%, especificidad del 86%, VPP del 68%, VPN del 78%, Prevalencia: 35% y Exactitud: 0.75, LR+ =4.0, LR- =0.51.

9. Al realizar el análisis por árbol de partición, obtuvimos la interacción de edad, con niveles de anticardiolipina polivalente y subclases IgM e IgG (Figura 15). Por este método observamos que a un valor de AcACL > 1.631 la probabilidad de presentar el diagnóstico clínico es del 80%. A partir de este nivel hay una mayor probabilidad de tener el diagnóstico hasta niveles de AcACL de 2.937. En el grupo de AcACL < 1.631, se observó que en menores de 7 años aumenta la probabilidad de SAF (80%), siendo que en mayores de 7 años es menor la probabilidad, disminuyendo aún mas con IgM < 45. Esto corroboraría con el valor que obtuvimos por curva ROC de dicha prueba, contraponiéndose al valor de corte establecido por el laboratorio fabricante de la prueba. Por tal motivo resulta importante realizar más estudios que incluyan más casos de IgM para confirmar este hallazgo.

10. Por regresión logística se obtuvo la fórmula siguiente:

$$\begin{aligned} &0.4854 + -2.23874950679692 * :ACL \text{ Tr} + 0.0046 * :EDAD \text{ Tr} \\ &+ ( :ACL \text{ Tr} - (-0.3661)) * (( :EDAD \text{ Tr} - 13.9993) * 0.27590) \\ &+ \text{Match}( :SEXO, 0, -0.1412, 1, 0.1412 .) \\ &+ ( :ACL \text{ Tr} - (-0.3661)) * \text{Match}( :SEXO, 0, 0.9196, 1, -0.9196, .) \\ &+ ( :EDAD \text{ Tr} - 13.9993) * \text{Match}( :SEXO, 0, -0.0585, 1, 0.0585, .) \\ &+ ( :ACL \text{ Tr} - (-0.3661))*(( :EDAD \text{ Tr} - 13.9993) * \text{Match}( :SEXO, 0, 0.4005, 1, -0.4005, .)) \end{aligned}$$

Debido al tipo de área bajo la curva que obtuvimos tuvimos que transformar ACL obteniendo la fórmula  $2((1/(5\sqrt{ACL}))-1)$  resultando por prueba de bondad de ajuste de W Shapiro-Wilk un valor de 0.0841 con la siguiente combinación al realizar la interacción entre el sexo, edad y AcACL transformada.

Corroboramos que la interacción en mujeres de edad mayor con incremento gradual de AcACL a partir de 0.425, aumenta la probabilidad de presentar un cuadro clínico positivo, siendo que a menor edad el incremento de niveles de ACL es gradual conforme aumenta la probabilidad de presentar la enfermedad, sin un valor de AcACL en específico. En varones observamos que aquellos con mayor edad tienen una menor probabilidad de presentar SAF, en tanto que en los menores aumenta la probabilidad a puntos de corte de 0.329 a 1.285 (Cuadro 9, Figura 16).

## **XI. DISCUSION**

Dentro de nuestra población, la mayoría de nuestros pacientes fueron mujeres con una relación 3.9:1.0 con una mediana de 14 años (6 meses a 18 años) y una intercuartil de 5 años.

En nuestro hospital realizamos de inicio pruebas polivalentes de AcACL a los pacientes con sospecha de SAF. Obtuvimos al punto de corte de 0.5 u/ml una sensibilidad del 70% y especificidad del 62% encontrándose por debajo de lo reportado en la literatura, con VPP 37% Y VPN del 86%. Por lo que proponemos en nuestro estudio mejorar estos resultados elevando el punto de corte a 0.642 u/ml. Con esto lograríamos elevar la especificidad a 77%, manteniendo un VPP de 36% y VPN de 89%, a expensas de disminuir la sensibilidad a 57%, mejorando la razón de grados de probabilidad positiva a 2.48, con la razón de grados de probabilidad negativa en 0.56. (Cuadro 10).

En cuanto a las subunidades de IgM e IgG, tomamos un valor de 20u como positivo para la prueba tal y como lo indica el fabricante y lo analizamos (Cuadro 11), obteniendo posteriormente los puntos de corte con mejores resultados, siendo que elevamos para IgG la especificidad a 86% a un punto de corte de 24u en comparación con 77% a 20u y para IgM se mantuvo la sensibilidad de 89 a 81% mejorando la especificidad de 24% a 63% a un punto de corte de 45, al analizar para ambas pruebas la razón de grados de probabilidad se mejoró con los puntos de corte propuestos.

Con lo anterior, podemos deducir que al realizar ambas pruebas podemos obtener a un valor de IgG de 24 una especificidad del 86% y a un valor de IgM de 20 una sensibilidad hasta del 89%, lo cual se acercaría a los valores de nuestra hipótesis inicial, sin embargo debido a que el número de casos de subunidades disminuyó en comparación a los que

obtuvimos con la polivalente, sugerimos incluir un número mayor de pacientes para corroborar la verdadera tendencia de las subunidades y así poder corroborar estos resultados.

Dentro de las manifestaciones clínicas analizadas, existen algunas que pueden corresponder al mismo paciente ya que algunas pruebas podían ser del mismo paciente en distinto tiempo de la enfermedad. Esto se debe tomar en cuenta ya que la presentación clínica de SAF varía de paciente a paciente y pudiera ser que la frecuencia obtenida fuera sesgada por el número de pruebas por paciente. Sin embargo pudimos comprobar que en el paciente pediátrico las manifestaciones clínicas mas frecuentes no fueron las trombosis sino la presencia de trombocitopenia con los títulos de Ac mas elevados, seguida de anemia hemolítica y en menor proporción pero con títulos altos la presencia de oclusión de arterias cerebrales y trombosis venosa profunda. En todos estos casos existe una fuerte asociación entre títulos elevados de AcACL polivalente e incluso de subunidades con la presencia de estas manifestaciones. Solo en la presencia de trombocitopenia, encontramos asociación con IgG positivo, no encontrándola en el resto de las manifestaciones clínicas.

