

9
205



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

**EVALUACION DE DOS METODOS INMUNOENZIMATICOS
PARA LA IDENTIFICACION DE ANTICUERPOS
ANTICARDIOLIPINA.**

TESIS MANCOMUNADA
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE :
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A N :
ADRIANA ALVAREZ ESPINOSA
MARIA ELENA PADILLA MENDOZA

México, D. F.

Febrero de 1993

**TESIS CON
FALLA LE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

| | Página |
|---|---------------|
| INTRODUCCION | |
| CAPITULO 1 | |
| ANTECEDENTES | |
| Historia | 2 |
| Aspectos clínicos | 3 |
| Características de anticuerpos antifosfolípidos | 5 |
| Mecanismos de patogenicidad | 8 |
| Prevalencia de anticuerpos antifosfolípidos | 10 |
| CAPITULO 2 | |
| MATERIAL Y METODOS | |
| Material | 15 |
| Origen y manejo de muestras | 16 |
| Cuantificación de proteínas | 16 |
| Sensibilidad del conjugado | 17 |
| ELISA de peroxidasa | 18 |
| ELISA de fosfatasa alcalina | 19 |
| Tratamiento estadístico | 20 |

CAPITULO 3

RESULTADOS

Estandarización de ELISA 21

Distribución demográfica de los sueros normales 21

Valores de los sueros normales 22

**Distribución demográfica de los sueros de los
pacientes** 22

Valores de los sueros de los pacientes 23

DISCUSION 24

BIBLIOGRAFIA 27

INTRODUCCION

Desde hace 83 años se sabe que hay reacciones antígeno-anticuerpo que involucran lípidos; éstas tienen interés clínico porque se asocian a infecciones, como en el caso de la sífilis y también se ha reconocido un síndrome clínico pleomórfico en el que probablemente la reacción entre fosfolípidos y anticuerpos específicos participan en su patogénesis.

Las pruebas para detectar anticuerpos antifosfolípidos son: el ensayo inmunoenzimático en fase-sólida (ELISA), y ensayos de coagulación (Detección del anticoagulante de lupus) y VDRL. La presente investigación tiene como objetivo, estudiar la sensibilidad, especificidad y concordancia en la detección de anticuerpos antifosfolípidos mediante los sistemas inmunoenzimáticos en fase-sólida con peroxidasa y fosfatasa.

Como se puede advertir, la investigación considera dos métodos de la prueba de ELISA, en las cuales se utiliza cardiolipina como antígeno.

La importancia de este estudio radica en que determina si los resultados obtenidos por ambos métodos son equivalentes.

CAPITULO 1

ANTECEDENTES

Historia

La presencia de anticuerpos antifosfolipidos (AFL) es un fenómeno que ha sido reconocido desde hace varias décadas, especialmente en el campo de enfermedades infecciosas. Se han incluido en esta categoría de anticuerpos los denominados "anticoagulante de lupus" (AL), anticuerpos contra cardiolipina, anticuerpos contra otros fosfolipidos, además de las pruebas falsas positivas para sífilis (VDRL), (1).

Estos anticuerpos se han asociado con eventos trombóticos, tanto venosos como arteriales. Entre las primeras descripciones figuran en 1963 la de Bowie y cols. (2) y en 1965 la de Alarcón-Segovia y Osmundson (3). El término de "anticoagulante de lupus", fue introducido por Feinstein y Rapaport en razón de que la mayoría de los pacientes en que se detectaba padecían lupus eritematoso generalizado (LEG). Posteriormente, han aparecido otros informes, pero no fue sino hasta los trabajos de Boey y Harris (4), cuando se logró disponer de un ensayo más apropiado para la apreciación sistematizada de estos anticuerpos y, en consecuencia, aumentó el interés por definir sus implicaciones clínicas.

Aspectos clínicos

Se ha encontrado que los AFL se asocian con diversas manifestaciones clínicas: oclusiones arteriales o trombosis venosa, pérdida fetal repetida, trombocitopenia, anemia hemolítica, síndrome de Evans, livedo reticularis, isquemia cerebral transitoria, migraña y corea (5). Los AFL ocurren en el LEG, pero pueden presentarse en otras alteraciones autoinmunes relacionadas u otras enfermedades no relacionadas (6).

La relación LEG/AFL parece irse conociendo a la luz de hallazgos recientes, como los dados a conocer por Alarcón-Segovia (7), que en una serie de 500 pacientes con LEG detectaron una fuerte asociación positiva de trombosis venosa, trombocitopenia, anemia hemolítica, úlceras en miembros inferiores y pérdida fetal repetida con la presencia de AFL. Se encontró también una asociación significativa, aunque menos intensa, entre AFL y oclusión arterial, livedo reticularis y mielitis transversa. Arbitrariamente, estos investigadores definieron con fines probablemente epidemiológicos el "síndrome antifosfolípido" como la ocurrencia en presencia de AFL de por lo menos dos de los eventos mencionados:

Así mismo, se han descrito pacientes que reúnen criterios de síndrome antifosfolípido, pero sin ninguna otra manifestación de LEG ni de otra enfermedad difusa del tejido conjuntivo: en estos casos se ha propuesto un "síndrome antifosfolípido primario" (4).

Muchos centros han reportado pacientes con síndrome antifosfolípido primario. Estos pacientes presentan una prueba negativa o débilmente positiva para anticuerpos antinucleares (AAN), y un alto título de AFL con complicaciones múltiples, sin anomalías inmunológicas asociadas.

Las complicaciones trombóticas que se presentan en el síndrome antifosfolípido primario parecen ser similares a las que se presentan con AFL asociados con LEG (8).

Se considera que un paciente presenta síndrome antifosfolípido cuando reúne dos o más de los siguientes criterios: (7)

Trombosis venosa: cualquier episodio de trombosis venosa profunda que ocurra sin otra causa aparente, con cuadro clínico característico, diagnosticado por el médico y con corroboración por venograma o estudio gamagráfico de preferencia.

Embolia pulmonar: se considera como otro criterio, si ocurre asincrónicamente con otros episodios trombóticos.

Hipertensión pulmonar venooclusiva: será considerada cuando el patrón hemodinámico lo sugiera o de ser posible con prueba histológica.

Trombocitopenia: cuenta de plaquetas por debajo de 150 mil en dos ocasiones.

Anemia hemolítica: caída de hemoglobina sanguínea de por lo menos 3 g/dl, reticulocitos 5% o Coombs positivo.

Úlceras en piernas: cuando sean concomitantes a la actividad clínica y en ausencia de trauma.

Pérdida fetal recurrente: dos o más abortos espontáneos.

Oclusión arterial: se considerará cuando afecte arterias nominadas o causen infarto bien definido y de preferencia con comprobación arteriográfica, ultrasonográfica o gamagráfica.

Livedo reticularis: cuando se encuentre.

Mielitis transversa: cuando se determine con exploración neurológica.

Además, debe tener anticuerpos antifosfolípidos positivos como requisito indispensable.

