

Anticuerpos antifosfolípido en población pediátrica asintomática

C. Aguilar Franco^a y J.F. Lucía Cuesta^b

^aServicio de Hematología. Hospital General del INSALUD. Soria.

^bServicio de Hematología. Hospital Miguel Servet. Zaragoza.

(*An Esp Pediatr* 2001; 54: 444-449)

Antecedentes

El hallazgo de alargamientos del tiempo de tromboplastina parcial activado (TTPA) con criterios de anticoagulante lúpico (AL) es un hecho poco frecuente en niños asintomáticos que con frecuencia precede a ciertos tipos de cirugía y posee un comportamiento clínico benigno.

Pacientes y métodos

Se ha realizado un análisis de las características biológicas y clínicas de 13 niños con anticuerpos antifosfolípidos (APLA) (media de edad al diagnóstico 5 años) diagnosticados entre enero de 1996 y septiembre de 2000 a los que se realizó un seguimiento prospectivo (mediana, 16 meses; extremos, 15-60). Se realizaron determinaciones de AL por técnicas coagulométricas según los criterios de la International Society for Thrombosis and Haemostasis (ISTH) y anticuerpos anticardiolipina (ACA) y anti- β_2 -glucoproteína I por enzimoimmunoanálisis (ELISA).

Resultados

Todos los casos de anticoagulante lúpico estudiados se diagnosticaron tras investigación de un alargamiento del TTPA detectado con anterioridad a cirugía (adenoidectomía, 8 casos; orquidopexia, 1 caso; cirugía oftalmológica, 1 caso), asociado a alguna infección vírica (mononucleosis infecciosa, 1 caso) o como hallazgo casual en una analítica de rutina (2 casos). Todos ellos eran de tipo primario y un 53,6% tuvieron carácter transitorio. Los ACA-IgG, anti- β_2 -glucoproteína I fueron negativos en todos los casos. El 30,7% presentaron valores ligeramente reducidos de factor XII:C (media, 38,2 U/dl). El diagnóstico de APLA no se vio acompañado de manifestaciones clínicas relacionadas con éstos ni tampoco se comunicó hemorragia quirúrgica en ningún caso.

Conclusiones

Los APLA primarios representan un hallazgo poco frecuente en la población pediátrica asintomática que se ha descrito con relativa frecuencia en el preoperatorio de determinados tipos de cirugía (adenoidectomía y amigdalectomía) o infecciones víricas. Con frecuencia se trata de fenómenos transitorios, de muy escasa relevancia clínica y que pueden acompañarse de valores ligeramente reducidos de factor XII, por lo que debe establecerse el diagnóstico diferencial con el déficit leve de ese factor.

Palabras clave:

Anticoagulante lúpico. Anticuerpos antifosfolípidos. Niños.

ANTIPHOSPHOLIPID ANTIBODIES IN ASYMPTOMATIC PEDIATRIC PATIENTS

Background

Findings of prolonged activated partial thromboplastin time (APTT) and lupus anticoagulant are rare in asymptomatic children and are often preceded by certain types of surgery. Clinical behaviour is usually favorable.

Patients and methods

We assessed the biological and clinical features of antiphospholipid antibodies found in 13 children diagnosed between January 1996 and September 2000 (mean age at diagnosis: 5 years). The patients were prospectively followed-up for a median of 16 months (range: 15-60). The diagnosis of lupus anticoagulant was based on the guidelines of the International Society of Thrombosis and Hematology and included coagulation-based assays as well as enzyme-linked immunosorbent assay for anticardiolipin and anti-beta 2 glycoprotein I.

Results

In all patients lupus anticoagulant was detected after investigation of prolonged APTT prior to surgery (adenoidectomy in eight patients, orchidopexy in one and eye surgery in one). The antibody was associated with infectious mononucleosis in one patient and was detected during routine laboratory investigations in two. All antibodies were primary and 53.6% of events were transient. In

Correspondencia: Dr. C. Aguilar Franco.

