



# Utilidad y prevalencia de los marcadores: anticoagulante lúpico, anticardiolipinas y anti- $\beta$ 2GPI en pacientes pediátricos

Chávez-Ortiz Zaide Gabriela,\* López-Valladares Karina Elvira,\* Benavides-Badillo María Angelina,\* Parra-Ortega Israel,\* López-Martínez Briceida<sup>‡</sup>

**Palabras clave:**

Anticuerpos  
antifosfolípidos,  
anticoagulante  
lúpico, enfermedades  
autoinmunes.

**Key words:**

*Antiphospholipid  
antibodies, lupus  
anticoagulant,  
autoimmune diseases.*

\* Laboratorio Clínico,  
Hospital Infantil de  
México Federico  
Gómez (HIMFG).

<sup>‡</sup> Subdirección de  
Servicios Auxiliares  
y Diagnóstico, HIMFG.

Correspondencia:  
Dra. Briceida López-  
Martínez  
Subdirección de  
Servicios Auxiliares y  
Diagnóstico,  
Hospital Infantil de  
México Federico  
Gómez.  
Dr. Márquez 162,  
Col. Doctores,  
06720, Ciudad de  
Méjico.  
Tel: 52289917 ext  
9022

E-mail:  
brisalopezmtz@  
gmail.com

Recibido:  
11/09/2018  
Aceptado:  
27/09/2018

## RESUMEN

**Introducción:** La autoinmunidad es una anomalía en la respuesta inmunitaria frente a antígenos propios por la pérdida de tolerancia y la generación de autoanticuerpos. El síndrome de anticuerpos antifosfolípidos (SAAF) es una enfermedad autoinmune, en la cual el paciente produce un grupo de anticuerpos antifosfolípidos. **Objetivos:** Evaluar la utilidad de la detección de estos marcadores en el diagnóstico de enfermedades autoinmunes especialmente SAAF en pacientes pediátricos del Hospital Infantil de México Federico Gómez. Determinar la prevalencia de los isotipos de anticuerpos antifosfolípidos. **Material y métodos:** Del 1 de enero de 2015 al 30 de junio de 2017 se obtuvieron 336 ensayos para la determinación de anticoagulante lúpico (AL) por el método de veneno de víbora de Russell diluido, anticuerpos anticardiolipina (aCL) y anti- $\beta$ 2GPI (a $\beta$ 2GPI) por ELISA indirecta. **Resultados:** 54% de los ensayos resultaron negativos y 46% positivos para uno o más marcadores. Dentro de los positivos, 58% fue positivo sólo para AL y 42% para AL + aCL y/o a $\beta$ 2GPI, siendo el a $\beta$ 2GPI isotipo IgM el más prevalente. De los que resultaron positivos, 62% se utilizó para integrar un diagnóstico para enfermedades autoinmunes, los más frecuentes fueron lupus eritematoso sistémico (35%) y SAAF (21%). Sólo los marcadores aCL y a $\beta$ 2GPI fueron estadísticamente significativos en el estudio. **Conclusiones:** El diagnóstico de enfermedades autoinmunes resulta ser complicado debido a que se genera una gran cantidad de determinantes auto-antígenicas que pueden tener en común alguno de estos determinantes, por lo que surge la necesidad de encontrar métodos analíticos que tengan alta sensibilidad y especificidad, en este estudio sólo aCL y a $\beta$ 2GPI son marcadores estadísticamente significativos.

## ABSTRACT

**Introduction:** Autoimmunity is an anomaly in the immune response to its own antigens due to the loss of tolerance and the generation of autoantibodies. **Objectives:** To evaluate the usefulness of the detection of these markers in the diagnosis of autoimmune diseases especially SAAF in pediatric patients of the Hospital Infantil de México Federico Gómez. To determine the prevalence of antiphospholipid antibody isotypes. **Material and methods:** From January 1, 2015 to June 30, 2017, 336 trials were obtained for the determination of lupus anticoagulant (AL) by the method of diluted Russell's viper venom, anticardiolipin antibody (aCL) and anti- $\beta$ 2GPI (a $\beta$ 2GPI) by ELISA. **Results:** 54% of the trials were negative and 46% positive for one or more markers. Within the positives 58% was positive only for AL and 42% for AL + aCL and / or a $\beta$ 2GPI, with the a $\beta$ 2GPI IgM isotype being the most prevalent. Of those who were positive, 62% were used to integrate a diagnosis for Autoimmune Diseases, the most frequent being systemic lupus erythematosus (35%) and SAAF (21%). Only the aCL and a $\beta$ 2GPI markers were statistically significant in the study. **Conclusions:** The diagnosis of autoimmune diseases turns out to be complicated due to the fact that a large number of autoantigenic determinants are generated that may have some of these determinants in common, so that the need arises to find analytical methods that have high sensitivity and specificity, in this study only aCL and a $\beta$ 2GPI are statistically significant markers.