Por árbol de partición y regresión logística confirmamos que a títulos mas altos de ACL mayor probabilidad de presentar la enfermedad, siendo en las mujeres en quienes a mayor edad y títulos elevados de ACL mayor probabilidad tienen de padecer SAF. Por el contrario observamos que la población masculina además de ser menor que la femenina, presentó mayor probabilidad de padecer SAF en la población de menor edad con títulos mas elevados, sin embargo esto puede deberse a que en nuestro estudio la muestra masculina positiva para la enfermedad fue tan solo de 10 casos de los cuales 5 corresponden al mismo paciente. A su vez el rango de edad varió de 3-15 años siendo la media de 12 y mediana de 13 (Cuadro 12). Ante estos resultados, no consideramos que tengamos una adecuada representación de la población masculina en los extremos de edad, por lo que se deberá estudiar posteriormente una muestra masculina más representativa.

Es importante considerar que el diagnóstico de SAF conforme al Consenso Internacional <sup>6</sup>, depende de la presencia de un criterio clínico así como de laboratorio, por lo que al incluir únicamente a los AcACL en nuestro estudio, puede servir como fundamento para compararse con otros anticuerpos y a su vez corroborar en el tiempo, la evolución de la enfermedad de nuestros pacientes para así disminuir la probabilidad de falsos positivos.

En cuanto a subunidades de AcACL IgM e IgG, es primordial incluir un número mayor de pacientes para mejorar conforme lo visto en nuestro estudio el diagnóstico de SAF en la población pediátrica y así ayudarnos a esclarecer muchas de las variantes en su diagnóstico.

## XII. ANEXOS

### ANEXO 1

#### Tablas y Cuadros

**Cuadro 1. Prueba AcACL a 0.5 u/ml y presencia de manifestación clínica**

PRUEBA	MANIFESTACION CLINICA		
	AUSENTE	PRESENTE	TOTAL
NEGATIVA	152	24	176
POSITIVA	94	55	149
TOTAL	246	79	325

**Cuadro 2. Número de casos por manifestaciones clínicas y correlación con prueba AcACL positiva**

Manifestación clínica	No. de casos de 79	Prueba de AcACL positiva
Trombocitopenia	54	33
Anemia hemolítica	14	13
Oclusión de arterias cerebrales	7	4
Migraña	4	4
<i>Livedo reticularis</i>	3	3
Trombosis venosa profunda	2	2
Corea	2	2
Gangrena	1	1
Ulceras	1	1

**Cuadro 3. Presencia de manifestaciones clínicas por subunidades positivas IgM e IgG de AcACL**

	IgM positiva n=61	IgG positiva n=27	p (likelihood ratio)
Trombocitopenia	13 (21%)	9 (33%)	0.0384
Anemia hemolítica	5 (8%)	3 (11%)	0.4498
Oclusión arteria cerebral	3 (5%)	2 (7%)	0.4311
Migraña	3 (5%)	2 (7%)	0.4311
Livedo reticularis	2 (3%)	2 (7%)	0.1695
Trombosis venosa profunda	2 (3%)	2 (7%)	0.1695
Gangrena	1 (2%)	1 (4%)	0.3387
Ulceras	1 (2%)	1 (4%)	0.3387
Corea	1 (2%)	1 (4%)	0.3387

**Cuadro 4. Prueba AcACL a 0.642 u/ml y presencia de manifestación clínica**

PRUEBA	MANIFESTACION CLINICA		TOTAL
	AUSENTE	PRESENTE	
NEGATIVA	135	17	152
POSITIVA	111	62	173
TOTAL	246	79	325

**Cuadro 5. Prueba de subunidad IgM de AcACL a 20 uMPL/ml y presencia de manifestación clínica**

PRUEBA	MANIFESTACION CLINICA		TOTAL
	AUSENTE	PRESENTE	
NEGATIVA	12	3	15
POSITIVA	37	24	61
TOTAL	49	27	76

**Cuadro 6. Prueba de subunidad IgM de AcACL a 45 uMPL/ml y presencia de manifestación clínica**

PRUEBA	MANIFESTACION CLINICA		TOTAL
	AUSENTE	PRESENTE	
NEGATIVA	31	5	36
POSITIVA	18	22	40
TOTAL	49	27	76

**Cuadro 7. Prueba de subunidad IgG de AcACL a 20 uGPL/ml y presencia de manifestación clínica**

PRUEBA	MANIFESTACION CLINICA		TOTAL
	AUSENTE	PRESENTE	
NEGATIVA	38	11	49
POSITIVA	11	16	27
TOTAL	49	27	76

**Cuadro 8. Prueba de subunidad IgG de AcACL a 24 uGPL/ml y presencia de manifestación clínica**

PRUEBA	MANIFESTACION CLINICA		TOTAL
	AUSENTE	PRESENTE	
NEGATIVA	42	12	54
POSITIVA	7	15	22
TOTAL	49	27	76

**Cuadro 9. Resultados de la probabilidad de presentar SAF en relación al sexo, edad y títulos de prueba polivalente de AcACL por regresión logística**

SEXO	EDAD	Ac ACL tr	Probabilidad de presentar el cuadro clínico
Femenino	Mayor	Incremento gradual a partir de valor de ACL >0.425	Mayor
Femenino	Menor	Incremento gradual	Mayor
Masculino	Mayor	Alto	Menor
Masculino	Menor	Incremento desde 0.329-1.285	Mayor

**Cuadro 10. Comparación de resultados de puntos de corte de AcACL a 0.5 y 0.642**

Prueba	Valor corte	Sensibilidad	Especificidad	VPP	VPN
AcACL +	0.5u	<b>70%</b>	62%	<b>37%</b>	<b>86%</b>
AcACL +	0.642u	57%	<b>77%</b>	<b>36%</b>	<b>89%</b>