Servicio de Hematología. Hospital General del INSALUD.

P.º de Santa Bárbara, s/n. 42002 Soria.

Correo electrónico: caraguilar@excite.com

Recibido en octubre de 2000.

Aceptado para su publicación en diciembre de 2000.

all patients lupus anticoagulant IgG and anti-beta 2 glycoprotein I were negative. Slightly reduced factor XII:C plasma concentrations (mean: 38.2 UI/dl) were found in 30.7% of the patients. No clinical manifestations of antiphospholipid symptoms were associated with the diagnosis of antiphospholipid antibodies and none of the patients experienced bleeding after surgery.

Conclusions

Primary antiphospholipid antibodies were infrequent in asymptomatic pediatric patients and were typically associated with certain types of surgery (adenoidectomy, tonsillectomy) or viral infections. They were usually transient and clinically irrelevant. These antibodies may be associated with slightly reduced plasma concentrations of factor XII and consequently a differential diagnosis with a mild factor XII deficiency should be considered.

Key words:

Lupus anticoagulant. Antiphospholipid antibodies. Children.

INTRODUCCIÓN

El conocido como síndrome antifosfolípido fue descrito en 1983 por Hughes¹ y se caracteriza por la asociación de anticuerpos antifosfolípido (APLA) con trombosis venosa o arterial (sobre todo en el territorio cerebral), abortos repetidos, trombocitopenia o trastornos neurológicos. Los APLA (anticoagulante lúpico [AL] y anticuerpos anticardiolipina [ACA]) son autoanticuerpos que, en su mayor parte, poseen especificidad frente a complejos de fosfolípidos aniónicos con determinadas proteínas de unión a fosfolípidos, entre las cuales la β_2 -glucoproteína I y la protrombina son las más relevantes^{2,3}. No obstante, se ha descrito una notable heterogeneidad entre los autoanticuerpos responsables del síndrome antifosfolípido, puesto que éstos también reaccionan con una amplia gama de proteínas involucradas en el proceso de la hemostasia y presentes en las plaquetas y la superficie vascular endotelial (proteína C, proteína S, trombomodulina, antitrombina, anexina V, factor tisular, proteínas de la fase de contacto o factor XI)⁴⁻⁶.

El AL se comporta como un inhibidor *in vitro* de la coagulación que no muestra especificidad por ningún factor del sistema hemostático; puede detectarse mediante la prolongación de tiempos de coagulación en pruebas de coagulación dependientes de fosfolípidos por mecanismos desconocidos. Por su parte, los ACA se detectan por medio de inmunoensayos en fase sólida (ELISA) debido a su capacidad de unirse a fosfolípidos aniónicos (con mayor frecuencia la cardiolipina). El uso combinado de las técnicas basadas en pruebas de coagulación para el diagnóstico de AL y métodos inmunológicos para los ACA es fundamental para un diagnóstico exacto del síndrome antifosfolípido.

Los APLA pueden encontrarse ya sea en individuos con evidencia de enfermedades reumáticas y del tejido conjuntivo, sobre todo el lupus eritematoso sistémico (LES)

y APLA secundarios, o en personas aparentemente sanas (APLA primarios). Las posibles consecuencias clínicas de este hallazgo en estos 2 subgrupos de pacientes son importantes; alrededor del 30-40% de los adultos con LES presentan APLA, y se han descrito fenómenos de trombosis en el 40% de dichos casos⁷. El riesgo de trombosis recurrente en adultos con LES y APLA positivos tras un período de seguimiento de 5 años oscila entre el 50 y el 75%⁸. Aquellos pacientes asintomáticos en los que el diagnóstico de los APLA se realiza de modo casual presentan una baja incidencia de complicaciones trombóticas (2,5% pacientes-años en el estudio de Finazzi et al⁹). En estos casos, el riesgo trombótico se asocia en gran medida a la presencia de títulos elevados de ACA-IgG o la presencia de AL⁹⁻¹¹.