## INTRODUCCIÓN

El síndrome de anticuerpos antifosfolípidos (SAAF) es una enfermedad adquirida de carácter autoinmune y sistémica en la que el individuo afectado produce anticuerpos

contra los fosfolípidos (aFL) o complejos de fosfolípidos-proteínas,<sup>1</sup> lo que se traduce en un aumento en la probabilidad de presentar trombosis y otras alteraciones hematológicas.<sup>2</sup> Este síndrome afecta en su mayoría a las mujeres aunque la diferencia no es tan marcada en

población pediátrica (1.2:1).<sup>3</sup> Se ha documentado que su etiología podría ser multifactorial, es decir, debida a factores ambientales, hormonas, carga genética, infecciones y fármacos.

Para establecer el diagnóstico se utilizan los criterios de Sapporo, en los cuales se indica que el paciente debe presentar al menos un criterio clínico y uno de laboratorio. Dentro de los criterios de laboratorio se incluyen los siguientes parámetros: Anticoagulante lúpico (AL) positivo, títulos medios o altos para anticuerpos anticardiolipina (aCL) y/o anticuerpos anti-β2 glicoproteína I (aβ2GPI), detectados en dos o más ocasiones en un intervalo mínimo de 12 semanas.<sup>4</sup> En 2012, en la ampliación de criterios, se incluyó la determinación del isotpgo IgA, en el caso de obtener resultados negativos para aCL o anti-β2GPI de isotpgo IgG o IgM.<sup>5</sup>

El AL es un tipo de inhibidor inespecífico de la coagulación, estructuralmente se trata de una inmunoglobulina que actúa contra proteínas como la β2GPI, la protrombina y complejos fosfolípido-proteína; es por ello que, al unirse a alguno de estos componentes, causa interferencias en las pruebas de laboratorio dependientes de fosfolípidos.

Los aCL son anticuerpos dirigidos contra los fosfolípidos que forman parte de la membrana de las mitocondrias (muy abundantes en músculo cardíaco), los cuales tienen una participación importante en la fosforilación oxidativa.

La β<sub>2</sub>GPI (apolipoproteína H) es un anticoagulante natural y su función es la de inhibir la vía intrínseca de la coagulación y la agregación plaquetaria. Cuando hay presencia de anticuerpos anti-β<sub>2</sub>GPI, éstos se unen al dominio I de la β<sub>2</sub>GPI alterando su función y favoreciendo eventos trombóticos debido a que hay interacción con receptores de las plaquetas que pueden activarlas.<sup>6</sup>

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un estudio para evaluar la utilidad y la prevalencia de los marcadores utilizados en el diagnóstico de enfermedades autoinmunes, especialmente SAAF, en pacientes pediátricos del Hospital Infantil de México Federico Gómez, utilizando los resultados generados del 1 de enero de 2015 al 30 de junio de 2017.

**Marcador 1: Anticoagulante lúpico (AL).** La muestra utilizada fue plasma obtenido de sangre periférica en un tubo con citrato de sodio al 3.2%.

El AL se determinó por el método de veneno de víbora de Russell diluido con un kit de reactivos de la casa comercial IL-Werfen y se llevó a cabo en un equipo ACL TOP 500 CTS de la misma casa comercial.

El reactivo dRVVT Screen es pobre en fosfolípidos, esta concentración hace que el ensayo sea sensible ante presencia del AL, modificando de esta forma su actividad debido a que los anticuerpos interfieren con la función de los fosfolípidos alargando el tiempo de formación del coágulo. El efecto que causa el AL sobre los fosfolípidos se ve neutralizado al agregar una mayor cantidad de éstos, acortando el tiempo de coagulación, esta es la función del reactivo dRVVT Confirm, es por ello que se procesan conjuntamente.