**Cuadro 11. Comparación de resultados de puntos de corte de subunidades de IgM e IgG**

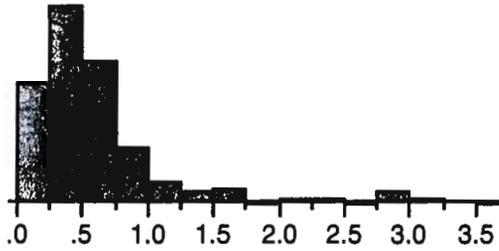
	Valor corte	Sensibilidad	Especificidad	VPP	VPN
IgG ACL	24u (20u)	<b>56% (59%)</b>	<b>86% (77%)</b>	<b>68% (59%)</b>	<b>78% (77%)</b>
IgM ACL	45u (20u)	<b>81% (89%)</b>	<b>63% (24%)</b>	<b>55% (39%)</b>	<b>86% (80%)</b>

**Cuadro 12. Población masculina enferma**

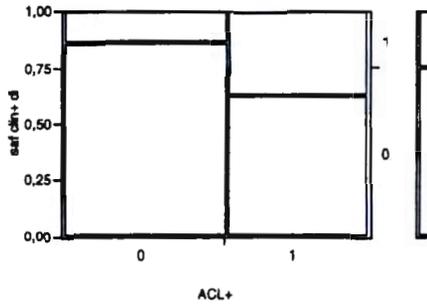
No. Paciente	Edad	ACL
1	15	0.584
2	14	1.033
2	13	1.631
2	13	1.354
2	13	2.359
2	13	0.645
3	13	0.780
4	13	0.756
5	11	0.672
6	3	0.682

**Figuras y gráficos**

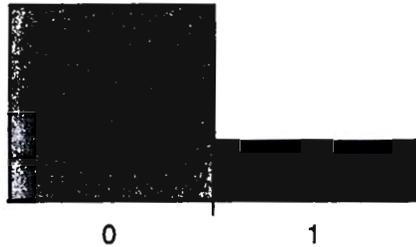
**Figura 1. Distribución de AcACL polivalente**



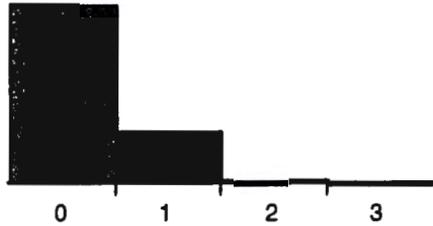
**Figura 2. AcACL positiva a 0.5 u/ml y presencia o no de manifestación clínica**



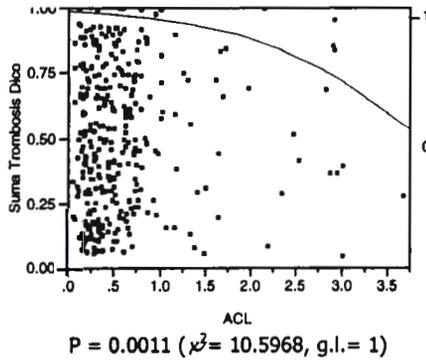
**Figura 3. Distribución de presencia o no de manifestaciones clínicas**



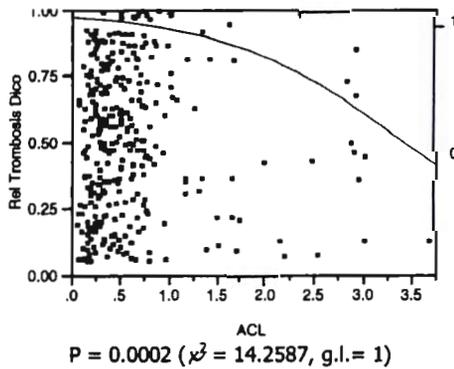
**Figura 4. Distribución de número de manifestaciones clínicas por paciente**



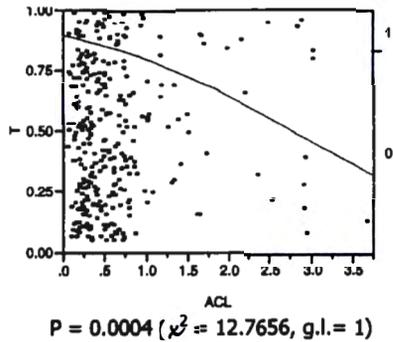
**Figura 5. Ajuste al modelo logístico de Manifestaciones clínicas de trombosis con ACL**



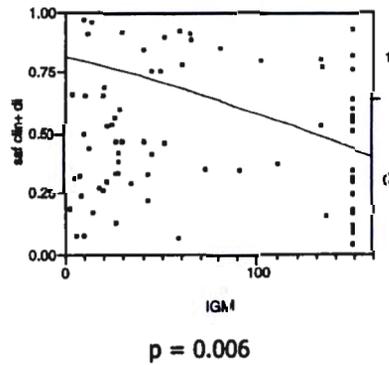
**Figura 6. Ajuste al modelo logístico de Manifestaciones clínicas relacionadas a trombosis (anemia hemolítica, corea, migraña) con ACL**



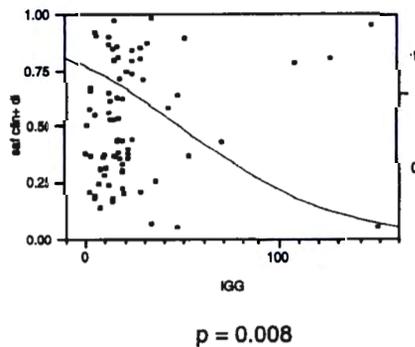
**Figura 7.** Ajuste al modelo logístico de Manifestaciones clínicas de trombocitopenia con ACL