En niños los APLA representan un hallazgo infrecuente con unas implicaciones controvertidas; desde el punto de vista del riesgo trombótico; también en este caso el riesgo trombótico descrito para los niños con LES y AL es tres veces superior al hallado en pacientes de similares características sin AL¹², pero con frecuencia el AL representa en este grupo de pacientes un fenómeno transitorio detectado únicamente en un estudio sistemático de coagulación¹³.

El estudio realizado ha consistido en el seguimiento prospectivo de un grupo de pacientes pediátricos asintomáticos en los que se diagnosticó AL; igualmente, se ha realizado una valoración de las características biológicas y de la relevancia clínica de esta anomalía.

PACIENTES Y MÉTODOS

En el período comprendido entre enero de 1996 y septiembre de 2000 se realizó un diagnóstico de AL en 13 niños (9 varones y 4 mujeres; media de edades al diagnóstico, 5 años). Todos estos pacientes se remitieron a nuestro departamento para estudio de un alargamiento del tiempo de tromboplastina parcial activado (TTPA) (ratio medio TTPA 1,34; reactivo APTT-STA[®], Diagnostica Stago, Asnières-sur-Seine, Francia) en, al menos, una determinación previa y carecían de historia hemostática personal o familiar. El resto del estudio de coagulación (tiempo de protrombina y de trombina) fue normal en todos los casos. La evaluación inicial incluía una mezcla en proporción 1:1 de plasma del paciente y plasma normal seguida de una incubación de la misma a 37 °C durante 1 h con determinación del TTPA tras ambas. En 12 de los niños incluidos en el estudio se obtuvo como mínimo una segunda muestra separada por, al menos, 6 a 8 semanas de la primera con objeto de confirmar la existencia del APLA (para ello se obtuvo el consentimiento de los padres). En todos los casos se realizó una determinación de la cifra plaquetaria (rango normal, 140-450 × 10⁹/l).

Todos los pacientes estudiados fueron seguidos de modo prospectivo (mediana de período de seguimiento, 16 meses; límites, 15-60) con el fin de detectar cualquier consecuencia clínica de los APLA (como trombosis) o la

aparición posterior de alguna prueba de cualquier tipo de trastorno autoinmune.

El diagnóstico de AL se realizó de acuerdo con los criterios del Comité Científico y de Estandarización de la International Society for Thrombosis and Haemostasis (ISTH)¹⁴. Las muestras de sangre venosa extraídas en tubos de cristal siliconado (con una proporción 1/10 de citrato trisódico al 3,8%) se sometieron a doble centrifugación (2.000 × g durante 15 min) para obtener plasma libre de plaquetas¹⁵; se conservaron alícuotas de este plasma congeladas a -30 °C, las cuales se usaron en el plazo de 2 semanas.

El protocolo diagnóstico de AL incluyó dos pruebas de cribado: una basada en el TTPA de alta sensibilidad a AL (PTT-LA[®], Diagnostica Stago, Asnières-sur-Seine, Francia) y otra en la prueba del tiempo de veneno de víbora diluida de Russell -DRVVT⁻¹⁶ (Murex Diagnostica Ltd., Dartford, Reino Unido; ratio normal < 1,2); también se empleó una técnica de confirmación (prueba de neutralización plaquetaria). Las técnicas de confirmación empleadas fueron Staclot[®] PNP (Diagnostica Stago) basada en un lisado plaquetario como fuente de fosfolípidos¹⁷ o Staclot[®] LA (Diagnostica Stago) que emplea fosfolípidos hexagonales¹⁸.

En todos los casos en los que se produjo una normalización del TTPA tras la mezcla con plasma normal (estudio de mezcla negativo) se descartó una deficiencia factorial de la vía intrínseca por el método de un tiempo mediante el empleo de plasmas deficitarios específicos (Diagnostica Stago).