Características de los anticuerpos antifosfolípidos

Los anticuerpos antifosfolípidos se detectan comúnmente en pacientes con sífilis, pero no están asociados con complicaciones clínicas. Algunas investigaciones se han enfocado a entender las diferencias entre AFL en sífilis y otras condiciones, y se ha sugerido que la ausencia de complicaciones clínicas en sífilis y AFL inducidos por drogas, y la presencia de estas complicaciones clínicas en AFL con LEG están relacionadas con las características del anticuerpo como: la diferencia de isotipos (9), avidéz (10,11), distribución de las subclases de IgG (11,12) y a la especificidad (13,14).

Algunos autores han propuesto que las clases de inmunoglobulinas tienen importancia clínica, encontrando que los AFL clase IgG se asocian más fuertemente con complicaciones clínicas (15-18).

En LEG los anticuerpos contra la doble hélice del ADN son principalmente de las subclases IgG1 e IgG3 (19-21), en contraste los AFL en LEG abarcan las cuatro subclases de IgG predominando IgG2 e IgG4 (11,12). Los anticuerpos inducidos en sífilis son principalmente IgG1 e IgG3 (11). Las diferencias en la distribución de subclases entre AFL en LEG y en sífilis implican una variación en la inducción de autoanticuerpos y un rearrreglo genético, lo que sugiere una diferencia en la antigenicidad o en la presentación del antígeno.

El tipo de cadena ligera de los AFL en LEG es predominantemente λ (11), la distribución normal de la cadena ligera es aproximadamente 2/3 de κ y 1/3 de λ (22), y las cadenas normales de los otros autoanticuerpos (19,20) y AFL inducidos en sífilis (11) son principalmente κ .

Se sugirió una teoría en la cual se explicaba la reactividad cruzada de los AFL, con los anticuerpos anti-ADN, ya que se pensó que el grupo fosfato que forma parte de la cabeza polar de los fosfolípidos imitaba al fosfodiéster de la doble hélice del ADN, esta teoría fue refutada con la explicación de que los anticuerpos de baja avidez - monoclonales- pueden tener reacción cruzada, mientras que los anticuerpos de alta avidez -aquellos derivados de pacientes- no la presentan (23, 24).

Los AFL reaccionan contra fosfolípidos aniónicos como fosfatidilserina, fosfatidilinositol y ácido fosfatídico en general, más bien que con la cardiolipina en particular (11,25). La mayoría de los investigadores han encontrado que los AFL no reaccionan con los fosfolípidos con carga positiva o neutra, como son la fosfatidiletanolamina y la fosfatidilcolina (11,25).

El epítoto reactivo en el fosfolípido no ha sido aún definido, sin embargo algunos componentes importantes de éste han sido establecidos. El grupo fosfodiéster y la carga negativa de la cabeza polar parecen ser necesarios, la longitud de la cadena y el grado de saturación juegan también un papel importante. Los AFL en LEG reaccionan mejor con fosfatidilgliceróles con 18 átomos de carbono y un doble enlace por cadena (C18:1), el enlace es mejor en cadenas de 18 átomos de carbono que en cadenas de 14 o 16, de fosfatidilgliceróles. Los AFL en LEG no reaccionan con fosfatidilgliceróles de 12 átomos de carbono (26).

Investigaciones recientes han sugerido que es necesaria la presencia de un cofactor plasmático para que se lleve a cabo la interacción entre el fosfolípido y el AFL, en el ensayo de ELISA.

El cofactor se identificó como beta-2-glicoproteína I (beta2GPI) también conocida como apolipoproteína H. Los anticuerpos anticardiolipina (ACL) reconocen a la beta2GPI unida a fosfolípidos aniónicos, pero estos anticuerpos no reconocen al

cofactor, si éste no está unido al fosfolípido, indicando que ambos, el fosfolípido y la glicoproteína comprenden el epítopo al cual estos anticuerpos están dirigidos (27).

Mecanismos de patogenicidad

Desde el punto de vista de mecanismos patogénicos en que están involucrados los AFL, se consideran dos grandes posibilidades por el momento: la vía que provoca manifestaciones como oclusión arterial, trombosis venosa, pérdida fetal recurrente, livedo reticularis, isquemia cerebral transitoria y corea, relacionada a los fenómenos intravasculares.

La otra vía puede provocar manifestaciones relacionadas probablemente a daño celular por los AFL, habiéndose identificado trombocitopenia (AFL IgG), anemia hemolítica (AFL IgM) y síndrome de Evans (AFL IgG/IgM) (7) además de evidencia de actividad contra células endoteliales.

Existe una estrecha relación entre los anticoagulantes de lupus y los AFL, sin embargo no ha sido definido con exactitud el porqué de la presencia de un anticoagulante se asocia a trombosis, aunque los hallazgos de que los AFL "in vivo" pueden actuar en varios sitios del proceso de coagulación permite comprender que realmente el resultado final dependerá de la suma algebraica de sus efectos parciales.

Los sitios de acción de los AFL incluyen plaquetas, células endoteliales o fosfolípidos asociados con el cofactor de las células endoteliales, trombomodulina. Los AFL pueden reaccionar contra los fosfolípidos de carga negativa de la pared plaquetaria, incluyendo fosfatidilserina la cual tiene reacción cruzada con cardiolipina, ésta además no es en sí misma un constituyente de las paredes celulares. Sin embargo, los fosfolípidos cargados negativamente normalmente no son expresados en la superficie de la pared celular de eritrocitos ni plaquetas ya que de lo contrario probablemente inducirían actividad procoagulante permanente.

Así hemos observado como se acumula también evidencia que los AFL puede interactuar con los fosfolípidos de las células endoteliales cuando se expresan en su superficie.

Se han informado también que los AFL clase IgG causan inhibición de la formación de prostaciclina posiblemente por interferencia de la disponibilidad de ácido araquidónico por interacción con los fosfolípidos de membrana que dan origen a este ácido graso, amplificando efectos de tromboxano A₂.

Otro modo de interacción de AFL con efecto trombótico es el de neutralizar el efecto de los fosfolípidos en la actividad de la trombomodulina.

Se comprende así que la ubicuidad de los fosfolípidos en las paredes celulares y el papel que juegan en la coagulación, así como en la síntesis de prostaglandinas

prostaglandinas pueden explicar varias de las manifestaciones asociadas a la presencia de AFL por lo menos en el terreno de la especulación.

Además la reactividad cruzada de algunos AFL con ADN y "vice-versa" (28) abren la posibilidad de que existan otras vías patogénicas implicadas como podría ser la formación de complejos autoinmunes.

Prevalencia de los anticuerpos antifosfolípidos

La prevalencia de AFL en LEG varía con el tipo de ensayo que se utilice y la población estudiada. En la tabla 1 se muestran las frecuencias de los AFL en diferentes aspectos clínicos (8).