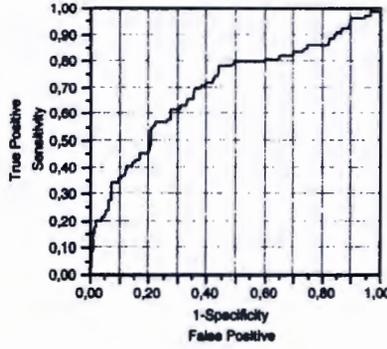
**Figura 8.** Asociación de manifestación clínica e IgM AcACL



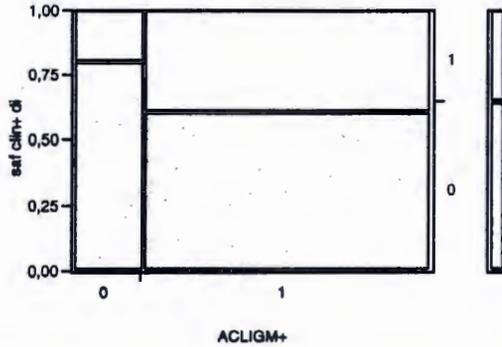
**Figura 9.** Asociación de manifestación clínica e IgG AcACL



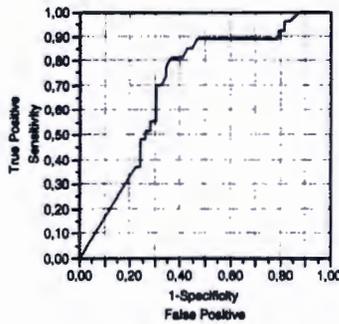
**Figura 10.** Curva ROC para obtener punto de corte para AcACL (área bajo la curva de 0.697)



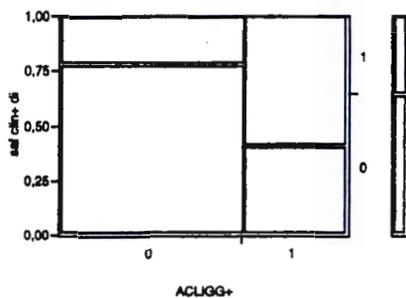
**Figura 11.** IgM de AcACL positiva a 20 uMPL/ml y presencia o no de manifestación clínica



