



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

TESIS:

“Uso del Tiempo de Coagulación con Sílica, versus método de referencia del Laboratorio de Trombosis en la detección de anticoagulante lúpico”

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA:

Karen Guadalupe Cortés Cortés

Directora de tesis: Q.F.B Evelyn Cortina de la Rosa

Asesora de tesis: Q.F.B. Patricia Vidal Millán

Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez

Laboratorio de Trombosis, Fibrinólisis y Función Plaquetaria

Departamento de Hematología

Ciudad de México 2021





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 esta 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.

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| ÍNDICE | 2 |
| INTRODUCCIÓN..... | 5 |
| MARCO TEÓRICO | 6 |
| Síndrome de Anticuerpos Antifosfolípidos | 6 |
| Clasificación del SAAF | 6 |
| Fisiopatología | 7 |
| Criterios de Diagnóstico del SAAF | 10 |
| Métodos de detección de anticuerpos en fase sólida | 13 |
| Anticoagulante lúpico | 15 |
| Antecedentes | 15 |
| Definición..... | 16 |
| Mecanismo de acción..... | 17 |
| Criterios de diagnóstico: guías ISTH, BCSH y CLSI..... | 18 |
| Métodos de detección del Anticoagulante Lúpico | 20 |
| Generalidades | 20 |
| Etapa pre-analítica | 21 |
| Tiempo de Tromboplastina Parcial activado (TTPa) sensible a lúpico | 23 |
| Tiempo de veneno de víbora de Russell diluido (TVVRd) | 24 |
| Tiempo de Coagulación con Kaolín (TCK) | 27 |
| Tiempo de inhibición de tromboplastina (TIT) o Tiempo de Protrombina diluido (TPd) | 28 |

| | |
|--|----|
| Tiempos de coagulación con venenos Textarin/Ecarin | 29 |
| Tiempo de tromboplastina parcial activado con fosfolípidos hexagonales | 30 |
| Tiempo de Coagulación con Sílica (SCT)..... | 31 |
| JUSTIFICACIÓN | 33 |
| PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA..... | 33 |
| HIPÓTESIS NULA..... | 34 |
| OBJETIVOS | 34 |
| MATERIAL Y MÉTODOS | 35 |
| Tipo de estudio | 35 |
| Población de estudio..... | 35 |
| Criterios de inclusión | 35 |
| Técnicas..... | 36 |
| Metodología | 36 |
| RESULTADOS | 37 |
| Técnica a introducir: Tiempo de Coagulación con Sílica | 37 |
| Resultados en pacientes..... | 38 |
| Resultados de la pruebas de SCT y TVVRd con respecto a la enfermedad..... | 40 |
| Desempeño de las pruebas TVVRd Y SCT | 43 |
| Determinación de otros anticuerpos | 43 |
| ANÁLISIS DE RESULTADOS | 44 |
| Técnica a introducir: Tiempo de Coagulación con Sílica | 44 |

| | |
|--|----|
| Resultados en pacientes..... | 45 |
| Resultados de la prueba de SCT con respecto a la enfermedad..... | 45 |
| Desempeño de las pruebas..... | 47 |
| Determinación de otros anticuerpos | 48 |
| CONCLUSIONES..... | 49 |
| REFERENCIAS | 50 |

INTRODUCCIÓN

El síndrome de anticuerpos antifosfolípidos (SAAF) constituye la trombofilia adquirida más frecuente en nuestra población y se establece cuando se presenta un evento clínico: trombosis arteriales o venosas en jóvenes sin causas justificadas, en las mujeres, la presentación puede ser con trombosis o por pérdidas gestacionales de repetición sin causas relacionadas a los productos o padres; además de los eventos clínicos, debe establecerse la presencia y persistencia de anticuerpos antifosfolípidos (AAFL). Es importante la persistencia, ya que las diferentes pruebas para su detección, reaccionan de forma cruzada en procesos inflamatorios o infecciosos, incluso por la acción de diferentes medicamentos. Es preciso establecer el diagnóstico confiable de la enfermedad debido a que la confirmación del síndrome condicionará que el paciente reciba anticoagulantes orales a largo plazo, ya que el riesgo de trombosis será permanente y la asociación del Síndrome con otros factores incrementa el riesgo de trombosis, lo que pone en peligro la vida del paciente.

El Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez es un hospital de concentración que incluye pacientes con diferentes tipos de enfermedades cardiovasculares, reumatológicas y autoinmunes que requieren del diagnóstico preciso y confiable de los AAFL cuando se sospecha de su presencia ya que la posibilidad de emitir resultados falsos negativos, implica un riesgo muy alto para la población de estudio.

Actualmente existen diferentes pruebas de tipo coagulométricas e inmunoenzimáticas para la detección de los AAFL. Si bien la estandarización de las pruebas inmunoenzimáticas para la detección de aCL y anti- β 2GP1 ha tomado particular importancia, el presente trabajo sólo se enfocará en la evaluación de una prueba para la detección de AL de reciente introducción al mercado nacional: Tiempo de Coagulación con Sílica (SCT por sus siglas en inglés) de la compañía Instrumentation Laboratory Werfen®, cuya capacidad de

detección se probó en muestras de pacientes que fueron previamente trabajadas con el método del tiempo de veneno de víbora de Russell diluido (TVVRd).

MARCO TEÓRICO

Síndrome de Anticuerpos Antifosfolípidos

El síndrome de anticuerpos antifosfolípidos (SAAF) es una enfermedad autoinmune, multisistémica, caracterizada por trombosis venosas y/o arteriales recurrentes en personas jóvenes, en las mujeres, además de la trombosis, puede presentar pérdidas fetales recurrentes que deben estudiarse para descartar fuentes inherentes al producto o la madre; frecuentemente se acompaña con trombocitopenia moderada. Su diagnóstico se establece por el antecedente de un factor clínico asociado a la presencia persistente de anticuerpos antifosfolípidos (AAFL), que pueden ser anticuerpos anticardiolipina (aCL), anti- β 2-glicoproteína1 (a- β 2GP1) y/o el llamado Anticoagulante Lúpico (AL).¹ Existen muy diversas manifestaciones clínicas en pacientes con SAAF e involucran prácticamente cualquier órgano, incluyendo corazón, pulmones, piel, cerebro, hígado, bazo y riñones.

Clasificación del SAAF

- Primario: cuando no está asociado a enfermedades autoinmunes.
- Secundario: en presencia de Lupus Eritematoso Sistémico (LES) o alguna otra enfermedad autoinmune.
- Catastrófico: se define como una forma agresiva del SAAF caracterizado por trombosis generalizada que ocurre en varios sitios de la vasculatura, a menudo resulta en falla multiorgánica que progresa rápidamente, está frecuentemente asociado con una morbi-mortalidad significativa.¹

Fisiopatología

La fisiopatología del SAAF es compleja y está caracterizada por un estado de hipercoagulabilidad por lo que se presentan episodios de trombosis arterial, venosa o de pequeños vasos, en las mujeres se presenta también con alteraciones en el embarazo.

El mecanismo de acción de los anticuerpos antifosfolípidos no se ha dilucidado completamente. Sin embargo, una de las teorías más aceptadas hasta el momento dice que los anticuerpos se dirigen a los fosfolípidos (FL) cargados negativamente, localizados en las membranas de células endoteliales, monocitos y plaquetas en momentos claves del ciclo celular como en la apoptosis o en la activación, en el caso de plaquetas. Al fijarse los anticuerpos, se generan señales intracelulares cuyo efecto final induce la expresión de moléculas de adhesión que a aumentan la expresión de factor tisular (FT) que lleva al paciente a un estado protrombótico.²

Entre los mecanismos fisiopatológicos del SAAF se conocen las alteraciones en las reacciones de las vías de inhibición de la coagulación así como en la fibrinolítica, en donde interfieren con la actividad de diversas proteínas reguladoras del sistema hemostático, tales como:

- Proteína C (PC): La PC es una glicoproteína tipo serpina (inhibidor serín proteasa), de síntesis hepática y vitamino K dependiente,³ actúa como anticoagulante natural en su forma activa. Para su activación requiere la presencia de trombina, calcio y FL; se requiere el complejo trombina-trombomodulina que facilita la unión de la PC a su receptor endotelial (re-PC), una vez unida a la membrana, la PC actúa sobre el factor V activado, cuando en el complejo participa la proteína S, el complejo enzimático es capaz de inhibir al factor VIII activado (fVIIIa), disminuyendo la generación de trombina y por consiguiente la formación de coágulos.⁴

- Inhibición de la Proteína S (PS): La PS es un cofactor de la PC, que facilita la actividad de la PCa sobre el fVIIIa por la formación de un complejo [PCa – PS] sobre las superficies de los FL, ambas proteínas requieren del segundo grupo carboxilo que reciben a través del ciclo de la vitamina K y les da funcionalidad para fijarse a la superficie de fosfolípidos.²
- Antitrombina (AT): La trombina es la enzima que se encarga de eliminar los fibrinopéptidos del fibrinógeno para generar monómeros de fibrina (MF). Esta enzima es regulada por la AT que fija a la trombina en la superficie de células endoteliales. En el SAAF los AAFL se unen a la trombina impidiendo la unión de la AT lo que provoca una excesiva activación de la enzima, que a su vez culmina con la estabilización de los coágulos.⁴
- Plasmina: Tiene como finalidad la digestión de la fibrina, desnaturalizando los coágulos. En el SAAF, algunos anticuerpos de isotipo IgG se unen a la plasmina entorpeciendo su función, prolongando la vida media de los coágulos y aumentando el riesgo de trombosis.⁴
- Activador tisular del plasminógeno (t-PA): Es una proteína perteneciente a las serín proteasas que se encuentra en las células endoteliales, encargada de catalizar la conversión de plasminógeno en plasmina, los AAFL se unen al t-PA impidiendo dicha conversión lo que favorece la permanencia del coágulo.^{4,2}

Como se observa, los efectos que favorecen la trombosis vía AAFL, abarcan desde la activación de la coagulación, facilitando la permanencia de los coágulos, su, crecimiento, incontrolado así como la inhibición de los mecanismos que los desnaturalizan.