Para la determinación de ACA-IgG e IgM se utilizó un método de ELISA en fase sólida (BL Diagnostika, Barcelona - intervalo de normalidad ACA-IgG 0-10 GPL/ml; ACA-IgM 0-7 MPL/ml), al igual que para la de los anticuerpos anti- β_2 -glucoproteína I (Corgenix Inc., Westminster, Colorado, EE.UU.; rango de normalidad 0-20 G/ml).

RESULTADOS

Todos los pacientes incluidos en el estudio cumplían los criterios diagnósticos de AL establecidos por la ISTH. El perfil específico de estos anticuerpos en las pruebas de coagulación es compatible con el llamado "perfil KCT" (tiempo de cefalina caolín, del inglés *Kaolin clotting time*, KCT) por Galli et al²⁰. Además, en todos los casos los APLA pueden considerarse primarios.

En 10 casos el diagnóstico de AL se realizó tras un estudio de coagulación anormal previo a cirugía (adenoidectomía en 8 casos, orquidopexia en 1 caso y cirugía oftalmológica en 1 caso); en el resto de los niños el AL se asociaba a una infección aguda por virus de Epstein-Barr (1 caso) o fue consecutivo al estudio de un TTPA anormal detectado en una analítica de rutina en un paciente asintomático.

En 7 casos (53,86%, seis en el preoperatorio de adenoidectomía y uno en el contexto de mononucleosis in-

fecciosa), el AL se comportó como un fenómeno transitorio; en uno de los niños el diagnóstico inicial de AL no se confirmó debido a falta de consentimiento de los padres para nuevas extracciones de sangre y en el resto de los casos persistió en nuevas determinaciones durante períodos que excedían los 6 meses. No se encontraron diferencias entre el sexo y la media de edad de los grupos de pacientes con AL transitorios o persistentes.

Los ACA-IgG y anticuerpos anti- β_2 -glucoproteína I fueron negativos y las cifras de plaquetas normales durante todo el período de seguimiento en todos los casos; se detectó positividad transitoria en títulos bajos (8 MPL/ml) para ACA-IgM en uno de ellos.

En todos los casos se produjo una normalización del TTPA tras la mezcla 1:1 con plasma normal y en ninguno de ellos se observó un alargamiento tras la posterior incubación compatible con un inhibidor tiempo-dependiente.

La medida de las concentraciones plasmáticas de factores de coagulación de la vía intrínseca reveló un descenso en los valores de FXII:C en 4 casos (30,7%; valores medios de FXII 38,2 U/dl), dos de ellos con AL transitorio, 1 con AL persistente y 1 con patrón de positividad desconocido debido a falta de confirmación. Uno de estos 4 niños mostraba además una reducción asociada de los niveles de FVIII y IX (50 U/dl, valores normales, 60-150; 43 U/dl, límites normales, 70-140, respectivamente).

El diagnóstico de APLA no se acompañó de manifestaciones clínicas relacionadas con ellos ni tampoco se comunicó hemorragia posquirúrgica en ningún caso.

DISCUSIÓN

No existen muchas referencias en la bibliografía internacional sobre las características biológicas y las consecuencias clínicas de los APLA en la edad pediátrica. La mayoría de los estudios han llevado a cabo el diagnóstico de AL en niños de modo consecutivo a la demostración de un cuadro trombótico^{21,22}; las conclusiones de dichos estudios se encuentran próximas a las características clínicas del AL en adultos: una proporción considerable de ellos (alrededor de un tercio) se asocian a los ACA y en alrededor de dos tercios de los niños con APLA se describe un tromboembolismo pulmonar y un elevado riesgo de recurrencia trombótica. Es difícil identificar grupos de niños asintomáticos con AL (aparte de aquellos con LES) y seguirlos de modo prospectivo para investigar la prevalencia de aparición de fenómenos trombóticos debido a la relativamente baja prevalencia de estos anticuerpos, la ausencia de base clínica para identificar a esos niños y la dificultad para la obtención de muestras de sangre en pacientes de corta edad.

