

# Prevalencia de anticuerpos neutralizantes y no neutralizantes en personas con hemofilia en Argentina

Laura B. Primiani\*, Mónica Nakatsuno\*\*, Miguel Candela\*,  
Grupo Argentino de Estudios de Inhibidores (GADEI)

\*Fundación de la Hemofilia de Buenos Aires,  
\*\*Novonordisk Pharma Argentina

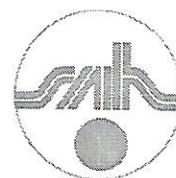
Correspondencia:

Fundación de la Hemofilia. TE: 4963 - 1755, Dom: Soler 3485, 1425 Buenos Aires

Trabajo Seleccionado para premio en el XVII Congreso Argentino de Hematología

Fecha de recepción: 1/9/05  
Fecha de aceptación: 1/10/06

HEMATOLOGIA, Vol. 10 N° 2: 35-38  
Mayo-Agosto, 2006



ARTÍCULO  
ORIGINAL

## RESUMEN

El desarrollo de inhibidores (Inh) o anticuerpos neutralizantes (Ac Ntr) es una de las complicaciones del tratamiento de personas con hemofilia (PCH). Los Ac Ntr actúan inhibiendo la actividad coagulante del FVIII/IX. Se conoce la existencia de Ac anti FVIII no neutralizantes (Ac no Ntr), con posible influencia en la vida media del FVIII transfundido. Los Ac Ntr se detectan en el laboratorio en ensayos coagulométricos y se cuantifican por método Bethesda o Nijmegen. Los Ac no Ntr sólo pueden detectarse en ensayos inmunológicos. Con el objeto de determinar la prevalencia de Ac Ntr y no Ntr estudiamos 801 muestras de PCH. La detección de Ac anti FVIII se realizó mediante una técnica de ELISA y los resultados positivos fueron confirmados por método Bethesda modificado o Nijmegen para obtener el título de Ac Ntr. En PCH B se realizó la titulación del inh por método Bethesda. La prevalencia de Ac Ntr en la población estudiada fue de 14.7% en hemofilia A y 5.0% en hemofilia B. Encontramos una baja prevalencia de Ac no Ntr (3.3%) en hemofilia A. Estos pacientes serán evaluados con mayor frecuencia dado el alto riesgo de desarrollar Ac Ntr en el futuro.

Palabras clave: hemofilia, inhibidores

## INTRODUCCIÓN

El término inhibidor (Inh) es utilizado para referirse a los aloanticuerpos que desarrollan personas con hemofilia (PCH) durante el tratamiento con concentrados de FVIII/IX. Estos anticuerpos son inmunoglobulinas que neutralizan la actividad coagulante del FVIII/IX y se denominan anticuerpos neutralizantes (Ac Ntr). En su mayoría son IgG, siendo las subclases predominantes IgG 1 e IgG4.

La presencia de Inh o Ac Ntr puede sospecharse ante la falta de respuesta al tratamiento sustitutivo en las dosis habituales de concentrados antihemofílico, o ser detectados en pruebas de laboratorio de

rutina (pruebas de corrección con plasma normal), en ausencia de síntomas.

La incidencia acumulativa de Ac Ntr es de 33% en hemofilia A y 7.5% en hemofilia B. Debido al fenómeno de desaparición de Inh y a los regímenes de inmunotolerancia, la prevalencia es menor: 3.6-21%. Los Inh en hemofilia B son mucho menos frecuentes, su incidencia es de 1 a 4%. La media de edad de desarrollo de inhibidores es entre 1.7 y 3.3 años. La incidencia de Inh en PCH A severa (FVIII < 1%) y moderada (FVIII 1-5%) es mayor que en PCH A leve (FVIII 5-25%)<sup>1,2</sup>.

En hemofilia, la mayoría de los Inh o Ac Ntr (80%) son de alta respuesta (AR), con picos históricos mayores a 5 UB/ml y su título aumenta bruscamente luego de pocos días de exposición a tratamiento. Los Inh de baja respuesta (BR) presentan títulos bajos (< 5.0 UB/ml) y ausencia de respuesta anamnésica luego de la administración de concentrados de factores antihemofílicos.