El Punto de Corte para el AL determinado por el Laboratorio de Coagulación Especial con base en el equipo, reactivos y población fue: Negativo > 1.2. Positivo ≤ 1.2.

**Marcador 2: Anticuerpos anticardiolipina (aCL).** La muestra utilizada fue suero obtenido de sangre periférica.

La detección de anticuerpos aCL se realizó mediante la técnica de ELISA indirecta<sup>7</sup> con los kits EUROIMMUN para determinar los isotipos A, G y M. En algunos casos los anticuerpos anticardiolipina requieren de la presencia de β2GPI para usarla como "cofactor" de la cardiolipina y de esta manera se da la identificación del antígeno; los pocios y el buffer muestra contienen a esta proteína. El ensayo fue de tipo cuantitativo por lo que los resultados se reportaron en U IgA, M o G - FL/mL.

**Marcador 3: Anticuerpos anti-β2GPI.** De igual forma que las aCL los aβ2GPI se determinaron mediante ELISA indirecta con kits EUROINMMUN identificando los isotipos A, G y M, pero los resultados fueron expresados en Unidades Relativas del isotpgo de inmunoglobulina (A, G o M) /mL (UR/mL IgA, G o M).

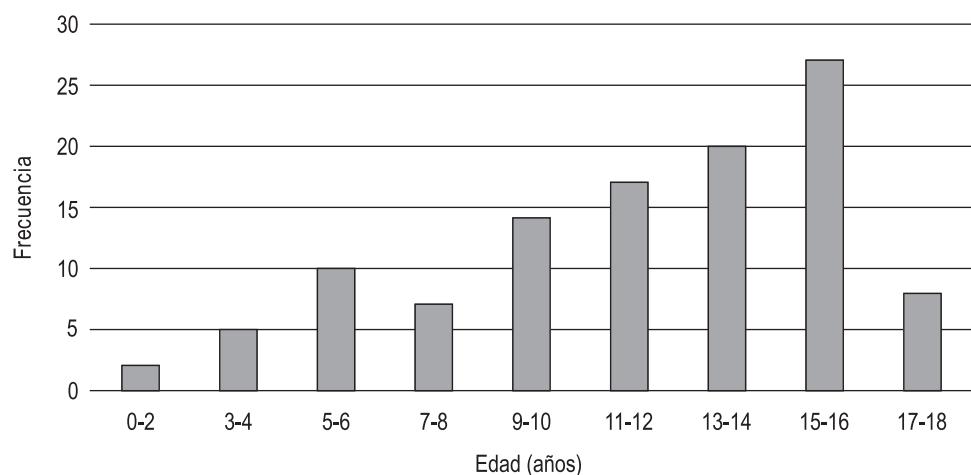
La técnica es semiautomatizada por lo que se utilizaron los siguientes equipos: Lector InfiniteF50, para los lavados Hydro FLEX y el software TECAN MAGELLAN FOR F50.

Los controles positivo y negativo fueron utilizados en cada ensayo como comprobación interna de la fiabilidad del desarrollo de las determinaciones. En el caso de los marcadores 2 y 3 existe un control de calidad externo que se lleva a cabo dos veces al año y es proporcionado por la casa comercial.

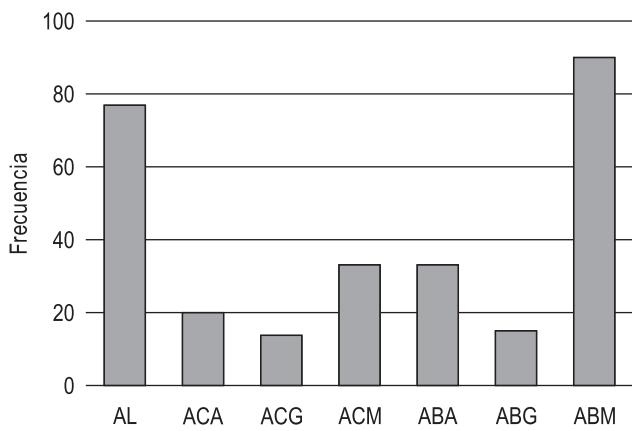
## RESULTADOS

A partir del 1 de enero de 2015 y hasta el 30 de junio de 2017 se realizaron 336 ensayos para anticoagulante lúpico, anticuerpos anticardiolipina y anti-B2GPI de isotpgo A, G y M. Dentro de éstos resultados 180 (54%) resultaron negativos y 156 (46%) positivos, los cuales pueden serlo para un ensayo o varios marcadores.