Nuestros hallazgos en niños asintomáticos son compatibles con los descritos en artículos previos. Se ha observado una asociación especialmente destacable entre la anomalía del estudio preoperatorio de coagulación en

niños que van a ser intervenidos de adenoidectomía o amigdalectomía y cuadros infecciosos (sobre todo víricos)^{23,24}. En niños sanos que van a ser sometidos a cirugía de los tipos mencionados se ha descrito una prevalencia de AL del 2%, habiéndose sugerido el antecedente de infecciones repetidas como posible mecanismo patogénico determinante de la aparición de esos autoanticuerpos. Algunos autores han llegado a cuestionar el valor del estudio preoperatorio de coagulación en la prevención de la hemorragia postoperatoria en el caso de la amigdalectomía y la adenoidectomía por la elevada frecuencia de falsos positivos en los resultados de laboratorio en esas circunstancias, la relativamente baja prevalencia de los trastornos hemorrágicos y su bajo valor predictivo del riesgo hemorrágico; no obstante, el riesgo de hemorragia postoperatoria significativa no es insignificante (del orden de un 4,8%)^{25,26}, lo cual hace que el estudio preoperatorio de coagulación previo a la cirugía sea una práctica sensata, sobre todo cuando la historia hemorrágica *per se* no es, en ocasiones, lo bastante sensible para la sospecha de un trastorno hemorrágico.

Los datos con los que se cuenta coinciden al señalar que el AL cuya detección en niños asintomáticos se realiza de modo casual es, con frecuencia, un fenómeno transitorio (53,8% en nuestro grupo evaluable de pacientes) con un comportamiento clínico benigno; de hecho, ninguno de nuestros pacientes presentó complicaciones tromboticas con independencia del carácter transitorio o persistente del autoanticuerpo. De modo excepcional, se ha descrito la aparición de una diátesis hemorrágica en niños con AL e hipoprotrombinemia adquirida asociada a trastornos autoinmunes o infecciones víricas²⁶; ésta puede sospecharse en niños con LES o una infección vírica reciente en los que aparece una sintomatología hemorrágica de gravedad variable junto a un alargamiento del TTPA, tiempo de protrombina y tiempo de trombina en los que el estudio revela la existencia de un AL y bajas concentraciones plasmáticas de protrombina.

En nuestra experiencia, los AL de niños asintomáticos por lo general se incluyen en el llamado "tipo infeccioso" caracterizado por su independencia de la β_2 -glucoproteína I (es decir, se unen directamente a los fosfolípidos aniónicos sin necesidad de que la β_2 -glucoproteína I actúe como cofactor). Este tipo biológico de APLA aparece en el contexto de una amplia variedad de infecciones²⁷, si bien con frecuencia el cuadro infeccioso no se manifiesta en el momento del diagnóstico o poco antes del mismo. Además este tipo de APLA no se ha relacionado con fenómenos tromboticos²⁸, si bien se han descrito casos de trombosis arteriales y venosas graves e incluso púrpura fulminante en niños con deficiencia de proteína S autoinmune consecutiva a AL transitorio post-infeccioso (varicela aguda)^{29,30}.

Nuestras conclusiones confirman que los AL con ACA negativos no suelen presentar reactividad para los anti-

cuerpos anti- β_2 -glucoproteína I³¹. El riesgo trombotico en casos de positividad para el AL parece vinculado a la dependencia de la β_2 -glucoproteína I ("tipo autoinmune" de ACA presentes en pacientes con LES y otros trastornos autoinmunes)³²; de hecho, sólo una minoría de pacientes con anticuerpos anti- β_2 -glucoproteína I aislados (ACA y AL negativos) desarrollan manifestaciones clínicas del síndrome antifosfolípido³³. Estudios recientes muestran cómo los tipos de patrones de los tiempos de coagulación (KCT y dRVVT) se relacionan con la positividad de los anticuerpos frente a la protrombina y la β_2 -glucoproteína I, respectivamente, los cuales pueden, a su vez, ser predictivos del riesgo de sufrir complicaciones tromboticas^{19,34}.