El anticoagulante de lupus también ha sido identificado en un 6-71% de los pacientes con LEG (29,30), estos resultados varían grandemente con el ensayo de coagulación escogido. En una revisión de la literatura Derksen encontró que sólo el 49% de los casos reportados estaban asociados con LEG. 20% estaban dentro del grupo de AFL inducidos por drogas (más comúnmente fenotiazina, procainamina, hidralazina y dilantin), 6% estuvieron asociados con enfermedad similar a lupus, y 33% fue asignado a etiologías misceláneas en donde se incluyen padecimientos hematológicos malignos, cáncer, hepatitis, vasculitis, infecciones y trombosis inexplicable o pérdida fetal en gente aparentemente sana (30).

| | <u>AFL</u> %+ | <u>AL</u> %+ |
|---------------------------------|------------------|-----------------|
| NORMAL | < 2 | < 1 |
| EMBARAZO NORMAL | < 2 | < 2 |
| LEG | 30-40 | 10-20 |
| LEG CON LIVEDO | 80 | *** |
| MUERTE FETAL RECURRENTE SIN LEG | 10-20 | 10-20 |
| ARTITRIS REUMATOIDE | 10* | < 5 |
| HIV | 60-90* | 20-40 |
| INFARTO MIOCARDIO | < 40 | 10-20 |

* BAJOS TITULOS

TABLA No. 1
PREVALENCIA ESTIMADA DE ANTICUERPOS ANTIFOSFOLIPIDOS Y ANTICOAGULANTE
DE LUPUS EN VARIAS POBLACIONES DE PACIENTES

Se han realizado estudios en muchas otras poblaciones para evaluar la prevalencia de ACL, pero se ha encontrado que la frecuencia exacta de ACL en la población general y en enfermedades reumáticas no seleccionadas es aún desconocida (31). Así mismo se encontró que pacientes con sífilis también pueden tener niveles elevados de ACL detectados por el método de ELISA, pero el título de ACL clase IgM es bajo (15). Una causa común que da un resultado falso-positivo en la prueba serológica para sífilis son las infecciones agudas (32), y también pueden ser una causa significativa de la elevación transitoria de ACL.

Vaarala et al. (33) evaluaron 149 sueros en los cuales se les detectó anticuerpos contra infecciones recientes incluyendo infecciones virales comunes tales como adenovirus, rubeola, varicela, parotiditis, así como micoplasma. En el 32% de estos sueros se detectaron niveles significativos de ACL, de los cuales el 10% presentó anticuerpos clase IgG, y al evaluar muestras posteriores de los mismos pacientes se presentó un descenso en los niveles de ACL. Los AFL también estuvieron asociados con infecciones por el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV). Se ha reportado que el anticoagulante de lupus se encuentra asociado con infecciones oportunistas (frecuentemente *Pneumocystis carinii*) con una incidencia del 20-42%.

Así mismo el 88-93% de los pacientes con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) mostraron ACL IgG, sin evidencia de complicaciones trombóticas (37,39).

En la enfermedad de Lyme se ha encontrado una incidencia del 30% de ACL y se ha demostrado que no existe reacción cruzada con *Borrelia burgdorferi* (39).

El título de ACL asociado a enfermedades reumáticas otras diferentes de LEG o síndrome antifosfolípido tiende a ser bajo y no está asociado con complicaciones clínicas. El 8-33% de los pacientes con artritis reumatoide son positivos para ACL IgG o IgM, con baja incidencia en otras enfermedades y sin asociación con trombosis o pérdida fetal repetida (31,40).

Generalidades de la detección de ACL

La detección de ACL por ELISA fue introducida hace aproximadamente 9 años con el objetivo de encontrar un método cuantitativo para la identificación de pacientes con AFL (42). Una ventaja potencial fue que la prueba puede ser hecha en suero preferentemente que en plasma, y los resultados podrían verse menos afectados por el método de preparación, transportación y almaceje de las muestras en comparación con la prueba de anticoagulante de lupus.

Además la prueba no se ve afectada por el uso de anticoagulantes en tubos.

El requerimiento más importante es que las enzimas una vez conjugadas con el anticuerpo, deben retener la mayor actividad enzimática y deben ser capaces de convertir el sustrato a producto, el cual debe ser fácilmente detectable.

En el ensayo inmonoenzimático para la detección de AFL, puede utilizarse como revelador la peroxidasa o la fosfatasa alcalina.

La peroxidasa cataliza la transferencia de átomos de una sustancia donadora a un aceptor. Tiene un peso molecular de 40 mil, está disponible en forma relativamente pura, es abundante ya que se extrae de los vegetales y es económica. Una gran ventaja en el uso de esta enzima es que hay un gran número de sustratos que se emplean para el desarrollo de la reacción colorida, entre ellos la benzina, o-toluidina y o-fenilendiamina, pero presenta la desventaja de que es rápidamente inactivada por contaminación bacteriana y desafortunadamente al agregar agentes bacteriostáticos como la azida de sodio o el metanol inactivan a la enzima. Sus sustratos son carcinogénicos y la enzima se ve afectada por el oxígeno (45).

El cromógeno más utilizado para la peroxidasa es la o-fenilendiamina, el rango para la generación del color no es siempre lineal. El pH como la concentración de peróxido de hidrógeno son críticos (46).

La fosfatasa alcalina es más resistente que la peróxidasa a tóxicos ambientales, agentes bacteriostáticos y a metabolitos bacterianos. La fosfatasa alcalina es específica para el enlace éster que une a los grupos fosfatos. Hay algunas desventajas para el uso de la fosfatasa alcalina, uno de estos es su elevado costo.

Otra desventaja es que tiene un peso molecular de 100 mil, por esta razón puede haber más problemas para obtener un conjugado activo. Y por último, debido a que la actividad óptima es a un pH de 8.6 en amortiguador de dietanolamina 2 M, los productos son poco coloridos a este pH, por lo que se debe de agregar una base relativamente fuerte (NaOH 1-3M) para convertir estos productos a formas aniónicas coloridas (46).

Se han realizado talleres con la participación de varios laboratorios de diferentes países para la estandarización de estos métodos (45,46), sin embargo, no se han confrontado, para seleccionar el método más adecuado de acuerdo con su sensibilidad, especificidad y su facilidad en la manipulación en el laboratorio.

Además, algunos autores sistemáticamente restan las absorbancias de los pozos sin cardiopina a los que fueron sensibilizados con ésta, por ejemplo el estudio realizado por Ruppin et al. (47) en el que se muestra una mayor especificidad utilizando este sistema, particularmente en presencia de hipergamaglobulinemia de la inmunoglobulina de clase IgG.