La detección de Ac Ntr se realiza en el laboratorio en estudios de mezclas con plasma normal basados en el APTT y se cuantifican mediante el método Bethesda<sup>3,4</sup> y el método Bethesda modificado o Nijmegen, siendo este último más específico en la detección de Inh de muy bajo título (0.6-1.0 UB/ml)<sup>5</sup>.

En los últimos años han aparecido varios trabajos donde se constata la existencia de anticuerpos no neutralizantes (Ac no Ntr) de FVIII los cuales pueden detectarse sólo por métodos inmunológicos. Distintos investigadores compararon un test de ELISA en fase sólida con los métodos Bethesda y Nijmegen. En un estudio realizado a 23 pacientes con hemofilia sin Inh por método Bethesda, se detectó la presencia de Ac no Ntr en el 39% de los pacientes y el 20% de los controles sanos. En pruebas post infusión de con-

centrados observaron la disminución del clearance de FVIII transfundido en un paciente con alto título de Ac no Ntr<sup>6</sup>. Esta alta incidencia de Ac no Ntr en hemofilia fue corroborada en un estudio posterior en 124 PCH A, donde el 22% presentó Ac no Ntr. La sensibilidad del test de ELISA reportada fue de 97.7%, la especificidad 78.4% y el valor predictivo negativo 98.6%<sup>7</sup>. Otros dos grupos de investigadores, por el contrario, encontraron una baja incidencia de Ac no Ntr en hemofilia pero coinciden con las anteriores publicaciones en cuanto a la concordancia entre el inmunoensayo y el método Bethesda en la detección de Ac Ntr de FVIII<sup>8,9</sup>. El tipo de FVIII utilizado como antígeno en la fase sólida se observó que influía en la sensibilidad del método. El FVIII, recombinante sin albúmina resultó ser el más sensible en la detección de Ac anti FVIII mientras que el FVIII con FvW disminuía la sensibilidad. Es posible que el FvW interfiera en la unión del Ac al FVIII<sup>10</sup>. Los Ac antifosfolípido no interfieren en este ensayo.

El objetivo de nuestro trabajo es determinar la prevalencia de anticuerpos neutralizantes (inhibidores) y no neutralizantes en la población con hemofilia en Argentina. Adoptamos el test de ELISA para el screening de Ac anti FVIII por su sensibilidad y alto valor predictivo negativo. El método Bethesda modificado o Nijmegen se utilizó para la cuantificación del título de Ac Ntr.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se incluyeron en este estudio personas con diagnóstico de hemofilia A y B en tratamiento con concentrados antihemofílicos u otros hemoderivados. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Fundación de la Hemofilia de Buenos Aires y la Academia Nacional de Medicina. Los participantes o sus padres suscribieron un consentimiento informado antes de realizarse el estudio.

Todos los centros del país que participaron recibieron instrucciones acerca de la extracción de sangre, fraccionamiento de plasmas, identificación, conservación y envío de muestras a nuestro laboratorio.

Los PCH no habían recibido tratamiento por lo menos 7 días previos a la toma de muestra. Los pacientes en profilaxis se estudiaron antes de recibir una nueva dosis.

### Muestras

Se obtuvieron muestras de sangre por punción venosa y se recogió en tubos Vacutainer citrato 0.129 M. Luego de centrifugar 15 minutos a 3.000 rpm, el plasma se transfirió con pipetas pasteur de plástico a tubos Eppendorff: 4 y 3 alícuotas de muestras correspondientes a hemofilia A y B respectivamente.

Estas fueron identificadas mediante un código (inicial de nombre y apellido y fecha de nacimiento) para garantizar la confidencialidad de la identidad de las personas incorporadas en el estudio. Las muestras se conservaron a  $-25^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento. Las alícuotas de plasma enviadas de las provincias se remitieron al laboratorio en hielo seco.

### Dosaje de FVIII/IX

El dosaje de FVIII/IX se realizó en el coagulómetro automático ACL 7.000. Se empleó plasma deficiente en FVIII/IX (Biopool), APTT sílica lio-filizada (IL), Plasma Calibrador (IL), control normal (IL).