Otro mecanismo donde interfieren los AAFL, es el de la anexina A5 (AnxA5), potente proteína anticoagulante que forma un escudo sobre las superficies y bloques de células endoteliales para su disponibilidad en reacciones de coagulación. Los AAFL interrumpen la

unión de la AnxA5 permitiendo que se generen reacciones de coagulación en las superficies celulares⁵. La activación del sistema del complemento por AAFL también promueve un estado de hipercoagulabilidad por inflamación.

La activación de neutrófilos favorece la expresión de FT y la liberación de trampas de neutrófilos extracelulares (NET's) e interleucina-8 (IL-8) son mecanismos importantes de trombosis asociada a AAFL.⁶

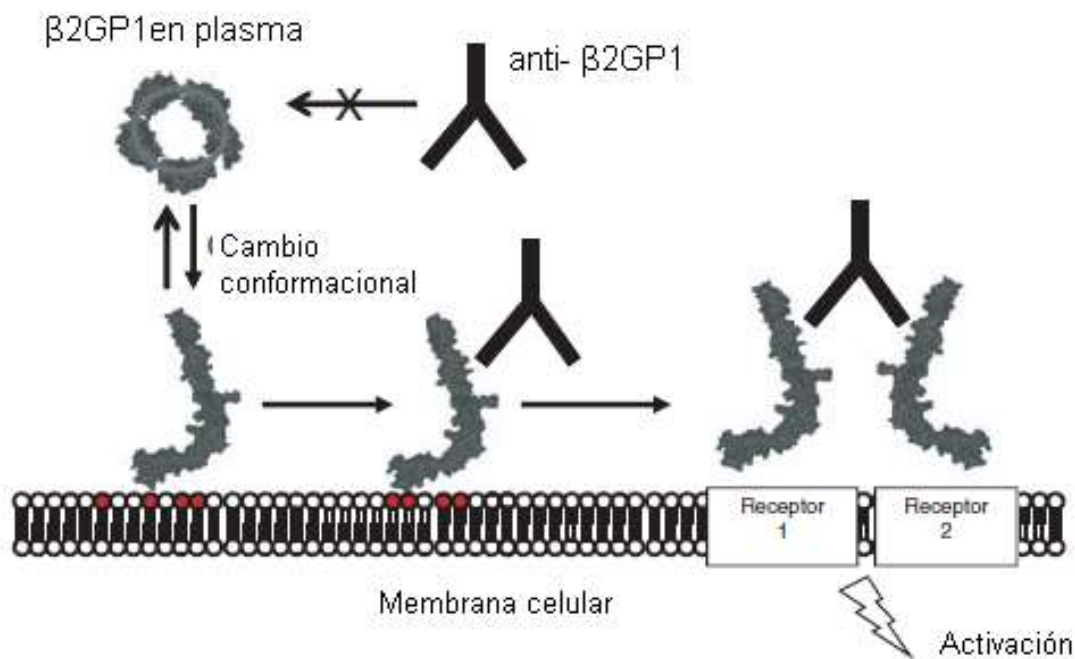
Otros mecanismos fisiopatológicos del SAAF son los que involucran a los anticuerpos anti-CL y anti- β 2GP1. Los anti-CL están dirigidos contra los complejos FL-proteínas de las membranas celulares, para su unión, estos anticuerpos requieren la presencia de la β 2GP1. Dentro de los mecanismos fisiopatológicos propuestos para anti-CL se encuentran la interferencia con la producción endotelial de prostaciclina, interferencia de la vía de la trombomodulina, interferencia en la función de la AT, promoción de la activación plaquetaria con la interacción mediada por FL o por interferencia en el paso de prekalikreína a kalikreína.

Por otro lado, se ha demostrado que la β 2GP1 posee propiedades anticoagulantes, debido a que la unión de los anticuerpos anti- β 2GP1 a la β 2GP1 aumenta la afinidad de esta última a los FL aniónicos de las membranas celulares, se establece una competencia con la β 2GP1 libre con el complejo por los FL con carga negativa, alterando las reacciones hemostáticas.⁷

Naturalmente, la β 2GP1 tiene una configuración en la que algunos epítopes se encuentran ocultos. Tras el contacto de la β 2GP1 con los FL, se realiza un cambio conformacional, que expondrá los epítopes que a su vez jugarán el papel de antígenos para los anticuerpos anti- β 2GP1 (**Fig. 1**). El complejo [FL- β 2GP1 y anti- β 2GP1] activa a las células endoteliales, monocitos, plaquetas y células trofoblásticas, cuyo efecto final favorece la trombosis. Particularmente, las células trofoblásticas pierden la capacidad de proliferar, invadir la

pared uterina y secretar la hormona gonadotropina coriónica humana (HCG), causando pérdidas fetales.⁸

Figura 1. Modelo de activación celular para anticuerpos anti-β2GP1.



La β2GP1 circula en plasma en configuración cerrada.

Modificada de: Tripodi A, de Groot PG, Pengo V. Antiphospholipid syndrome: laboratory detection, mechanisms of action and treatment. J. Intern Med. 2011.

Criterios de Diagnóstico del SAAF

Como ya se mencionó anteriormente, en el SAAF se presentan diversas manifestaciones clínicas que no necesariamente se relacionan con eventos trombóticos, estas incluyen lesiones en una válvula cardíaca, livedo reticularis, trombocitopenia idiopática y manifestaciones neurológicas como la corea, la epilepsia y la mielopatía transversa¹¹ también puede presentarse nefropatía, esta variedad de manifestaciones puede ocurrir en muchas otras condiciones y no necesariamente en el SAAF lo que dificulta su diagnóstico particularmente cuando las características clínicas clásicas están ausentes.

En 1999 se establecieron los criterios preliminares para el diagnóstico del SAAF en Sapporo Japón, posteriormente se establecieron los criterios de diagnóstico actuales en el 11° Congreso Internacional sobre AAFL en Sydney Australia⁹, en donde expertos

propusieron algunas modificaciones a los criterios, tal como la inclusión de anticuerpos anti-β2GP1.¹⁰ El objetivo principal de este grupo de trabajo fue examinar los resultados de las pruebas de laboratorio y su asociación con las manifestaciones clínicas.

Para establecer el diagnóstico del SAAF se requiere la presencia de al menos un criterio clínico y un criterio de laboratorio.¹¹

Criterios clínicos

Los pacientes que cumplen los criterios deben ser estratificados de acuerdo a las causas contribuyentes de la trombosis.

- ▶ Trombosis vascular: uno o más episodios clínicos de trombosis arterial, venosa o de pequeños vasos en cualquier tejido u órgano (validados objetivamente mediante estudios imagenológicos o por histopatología).
- ▶ Complicaciones del embarazo:
 - Una o más muertes inexplicables de fetos morfológicamente normales a las 10 semanas o más de gestación, con morfología fetal normal, o
 - Uno o más nacimientos prematuros de neonatos morfológicamente normales a las 34 semanas de gestación o antes, debido a eclampsia, preclampsia severa o a insuficiencia placentaria severa, o
 - Tres o más abortos espontáneos consecutivos inexplicables antes de la semana 10 de gestación, habiéndose excluido anomalías maternas anatómicas u hormonales, así como alteraciones cromosómicas en ambos padres.

Criterios de Laboratorio.

La prueba debe ser realizada al menos 12 semanas después de la manifestación clínica y no se recomienda establecer el diagnóstico de SAAF si más de 5 años separan alguna de las pruebas positivas de la manifestación.

- ▶ Anticoagulante lúpico en plasma, en dos o más ocasiones con un intervalo mínimo de 12 semanas de acuerdo con las pautas establecidas por la Sociedad Internacional de Trombosis y Hemostasia (guías ISTH), Guías Británicas o del Colegio Americano de Patólogos Clínicos (CLSI).
- ▶ Anticuerpos aCL IgG y/o IgM en suero o plasma con títulos medios altos (>40 GPL o MPL, o >percentil 99), en dos o más ocasiones con un intervalo mínimo de 12 semanas, determinados por una prueba de ELISA estandarizada.
- ▶ Anticuerpos anti-β2GP1 IgG y/o IgM en suero o plasma con un título >percentil 99, en dos o más ocasiones con un intervalo mínimo de 12 semanas determinados por una prueba de ELISA estandarizada.