CAPITULO 2

MATERIAL Y METODOS

Material

- Lector de ELISA MR 300 DYNATECH LABORATORIES INC.
- Placas NUNC 96F 4-39454.
- Albúmina Sigma A-8022.
- Anti-IgG humana obtenida en cabra conjugado peroxidado. Sigma A-6029.
- Anti-IgG humana obtenida en cabra conjugado con fosfatasa alcalina. Sigma A-3150.
- Cardiolipina en etanol absoluto. Sigma C-1649.
- Suero bovino neonato. IN VITRO S-02
- IgG humana purificada por cromatografía con DEAE celulosa.
- Acido cítrico
- Acido sulfúrico
- Bicarbonato de sodio
- Carbonato de sodio
- Citrato trisódico
- Cloruro de magnesio
- Cloruro de sodio
- Dietanolamina
- Etanol absoluto

- Fosfato monobásico de sodio anhidro
- Fosfato dibásico de sodio dodecahidratado
- Hidróxido de sodio
- O-fenilendiamina
- Peróxido de hidrógeno al 30%
- P-nitrofenilfosfato disódico
- Tween 20

Origen y manejo de las muestras

Se incluyeron todas las muestras de sueros, en las que se pedía la determinación de ACL, al laboratorio de Inmunología del Instituto Nacional de Cardiología, en el período del 30 de octubre de 1991 al 15 de julio de 1992.

Se recolectaron 100 sueros de donadores clínicamente sanos del mismo Instituto.

Las muestras se tomaron por punción venosa recolectándose en tubos sin anticoagulante. Se centrifugó a 4°C, 15 minutos, y se almacenaron a -40°C en alícuotas de 200 microlitros por duplicado en viales eppendorf de 1.5 ml hasta el corrimiento.

Cuantificación de proteínas

La medición de proteínas en la presente investigación se realizó por el método de Lowry (48).

Sensibilidad del conjugado

Para conocer la sensibilidad de los conjugados se realizaron curvas dosis-respuesta para ambos conjugados (46). Las diluciones empleadas fueron 1:1000, 1:5000, 1:10000 y 1:15000.

Procedimiento:

- 1) Realizar diluciones de IgG en solución amortiguadora de carbonatos 0.01M pH 9.6. Partiendo de una concentración de 1 microgramo de IgG/ml hasta 90ng/ml.
- 2) Con las diluciones anteriores sensibilizar las placas con 100 microlitros/pozo, y se incubó a 4°C toda la noche.
- 3) Lavar las placas con PBS tween 0.5% pH 7.4. (solución de lavado) 4 veces.
- 4) Bloquear con 300 microlitros/pozo de PBS tween 0.5%, albúmina 0.5%, pH 7.4. 1 hora a 37°C.
- 5) Lavar 4 veces con la solución de lavado.
- 6) Agregar 100 microlitros/pozo del conjugado anti-IgG enzima diluido en PBS tween 0.5%, albúmina 0.5%, pH 7.4. (Las diluciones que se utilizaron del conjugado fueron: 1:1000, 1:5000, 1:10,000, 1:15,000, a partir de una concentración inicial).
- 7) Lavar 4 veces con la solución de lavado. Los pasos anteriores son comunes para el conjugado con peroxidasa como para el conjugado con fosfatasa alcalina.
- 8) Para el conjugado anti-IgG peroxidasa se agregan 100 microlitros/pozo del sustrato. (o-fenilendiamina y peróxido de hidrógeno en solución amortiguadora de citratos pH 4.5, en una proporción de 1 microgramo de o-fenilendiamina por 1 ml de solución amortiguadora y 4 microlitros de peróxido de hidrógeno al 30%). Se deja reaccionar durante 15 minutos a temperatura ambiente.

8a) Para el conjugado con anti-IgG fosfatasa alcalina se agregan 200 microlitros /pozo del sustrato (1 microgramo de p-nitrofenilfosfato por 1 ml de solución amortiguadora de dietanolamina pH 9.8) Se incuba durante 1 hora a 37 C, en la oscuridad.

9) Se para la reacción con 50 microlitros/pozo de ácido sulfúrico 0.1N. Leer a 490 nm.

9a) Se para la reacción con 50 microlitros/pozo de hidróxido de sodio 3N. Leer a 405 nm.

ELISA de peroxidasa

Los ACL, clase IgG fueron detectados por el método de ELISA de acuerdo a Gharavi et al (9) con algunas modificaciones (48).

Procedimiento:

1) Sensibilizar con 1500 ng/pozo de cardiopina en un volumen de 29 microlitros/pozo. Con el siguiente esquema 2 pozos sin cardiopina y tres pozos con cardiopina para cada muestra.

2) Secar al vacío por una hora.

3) Bloquear con 300 microlitros/pozo con PBS-Suero fetal bovino al 10%, 0.01 M, pH 7.4.(PBS-SFB). Incubar 2 horas a temperatura ambiente.

4) Lavar con PBS 0.01 M, pH 7.4. (Solución A), 4 veces.

5) Poner 100 microlitros/pozo de la dilución 1:100 del suero del paciente. (10 microlitros del suero más 990 microlitros de PBS-SFB). Incubar 1 hora a temperatura ambiente con agitación.

- 6) Lavar 4 veces con la solución A.
- 7) Agregar 100 microlitros/pozo de la dilución 1:1000 del conjugado peroxidado en PBS-SFB. Incubar 1 hora a temperatura ambiente con agitación.
- 8) Lavar 4 veces con la solución A.
- 9) Agregar 100 microlitros/pozo de sustrato (Descrito en la curva dosis-respuesta). Se incuba durante 15 minutos a temperatura ambiente.
- 10) Parar la reacción con 50 microlitros/pozo de ácido sulfúrico 0.01N. Leer a 490 nm

ELISA de fosfatasa alcalina

Para esta parte de la investigación se utilizó el método descrito por Loizou (49), y Delezé (50) con algunas modificaciones.

Procedimiento:

- 1) Sensibilizar las placas con 2500 ng/pozo de cardiolípina en un volumen de 50 microlitros/pozo, en todos los pozos de la placa.
- 2) Secar al vacío por 30 minutos.
- 3) Bloquear con 300 microlitros de PBS-SFB 10%, 0.01 M, pH 7.4. Incubar dos horas a temperatura ambiente.
- 4) Lavar con PBS 0.01 M, pH 7.4. (Solución A). 3 veces.
- 5) Agregar 200 microlitros/pozo de la dilución 1:50 del suero del paciente (20 microlitros del suero más 980 microlitros de PBS-SFB). Incubar 1 hora a temperatura ambiente.
- 6) Lavar 3 veces con solución A.

- 7) Agregar 200 microlitros/pozo de la dilución 1:1000 del conjugado con fosfatasa alcalina. Incubar 1 hora a temperatura ambiente.
- 8) Lavar 3 veces con solución A.
- 9) Agregar 200 microlitros/pozo del sustrato (Descrito en la curva dosis-respuesta para el conjugado con fosfatasa alcalina.) Incubar 1 hora a 37°C, en la oscuridad.
- 10) Parar la reacción con 50 microlitros/pozo de hidróxido de sodio 3N. Leer a 405 nm.

Tratamiento estadístico

Estadística descriptiva: promedio, desviación estándar, coeficiente de variación.

Estadística inferencial: sensibilidad, especificidad, valores de predicción y concordancia con prueba de kappa. (52).