### Detección de Ac Ntr y Ac no Ntr de FVIII

La detección de anticuerpos anti FVIII se llevó a cabo por método de ELISA en fase sólida GTI-FVIII Inhibitor Assay (Genetic Testing Institute, Brookfield, USA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Los plasmas y controles positivo y negativo, provistos en el kit, fueron diluidos 1/4 con solución (sc) salina tamponada Tris. Se agregaron 50  $\mu\text{l}$  de estas diluciones por duplicado a los pocillos de las microcubetas recubiertos con moléculas de FVIII recombinante humano, previamente lavadas con buffer Tris. Las placas selladas se incubaron 40 min a  $37^{\circ}\text{C}$ . Se realizaron 4 lavados con buffer Tris/CiNa en lavador automático. Se añadió a los pocillos anti-inmunoglobulina humana (diluida 1/100 con diluyente de reactivo) marcado con fosfatasa alcalina (anti IgG-Fc), excepto a los designados como blanco, y se incubó 40 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$ . Se repitió la serie de 4 lavados. El substrato paranitrofenilfosfato (PNPP) se reconstituyó con 0.5 ml de agua destilada y se diluyó 1/100 en buffer enzima substrato. Se agregó 100  $\mu\text{l}$  de substrato diluido a todos los pocillos, excepto a los designados como blanco, y se incubó la placa a temperatura ambiente durante 30 min en la oscuridad. La reacción se frenó con el agregado de 100  $\mu\text{l}$  de sc de hidróxido de sodio 3 M. Se efectuó la lectura de la DO a 405 nm en lector de microplaca (Bio-Tek Instruments, USA).

El test se aceptó cuando la DO de los controles negativo y positivo fue menor a 0.200 y mayor a 0.800 respectivamente. Las lecturas en duplicado de muestras y controles no debían superar el 20% de la media de los dos valores. Se consideraron positivas las muestras cuya DO fueron mayor a 2 x la DO de la media del control negativo.

### Titulación de inhibidores o Ac Ntr de FVIII/IX

Método Bethesda modificado o Nijmegen. Una mezcla 1:1 de plasma del paciente (PP) y pool nor-

mal (PN) ajustado a pH 7.4 con buffer imidazol) se incubó 2 hs a 37°C junto con una mezcla control 1:1 de plasma deficiente (PDef) en FVIII y PN. Finalizada la incubación, se realizó el dosaje de FVIII en ambas mezclas y se calculó el FVIII residual: % FVIII mezcla (PP+PN)/% FVIII mezcla (PDef+PN). El % de FVIII residual se interpoló en el gráfico semilogarítmico: % FVIII res (log) vs UB/ml (decimal). Se considera 1 UB/ml la cantidad de inhibidor que neutraliza el 50% del FVIII. Cuando el FVIII residual resultó menor a 25% se efectuaron diluciones seriadas del plasma del paciente en buffer imidazol y se repitió el ensayo por método Bethesda clásico. El título obtenido se multiplicó por la inversa de la dilución que dejó el 50% de FVIII residual.

La titulación de inhibidores de FIX se efectuó por método Bethesda sin incubación previa.

## Resultados

Se analizaron 801 muestras de personas con hemofilia de 5 meses a 73 años de edad: hemofilia A 701 (severa 535, moderada 115, leve 51) y hemofilia B 100 (severa 64, moderada 31, leve 5). Tabla I.

El test de ELISA fue positivo en 126/701 muestras de hemofilia A. En 103/126 (14.6%) el ensayo de Bethesda mod. o Nijmegen resultó positivo con títulos de Ac Ntr en 0.6 y 8200 UB/ml. 42/103 (40.8%) presentaron título alto (mayor a 5.0 UB/ml) y 61/103 (59.2%) título bajo (menor a 5.0 UB/ml). Un ejemplo de los resultados se presenta en Tabla II.

Se observó una moderada correlación entre la DO en el ELISA y el título de inhibidor. Tabla III.

23 muestras fueron ELISA positivo y Bethesda negativo, lo que se interpretó como presencia de Ac no Ntr que representa el 3.3% de la población con hemofilia A estudiada. Tabla IV.

En 5/100 (5%) muestras de personas con hemofilia B se detectó inhibidor con títulos entre 1.4 y 17.2 UB/ml.

Los resultados fueron enviados a los médicos responsables de cada región acompañados por un cuestionario donde se solicitaba información acerca de antecedentes de inhibidores personales o familiares y respuesta al tratamiento sustitutivo.