Es interesante destacar que en todos nuestros pacientes se produjo una normalización del TTPA en los estudios de mezcla 1:1 sin existir en ninguno evidencia de inhibición tiempo-dependiente tras la incubación de dicha mezcla. Clyne et al³⁵ analizaron un grupo de pacientes con AL (TTPA largo) y estudios de mezcla 1:1 negativos (normalización del TTPA) y lograron correlacionar dicha negatividad con ratios iniciales de TTPA más bajos (AL "débiles"); se observó, además, una elevada incidencia de infección por el VIH entre estos pacientes (con AL de "tipo infeccioso"). Nuestra experiencia coincide con todos estos hallazgos y confirma que el AL puede presentarse con una gama heterogénea de resultados en los estudios de mezcla y que la corrección en los mismos del TTPA no puede considerarse diagnóstica de un déficit factorial ni excluir de raíz un AL; por lo tanto, en ausencia de un déficit factorial (o incluso con valores aislados bajos de FXII como posteriormente se menciona) la búsqueda de un AL como parte de un estudio de alargamiento del TTPA está justificada. De hecho, el diagnóstico de un AL en lugar de un déficit factorial leve de la vía intrínseca es uno de los errores más frecuentes en las técnicas de estudio del AL³⁶.

Recientemente se ha descrito³⁷ un descenso, por lo general leve, de las concentraciones plasmáticas de factor XII:C en una proporción significativa de pacientes con AL positivo (37,3%) no relacionado con el carácter persistente o transitorio del anticuerpo; en algunos casos (19,4%) se trata de un "seudodéficit", puesto que los bajos valores de FXII:C medidos por el método en un tiempo no se confirman cuando se emplea para la misma muestra una técnica de sustrato cromogénico o de tipo inmunoquímico (medida del factor XII antigénico)^{37,38}. No obstante, también se ha descrito un déficit aparentemente real de FXII (con valores reducidos de FXII por los tres métodos) asociada al aislamiento de anticuerpos específicos frente al FXII en alrededor de un 20% de pacientes con AL positivo^{37,39}. Por lo tanto, el diagnóstico de "déficit de FXII" debería inexcusablemente incluir la determinación del FXII antigénico y excluir la presencia de un AL asociado independientemente de los resultados de las mezclas rea-

lizadas. La incidencia encontrada de concentraciones bajas de FXII en el contexto de un AL en nuestra serie se aproxima, por lo tanto, a la de estudios previos; sin embargo, no puede asegurarse el tipo de este déficit debido a la falta de disponibilidad de las técnicas adecuadas.

En resumen, el hallazgo de APLA en niños asintomáticos constituye un hecho poco frecuente y de prácticamente nula relevancia clínica con independencia del carácter transitorio o persistente de éstos. Su hallazgo no se asocia con fenómenos trombóticos y el seguimiento de estos niños no se justifica ni por este riesgo ni por el de desarrollar procesos autoinmunes. La aparición de este tipo de alteraciones en el estudio preoperatorio de algunos tipos de cirugía como la de adenoides o amígdalas, así como en el curso de determinadas infecciones víricas es especialmente característica. Los principales diagnósticos diferenciales constituyen los alargamientos inespecíficos del TTPA y los déficit de factor XII (con frecuencia asociados a un AL).