Se reconoce la siguiente clasificación de SAAF:

Tipo I: Más de un criterio de laboratorio presente, cualquier combinación.

Tipo IIa: Sólo AL presente.

Tipo IIb: Sólo anti-CL presente.

Tipo IIc: Sólo anti-β2GP1 presente.

Estudios clínicos confirman que la tripe positividad en pacientes con SAAF indica un alto riesgo de recurrencia de trombosis y en portadores se incrementa el riesgo de desarrollar un primer evento trombótico, por lo que incluso se considera innecesaria la repetición de

las mediciones a las 12 semanas. Para caracterizar el perfil de anticuerpos del paciente, las tres pruebas deben realizarse, preferentemente en la misma toma de muestra¹².

Los pacientes doblemente positivos (en su mayoría AL negativo) generalmente tienen un riesgo menor de desarrollar trombosis. Es importante tener en cuenta la variabilidad entre pruebas, laboratorios y rendimiento del ensayo ya que una muestra con un resultado positivo determinada mediante un ensayo, no necesariamente será positivo al realizar la determinación en otro laboratorio con un ensayo diferente, es por esto que se sigue recomendando volver a realizar la prueba a las 12 semanas para confirmar la permanencia con la finalidad de evitar un mal diagnóstico debido a una positividad transitoria de anticuerpos. Al repetir la prueba y obtener un resultado similar se asegura la confiabilidad del primer resultado y de la prueba en general, lo cual es importante teniendo en cuenta la falta de estandarización e interferencias de las pruebas disponibles.

Métodos de detección de anticuerpos en fase sólida

Una de las dianas antigénicas de los AAFL son las proteínas o los complejos proteínas-FL, entre estas proteínas las más conocidas son la β 2GP1, identificada como el principal cofactor de los anti-CL, la protrombina y la AnxA5.

Hasta hace algunos años, los ensayos para detectar anticardiolipina y anti- β 2GP1 no estaban estandarizados. Actualmente, las unidades de expresión recomendadas son GPL y MPL para aCL de isotipo IgG e IgM. Para anti- β 2GP1 las unidades de consenso son UI/mL. Se determinan mediante inmunoensayos utilizando anticardiolipina u otro FL aniónico en fase sólida.

La prueba para detectar anti-CL en 1983 se realizaba mediante una técnica de radioinmunoensayo (RIA) que usaba cardiolipina como antígeno junto con una mezcla de buffer de fosfato con gelatina empleada como diluyente de muestras y del conjugado y anticuerpos IgG o IgM humana marcados con yodo radioactivo; posteriormente, se

modificó el método empleando suero bovino fetal que reemplazó a la gelatina y los anticuerpos fueron marcados con peroxidasa para no usar como marcador material radioactivo.^{13,11}

Para realizar estos ensayos puede usarse una muestra de suero o plasma, esto va a depender del kit y de la casa comercial que se utilice en cada laboratorio. La adición de azida u otros conservadores a las muestras pueden afectar de manera negativa los resultados. No deben utilizarse muestras que estén contaminadas con microorganismos, que hayan recibido un tratamiento a base de calor o que contengan partículas visibles. Tampoco deben emplearse sueros o muestras muy hemolizadas o lipémicas. Si la muestra presenta partículas visibles deben ser eliminadas por centrifugación antes de realizar la prueba.¹⁴

Las muestras se pueden conservar de 2-8°C si el análisis se efectúa en un plazo de 8 horas. Si el análisis no va a realizarse en un plazo de 48 horas deberán congelarse a una temperatura de -20°C o inferior. Las muestras congeladas deben mezclarse bien después de descongelarse y antes del análisis.

El análisis de ELISA es muy sensible y es capaz de detectar incluso pequeñas diferencias en las poblaciones de pacientes.¹¹ Sin embargo plataformas automatizadas recientes con variaciones en la fase sólida (por ejemplo: micropartículas magnéticas y microesferas) y diversos sistemas de detección (quimioluminiscencia, citometría de flujo y sistemas multiplex) han sido introducidos en el mercado, estos ensayos tienen la ventaja de mejorar las condiciones de trabajo ya que proporcionan un protocolo estricto sobre cómo se debe realizar la prueba, lo que permite reducir la variación entre laboratorios; son más rápidos pues proporcionan varios resultados a la vez y evitan la realización de múltiples ELISA's

La obtención de los resultados va a depender del kit comercial utilizado por cada laboratorio ya que existen diversas casas comerciales que ofrecen la prueba, cada laboratorio deberá determinar su propio intervalo normal basándose en las técnicas, los controles, los materiales y la población de pacientes que utilice. El resultado puede entonces clasificarse como negativo o positivo.

El tema de los puntos de corte de estos ensayos sigue siendo controvertido. La última recomendación sugiere calcular el percentil 99 de la distribución de resultados en población normal, valores por encima de ese punto se interpretan como positivos. Sin embargo para el ensayo de anti-CL la mejor recomendación es usar el punto de corte de 40 unidades GPL o MPL para definir al SAAF, este valor puede ser sustancialmente diferente al valor del percentil 99.¹⁵ La razón de usar el punto de corte de 40 unidades es debida a un estudio italiano de 1996 que demostró por primera vez que el riesgo tromboembólico sólo se asociaba a valores de anti-CL mayores a 40 unidades. Valores entre el punto de corte negativo (>percentil 99) y 40 unidades se deben informar como indeterminados, esto es similar a lo que antes se conocía como “título bajo positivo”. Muchas infecciones provocan la presencia transitoria de anticuerpos anticardiolipina, si en un paciente que presenta signos clínicos de infección se obtiene un resultado positivo, se repetirá la prueba cuando la infección haya desaparecido. El factor reumatoide puede interferir con la prueba de anticuerpos IgM en fase sólida ofreciendo resultados falsos positivos.¹⁶

Anticoagulante lúpico

Antecedentes

El inhibidor inespecífico conocido como anticoagulante lúpico fue descrito por primera vez en 1952 por Cloney y colaboradores en dos pacientes con LES que presentaron resultados falsos positivos para sífilis. Poco después se reportaron varios casos de pacientes que no

padecían lupus pero sí presentaban datos de un inhibidor que alteraba las pruebas de coagulación¹⁷.Feinstein y colaboradores en 1972 denominaron a este inhibidor de la coagulación “Anticoagulante Lúpico” basado en su prevalencia en pacientes con LES.

En 1965, Yin y Gaston purificaron el anticoagulante circulante en un paciente con lupus. En ese mismo año, Donato Alarcón-Segovia, del Instituto Nacional de la Nutrición de México, y P.J. Osmundson describieron la asociación de úlceras en las piernas y lesiones vasculares periféricas de pacientes en cuyo plasma se encontró serología falsa positiva para sífilis y anticoagulante lúpico. Este fue el primer informe sobre SAAF y lesiones cutáneas.¹⁸

En 1952 una enfermedad parecida al lupus inducida por fármacos se describió por primera vez con hidralazina y posteriormente con mesantoina, un anticonvulsivante, en 1957. Aunque ya estaba en el mercado durante 10 años, el primer caso de lupus inducido por procainamida no se informó hasta 1962.¹⁹

La descripción de la presencia del anticoagulante circulante en lupus inducido por medicamentos fue iniciada en el año 1977, por dos grupos; uno en Boston, con Canoso, que describió que la clorpromazina inducía la presencia de un inhibidor de la coagulación; y el otro, con Bell et al, quienes informaron que en los pacientes en los que la procainamida inducía lupus, había presencia de anticoagulantes circulantes.

Muchas otras drogas que tienen pocas características químicas o farmacológicas se han descrito posteriormente como causa de LES. En términos de frecuencia-ocurrencia, las drogas más prevalentes son procainamida, hidralazina e isoniazida.