El 72% de los ensayos positivos correspondieron a mujeres y 28% a hombres. En la figura 1 se muestran las frecuencias en las que se presentaron los anticuerpos

**Figura 1.**

Los ensayos se practicaron en pacientes de 0 a 18 años, teniendo una media de 12 años. La mayoría de los que presentaron algún tipo de anticuerpo antifosfolípido tenían entre nueve y 16 años.



**Figura 2.** En esta población, se encontró que los marcadores más prevalentes fueron AL y a $\beta$ 2GPI isotipo M. Cabe resaltar que se determinaron 20 ensayos positivos para ACA y 33 para ABA.

Abreviaturas: AL = Anticoagulante lúpico. ACA = Anticardiolipina isotipo A. ACG = Anticardiolipina isotipo G. ACM = Anticardiolipina isotipo M. ABA = Anti- $\beta$ 2GPI isotipo A. ABG = Anti- $\beta$ 2GPI isotipo G. ABM = Anti- $\beta$ 2GPI isotipo M.

según su edad y en la figura 2 la prevalencia de los marcadores evaluados.

Dentro de los positivos, 58% fue positivo sólo para AL y 42% para AL + aCL y/o a $\beta$ 2GPI, siendo el a $\beta$ 2GPI isotipo IgM el más prevalente. De los que resultaron positivos, 62% se utilizó para integrar un diagnóstico para enfermedades autoinmunes, las más frecuentes fueron lupus eritematoso sistémico (35%) y SAAF (21%); sin embargo, existen diagnósticos muy heterogéneos debido a que proceden de diferentes salas de consulta (*cuadro I*).

Por el método de  $\chi^2$  se encontró que, en este estudio, los marcadores estadísticamente significativos fueron los aCL y a $\beta$ GPI.

## DISCUSIÓN

El diagnóstico de enfermedades autoinmunes resulta ser un trabajo difícil debido a que en este tipo de patologías se genera una gran cantidad de determinantes autoantigénicas capaces de causar diversas enfermedades que pueden tener en común alguno de estos determinantes, por lo que surge la necesidad de encontrar métodos analíticos aplicados al laboratorio clínico que tengan alta sensibilidad y especificidad<sup>8</sup> para elevar la calidad del diagnóstico diferenciando verdaderos positivos y negativos.

**Cuadro I.** Diagnósticos definitivos de los pacientes con marcadores positivos.

Diagnóstico	%
Lupus	35
SAAF primario	10
EA (sin lupus)	8
SAAF + EA (sin lupus)	6
Trombosis (sin SAAF o lupus)	6
Infección (bacteriana/viral)	6
SAAF secundario	5
Daño hepático/renal	3
Hipertensión	3
PHS	3
Fenómeno de Raynaud	3
Trombocitopenia	2
Otro	10

SAAF = Síndrome de anticuerpos antifosfolípidos.

EA = Enfermedades autoinmunes.

**Cuadro II.** Asociación entre cada marcador en estudio y la presencia o ausencia de enfermedades autoinmunes.

Marcador/ Enfermedad	AL		aCL		a $\beta$ 2GPI	
	Positivos	Negativos	Positivos	Negativos	Positivos	Negativos
Enfermedad autoinmune	52	45	34	59	68	25
Sin enfermedad autoinmune	22	30	11	45	29	27
Estadísticamente significativo		No		Sí		Sí

El valor de p fue evaluado mediante la prueba de  $\chi^2$ , considerando el valor  $\leq 0.05$  para significancia estadística.

El AL es un ensayo que arroja un valor predictivo positivo o negativo, por lo que inicialmente se tuvo la hipótesis de que al tener un resultado positivo para AL debía encontrarse algún isotipo de aCL o a $\beta$ 2GPI, lo cual no ocurrió en todos los ensayos realizados pues hubo pacientes que presentaban AL positivo y aCL - a $\beta$ 2GPI negativo (25%) o AL negativo y aCL - a $\beta$ 2GPI positivo (49%). En el estudio cuando aparecían en conjunto AL- aCL o a $\beta$ 2GPI el anticuerpo predominante que se encontró fue a $\beta$ 2GPI isotipo M, este anticuerpo es el que se asocia a episodios trombóticos.<sup>9</sup>

La asociación entre anticoagulante lúpico y enfermedades autoinmunes resultó no ser significativa estadísticamente (*cuadro II*), pues al ser un reactante de fase aguda su concentración puede elevarse cuando el individuo cursa con algún tipo de inflamación o infección.