CAPITULO 3

RESULTADOS

Estandarización de ELISA.

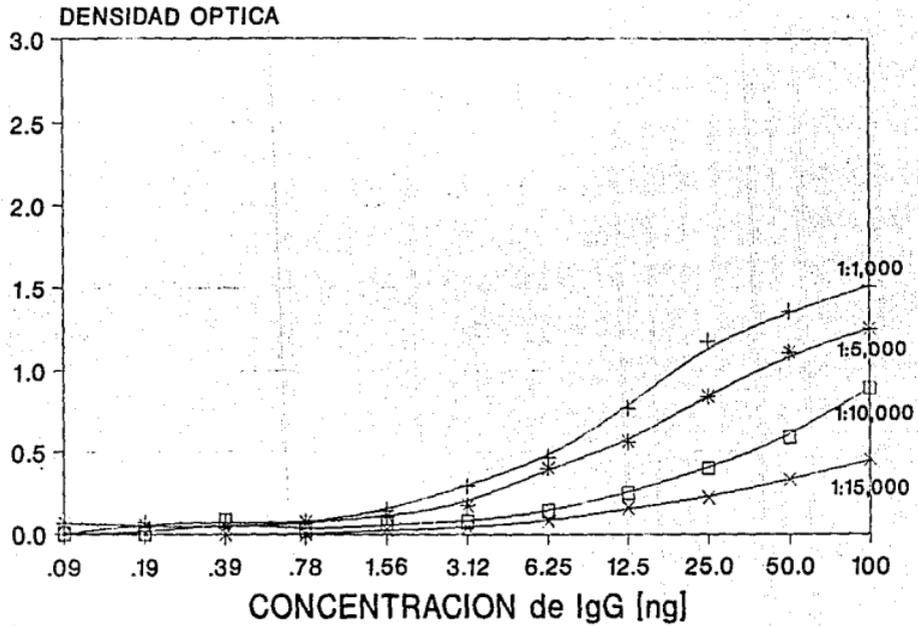
La dilución del conjugado que presenta mayor linealidad es la de 1:1000, tanto para el conjugado peroxidado, como para el acoplado a fosfatasa alcalina estos resultados se observan en las gráficas 1, 2, 3 y 4.

Distribución demográfica de los sueros normales

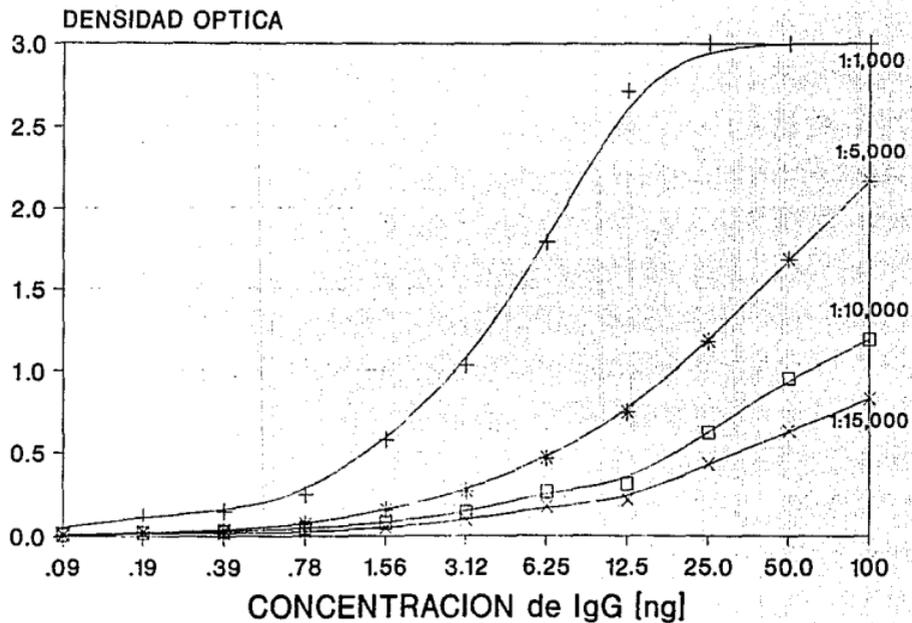
Se reunieron también 100 sueros de sujetos clínicamente sanos, donadores altruistas de sangre en el Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez". La distribución de edad y sexo de estos sujetos se muestra en la tabla 2. Todos estos sueros resultaron negativos para las siguientes pruebas: Hepatitis, Sífilis y Sida.

La mayoría de los sueros pertenecieron a donadores del sexo masculino, las edades van desde 19-52 años.

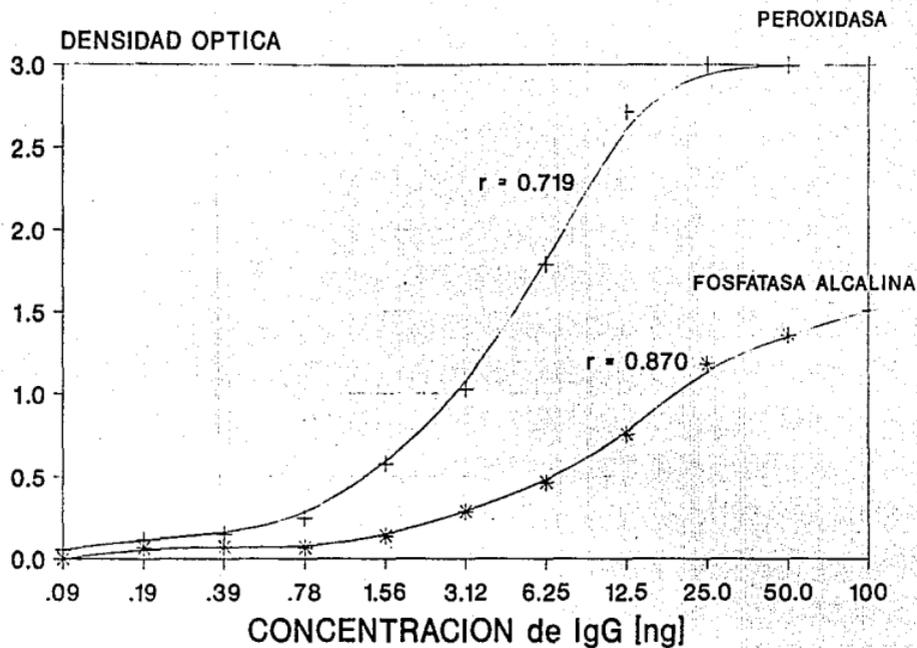
CURVA DOSIS RESPUESTA DE ANTI-IgG HUMANA
HECHA EN CABRA CONJUGADA A
FOSFATASA ALCALINA