Definición

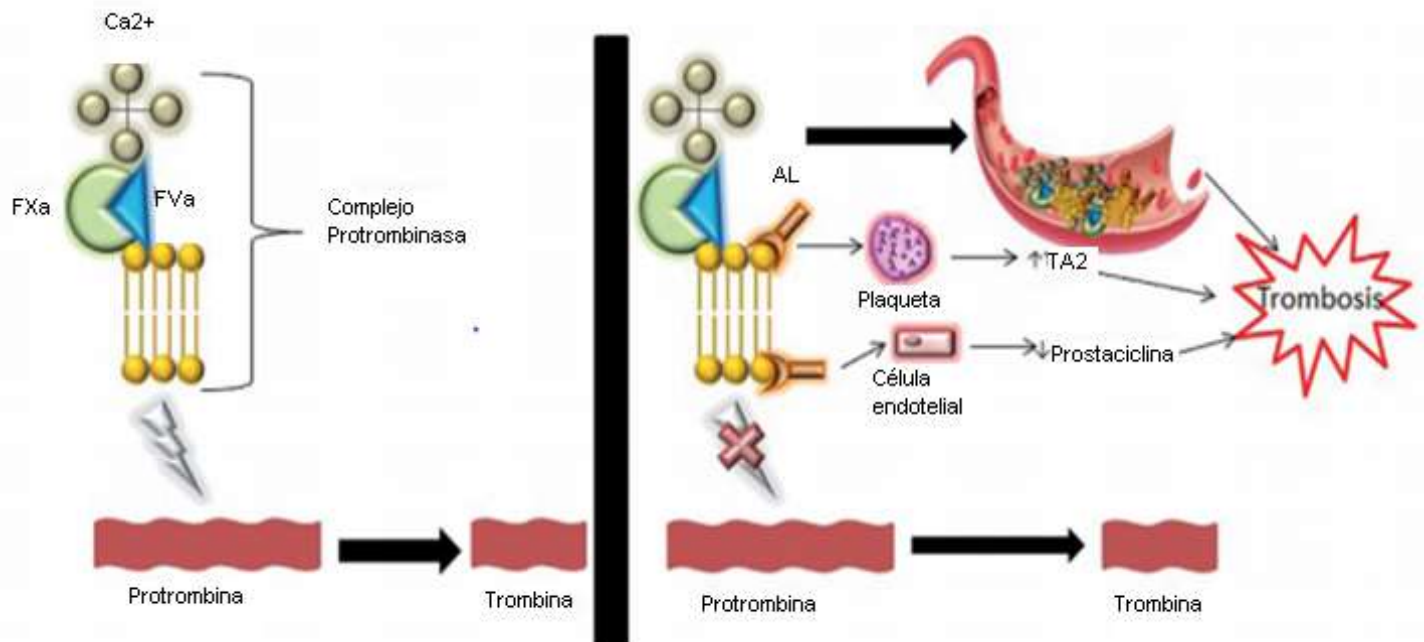
Se define como una mezcla de anticuerpos que se compone de inmunoglobulinas de isotipo IgG, IgA o ambas que interfiere con las reacciones de coagulación dependientes de FL. Los anticuerpos no están dirigidos contra los factores de coagulación sino contra

ciertos epítopes de FL aniónicos. Se puede encontrar en diferentes entidades clínicas como enfermedades autoinmunes, exposición a drogas y antibióticos, infecciones bacterianas, virales o protozoarias y enfermedades linfoproliferativas. Aunque el AL en el laboratorio prolonga las pruebas de coagulación no correlaciona con procesos hemorrágicos, por el contrario se asocia a procesos trombóticos.

Mecanismo de acción

En condiciones normales, en la llamada cascada de coagulación se forma el complejo activador de la protrombina, del cual forman parte el factor diez activado (fXa), factor V activado (fVa), iones de calcio y FL de origen tisular o plaquetario. Este complejo se encarga de la activación de la trombina que formará fibrina a partir del fibrinógeno. En las pruebas *in vitro* en presencia de AL, se une a los FL del complejo activador de la protrombina, bloqueando los sitios de unión de las proteínas procoagulantes lo que se refleja como un inhibidor adquirido de la coagulación que se manifiesta prolongando las pruebas de coagulación dependientes de FL, por el contrario, fisiológicamente, estos anticuerpos favorecen eventos trombóticos por diversos mecanismos que ya se han mencionado. Así mismo se les ha asociado con la disminución en la síntesis de prostaciclina en células endoteliales acompañada de aumento en la producción del tromboxano A2 plaquetario, ambos factores favorecen la aparición de manifestaciones trombóticas.

Figura 2. Mecanismo fisiopatológico del anticoagulante lúpico.



Tomada de Santamaria Y. *Mecanismos fisiopatológicos del síndrome antifosfolípido*. MED.UIS.2014

Criterios de diagnóstico: guías ISTH, BCSH y CLSI

Debido a la heterogeneidad de estos anticuerpos, la amplia variabilidad que hay entre reactivos e instrumentos y la falta de un “estándar de oro” se han dificultado los criterios para su diagnóstico, por esto, diferentes grupos de expertos han establecido guías para la detección de AL en el laboratorio (**Tabla 1**). Es necesario destacar que aunque no existe un consenso entre estos grupos, actualmente se encuentran disponibles guías publicadas por la Sociedad Internacional de Trombosis y Hemostasia (ISTH 2009), Comité Británico de Estándares de Hematología (BCSH 2012) y la más reciente del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI 2014).

Tabla 1. Resumen de acuerdos para la detección de anticoagulante lúpico.²⁰

| | ISTH 2009 | BCSH 2012 | CLSI 2014 |
|---|--|---|---|
| Preparación de la muestra | Doble centrifugación | Doble centrifugación | Doble centrifugación |
| Pruebas a emplear | TTPa y TVVRd | TTPa y TVVRd u otros | TTPa y TVVRd y/u otros |
| Orden de los pruebas | Detección-Mezcla-Confirmatorio | Detección-Mezcla-Confirmatorio | Detección-Confirmatorio-Mezcla |
| IR | Percentil 99 | Percentil 97.5 | Percentil 97.5 |
| Cálculos para demostrar la dependencia de FL | % de corrección de detección por confirmatorio, o Ratio LA (d/c) | % de corrección de detección por confirmatorio, o Ratio LA (d/c) | % de corrección de detección por confirmatorio, o Ratio LA (d/c) |
| Ensayos de mezcla | Realizar mezcla 1:1 con <i>pool</i> interpretar con ICA | Realizar una mezcla 1:1 con <i>pool</i> | Realizar mezcla 1:1 con <i>pool</i> interpretar con ICA |
| Pacientes bajo tratamiento con VKA | Plasma sin diluir si INR <1.5 Mezcla 1:1 con <i>pool</i> si INR >1.5 <3.0 | Detección y confirmatorio en mezcla 1:1 con <i>pool</i> ; TE+TVST o PNP | Detección y confirmatorio en mezcla 1:1 con <i>pool</i> ; TE+TVST o PNP |
| Pacientes bajo tratamiento de HNF | Interpretar con cuidado | No recomendado | Puede detectar AL en algunos casos donde el neutralizador de heparina es efectivo |

Modificada de: Gary W. Moore Recent Guidelines and Recommendations for Laboratory Detection of Lupus Anticoagulants. 2014.

Abreviaturas: TTPa, Tiempo de Tromboplastina Parcial activado; TVVRd, Tiempo de Veneno de Víbora de Russell diluido; LA, Anticoagulante lúpico; ICA, índice de Anticoagulante Circulante; INR, Razón Normalizada Internacional; PNP, Procedimiento de Neutralización de Plaquetas; TE, Tiempo de Ecarina; TVST, Tiempo de Veneno de Serpiente de Taipan; IR, Intervalo de Referencia; VKA, Antagonistas de la vitamina K; HNF, Heparina no fraccionada; (d/c), detección/confirmatorio.

El concepto más importante en el que los tres organismos coinciden, es que un valor de detección o escrutinio de AL elevado no debe considerarse un falso positivo, sino un tiempo de coagulación alargado que requiere de pruebas confirmatorias. Debe tenerse en cuenta que, si bien el percentil 97.5 generará más falsos positivos, el uso del percentil 99.0 originará más falsos negativos presentando mayor riesgo de una falla en el diagnóstico y tratamiento de los pacientes.²¹

Métodos de detección del Anticoagulante Lúpico

Generalidades

Existen diversas pruebas de coagulación que se usan para el diagnóstico de AL las cuales han ido evolucionando a través del tiempo, así mismo, se han añadido pruebas con mayor sensibilidad y especificidad de acuerdo a las recomendaciones de las guías internacionales, estas sugieren la realización de pruebas de detección, mezcla y confirmatorias en un orden específico.

1.- Pruebas de escrutinio.

Las pruebas de detección de AL miden la capacidad de los AAFL de prolongar los tiempos de coagulación dependientes de FL, no obstante, debe tenerse presente que el déficit de factores de coagulación o la presencia de otros inhibidores pueden también prolongar dichos tiempos. En las pruebas de detección se utiliza un reactivo con una baja concentración de FL lo que le proporciona al ensayo una alta sensibilidad ante la presencia de AL.

2.- Ensayos de mezclas o comprobación de inhibición.

Para determinar si la prolongación de un ensayo de detección es debida a un inhibidor se realiza el mismo ensayo sobre una mezcla del plasma del paciente con un *pool* de plasmas normales. En general se utilizan mezclas 1:1 (1 parte de plasma de paciente y 1 de plasma normal). La interpretación de los resultados puede hacerse según diversos criterios. La recomendación es que el punto de corte de los ensayos de mezcla se debe tomar como aquel que corresponda al percentil 99 de la distribución normal o al que se determine a través del índice de actividad anticoagulante (ICA), también conocido como Índice de Rosner (IR). El cálculo del mismo es como se indica:

$$IR = \frac{\text{Tiempo en segundos de la mezcla} - \text{Tiempo en segundos del pool normal}}{\text{Tiempo original en segundos del paciente}} \times 100$$

3.- Pruebas confirmatorias

Las pruebas confirmatorias como su nombre lo indica, son las que confirman la naturaleza dependiente de FL del efecto inhibitorio, necesitan ser altamente específicas ya que son las pruebas concluyentes del ensayo. Se basan fundamentalmente en la corrección de los tiempos de coagulación de las pruebas utilizadas en la primera fase mediante el uso de altas concentraciones de FL. El uso de plaquetas activadas o congeladas y descongeladas que se utilizan en la prueba conocida como neutralización con plaquetas (PNP) no se recomienda por la inestabilidad de la preparación plaquetaria pero puede ser utilizada como prueba secundaria en laboratorios con experiencia en su uso. Se sugiere que para todas las pruebas de detección, mezclas y confirmatorias se expresen los resultados como la razón de tiempos del paciente respecto al resultado obtenido del *pool*.