**Figura 12.** Curva ROC para obtener punto de corte de subunidad IgM de AcACL (area bajo la curva 0.702)



**Figura 13. IgG de AcACL positiva a 20 uMPL/ml y presencia o no de manifestación clínica.**



**Figura 14. Curva ROC para punto de corte de subunidad IgG de AcACL (area bajo la curva 0.724)**

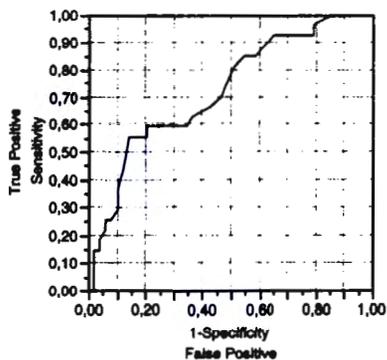
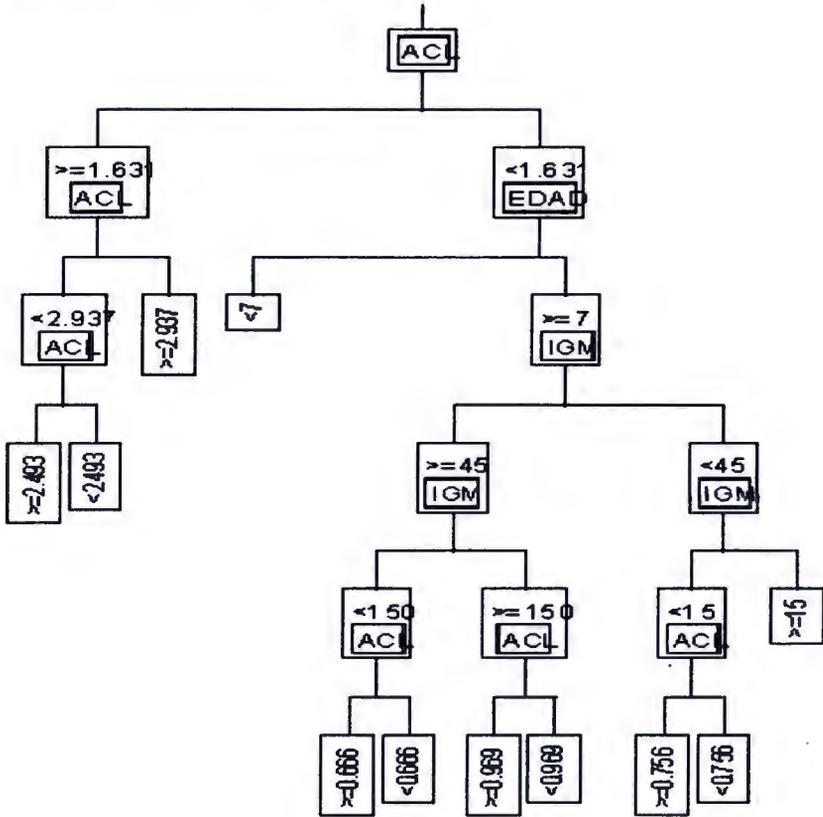
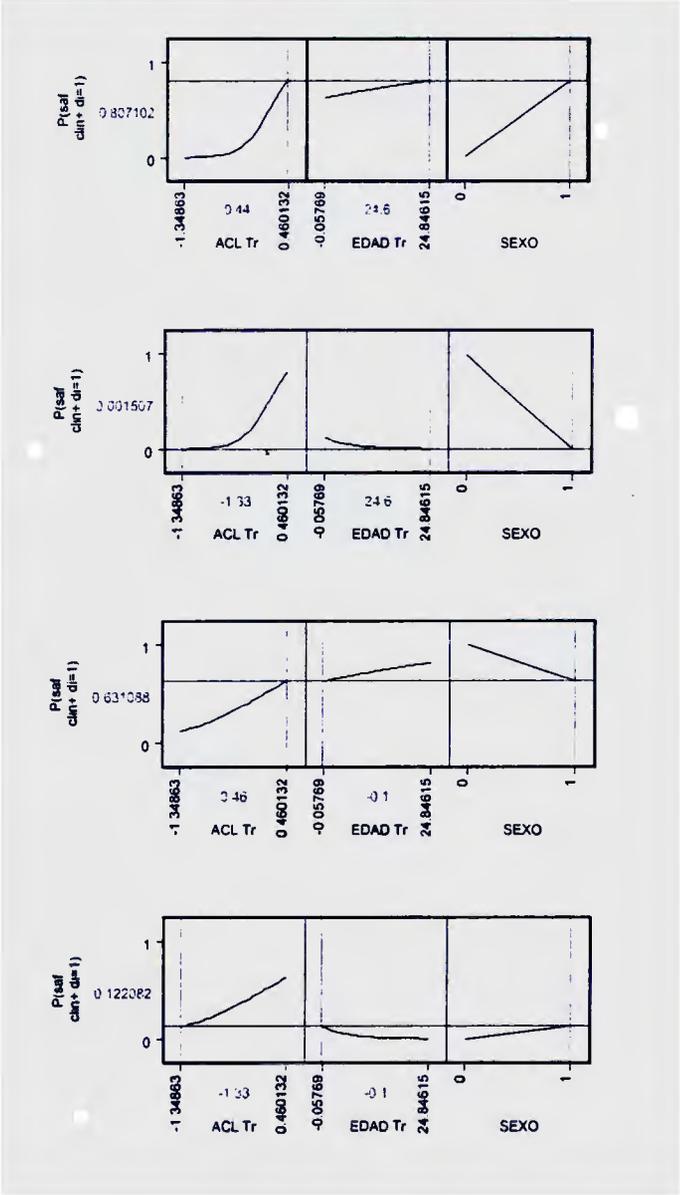
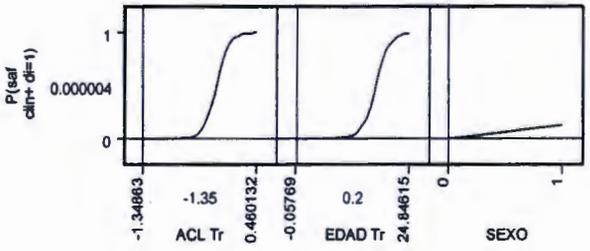
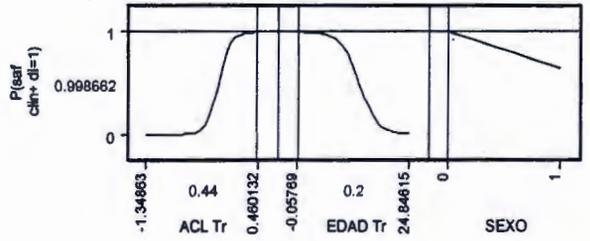
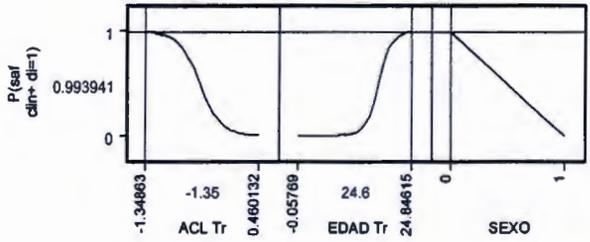
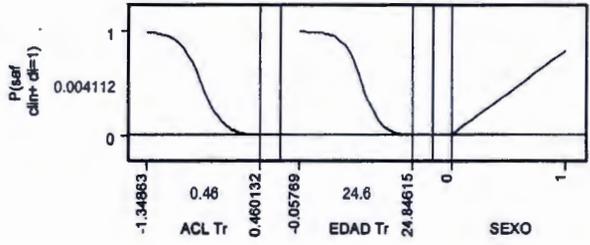


Figura 15. Arbol de partición



**Figura 16. Esquemas de correlación entre la probabilidad de SAF con la interacción del sexo, edad y títulos de AcACL por regresión logística**





**Anexo 2**

**HOJA DE RECOLECCION DE INFORMACIÓN**

---

**DATOS GENERALES:**

Nombre del paciente:

No. de Registro:

Edad:

Sexo:

**DIAGNOSTICO DE INGRESO:**

---

**CUADRO CLINICO:**

**RIÑÓN:**

Trombosis de arteria renal SI\_ NO\_

Infarto renal SI\_ NO\_

Microangiopatía trombótica renal SI\_ NO\_

**SNC:**

Trombosis venosa de SNC SI\_ NO\_

Senos venosos cerebrales SI\_ NO\_

Oclusión de arterias cerebrales

    Ataques isquémicos transitorios SI\_ NO\_

    Infartos SI\_ NO\_

**EXTREMIDADES:**

Trombosis profunda de extremidades inferiores

    Venosa SI\_ NO\_

    Arterial SI\_ NO\_

Isquemia o gangrena de extremidades SI\_ NO\_

Isquemia digital SI\_ NO\_

Úlceras SI\_ NO\_

**PULMÓN:**

Embolismo pulmonar SI\_ NO\_

Microtrombosis pulmonar (hemorragia alveolar) SI\_ NO\_

Hipertensión pulmonar SI\_ NO\_

**RETINA:**

Trombosis de vena de retina SI\_ NO\_

**HIGADO E INTESTINO:**

Embolismo de venas hepáticas SI\_ NO\_

Infarto hepático SI\_ NO\_

Trombosis de arteria mesentérica SI\_ NO\_

**CORAZÓN:**

Trombosis coronaria SI\_ NO\_

Infarto del miocardio SI\_ NO\_

Insuficiencia valvular mitral o aórtica SI\_ NO\_

**OTRAS MANIFESTACIONES:**

Anemia hemolítica con Coombs positivo SI\_ NO\_

Trombocitopenia SI\_ NO\_

Enfermedad de Addison (infarto o hemorragia adrenal) SI\_ NO\_

Sx. de Budd Chiari SI\_ NO\_

Mielopatía transversa SI\_ NO\_

Corea SI\_ NO\_

Livedo reticularis SI\_ NO\_

Alteraciones neuropsiquiátricas SI\_ NO\_

Necrosis avascular de hueso SI\_ NO\_

Migraña SI\_ NO\_

**SAF CATASTRÓFICO:**

Síndrome de dificultad respiratoria del adulto en el niño con falla multiorgánica y oclusión vascular múltiple SI\_ NO\_