BIBLIOGRAFÍA

- Hughes GRV. Thrombosis, abortion, cerebral disease and the lupus anticoagulant. *Br Med J* 1983; 287: 1088-1089.
- McNeil HP, Simpson RJ, Chesterman CN, Krilis SA. Antiphospholipid antibodies are directed against a complex antigen that includes a lipid-binding inhibitor of coagulation: beta2 glycoprotein I (apolipoprotein H). *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 4120-4124.
- Bevers EM, Galli M, Barbui T, Comfurius P, Zwaal RFA. Lupus anticoagulant IgGs (LA) are not directed to phospholipids only, but to a complex of lipid-bound human prothrombin. *Thromb Haemostas* 1991; 66: 629-632.
- Oosting JD, Derksen RHW, Bobbink IWG, Hackeng TM, Bouma BN, De Groot KI. Antiphospholipid antibodies directed against a combination of phospholipids with prothrombin, protein C or protein S: an explanation for their pathogenetic mechanism? *Blood* 1993; 81: 2618-2625.
- Shibata S, Harpel PC, Ghavari A, Rand J, Fillit H. Autoantibodies to heparin from patients with antiphospholipid antibody syndrome inhibit formation of antithrombin III-thrombin complexes. *Blood* 1994; 83: 2532-2540.
- De Groot PG, Oosting JD, Derksen RHW. Antiphospholipid antibodies: specificity and pathophysiology. *Baillieres Clin Haematol* 1993; 6: 691-709.
- Ginsberg KS, Liang MH, Newcomer I, Goldhaber SZ, Schur PH, Hennekens CH et al. Anticardiolipin antibodies and the risk for ischemic stroke and venous thromboembolism. *Ann Intern Med* 1992; 117: 997-1002.
- Rosove MH, Brewer PMC. Antiphospholipid thromboses: clinical course after the first thrombotic event in 70 patients. *Ann Intern Med* 1992; 117: 303-308.
- Finazzi G, Brancaccio V, Moia M et al. Natural history and risk factors for thrombosis in 360 patients with antiphospholipid antibodies: a four year prospective study from the Italian registry. *Am J Med* 1996; 100: 530-536.
- Silver RM, Porter TF, Van Leeuwen I, Jeng G, Scott JR, Branch DW. Anticardiolipin antibodies: clinical consequences of "low titers". *Obst Gynecol* 1996; 87: 530-536.
- Vila P, Hernández MC, López-Fernández MF, Batlle J. Prevalence, follow-up and clinical significance of the anticardiolipin antibodies in normal subjects. *Thromb Haemost* 1994; 72: 209-213.
- Manco-Johnson MJ, Nuss R. Lupus anticoagulant in children with thrombosis. *Am J Hematol* 1995; 48: 240-243.
- Singh AK, Rao KP, Kizer J, Lazarchick J. Lupus anticoagulants in children. *Ann Clin Lab Sci* 1988; 18: 384-387.
- Brandt JT, Triplet DA, Alving B, Scharrer I. Criteria for the diagnosis of lupus anticoagulants: An update. *Thromb Haemost* 1995; 74: 1185-1190.
- Sletnes KE, Gravem K, Wisloff F. Preparation of plasma for the detection of lupus anticoagulants and antiphospholipid antibodies. *Thromb Res* 1992; 66: 43-53.
- Thiagaraja P, Pengo V, Shapiro S. The use of dilute Russell viper venom time for the diagnosis of lupus anticoagulants. *Blood* 1986; 68: 869-874.
- Arnout J, Huybrechts E, Vanrusselt M, Vermeylen J. A new lupus anticoagulant neutralization test based on platelet-derived vesicles. *Br J Haematol* 1992; 80: 341-346.
- Triplet Da, Barna LK, Unger GA. A hexagonal (II) phase phospholipid neutralization assay for lupus anticoagulant identification. *Thromb Haemost* 1993; 70: 787-793.
- Loizou S, McCrea JD, Rudge AC, Reynolds R, Boyle C, Harris EN. Measurement of anticardiolipin antibodies by an enzyme linked immunosorbent assay: standardization and quantitation of results. *Clinical and Experimental Immunology* 1985; 62: 738-745.
- Galli M, Finazzi G, Norbis F, Marziali S, Marchioli R, Barbui T. The risk of thrombosis in patients with lupus anticoagulant is predicted by their specific coagulation profile. *Thromb Haemostas* 1999; 81: 695-700.
- Nuss R, Hays T, Manco-Johnson MJ. Childhood thrombosis. *Pediatrics* 1995; 96: 291-294.
- Manco-Johnson MJ, Nuss R. Lupus anticoagulant in children. *Am J Hematol* 1995; 48: 240-243.
- Burk C, Miller L, Handler S, Cohen A. Preoperative history and coagulation screening in children undergoing tonsillectomy. *Pediatrics* 1992; 89: 691-695.
- García-Callejo FJ, Pardo Mateu L, Velert Vila MM, Orts Alborch M, Monzo Gandía R, Marco Algarra J. Utilidad de las pruebas preoperatorias de coagulación en la prevención de la hemorragia post-amigdalectomía en niños. *Acta Otorrinolaringol Esp* 1997; 48: 473-478.
- Manco-Johnson MJ. Antiphospholipid antibodies in children. *Semin Thromb Haemostas* 1998; 24: 591-598.
- Bernini JC, Buchanan GR, Ashcraft J. Hypoprothrombinaemia and severe hemorrhage associated with lupus anticoagulant. *J Pediatr* 1993; 123: 937-939.
- Hansen KE, Arnason J, Bridges AJ. Autoantibodies and common viral illnesses. *Semin Arthritis Rheum* 1998; 27: 263-271.
- Vaarala O. Binding profiles of anticardiolipin antibodies in sera from patients with SLE and infectious diseases. *J Autoimmun* 1991; 4: 819-830.
- Nguyen P, Reynaud J, Pouzol P, Munzer M, Richard O, Francois P et al. Varicella and thrombotic complications associated with transient protein C and protein S deficiencies in children. *Eur J Paediatr* 1994; 153: 646-649.
- Manco-Johnson MJ, Nuss R, Key N, Moertel C, Jacobson L, Meech S et al. Lupus anticoagulant and protein S deficiency in children with postvaricella purpura fulminans or thrombosis. *J Pediatr* 1996; 128: 319-323.
- Martinuzzo ME, Forastiero RR, Carreras LO. Anti-beta2 glycoprotein I antibodies: detection and association with thrombosis. *Br J Haematol* 1995; 89: 397-402.