Etapa pre-analítica

En general los problemas pre-analíticos en las pruebas de hemostasia son una causa importante de error diagnóstico y pueden conducir a eventos clínicos adversos significativos, es por esto que la etapa pre-analítica es de suma importancia para poder garantizar la confiabilidad de los resultados.²²

Las muestras deben ser colectadas en tubos con citrato de sodio al 3.2% manteniendo una proporción de 9 partes de sangre por una de anticoagulante (9:1). En muestras con valores de hematocrito elevado (Hto>55.0%) la relación sangre total: anticoagulante se pierde debido a que el volumen plasmático disminuye, ocasionando que el citrato de sodio del tubo quede en exceso provocando un falso alargamiento en los tiempos de coagulación, de ahí que en valores >55.0 y < 20.0% de hematocrito, debe ajustarse la cantidad de citrato de sodio.²³

La obtención del plasma pobre en plaquetas se debe realizar por doble centrifugación; la primera para obtener un recuento de plaquetas menor a $10 \times 10^9/L$, y la segunda para eliminar fragmentos plaquetarios, esto debido a que la presencia de plaquetas residuales puede acortar los tiempos de coagulación provocando resultados falsos negativos. Los laboratorio deben contar con un *pool*, ya que es necesario para comparar el resultado del paciente, dicho *pool* debe ser tratado de igual manera que la muestra del paciente considerando que éste es una mezcla de plasmas de al menos 20 donadores sanos los cuales no sean familiares del paciente. Para el almacenamiento de muestras por periodos mayores a ocho horas el plasma separado de debe congelar a $-20^{\circ}C$, temperatura a la cual la muestra es muy estable por un mes, antes de su procesamiento la muestra se debe someter a un choque térmico, es decir, colocar en baño maría a $37^{\circ}C$ por 10 minutos.

Es muy importante asegurarse de que el paciente se encuentre libre de tratamiento anticoagulante. En el caso de estar bajo tratamiento se recomienda al médico tratante la suspensión por al menos 72 horas previas en el caso de anticoagulantes orales AVK o los días necesarios para lograr un $INR \leq 1.5$; antes de la próxima inyección en el caso de heparina de bajo peso molecular (12-14 horas posterior a su última aplicación), ó 6-8 horas después de suspender la infusión de heparina no fraccionada. No se recomienda analizar las muestras de plasmas contaminados con heparina no fraccionada (HNF) ya que interfiere con los resultados haciendo más difícil su interpretación. Sin embargo las muestras pueden ser tratadas con un neutralizador de heparina (sulfato de protamina, heparinasa o polibreno).

En caso de no procesar la muestra en el momento la muestra deberá resguardarse a $-80^{\circ}C$; En el caso de los Anticoagulantes Orales Directos, se recomienda la suspensión de los mismos tres días antes de la toma de muestra.

Cualquier suspensión del tratamiento anticoagulante, tiene que ser supervisada por el médico tratante.

Tiempo de Tromboplastina Parcial activado (TTPa) sensible a lúpico

El TTPa es una de las pruebas de detección más utilizadas, su sensibilidad varía de acuerdo al reactivo utilizado. En 1995 Denis-Magdelaine y colaboradores, realizaron un estudio en el que evaluaron la sensibilidad de 16 reactivos, observaron una gran variabilidad entre estos, y demostraron que los reactivos que presentaron mayor sensibilidad fueron los que utilizaban cerebro animal como fuente de FL y sílica o ácido elálgico como activador, mientras que la sensibilidad fue menor para los que utilizaban FL de soja y kaolín/celite como activador.²⁴

Sin embargo, más tarde en 2007 Detarsio y colaboradores evaluaron la sensibilidad de 19 reactivos comerciales de TTPa para detectar AL en los que analizaron el tipo de activador y el origen de los fosfolípidos llegando a la conclusión de que la sensibilidad es debida a la cantidad de FL presentes en el reactivo. El origen de los FL (vegetal, animal o sintético) y el tipo de activador de contacto en los reactivos de TTPA, no parecen explicar las diferencias encontradas en la sensibilidad, dado que el mismo tipo de activador y de FL fueron encontrados tanto en los reactivos de mayor sensibilidad, como en los de menor sensibilidad. Los reactivos con FL de origen animal no mostraron ser más sensibles que aquellos con FL de origen vegetal.²⁵

La prueba de TTPa se fundamenta en la capacidad del plasma de formar un coágulo de fibrina a través de la vía intrínseca de la cascada de coagulación, requiere los factores de coagulación I, II, V, VIII, IX, X, XI y XII, así como FL plaquetarios y calcio. La prueba se efectúa reponiendo el calcio que fue inactivado con el anticoagulante, se agrega

tromboplastina parcial (carece de FT) y un activador de superficie que actúa sobre los factores de contacto de la vía intrínseca, iniciando así la cascada de coagulación.

Los resultados de la prueba de TTPa pueden ser expresados en segundos, sin embargo, es recomendable calcular y reportar los índices normalizados, que utilizan los valores obtenidos en pacientes y *pool* de trabajo. El índice se expresa como se muestra a continuación:²⁶

$$\text{Índice normalizado TTPa} = \frac{\text{TTPa paciente}}{\text{TTPa media del intervalo de referencia}}$$

En el primer trimestre del embarazo se incrementan los niveles de fVIII y fibrinógeno, lo que podría enmascarar un AL positivo, atenuando su efecto anticoagulante en las pruebas *in vitro*.²⁷

Tiempo de veneno de víbora de Russell diluido (TVVRd)

El tiempo de Veneno de Víbora de Russell diluido se aceptó por primera vez tras la publicación de Thiagarajan et al en 1986. En su estudio describieron un método basado en el tiempo de veneno de víbora de Russell (TVVR) usando cantidades limitadas de FL y veneno, diluyeron el veneno para obtener tiempos de coagulación aproximadamente de 25 segundos en plasmas normales, con esta dilución se logró una distinción, ligeramente mejor, de AL y plasmas normales en comparación con concentraciones de veneno más altas.²⁸ Desde entonces, el método de Thiagarajan se ha simplificado y estandarizado.

La prueba de TVVRd se basa en la capacidad que posee el veneno de víbora de Russell para activar directamente al factor X (fX), el factor X activado (fXa) cataliza la transformación de protrombina a trombina en presencia de fVa, calcio y fosfolípidos. Bajas concentraciones de FL hacen que la prueba sea sensible a la presencia de AL.^{29,30} Para ello se usan dos reactivos, el de escrutinio y el confirmatorio, los cuales varían

principalmente en la concentración de FL, la prueba de detección contiene una baja concentración de FL y la prueba confirmatoria alta; el reactivo contiene entonces calcio, veneno de víbora de Russell diluído y fosfolípidos, las muestras se mezclan en primer lugar con el de detección, determinando el tiempo transcurrido hasta la formación del coágulo.³¹De acuerdo a las recomendaciones de la ISTH, cuando el tiempo de escrutinio es alargado, se realiza una prueba en la mezcla a partes iguales del plasma en estudio con *pool* normal, para excluir deficiencias de los factores de la vía intrínseca que pueden prolongar los resultados iniciales. Al mezclar plasma normal con el plasma problema se compensan los factores que faltan en el plasma del paciente. Si la prueba de mezcla se sigue prolongando, podría indicar que el plasma problema es positivo para AL o cualquier otro inhibidor.

Ya que el TVVR activa directamente el fX evitando los factores anti-hemofílicos y de contacto de la vía intrínseca se dice que estas pruebas son más específicas para AL que las pruebas de TTPa.

Para garantizar la confiabilidad de los resultados de la prueba se debe asegurar que el paciente no esté siendo tratado con ningún derivado heparínico, la prueba puede realizarse si está en tratamiento con AVK pero se recomienda que su INR ≤ 1.5 .

El diagnóstico de AL no se debe basar únicamente en el resultado de las pruebas de detección, tanto la sensibilidad como la especificidad de la prueba para la detección de AL aumentan si la prueba de detección se utiliza junto con la prueba confirmatoria. El resultado final se puede expresar como una proporción de los tiempos de coagulación.

Los resultados de las pruebas de escrutinio y confirmatorias pueden ser expresadas como tiempos de coagulación en segundos. Las guías internacionales recomiendan que los resultados se calculen y reporten como un índice normalizado para la correcta interpretación de la prueba. Para ello, cada laboratorio debe establecer un valor de

referencia para el AL calculando el percentil 99 de la distribución de resultados en población normal (de acuerdo a la ISTH) o percentil 97.5 de acuerdo al CLSI.