**CRITERIO PARA REALIZACION DE ELISA:**

**RESULTADOS DE PRUEBAS DE LABORATORIO:**

	POSITIVO	POLIVANTE	MPL	GPL	NEGATIVO
<b>Anticuerpos ACL</b>					

**DIAGNOSTICO FINAL:**

Síndrome antifosfolípido:

Sí/No

### **Anexo 3**

Descripción de la prueba Quanta Lite:

Se valora la prueba de ELISA QUANTA Lite™ para determinación de anticuerpos ACL en unidades MPL (IgM) y en unidades GPL (IgG). De la cual se cuenta con 30 controles sanos.

ELISA QUANTA Lite™ ACL es una prueba de ELISA para la detección en suero humano de anticuerpos ACL, utilizando la técnica de emparedado de ELISA. Existe una prueba para cada isotipo IgM o IgG.

Se utilizan placas de plástico con pequeños pozos cubiertos con cardioplipina purificada y estabilizada (para prevención de la unión de los Ac al pozo, se agrega albúmina de suero bovino)

- Inicialmente se coloca en un tubo de ensayo 5  $\mu$ L del suero del paciente en 500  $\mu$ L de diluyente para obtener una dilución 1:100.
- Por otra parte en un pozo de la placa se agregan 100  $\mu$ L del reactivo comercial con anticuerpos IgM ó IgG que constituyen los controles positivos IgM e IgG respectivamente.
- A otro pozo se agregan 100  $\mu$ L de suero de un control negativo, que tiene ausencia de anticuerpos (del cual se cuenta con 30 controles sanos).
- Y finalmente de la dilución 1:100 del suero del paciente se toman 100  $\mu$ L que se colocan en un pozo para determinación de IgM y otro para IgG.
- Se esperan 30 minutos de incubación a temperatura ambiente, durante este periodo los anticuerpos IgM ó IgG ACL presentes en el suero se unen a la cardioplipina.
- Posteriormente se decanta, mediante la realización de 3 lavados con PBS twin (solución de lavado).
- Luego se agregan 100  $\mu$ L de conjugado (IgM ó IgG ACL marcada y conjugada con

peroxidasa –HRP-).

- Se deja 30 minutos con el conjugado.

- Se lava nuevamente por 3 ocasiones con PBS-twin (material de lavado), para remover todo material no unido. La proteína no unida es removida mediante un proceso de lavado y la IgM ó IgG ACL marcada y conjugada con peroxidasa ya está adherida a los pozos.

- Luego se agrega tetrametilbencidina que es el revelador o cromógeno, sustrato de la peroxidasa, el cual sufre un cambio de coloración en la presencia de la enzima conjugada adquiriendo un color azul.

- Se deja en reposo 30 minutos.

- Posteriormente se cambia el pH al agregar ácido sulfúrico 100  $\mu$ L, cambiando el color a amarillo.

- Se lee posteriormente en el lector de ELISA a un filtro de 450 nm., mediante una lectura de absorbancia.

- Finalmente se determina la presencia o ausencia de anticuerpos IgM ó IgG ACL comparando la densidad óptica de la muestra interpolándola con la curva de calibración.

- Los resultados obtenidos son reportados en unidades MPL ó GPL/ml.