32. Amengual O, Atsumi T, Khamashta MA, Koike T, Hughes GRV. Specificity of ELISA for antibodies to β_2 -glycoprotein I in patients with antiphospholipid syndrome. *Br J Rheumatol* 1996; 35: 1239-1243.
33. Cabral AR, Amigo MC, Cabiedes J, Alarcón-Segovia D. The antiphospholipid/cofactor syndrome: a primary variant with antibodies to β_2 -glycoprotein I but no antibodies detectable in standard antiphospholipid assay. *Am J Med* 1996; 101: 472-481.
34. Galli M, Finazzi G, Bevers EM, Barbui T. Kaolin clotting time and dilute Russell's viper venom time distinguish between prothrombin-dependent and β_2 -glycoprotein I-dependent antiphospholipid antibodies. *Blood* 1995; 86: 617-623.
35. Clyne LP, Yen Y, Kriz NS, Breitenstein MG. The lupus anticoagulant: high incidence of negative mixing studies in a human immunodeficiency virus-positive population. *Arch Pathol Lab Med* 1993; 117: 595-601.
36. Jennings I, Kitchen S, Woods TAL, Preston FE, Greaves M (on behalf of the UK National External Quality Assessment Scheme for Blood Coagulation). Potentially clinically important inaccuracies in testing for the lupus anticoagulant: an analysis of results from three surveys of the UK National Assessment Scheme (NEQAS) for Blood Coagulation. *Thromb Haemostas* 1997; 77: 934-937.
37. Gallimore MJ, Jones DW, Winter M. Factor XII determinations in the presence and absence of phospholipid antibodies. *Thromb Haemost* 1998; 79: 87-90.
38. Jones DW, Gallimore MJ, Winter M. Pseudo factor XII deficiency and phospholipid antibodies. *Thromb Haemost* 1996; 75: 696-697.
39. Jones DW, Gallimore MJ, Harris SL, Winter M. Antibodies to factor XII associated to lupus anticoagulant. *Thromb Haemost* 1999; 81: 387-390.