El cálculo de los resultados normalizados de ambas pruebas se hace como se presenta a continuación:

$$TVVRd \text{ detección} = \frac{\text{Resultado del paciente en segundos}}{\text{Resultado del Pool en segundos}}$$

$$TVVRd \text{ confirmatorio} = \frac{\text{Resultado del paciente en segundos}}{\text{Resultado del Pool en segundos}}$$

Posteriormente se calcula el resultado global de la prueba y con base en el resultado obtenido y de acuerdo al valor del punto de corte establecido por cada laboratorio se determina si el resultado es negativo o positivo para AL.

Para el cálculo global de la prueba se utiliza la siguiente fórmula:

$$\text{Índice de Russell} = \frac{TVVRd \text{ detección} - TVVRd \text{ confirmatorio}}{TVVRd \text{ detección}} * 100$$

Es importante resaltar que el hallazgo de un anticoagulante lúpico puede ser transitorio en pacientes con enfermedades autoinmunes, infecciones, o por efecto de medicamentos lo cual, no necesariamente representa un riesgo de trombosis, es por esto que se recomienda que la prueba se repita a las 12 semanas para confirmar la permanencia de cualquiera de los AAF que hubieran resultado positivos, a menos que se trate de un resultado triple positivo: anticoagulante lúpico, anti-b2GP1 y anti-CL, en cuyo caso, no es necesario repetir la prueba a las 12 semanas.

Es bien sabido que los ACOD's como el dabigatrán, rivaroxaban y apixaban por su efecto directo sobre los factores II y X, causan interferencia en la prueba provocando resultados

falsos positivos en los ensayos de TVVRd por lo que no se recomienda la realización de la prueba si el paciente toma dichos anticoagulantes, las recomendaciones comunes sugieren que la prueba se realice antes de la ingesta del medicamento y preferentemente 3 días después de suspender su ingesta.³²

En 2013 M. E. Martinuzzo et al, realizaron un estudio en donde evaluaron la frecuencia de resultados falsos positivos de AL en pacientes que recibían tratamiento con ACOD's y HBPM en donde observaron que las muestras de estos pacientes presentaban tiempos prolongados en las pruebas de detección y mezcla. Estos hallazgos son interesantes ya que en algunas circunstancias los médicos no tuvieron en cuenta estos efectos y tomaron la muestra de pacientes que recibían Enoxaparina durante el evento agudo y se obtuvieron resultados inconsistentes disminuyendo la especificidad del diagnóstico de SAAF, es por esto que estos autores recomiendan realizar la medición del ensayo anti-Xa en estos casos para descartar la presencia de HBPM en el plasma.³³

Algunos inhibidores del fV están dirigidos contra el sitio de unión de los FL de dicho factor y pueden enmascarse como AL, estos inhibidores muestran corrección con la adición de FL lo que hace que sea difícil discriminar entre ellos y el AL.

Tiempo de Coagulación con Kaolín (TCK)

El TCK es una prueba de detección de AL basada en un TTPa en la que no se agregan fosfolípidos, sin embargo, esta prueba se ve afectada por muchas anomalías de la coagulación, por lo tanto puede volverse más específica diluyendo el plasma del paciente con un *pool* de plasma normal en lugar de analizar el plasma puro del paciente. El ensayo es ampliamente usado por su alta sensibilidad pero tiene la desventaja de ser muy sensible al número de plaquetas residuales en el plasma a estudiar. Por este motivo es imprescindible la filtración de los plasmas cuando se prepara el PPP.

Actualmente las guías de la ISTH 2009 no recomiendan el uso de kaolín como activador en las pruebas basadas en TTPa porque su naturaleza particulada compromete el principio de detección, requiere de mezcla constante para prevenir la sedimentación rápida de las partículas y no incluye una prueba confirmatoria.

Tiempo de inhibición de tromboplastina (TIT) o Tiempo de Protrombina diluido (TPd)

El anticoagulante Lúpico rara vez afecta el Tiempo de Protrombina (TP) realizado con las técnicas habituales. Esto se debe, en parte, a la alta concentración de fosfolípidos del reactivo original. La prueba de TIT se basa en la dilución del reactivo de TP para disminuir la concentración de los FL. El AL puede hacerse evidente utilizando tromboplastina diluida desde 10^{-1} y 10^{-4} .

El resultado puede ser expresado como un tiempo de coagulación en segundos, los resultados se calculan y se reportan como un índice normalizado.

Rosner y colaboradores describieron un índice de TIT y lo definieron como Índice de Tiempo de Inhibición de Tromboplastina y se puede expresar de la siguiente manera:

$$\text{Índice de TIT} = \frac{\left(\frac{TP \text{ paciente}}{TP \text{ normal}}\right) \text{Tromboplastina diluida}}{\left(\frac{TP \text{ paciente}}{TP \text{ normal}}\right) \text{Tromboplastina sin diluir}}$$

El criterio de positividad es el índice TIT >1.25 , aunque siempre es recomendable el establecimiento de valores de referencia locales.

Esta prueba es positiva con los inhibidores potentes, es decir, no es sensible a los inhibidores débiles. Actualmente está casi en desuso debido a su falta de especificidad, pues se ha encontrado positiva en casos de déficit severos del factor VIII así como en plasmas heparinizados.³⁴

Se han adoptado diversos enfoques para las diluciones de tromboplastina lo que resulta en diferencias significativas al momento de realizar el diagnóstico.

Tiempos de coagulación con venenos Textarin/Ecarin

Dentro de los ensayos de confirmación se encuentran las nuevas pruebas que usan venenos de víbora que activan a la protrombina con diferente requerimiento de FL. La prueba de Ecarin se puede considerar un ensayo confirmatorio si se usa en combinación con la prueba de Textarin.³⁵

El reactivo Textarin, es una fracción de proteína aislada del veneno de la serpiente marrón oriental australiana (*Pseudonajatextilis*), activa directamente la protrombina en presencia de fV, iones de calcio y FL³⁶; mientras que Ecarin, un veneno de la víbora de la sierra (*Echiscarinatus*) activa la protrombina en ausencia de cofactores y FL generando meizotrombina, un precursor catalíticamente activo de la trombina capaz de transformar el fibrinógeno en fibrina.³⁷ En presencia de AL, el tiempo de Textarin se prolonga debido a la dependencia de FL pero el tiempo de Ecarin no, ya que la formación del coágulo ocurre en ausencia de FL. Por lo tanto la expresión de los resultados como un cociente de los tiempos de coagulación con ambos venenos genera un índice con alta sensibilidad para el AL.

Los dos tiempos de veneno se comparan como una proporción. Una alta proporción de Textarin / Ecarin (es decir, prolongación del tiempo de Textarin en relación con el tiempo de Ecarin) sugiere la presencia de un anticoagulante lúpico.

La deficiencia o inhibidores de la protrombina prolongarán los tiempos de Textarin y Ecarin y la deficiencia o inhibidores del fV también prolongan el tiempo de Textarin.

Tiempo de tromboplastina parcial activado con fosfolípidos hexagonales

El AL tiene especificidad por los FL aniónicos y de esa manera interfiere en el ensamble de los factores de la coagulación sobre micelas o superficies fosfolípídicas en diferentes etapas de la coagulación. Los FL “*in vivo*” pueden adquirir una configuración hexagonal, como resultado del daño de la membrana celular, podrían presentar anticuerpos producidos en respuesta al daño celular que induce el cambio de los fosfolípidos de fase laminar a hexagonal, el AL puede unirse con mayor facilidad a estos fosfolípidos pues está aumentada la especificidad.

En el laboratorio, la detección del AL se puede realizar por medio de una prueba de TTPa sensibilizada en la que el reactivo contenga fosfolípidos en fase hexagonal. Por ejemplo; el kit STACLOT® LA de Stago contiene moléculas de fosfatidiletanolamina como fuente de fosfolípidos hexagonales.

La prueba se fundamenta en que en solución acuosa a 37 °C, las moléculas de fosfatidiletanolamina purificadas presentan estructuras moleculares hexagonales. Estas estructuras se reconocen por los AAFL de tipo lúpico. La aportación de fosfatidiletanolamina en fase hexagonal corrige la prolongación del TTPa debida a la presencia de AL.

Los resultados se expresan como el delta (o diferencia) de los tiempos de coagulación en segundos entre dos tiempos que se realizan al mismo tiempo. Un valor delta se puede determinar restando los valores del tubo 2 de los valores del tubo 1. La composición de ambos tubos es casi igual: plasma del paciente más *pool* de plasma normal y reactivo de TTPa, la diferencia es que el tubo 1 contiene buffer en lugar de los FL en fase hexagonal que están presentes en el tubo 2.

Una disminución del tiempo de coagulación del plasma del tubo 2 ≥ 8 segundos con relación al del tubo 1 revela una neutralización de los AAFL lo que se expresa como un resultado

positivo y cuando es < 8 la prueba se considera negativa. En ciertas ocasiones el resultado del tubo 2 puede ser superior al del tubo 1 y por tanto TC1 – TC2 dan un valor negativo. Este valor no es erróneo y el resultado de la muestra se debe considerar negativo.

Se recomienda que cada laboratorio compruebe con arreglo a sus propias condiciones operativas el valor límite de 8 segundos en al menos 20 plasmas normales. El resultado debe interpretarse en función del estado clínico y biológico del paciente.