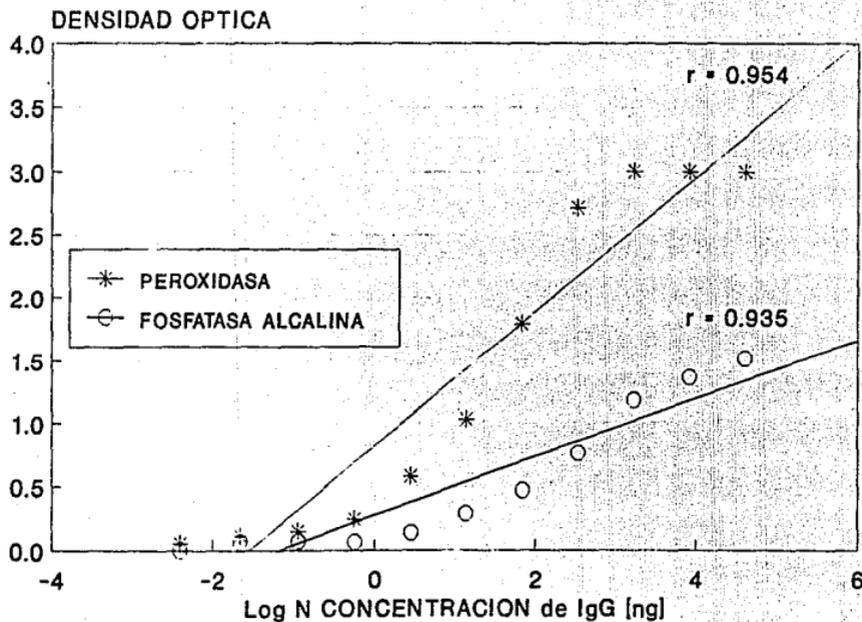
CURVA DOSIS RESPUESTA DE ANTI-IgG HUMANA
HECHA EN CABRA CONJUGADA A
PEROXIDASA



CURVA DOSIS RESPUESTA DE LA DILUCION
DE TRABAJO DE AMBOS CONJUGADOS
(1:1,000)



CURVA DOSIS RESPUESTA DE LA DILUCION
DE TRABAJO DE AMBOS CONJUGADOS
(1:1,000)



Valores de los sueros normales

En los ensayos de fosfatasa y peroxidasa se corrieron los 100 sueros de donadores clínicamente sanos con el propósito de obtener los puntos de corte correspondientes. En el sistema de peroxidasa los resultados se obtuvieron restando la densidad óptica de los pozos que no fueron sensibilizados con cardiolipina a los que fueron sensibilizados con ésta, mientras que en el sistema de la fosfatasa el resultado final es el promedio de las densidades ópticas de los duplicados.

El punto de corte para ambos sistemas se obtuvo con el promedio de las densidades ópticas de los 100 sueros más 5 desviaciones estándar. Ningún suero presentó un valor mayor del punto de corte. Los resultados se observan en la tabla 3.

Se utilizó como control positivo un suero obtenido de un paciente con diagnóstico de Síndrome antifosfolípido primario, se incluyó el mismo en todas las placas y sobre sus valores se calculó el coeficiente de variación.

Distribución demográfica de las muestras de pacientes

Se recolectaron muestras de sueros correspondientes a 102 pacientes en el período designado. La distribución de la edad y sexo de los pacientes se muestra en la tabla 4. Así como en la tabla 5 se muestran los diagnósticos asignados en el expediente de estos pacientes.

| | N | 100 |
|---------------|-----------|---------|
| <u>SEXO :</u> | MASCULINO | 85 |
| | FEMENINO | 15 |
| <u>EDAD :</u> | MEDIA | 30.66 |
| | MEDIANA | 21 |
| | MODA | 27 |
| | INTERVALO | 19 - 52 |

TABLA No. 2
DISTRIBUCION DEMOGRAFICA DE SUEROS NORMALES

| | PEROXIDASA % | FOSFATASA ALCALINA % |
|-----------------------------|-----------------|-------------------------|
| PROMEDIO | 0.020 | 0.0754 |
| DESVIACION ESTANDAR | 0.03087 | 0.0597 |
| PUNTO DE CORTE | 0.174 | 0.374 |
| COEFICIENTE DE VARIACION | 14.3 | 11.11 |

TABLA No. 3
VALORES DE LOS SUEROS NORMALES

| | N | 102 |
|---------------|-----------|---------|
| <u>SEXO :</u> | MASCULINO | 21 |
| | FEMENINO | 81 |
| <u>EDAD :</u> | MEDIA | 36 |
| | MEDIANA | 36 |
| | MODA | 36 |
| | INTERVALO | 12 - 73 |

TABLA No. 4
DISTRIBUCION DEMOGRAFICA DE LAS MUESTRAS DE LOS PACIENTES

Entre estos diagnósticos estacan por su importancia la Cardiopatía reumática inactiva, LEG y el SAFP. El grupo de los misceláneos está integrado por los siguientes diagnósticos: infecciones de vías respiratorias, extras ventriculares aisladas, síndrome hemorrágico pulmonar renal, insuficiencia mitral operada, síndrome de Raynaud, enfermedad de Alport, prolapso de la válvula mitral operada, esclerosis sistémica progresiva.

Valores de los sueros de los pacientes

Se probaron los 102 sueros de los pacientes en ambos sistemas y los resultados se muestran en la tabla 6.

Se consideró la prueba de peroxidasa como modelo por la característica de restar la reacción que ocurre en ausencia del antígeno a la reacción que se presenta con el antígeno, este hecho no se considera en la prueba de la fosfatasa alcalina descrita.

Se aplicó la prueba de kappa para evaluar la concordancia entre ambos sistemas, sin considerar a alguno de estos dos sistemas como mejor. Los valores resultantes de especificidad, sensibilidad, valores predictivos y kappa se muestran en la tabla 6.

| <u>DIAGNOSTICO</u> | <u>NUMERO DE PACIENTES</u> |
|------------------------------------|----------------------------|
| CARDIOPATIA REUMATICA INACTIVA | 13 |
| LUPUS ERITEMATOSO GENERALIZADO | 15 |
| SINDROME PRIMARIO ANTIFOSFOLIPIDO | 13 |
| CARDIOPATIA CONGENITA CIANOGENA | 5 |
| HIPERTENSION ARTERIAL SISTEMICA | 5 |
| CARDIOPATIA ISQUEMICA | 5 |
| ARTERITIS DE TAKAYASU | 4 |
| CANCER DE MAMA | 2 |
| ARTRITIS REUMATOIDE | 4 |
| TROMBOEMBOLIA PULMONAR | 6 |
| HIPERTENSION ARTERIAL PULMONAR | 2 |
| PERICARDITIS | 3 |
| CARDIOPATIA CONGENITA ACIANOGENA | 2 |
| SINDROME DE MARFAN | 2 |
| CARDIOPATIA DILATADA | 3 |
| MIXOMA AURICULAR | 2 |
| CARDIOPATIA REUMATICA INACTIVA | |
| MAS LUPUS ERITEMATOSO GENERALIZADO | 1 |
| MISCELANEOS | 15 |