## Discusión

Todos los pacientes con antecedentes de Ac Ntr (Inh) establecido fueron detectados en el test de screening de Ac anti FVIII por ELISA. Se detectaron 30 nuevos casos de Ac Ntr, en 6 de ellos se confirmó

TABLA I.- Tipo y severidad de la hemofilia de la población estudiada

	Hemofilia A		Hemofilia B	
	n	%	n	%
Severa (< 1%)	535	76.3	64	64
moderada (1-5%)	115	16.4	31	31
leve (5-25%)	51	7.3	5	5
Total	701	87.5	100	12.5

TABLA II.- Ejemplos de resultados de los ensayos de ELISA y Bethesda

Muestra	FVIII %	ELISA DO	UB/ml	Muestra	FVIII %	ELISA DO	UB/ml
HM 110569	<1	3.411	8200	AB090489	<1	0.333	2.0
MC110671	<1	0.118	-	AM230488	<1	0.139	-
MC030684	<1	0.114	-	AM310886	<1	1.374	8.0
AD250547	<1	0.133	-	RR280792	<1	0.181	-
MJ190698	<1	0.132	-	PP010489	<1	0.090	-
JP251184	<1	0.199	-	TC150252	6.3	0.200	-
CR191080	20	0.142	-	JO020392	<1	1.362	1.7
IB111284	2	0.167	-	RG260387	1.1	0.137	-
CS071191	<1	0.111	-	AV030172	1.2	0.088	-
RA310882	3.7	0.162	-	TM141273	2.3	0.096	-
LE220390	<1	0.152	-	AV140607	1.3	0.130	-
AC030295	<1	1.264	1.7	AM050562	<1	0.161	-
RB260394	<1	1.532	2.7	MM280286	<1	0.088	-
JS150367	<1	0.106	-	JS200583	<1	0.285	0
ES131197	1.8	0.128	-	PS200596	<1	0.273	0
LS090296	4.7	0.100	-	JG281044	<1	2.108	0
MJ250373	<1	0.168	-	CA230286	<1	0.226	-
WM010772	<1	1.031	3.2	AL050897	<1	0.350	0
GM150975	<1	0.459	0.7				
CR120775	7.8	0.117	-	Control neg		0.133	
MR120571	6.1	0.139	-	Control pos		2.067	
CV060593	<1	0.108	-				
DR160994	<1	0.118	-	Cut-off		0.266	

TABLA III.- Correlación entre Método Bethesda y ELISA

Método Bethesda (UB/ml)	Método Elisa (DO 405 nm)	
0.6-4.4	0.283-2.078	(1.180)
8.0-8200	1.310-3.161	(2.235)
0-0.4*	0.068-0.200	(0.141)

\* Títulos de inhibidor anteriores al presente estudio. (últimos cinco años)

TABLA IV.- Resultados de los test de ELISA y Bethesda en personas con Hem A

Muestras analizadas	701	%
Test de ELISA negativo	575	82.0
Test de ELISA positivo (Ac Ntr y no NTr)	126	18.0
- Bethesda positivo (Ac Ntr)	103	14.7
- Bethesda negativo (Ac no Ntr)	23	3.3

TABLA V.- Prevalencia de Ac Ntr o inhibidores en Argentina

Hemofilia A	14.7	%
Hemofilia B	5.0	%

respuesta inadecuada a las dosis habituales de concentrados de factores. El 60% de los Inh detectados fueron de alta respuesta; 30% de ellos presentó un bajo título de Ac Ntr al momento del estudio.

5/23 muestras en las que se demostró Ac no Ntr pertenecían a personas que presentaban 1 o más de las siguientes características: antecedentes personales de Inh en la niñez que desaparecieron, hermano con Inh de alta respuesta, familiares de segundo grado con Inh de alta o baja respuesta, falta de respuesta adecuada a las dosis habituales de factores anti-hemofílicos.

La prevalencia de Ac Ntr en la población estudiada es de 14.7% en hemofilia A y de 5.0% en hemofilia B. La prevalencia fue mayor en hemofilia A severa: 18.7% que en hemofilia A moderada y leve (2.6 y 1.9% respectivamente).