La presencia de inhibidores de factores de la coagulación ofrece normalmente un resultado negativo. No obstante, vista la heterogeneidad de estos anticuerpos, algunos de ellos pueden interferir en la prueba. De igual modo, si se sospecha de su presencia, proceder a realizar una prueba específica para confirmarlo.

Los inhibidores de la trombina presentes en la muestra a analizar pueden interferir en esta prueba y mostrar resultados falsamente positivos.

Tiempo de Coagulación con Sílica (SCT)

La prueba de tiempo de coagulación con sílica fue desarrollada en 1992 por Tripodi y colaboradores, ellos desarrollaron un método de detección y confirmación para AL en el que usaron dos concentraciones diferentes de FL, observaron que la mayor sensibilidad de SCT para AL no se apreciaba cuando los FL estaban totalmente ausentes pero si a una concentración baja, llegando a la conclusión de que una concentración baja de FL es necesaria para maximizar la sensibilidad de la prueba con respecto a la prolongación de los tiempos de coagulación provocados por AL.³⁸El ensayo se propuso como un sustituto de la prueba de TCK ya que la suspensión de kaolín era demasiado turbia y no adecuada para el análisis con instrumentos foto-ópticos.

La prueba de SCT es una modificación del TTPa en el que se usa sílica como activador; se compone por un reactivo de detección o escrutinio y uno confirmatorio que contienen una concentración baja y muy alta en FL, respectivamente.

El fundamento de la prueba de SCT es muy similar al del TTPa, la sílica en presencia de calcio va a activar a los factores de contacto de la vía intrínseca, la baja concentración de FL en el reactivo de detección hacen a la prueba altamente sensible ante la presencia de AL que alarga el tiempo de coagulación cuando se encuentra presente; por su parte, la alta concentración de FL en el reactivo confirmatorio neutralizará al AL acortando los tiempos de coagulación significativamente.³⁹

Los resultados pueden ser expresados como tiempos de coagulación en segundos, las guías internacionales recomiendan que los resultados sean calculados y reportados como un índice normalizado en donde se va a dividir el tiempo de coagulación del paciente entre el tiempo de coagulación de un *pool*.

Los resultados se pueden calcular como se presenta a continuación:

$$1. \text{ SCT Detección} = \frac{\text{Resultado del paciente en segundos}}{\text{Resultado del Pool en segundos}}$$

$$2. \text{ SCT Confirmatorio} = \frac{\text{Resultado del paciente en segundos}}{\text{Resultado del Pool en segundos}}$$

$$3. \text{ Índice SCT} = \frac{\text{Índice SCT Detección}}{\text{Índice SCT Confirmatorio}}$$

La interpretación de los resultados requiere el establecimiento de un punto de corte. Las pautas más recientes para la detección de AL sugieren el uso de un *pool* de 40 donadores sanos o más en el que se va a tomar el percentil 99 de la distribución de los resultados como punto de corte. Cada laboratorio tiene que establecer sus propios puntos de corte considerando el tipo de población que atiende.

El resultado puede verse alterado por uso de anticoagulantes orales AVK y deficiencias de factores de la vía intrínseca.

Usar sólo el procedimiento de confirmación no discrimina entre AL y la presencia de HNF. Algunos reactivos confirmatorios de SCT disponibles comercialmente contienen un neutralizador de heparina que permite realizar pruebas en presencia de HNF. Sin embargo, las muestras de plasma que contienen niveles de HNF mayores que el nivel indicado pueden dar resultados prolongados. Las muestras de plasma pueden tratarse con un neutralizador de heparina, sin embargo no son reactivos de fácil acceso en el país, además de que la confirmación de la ausencia de heparina implica la medición directa de la heparina, lo que encarecería aún más la prueba, por lo que la recomendación principal sería el rechazo de muestras que contengan heparina de cualquier peso molecular.

JUSTIFICACIÓN

El Laboratorio de Trombosis, Fibrinólisis y Función Plaquetaria del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez es un laboratorio especializado en pruebas de hemostasia que debido al tipo de enfermos que recibe, requiere de las mejores herramientas para la detección de Anticoagulante Lúpico. Se disponía de una prueba de TTPa sensible al AL (sin prueba confirmatoria), sin embargo, los resultados de ambas pruebas coincidían por lo general, por lo que en realidad no era posible detectar bajo esta combinación de pruebas, pacientes con AL diferentes a los detectados por la prueba más conocida y usada que es el TVVRd.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se ha descrito que el anticoagulante lúpico es el anticuerpo antifosfolípido más trombogénico, por lo que su detección es muy importante para los enfermos. Hasta el momento, no existe una prueba “estándar de oro” que permita la detección de la totalidad

de variantes de AL, por lo que las guías internacionales recomiendan el uso de al menos dos pruebas con diferente fundamento para aumentar la posibilidad de encontrar verdaderos positivos en pacientes que no se detectan por la prueba de TTVRd. Se planteó la siguiente pregunta de investigación:

¿La prueba de Tiempo de Coagulación con Sílica será capaz de encontrar resultados positivos de AL diferentes a los encontrados por la prueba de TVVRd?

HIPÓTESIS NULA

La prueba para detección de AL Tiempo de Coagulación con Sílica detecta los mismos pacientes con anticoagulante lúpico positivo que el Tiempo de Veneno de Víbora de Russell diluido.

OBJETIVOS

1. Comparación del sistema de detección de AL por las pruebas de Tiempo de Veneno de Víbora de Russell diluido *versus* Tiempo de Coagulación con Sílica.
2. Establecer características mínimas de desempeño de la prueba de SCT:
 - a. puntos de corte para la prueba de SCT de escrutinio y confirmatoria.
 - b. especificidad y sensibilidad de la prueba de SCT.
3. Establecer una correlación clínica de los dos sistemas de detección de AL.

MATERIAL Y MÉTODOS

Tipo de estudio

Estudio retrospectivo, observacional que consiste en la recopilación de datos clínicos de pacientes cuyas muestras de plasma se obtuvieron bajo las mejores condiciones pre-analíticas y se trabajaron con el sistema de detección de AL original. Asimismo, una alícuota de la muestra original de cada paciente, se conservó a -70°C y se descongeló para realizarle la prueba de SCT en bloques.

Población de estudio

Se analizaron 123 muestras de pacientes que acudieron al servicio de Hematología del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, a quienes se les solicitó la prueba de AL por sospecha de Síndrome de Anticuerpos Antifosfolípidos o como parte del panel de pruebas en el estudio de Lupus Eritematoso Sistémico.

Criterios de inclusión

- Muestras de pacientes con solicitud de detección de AL y sospecha de SAAF y/o LES.
- Pacientes sin sospecha de uso de heparinas.
- Pacientes con anticoagulantes orales antagonistas de vitamina K e $\text{INR} < 1.5$.
- Alícuotas bien identificadas y con volumen mínimo de 1.2 mL.

De los 123 registros originales, se descartaron 31 que no cubrieron con los criterios mencionados anteriormente, de ahí que se conservaron los registros y muestras de 92 pacientes para los cuales se solicitó la detección de AL. Debido a la heterogeneidad de las situaciones clínicas, se dividieron en 4 grupos:

1. Lupus Eritematoso Sistémico (LES).
2. Pacientes con sospecha de SAAF (PSAAF).
3. Pacientes con Cualquier Enfermedad Autoinmune diferente a LES (NO LES)
4. Enfermedad No Diferenciada (END)

Técnicas

La búsqueda del AL se realizó originalmente mediante el uso de las pruebas de rutina del laboratorio de Trombosis del Departamento de Hematología: TVVRd screen® (HemosIL) y TTPa (aPTT-SP liquid® HemosIL). Los resultados de la prueba de TVVRd se compararon contra los obtenidos por la prueba de SCT HemosIL® (proporcionado por IL Werfen México).

Ambas pruebas son coagulométricas y se procesaron en un equipo automatizado ACL Elite 9000 de la Compañía IL Werfen ®.

Metodología

Todas las muestras se tomaron en tubos con citrato de sodio a una concentración de 3.2% manteniendo la relación (9:1) sangre: anticoagulante. El plasma de cada muestra se obtuvo por doble centrifugación de acuerdo a las guías de la ISTH, se guardaron tres alícuotas de cada muestra a una temperatura de -70°C hasta su proceso.

Se seleccionaron las muestras de acuerdo a los criterios de inclusión y una vez que se establecieron los valores normales de la prueba de SCT, las muestras de los pacientes se descongelaron por bloques en baño maría a 37°C por 10 minutos.

Se trabajaron en el mismo equipo de acuerdo al protocolo del reactivo que se rige por las especificaciones comentadas en la introducción.

Tiempo de veneno de víbora de Russell:

un volumen de plasma que se incubaba a 37°C por 1 minuto + 1 volumen de reactivo, al mezclarse se activa el cronómetro que se detiene por la opalescencia que se obtiene cuando se generan las primeras trazas de fibrina (cambio en la densidad óptica de la muestra). En los casos en que la prueba de escrutinio presentó resultados alargados, la muestra de los pacientes se mezcló a partes iguales con un *pool* de plasmas formado por el plasma de más de 25 sujetos sanos, cuyas muestras se trataron igual que las de los pacientes, se mezclaron y alicuotaron para mantenerse a -70°C hasta su uso.