El método de determinación, los valores de corte y el material de referencia influyen en los resultados; como consecuencia, hay variabilidad en cuanto a sensibilidad y especificidad en la medición. Sin embargo, en el caso de los ensayos realizados en el Hospital Infantil de México, previamente se determinó una media poblacional con respecto al tipo de pacientes que se atienden para disminuir la cantidad de variables analíticas, además de seguir las recomendaciones en la guía denominada *Update of the guidelines for lupus anticoagulant detection*.<sup>4</sup>

En la actualización del 2012 de la *International consensus guidelines on anticardiolipin and anti- $\beta$ -glycoprotein I testing: report from the 13th International Congress on Antiphospholipid Antibodies*<sup>5</sup> se recomienda la determinación de AFL del isotipo A para los AFL cuando no se detecten los isotipos G o M de ambos marcadores. Está documentado que el isotipo A aparece en menor proporción<sup>8</sup> que los mencionados anteriormente, pero en este estudio se encontró que su prevalencia era aún mayor que el isotipo G para aCL y a $\beta$ 2GPI (*figura 2*).

La  $\beta$ 2GPI es una proteína necesaria para determinar analíticamente algunos aCL,<sup>10</sup> por lo que se ha propuesto determinar solamente los a $\beta$ 2GPI. Sin embargo, en los ensayos no siempre resultan positivas ambas, es por ello que en el documento *International consensus statement on an update of the classification criteria for definite Antiphospholipid syndrome*<sup>1</sup> se recomienda su determinación. En el caso de este trabajo es estadísticamente significativa como marcador en enfermedades autoinmunes.

## REFERENCIAS

- Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, Branch DW, Brey RL, Cervera R et al. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). J Thromb Haemost. 2006; 4 (2): 295-306.
- Espinosa G, Cervera R. Antiphospholipid syndrome. Arthritis Rheum 2008 (64): 1-10
- Lirola MJ, Camacho MS. Síndrome antifosfolípido pediátrico. Protoc Diagn Ter Pediatr. 2014; 1: 79-89.
- Pengo V, Tripodi A, Reber G, Rand JH, Ortel TL, Galli M et al. Update of the guidelines for lupus anticoagulant detection. Subcommittee on Lupus Anticoagulant/Antiphospholipid Antibody of the Scientific and Standardisation Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. J Thromb Haemost. 2009; 7 (10): 1737-1740.
- Lakos G, Favalo EJ, Harris EN, Meroni PL, Tincani A, Wong RC et al. International consensus guidelines on anticardiolipin and anti- $\beta$ -glycoprotein I testing: report from the 13th International Congress on Antiphospholipid Antibodies. Arthritis Rheum. 2012; 64 (1): 1-10.
- Alfaro-Pacheco R. Síndrome antifosfolípido. Rev Med de Costa Rica y Centro América. 2009; 66 (58): 313-317.
- Tincani A, Allegri F, Balestrieri G, Reber G, Sanmarco M, Meroni P et al. Minimal requirements for antiphospholipid antibodies ELISAs proposed by the European Forum on antiphospholipid antibodies. Thromb Res. 2004; 114 (5-6): 553-558.
- Amengual O, Atsumi T, Khamashta MA, Koike T, Hughes GR. Specificity of ELISA for antibody to beta 2-glycoprotein I in patients with antiphospholipid syndrome. Br J Rheumatol. 1996; 35 (12): 1239-1243.
- Wong RC, Favalo EJ. Clinical features, diagnosis, and management of the antiphospholipid syndrome. Semin Thromb Hemost. 2008; 34 (3): 295-304.
- Marai I, Gilburd B, Blank M, Shoenfeld Y. Anti-cardiolipin and anti-beta2-glycoprotein I (beta2GP-I) antibody assays as screening for anti-phospholipid syndrome. Hum Antibodies. 2003; 12 (3): 57-62.