Nuestros resultados son similares a los reportados en la literatura mundial. Se observó una baja prevalencia de Ac no Ntr de 3.3% en personas con hemofilia A. Estos pacientes serán evaluados con mayor frecuencia dado el alto riesgo de desarrollar inhibidores en el futuro.

**Adendum Grupo GADEI:** Tezanos Pinto M, Pérez Bianco R, Primiani L, Candela M, Neme D, Casinelli M, Lucero A, Careri P, Vernavá V (Buenos Aires); Guerrero V, Negrete G, Saravia SL (Tucumán); Berreta A, Bordone R, Rizzi L, Williams M, Lauría M, Roberts M (Córdoba); Yáñez S (Mendoza); Rescia V, Dávoli M (Santa Fe), Canónico V, Gómez de Herrera M (San Juan); Lanari E, Romero Maciel

A (Corrientes); Bartomioli M, Martínez P (Bahía Blanca); Sliba G (Mar del Plata); Morales M, Quinteros R (Salta); Mariani L, Schweri M, Mariani S (Misiones); Negri Aranguren P (Entre Ríos); Cabanne V, Raña P (Neuquén); Torresi M (San Luis).

## SUMMARY

The development of inhibitors or neutralizing antibodies is a complication in the treatment of persons with haemophilia. These antibodies inhibit the FVIII/FIX coagulant activity. It has been found that non-neutralizing antibodies against FVIII may impact in the half-life of transfused FVIII. Neutralizing antibodies or inhibitors are detected by functional assays and titer defined by Bethesda or Nijmegen assays. Non-neutralizing antibodies can be demonstrated only by immunological tests. In order to establish the prevalence of neutralizing and non-neutralizing antibodies, 801 samples of persons with haemophilia were studied. We screened for anti FVIII antibodies by ELISA technique and if positive, the inhibitor titer was measured with the Nijmegen modification of Bethesda assay. Samples from persons with haemophilia B were screened for neutralizing antibodies using Bethesda assay. Prevalence of neutralizing antibodies in persons with haemophilia in Argentina was 14.7% in haemophilia A and 5.0% in haemophilia B. We found a low prevalence of non-neutralizing antibodies in haemophilia A (3.3%). These patients will be controlled more often due to their higher risk of developing neutralizing antibodies in the future.

**Key words:** haemophilia, inhibitors

## BIBLIOGRAFÍA

- DiMichele D. Inhibitors: resolving diagnostics and therapeutic dilemmas. *Haemophilia* 2002; 8: 280-2887.
- DiMichele D. Inhibitors in haemophilia: a primer. *Haemophilia* 2000; 6 (Suppl 1): 38-40.
- Kasper CK, et al. A more uniform measurement of FVIII inhibitors. *Thromb Diath Haemorrh* 1975; 34: 869-872.
- Sahud MA. Laboratory diagnosis of inhibitors. *Semin Thromb Hemost* 2000; 26: 195-203.
- Verbruggen B, Novakova I, Wessels H y col. The Nijmegen Modification of the Bethesda Assay for Factor VIII: C Inhibitors: improved Specificity and Reliability. *Thromb Haemost* 1995; 73 (2): 247-251.
- Dazzi F, Tison T, Vianello P y col. High incidence of anti-FVIII antibodies against non-coagulant epitopes in haemophilia patients: a possible role for the half-life of transfused FVIII. *Br J Haematol* 1996; 93: 688-693.
- Martin PG, Sukhu K, Chambers E y col. Evaluation of a novel ELISA screening test for detection of factor FVIII inhibitory antibodies in haemophiliacs. *Clin Lab Haem* 1999; 21: 125-128.
- Ling M, Duncan EM, Rodgers SE y col. Low detection rate of antibodies to non-functional epitopes on FVIII in patients with haemophilia and negative for inhibitors by Bethesda assay. *J Thromb Haemost* 2003; 1: 2648-53.
- Shetty S, Ghosh K, Mohanty D. An Elisa Assay for the detection of Factor VIII Antibodies- Comparison with the Conventional Bethesda Assay in a large Cohort of Haemophilia Samples. *A Haematologica* 2003; 109: 18-22.
- Lindgren A, Wadenvik H, Tengborn L. Characterization of inhibitors to FVIII with an ELISA in congenital and acquired haemophilia. *Haemophilia* 2002; 8: 644-8.