TABLA No. 5
DIAGNOSTICOS ASIGNADOS A LOS PACIENTES

TABLA No. 6
TABLA DE CONTINGENCIA

| | PEROXIDASA | |
|---------------------------|------------|---------|
| | + | - |
| + | 8 | 5 |
| FOSFATASA | | |
| - | 9 | 80 |
| SENSIBILIDAD | | |
| | | 52 % |
| ESPECIFICIDAD | | |
| | | 94 % |
| VALOR PREDICTIVO + | | |
| | | 61.53 % |
| VALOR PREDICTIVO - | | |
| | | 89.88 % |
| KAPPA | | |
| | | 0.4515 |

DISCUSION

La determinación de ACL se realiza en la actualidad como una prueba en medicina clínica e investigación, para identificar pacientes que presentan anticuerpos antifosfolípidos, tanto para diagnóstico y tratamiento del SAF, sin embargo es bien conocido que se tienen problemas para uniformar la metodología en diferentes laboratorios. Las pruebas evaluadas en este trabajo son dos métodos inmunoenzimáticos utilizados con regularidad por los investigadores en diversas comunicaciones científicas (3,5,7,49,50), se considera por lo tanto aceptable el uso de cualquiera de ellos. Es posible que los resultados obtenidos con estas pruebas no muestren concordancia, lo que ha resultado en este trabajo parece apoyar esta idea.

La determinación de ACL por ELISA con peroxidasa se asoció con una distribución de cada suero probado en la placa que permite obtener valores de densidad óptica individuales de la reacción que ocurre en ausencia del antígeno y también en presencia del mismo, en cambio la distribución usual en el ELISA con fosfatasa no identifica individualmente la reacción en ausencia del antígeno.

Estas características de los métodos probados permiten comprender que el ELISA con peroxidasa identifica con mayor exactitud la proporción de la cifra de densidad óptica que se debe a la reacción antígeno anticuerpo evaluada.

Se observó una mayor sensibilidad para la identificación de ACL con el ELISA de peroxidasa (100% considerada el modelo ideal) al compararlo con ELISA de fosfatasa (52%).

Probablemente uno de los factores que influye, en la sensibilidad, es que al obtener el punto de corte para el ELISA de peroxidasa probando sueros normales se observa una tendencia a tener poca diferencia en el valor de densidad óptica de la reacción sin antígeno y con antígeno lo que da un valor cercano al cero como la cifra real de la reacción específica; este fenómeno no se evalúa en el ELISA de fosfatasa y los valores obtenidos representan la suma de la reacción sin antígeno y con antígeno, la consecuencia de esto es que las cifras obtenidas y el punto de corte son más altos.

Al considerar la especificidad de estas pruebas se observó que en el ELISA de fosfatasa hay una proporción de falsos positivos (4.9%), y de falsos negativos (8.8%), es probable que las características comentadas de ambos métodos jueguen también un papel en este fenómeno, lo que resulta en una menor sensibilidad y especificidad en el ELISA de fosfatasa.

Al evaluar desde el punto de vista de concordancia de ambas pruebas se encontró un valor de kappa de 0.45 lo que indica una concordancia subóptima para unas pruebas que se pretende sean equiparables, este fenómeno apoya la idea de que puede existir una diferencia substancial en la identificación de ACL por estos métodos.

Llama la atención que a pesar de las peculiaridades identificadas en el presente trabajo, el ELISA de fosfatasa se ha desempeñado (7) como un complemento útil en la identificación de pacientes con SAF.

El saber que una proporción de los valores obtenidos por este método en realidad corresponden a reacciones inespecíficas plantea interrogantes que deberán responderse en estudios posteriores. Sería muy interesante el conocer si alguno de estos métodos con diferencias importantes en la detección de la reacción antígeno-anticuerpo específica, correlaciona significativamente mejor que el otro con los eventos clínicos que componen al SAF; más aún al tener conocimiento que en la biología de los anticuerpos AFL intervienen otros factores además del antígeno y del anticuerpo.

BIBLIOGRAFIA

1. Cronin Me, Biswas RM, Van Der Straeton C, et al. IgG and IgM anticardiolipin antibodies in patients with lupus with anticardiolipin antibody associated clinical syndromes. J Rheumatol 1988;15:795-8.
2. Bowie EJ, Thompson JH, Pascuzzi Ca, et al. Trombosis in sistemic lupus erithematosus despite circulating anticoagulants. J Lab Clin Med 1963;62:416-30.
3. Alarcón-Segovia D. Osmundson PJ. Peripheral vascular syndromes associated with systemic lupus erithematosus. Ann Intern Med 1965;62:907-19.
4. Asherson RA. A "Primary" antiphospholipid Syndrome? J.Rheumatol 1988;15:1742-6.
5. Alarcón-Segovia D. Pathogenic potential of antiphospholipid antibodies. J Rheumatol 1988;15:890-3.
6. Lie JT. Vasculopathy in the antiphospholipid syndrome: Trombosis or vasculitis, or Both? J Rheumatol 1989;16:713-15.

7. Alarcón-Segovia D, Sánchez-Guerrero J. Primary antiphospholipid syndrome. *J Rheumatol* 1989;16:482-8.

8. Sammaritano LR, Azzudin E, Gharavi, et al. Antiphospholipid syndrome: Immunologic and Clinical Aspects. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, Vol 20. No.2 (October), 1990:81-96.

9. Gharavi AE, Harris EN, Asherson RA, et al. Anticardiolipin antibodies: Isotype and phospholipid distribution and Phospholipid specificity. *Ann Rheum Dis* 1987;46:1-6.

10. Costello PB, Green FA. Binding affinity of serum immunoglobulin G to cardiolipin and other phospholipids in patients with systemic lupus erythematosus and syphilis infection. *Immun* 1988;56:1738-1742.

11. Levy RA, Gharavi Ae, Sammaritano LR, et al. Characteristics of IgG antiphospholipid antibodies in patients with SLE and syphilis. *J Rheumatol* 1990;171:1036-1041.

12. Gharavi AE, Harris EN, Lockshin MD, et al. IgG subclasses and light chain distribution of anticardiolipin and anti-DNA antibodies in systemic Lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 1988;47:286-290.

13. Colaco CB, Male DK. Antiphospholipid antibodies in syphilis and a thrombotic subset of SLE: Distinct profiles of epitope specificity. *Clin Exp Immunol* 1985;59:449-456.

14. Harris EN, Gharavi AE, Wasley GD, et al. Use of an enzyme-linked immunosorbent assay and of inhibition studies to distinguish between antibodies to cardiolipin from patients with syphilis or autoimmune disorders. *J Infect Dis* 1988;157:213-231.

15. Harris EN, Gharavi AE, Hughes GR. Antiphospholipid antibodies. *Clin Rheum Dis* 1985;11:591-609.

16. Harris EN, Chan JK, Asherson RA, et al. Thrombosis recurrent, fetal loss, and thrombocytopenia. Predictive value of the anticardiolipin antibody test. *Arch Intern Med* 1986;146:2153-2156.