## **Anexo 4**

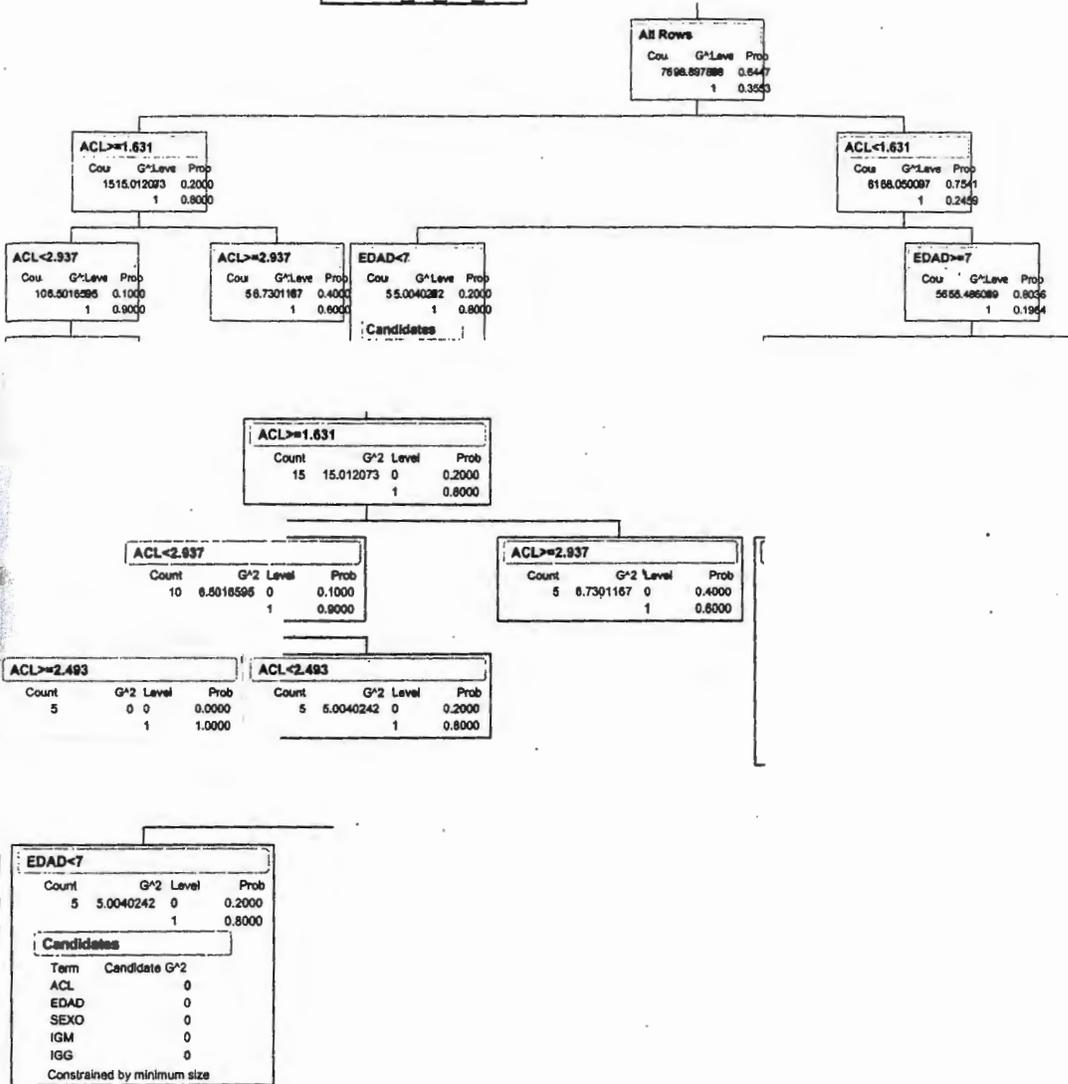
### **DEFINICIONES OPERACIONALES:**

1. SAF clínico: se refiere a la presencia de alguna de las 31 manifestaciones clínica que se incluya dentro del apartado de "variables de manifestaciones clínicas de SAF". Variable nominal (positivo/negativo).
2. Anticuerpos ACL: Presencia de anticuerpos para ACL en su forma polivalente o por isotipo IgG y/o IgM, detectado por el método de ELISA QUANTA Lite™ ACL y que corresponde a "variables de interés para la contrastación de hipótesis". Variable nominal (positivo/negativo) o bien continua tanto para su forma polivalente como de subclases IgG e IgM
3. Género: Condición orgánica que distingue lo masculino de lo femenino, determinado por las características fenotípicas y genotípicas del individuo. Variable nominal (masculino/femenino)
4. Edad: Unidad de tiempo transcurrido desde el nacimiento hasta el momento de su estudio. Variable continua (años)
5. Trombosis: Oclusión trombótica de cualquier arteria, vena o capilar y que dependiendo del sitio de presentación se describe en "variables de manifestaciones clínicas de SAF" como embolismo de venas hepáticas, embolismo pulmonar, microangiopatía trombótica renal, trombosis de arteria renal, trombosis venosa de SNC, trombosis de senos venosos cerebrales, trombosis profunda de extremidades inferiores (venosa o arterial), microtrombosis pulmonar (hemorragia alveolar), trombosis de vena de retina, trombosis de arteria mesentérica, trombosis coronaria, Sx. de Budd Chiari. Variable nominal (positivo/negativa)

6. Livedo reticularis: Moteado purpúrico de la piel, sobre todo de extremidades. Variable nominal (positivo/negativa)
7. Migraña: Cefalea sin alteración orgánica aparente que no responde a analgésicos comunes. Variable nominal (positivo/negativa)
8. Ataque isquémico transitorio: Episodios únicos o intermitentes de disminución de la función motora, causada por isquemia cerebral transitoria. Variable nominal (positivo/negativa)
9. Accidente cerebrovascular: Hemorragia o infarto cerebral demostrado por pruebas de gabinete. Variable nominal (positivo/negativa)
10. Mielitis transversa: Proceso inflamatorio agudo que afecta médula espinal, con patrón ascendente, progresivo. Variable nominal (positivo/negativa)
11. Infarto: datos clínicos, laboratorio o paraclínicos que determinen la presencia de un área circunscrita de necrosis tisular isquémica debida a flujo sanguíneo inadecuado y que dependiendo del sitio de presentación se describen en "variables de manifestaciones clínicas de SAF" como infarto renal, infarto hepático o infarto del miocardio, oclusión de arterias cerebrales, enfermedad de Addison (infarto o hemorragia adrenal). Variable nominal (positivo/negativa)
12. Isquemia: Disminución local del aporte de sangre, a causa de obstrucción del flujo de sangre arterial y que dependiendo del sitio de presentación se describen en "variables de manifestaciones clínicas de SAF" como isquemia o gangrena de extremidades e isquemia digital. Variable nominal (positivo/negativa)
13. Gangrena: Necrosis de una parte del cuerpo, causada por insuficiencia del riego sanguíneo. Variable nominal (positivo/negativa)

14. **Úlceras:** Interrupción de la continuidad de la superficie epitelial. Variable nominal (positivo/negativa)
15. **Corea:** Movimientos amplios, arrítmicos, involuntarios, de tipo potente, rápido, saltón y de breve duración. Variable nominal (positivo/negativa)
16. **Trombocitopenia:** Disminución del número absoluto de plaquetas por debajo de valores normales. Variable nominal (positivo/negativa)
17. **Necrosis avascular de hueso:** flujo sanguíneo inadecuado a cierto tejido óseo que produce muerte celular. Variable nominal (positivo/negativa)
18. **Insuficiencia valvular mitral o aórtica:** cierre incompleto valvular que permite flujo sanguíneo a través de la misma. Variable nominal (positivo/negativo)
19. **Hipertensión pulmonar:** presencia de elevación de la presión de la circulación menor o falla de cavidades derechas del corazón. Variable nominal (positivo/negativo)
20. **Anemia hemolítica con Coombs positivo:** disminución de la concentración de hemoglobina por debajo de los límites para la edad. Variable nominal (positivo/negativo)
21. **Alteraciones neuropsiquiátricas:** alteración en cuanto a la psique (mente). Variable nominal (positivo/negativo)
22. **SAF catastrófico:** Síndrome de dificultad respiratoria del adulto en el niño con falla multiorgánica y oclusión vascular múltiple. Variable nominal (positivo/negativo)