17. Alving BM, Bahr CF, Tang DB. Correlation between Lupus anticoagulants and anticardiolipin antibodies in patients with prolonged activated partial thromboplastin time. *Am J Med* 1990;88:112-116.

18. Lockshin MD, Druzin ML, Qamar T. Prednisone does not prevent recurrent fetal death in women with antiphospholipid antibody. *Am J Obstet Gynecol* 1989;160:439-443.

19. Eisenberg RA, Dye K, Craven SY, et al. Subclass restriction and polyclonality of the systemic lupus erythematosus marker anti-Sm. *J Clin Invest* 1985;75:1270-1277.
20. Schur PH, Monroe M, Rothfield N. The subclass of antinuclear and antinucleic acid antibodies. *Arthritis Rheum* 1972;15:174-182.
21. Rubin RL, Tang FL, Chang EK, et al. IgG subclasses of autoantibodies in systemic lupus erythematosus, Sjogren's syndrome, and drug induced autoimmunity. *J Immunol* 1986;137:2528-2534.
22. Goodman J. Immunoglobulins I: Structure and fuction, in Stites DP, Stobo JD, Wells JV (eds): *Basic and clinical immunology*. East Norwalk, CT, Appleton and Lange, 1987, p30.
23. Eilat D, Zlotnik AY, Fischel R. Evaluation of the cross reaction between anti-DNA and anticardiolipin antibodies in SLE and experimental animals. *Clin Exp Immunol* 1986;65:269-278.
24. Smeenk RJT, Lucassen WAM, Swaak TJG. Is anticardiolipin activity a cross reaction of anti-DNA or a separate entity? *Arthritis Rheum* 1987;30:607-617.
25. Harris EN, Gharavi AE, Loizous, et al. Crossreactivity of antiphospholipid antibodies. *J Clin Lab Immunol* 1985;16:1-6.

26. Levy RA, Gharavi AE, Sammaritano LR, et al. Fatty acid chain is a critical epitope for antiphospholipid antibody. *J Clin Immunol* 1990;10:141-145.

27. McNeil HP, Chesterman CN, Krilis SA. Antiphospholipid antibodies are directed against a complex antigen which includes a lipid-binding glycoprotein, *Proc Nat Acad Sci USA* 1990;87:4120-4124.

28. Harris EN, Gharavi AE, Tincani A, et al. Affinity purified anticardiolipin and anti-DNA antibodies. *J Clin Lab Immunol*. 1985;17:155-162.

29. Rosner E, Pazner R, Lusky A, et al. Detection and quantitative evaluation of lupus circulating anticoagulant activity. *Thromb Haemostasis* 1987;57:144-147.

30. Derksen RH, Kater L: Lupus anticoagulant. Revival of an old phenomenon. *Clin Exp Rheum* 1985;3:349-357.

31. Fort JG, Cowchocks, Abruzzo JL, et al. Anticardiolipin antibodies in patients with rheumatic diseases. *Arthritis Rheum* 1987;30:752-760.

32. Harvey AM, Shulman LE. Connective tissue disease and the chronic biologic false-positive test for syphilis (BFP reaction). *Med Clin North Am* 1966;50:1271-1279.
33. Vaarala O, Palusuo T, Kleemola M, et al. Anticardiolipin response in acute infections. *Clin Immunol Immunopathol* 1986;41:8-15.
34. Cohen AJ, Philips TM, Kessler GM. Circulating coagulation inhibitor in the acquired immunodeficiency syndrome. *Ann Intern Med* 1986;104:175-180.
35. Gold JE, Haubenstock A, Zalusky R. Lupus anticoagulant and AIDS N. *Engl J Med* 1986;314:1252-1253.
36. Taillan B, Roul C, Fuzibet JG, et al. Circulating anticoagulant in patients seropositive for human immunodeficiency virus. *Am J Med* 1989;87:238.
37. Canoso RT, Zon LI, Groopman JE. Anticardiolipin antibodies associated with HTLV-III infection. *Br J Haematol* 1987;64:495-498.
38. Stimmler MM, Quismorio FP, McGehee WG, et al. Anticardiolipin antibodies in acquired immunodeficiency syndrome. *Arch Intern Med* 1989;149:1833-1835.

39. Mackworth-Young CG, Harris EN, Steere AC, et al. Anticardiolipin antibodies in Lyme disease. *Arthritis Rheum* 1988;31:1052-1054.

40. Buchanan RRC, Wardlaw Jr, Riglar AG, et al. Antiphospholipid antibodies in the connective tissue diseases: Their relationship to the antiphospholipid syndrome and forme fruste disease. *J Rheum* 1989;16:757-761.

41. Hull RG, Harris en, Gharavi AE, et al. Anticardiolipin antibodies: Occurrence in Behcet's syndrome. *Ann Rheum Dis* 1984;43:746-748.

42. Harris EN, Gharavi AE, Boey ML, et al. Anticardiolipin antibodies: Detection by radioimmunoassay and association with thrombosis in systemic lupus erythematosus. *Lancet* 1983;2:1211-1214.

43. Harris EN, Gharavi AE, et al. Evaluation of the anti-cardiolipin antibody test: Report of an international workshop held 4 April 1986. *Clin Exp Immunol* 1986;68:215-222.

44. Harris EN, The Second International Anti-cardiolipin Standardization workshop/The Kingston Anti-Phospholipid Antibody Study (KAPS) Group.

45. Rose NR, Bigazzi PLE. *Methods in immunodiagnosis*. A Wiley Medical Publication. John Wiley & Sons. pp 188-192.
46. Kemeny DM. *A practical Guide to Elisa* Pergamon Press 1990
47. Rupin A, Gruel Y, Waiter H, et al. ELISA for the detection of anticardiolipin antibodies. High specificity based on the use of adult bovine serum as buffer and systematic subtraction of non-specific binding. *J Immunol Methods* 1991;138:225-231.
48. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AI, and Randall RJ. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J Biol Chem* 1951;193,265.
49. Nava A, Bañales JL., Reyes PA. Effect of Heat Inactivation and sheep erythrocyte Adsorption on the titer of Anticardiolipin Antibodies in Primary Antiphospholipid Syndrome and Health Blood Donors'sera. *J Clin Lab Anal* 1992 6:148-150.
50. Loizou S, McCrea JD, Rudge AC, et al. Measurement of anticardiolipin antibodies by and Enzyme Linked Immunosorbent assay (ELISA): Standarization and quantitation of results. *Clin Exp Immunol*.1985;62:738-745.

51. Delezé M, Oria CV, Alarcón-Segovia D. Occurrence of Both Hemolytic Anemia and Thrombocytopenic Purpura (Evan's Syndrome) in Systemic Lupus Erythematosus. Relationship to Antiphospholipid Antibodies. J Rheumatol. 1988;15:611-615.

52. Kramer M, Feinstein A. Clinical Biostatistics. LIV. The biostatistics of concordance. Clin Pharmacol. 1981;29(1):111-123.