# Anexo 5



ACL<1.631			
Count	G*2 Level	Prob	
81	68.050097	0	0.7541
		1	0.2459

EDAD>=7			
Count	G*2 Level	Prob	
56	55.486069	0	0.8036
		1	0.1964

IGM<45			
Count	G*2 Level	Prob	
23	29.720163	0	0.6522
		1	0.3478

IGM<45			
Count	G*2 Level	Prob	F
33	20.105982	0	0.91
		1	0.01

IGM>=45			
Count	G*2 Level	Prob	
23	29.720163	0	0.6522
		1	0.3478

IGM<150			
Count	G*2 Level	Prob	
13	17.944828	0	0.4615
		1	0.5385

IGM>=150			
Count	G*2 Level	Prob	
10	6.5016595	0	0.9000
		1	0.1000

ACL>=0.666			
Count	G*2 Level	Prob	
8	8.9973623	0	0.2500
		1	0.7500

ACL<0.666			
Count	G*2 Level	Prob	
5	5.0040242	0	0.8000
		1	0.2000

ACL>=0.999			
Count	G*2 Level	Prob	
5	5.0040242	0	0.8000
		1	0.2000

ACL<0.999			
Count	G*2 Level	Prob	
5	0	0	1.0000
		1	0.0000

IGM<45			
Count	G*2 Level	Prob	
33	20.105982	0	0.9091
		1	0.0909

IGM<15			
Count	G*2 Level	Prob	
13	14.045308	0	0.7892
		1	0.2308

IGM>=15			
Count	G*2 Level	Prob	
20	0	0	1.0000
		1	0.0000

ACL>=0.756			
Count	G*2 Level	Prob	
6	8.3177662	0	0.5000
		1	0.5000

ACL<0.756			
Count	G*2 Level	Prob	
7	0	0	1.0000
		1	0.0000

### XIII. BIBLIOGRAFIA:

1. RAVELLI A., et al. "Antiphospholipid antibody syndrome in pediatric patients". *Rheum Dis Clin North Am.* 1997; 23: 657-672.
2. ASHERSON R. "Major histocompatibility complex associations with primary antiphospholipid syndrome". *Arthritis Rheum.* 1992; 35: 124-125.
3. MERRIL J. "Which Antiphospholipid antibody tests are most useful?". *Rheum Dis Clin North Am.* 2001; 27: 525-549.
4. AGUILAR C., LUCIA J.F. "Anticuerpos antifosfolípido en población pediátrica asintomática". *An Esp Pediatr.* 2001; 54: 444-449.
5. LEVINE J., et al. "The Antiphospholipid syndrome". *N Engl J Med.* 2002; 347: 145-146.
6. WILSON W., et al. "International consensus statement on preliminary classification criteria for definite antiphospholipid syndrome: report of an international workshop". *Arthritis Rheum.* 1999; 42: 1309-1311.
7. ESCALANTE A., et al. "Accuracy of Anticardiolipin Antibodies in identifying a history of thrombosis among patients with systemic lupus erythematosus". *Am J Med.* 1995; 98: 559-565.
8. ROUBEY R. "Comparision of an emzime-linked immunosorbent assay for antibodies to  $\beta$ 2-glycoprotein I and a conventional anticardiolipin immunoassay". *Arthritis Rheum.* 1996; 39: 1606-1607
9. HANLY J. "Antiphospholipid syndrome: an overview". *Canadian Medical Association Journal.* 2003; 168 (13): 1675-82.
10. GALLI M. et al. "Anticardiolipin antibodies (ACA) direceted not to cardiolipin but to a plasma protein cofactor". *Lancet.* 1990; 335: 1544-47.

11. OOSTING J. et al. "Antiphospholipid antibodies directed against a combination of phospholipids with prothrombin, protein C, or protein S: an explanation for their pathogenic mechanism?". *Blood*. 1993; 81: 2618-2625.
12. PETRI M. "Diagnosis of Antiphospholipid antibodies". *Rheum Dis Clin North Am*. 1994; 20: 443-469.
13. BERTOLACCINI M. et al. "Múltiple Antiphospholipid tests do not increase the diagnostic yield in antiphospholipid syndrome". *British J Rheum*. 1998; 37: 1229-1232.
14. MATSURA E. et al. "Anticardiolipin cofactor (s) and differential diagnosis of autoimmune disease". *Lancet*. 1991; 336: 177-178.
15. GREAVES M. "Antiphospholipid antibodies and thrombosis". *Lancet*. 1999; 1348-1353.
16. KRAEMER HC. "Copying strategies in Psychiatric clinical research". *J consult clin psychol*. 1981; 49: 309-19.
17. RUIZ A., et al. "Epidemiología clínica" (Investigación clínica aplicada), edición 1ª, (sine loco), 2004, Editorial medica panamericana, cd rom incluido, 141-162
18. LOIZOU S., et al. "Measurement of anticardiolipin antibodies by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), standarization and quantification of results". *Clin Exp Immunol*. 1985; 62: 738-745
19. HARRIS EN. "The second international anticardiolipin standarization workshop. The Kingston antiphospholipid antibody study (KAPS) group". *Am. J. Clin. Pathol*, 1990; 94: 476-484.