Tiempo de coagulación con Sílica: 1 volumen de plasma + 1 volumen de los reactivos con sílica (de escrutinio en un caso y confirmatorio en el otro), la mezcla se incubaba a 37°C y se recalcifica con cloruro de calcio después de 1 minuto. Se activa el cronómetro y se toma el tiempo que tarda en formar el coágulo. Como material de control para la evaluación del SCT, se utilizaron: control normal comercial (LA Negative Control HemosIL®), control positivo (LA Positive Control HemosIL®, ambos con intervalos conocidos.

Para el tratamiento de los resultados obtenidos en las pruebas de escrutinio y confirmatorias de los pacientes, se usa el valor obtenido en las mismas pruebas un *pool* de plasmas normales, que se obtiene de acuerdo a la descripción previa y se usa de acuerdo al cálculo comentado en la introducción: Índice Normalizado de SCT.

RESULTADOS

Técnica a introducir: Tiempo de Coagulación con Sílica

Para obtener la imprecisión intra-laboratorio (Coeficiente de Variación), se realizaron 24 repeticiones de los controles: CN y CP; para la imprecisión inter-laboratorio, se tomaron los datos de 15 ocasiones diferentes. Los valores de imprecisión obtenidos se encuentran por

abajo del 5.0 %, excepto el CV inter-corrida para el control Normal del SCT confirmatorio, donde se obtuvo un CV=5.07%. En la **Tabla 2**, se muestran los resultados de la precisión para ambas pruebas.

Tabla 2. Evaluación de precisión de la prueba de SCT. Pool normal y Controles comerciales.

| | Control N | | Control P | | Pool | |
|--------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| | n= 24 | n=15 | n= 24 | n=15 | n= 24 | n=15 |
| Imprecisión | Intra-corrida (% C.V.) | Inter-corrida (% C.V.) | Intra-corrida (% C.V.) | Inter-corrida (% C.V.) | Intra-corrida (% C.V.) | Inter-corrida (% C.V.) |
| SCT escrutinio | 3.62 | 4.87 | 3.87 | 4.85 | 2.35 | 4.8 |
| SCT confirmatorio | 1.62 | 5.07 | 3.15 | 4.85 | 1.0 | 3.9 |

C.V.: Coeficiente de Variación, SCT: Tiempo de Coagulación con Sílica, Control N: control negativo, Control P: control positivo.

De acuerdo a las guías de la ISTH, cada laboratorio debe establecer los intervalos de normalidad para cada fase de las pruebas. De ahí, establecer el percentil 99 como el límite de normalidad, ya que un resultado > percentil 99 obliga a continuar con el algoritmo de la prueba para confirmar el alargamiento de los tiempos de coagulación dependiente de fosfolípidos. Los valores de normalidad para la prueba de TVVRd estaban previamente establecidos (media ± D.E. y percentil 99: 1.23 ± 0.11 y 1.48). Para la prueba de SCT, se midieron los tiempos de SCTscr y SCTconf en 40 sujetos sanos (13 mujeres), y se calculó el índice normalizado de SCT (INSCT), media ± D.E. y percentil 99: 1.0 ± 0.11 y 1.21. Los valores por encima de este percentil 99 se consideraron positivos (AL+).

Resultados en pacientes

De 92 pacientes seleccionados, 76 fueron mujeres (82.6%), con una edad de 17-63 años (mediana=39.5), los hombres tenían de 18-59 años (mediana=31), sin diferencia

significativa. En la **tabla 3** se muestran los resultados obtenidos por género para las pruebas de TVVR y SCT así como los índices normalizados para ambas pruebas.

Tabla 3. Índices normalizados obtenidos para las pruebas de TVVRd y SCT.

| | TVVR escrutinio | TVVR confirmatorio | SCT escrutinio | SCT confirmatorio | Í. TVVRd escrutinio normalizado | RN SCT |
|-----------------------------|------------------------|-----------------------|----------------------|----------------------|---------------------------------------|---------------------|
| Femenino (N=76) | 34.4 (28.9-67.3) | 29.7 (28.1-42.05) | 40.1 (28.1-92.1) | 38.6 (30.2-61.7) | 1.03 (0.87-2.06) | 0.97 (0.68-2.5) |
| Masculino (N=16) | 39.05 (29.85-140.5) | 32.9 (30.3-43.85) | 45.3 (33.25-145) | 41.6 (30.85-60.5) | 1.2 (0.85-4.26) | 1.02 (0.66-3.15) |
| Total (N=92) | 35.1 (29.03-77.9) | 30.8 (28.1-43.85) | 41.2 (30.1-116.2) | 39.4 (30.4-60.8) | 1.05 (0.86-2.4) | 0.98 (0.67-3.15) |

Los resultados son presentados en mediana e intervalos (percentil 5 y 95).

TVVRd: Tiempo de Veneno de Víbora de Russell diluido. SCT: Tiempo de Coagulación con Sílica, RN: Razón Normalizada

Fórmulas:

$$\text{Índice TVVRd escrutinio normalizado} = \frac{\text{Resultado del paciente en segundos}}{\text{Resultado del Pool en segundos}}$$

$$\text{Índice TVVRd confirmatorio normalizado} = \frac{\text{Resultado del paciente en segundos}}{\text{Resultado del Pool en segundos}}$$

$$\text{Razón normalizada TVVRd} = \frac{\text{Escrutinio Normalizado} - \text{Confirmatorio Normalizado}}{\text{Escrutinio Normalizado}} * 100$$

$$\text{SCT escrutinio} = \frac{\text{Resultado del paciente en segundos}}{\text{Resultado del Pool en segundos}}$$

$$\text{SCT confirmatorio} = \frac{\text{Resultado del paciente en segundos}}{\text{Resultado del Pool en segundos}}$$

$$\text{Razón normalizada SCT} = \frac{\text{Índice SCT escrutinio}}{\text{Índice SCT confirmatorio}}$$

Resultados de la pruebas de SCT y TVVRd con respecto a la enfermedad

Al dividirlos por grupos de enfermedad, se encontraron índices normalizados significativamente diferentes en ambas pruebas. En la **figura 3 y 4** se muestran los índices normalizados por grupos de estudio y prueba.

Figura 3. Índice Normalizado para TVVRd escrutinio por grupo de estudio y resultado final.

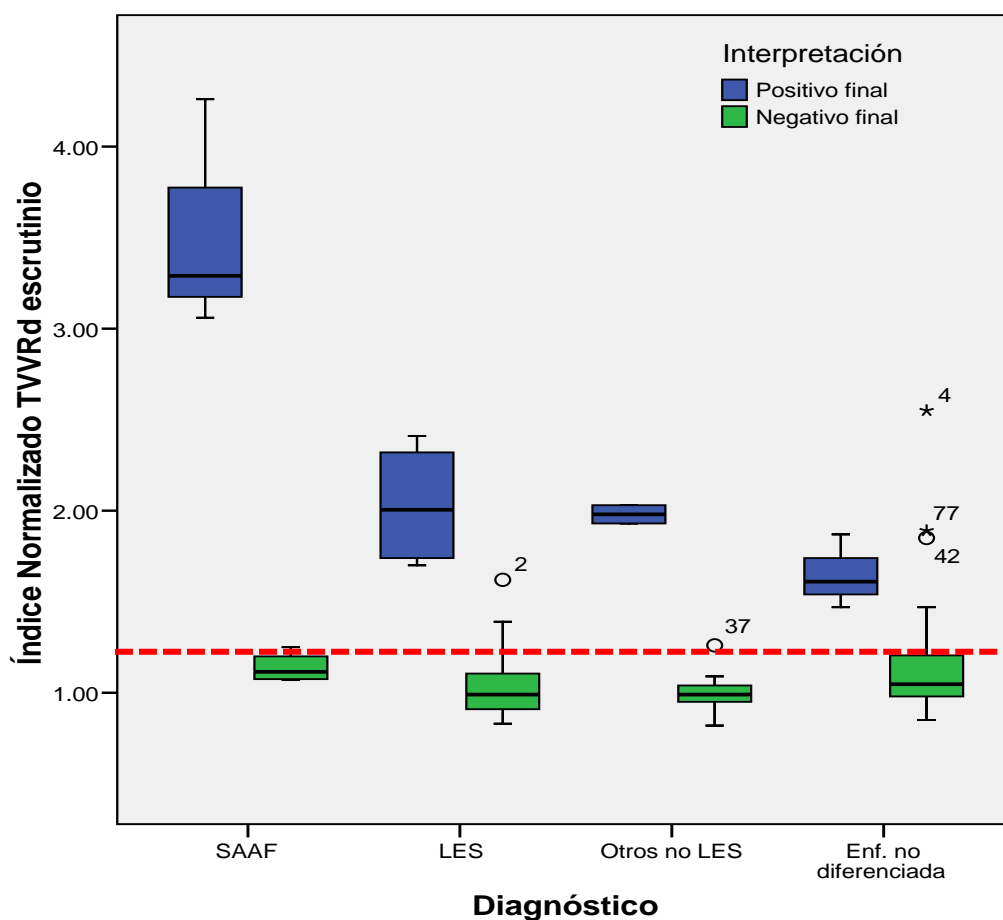
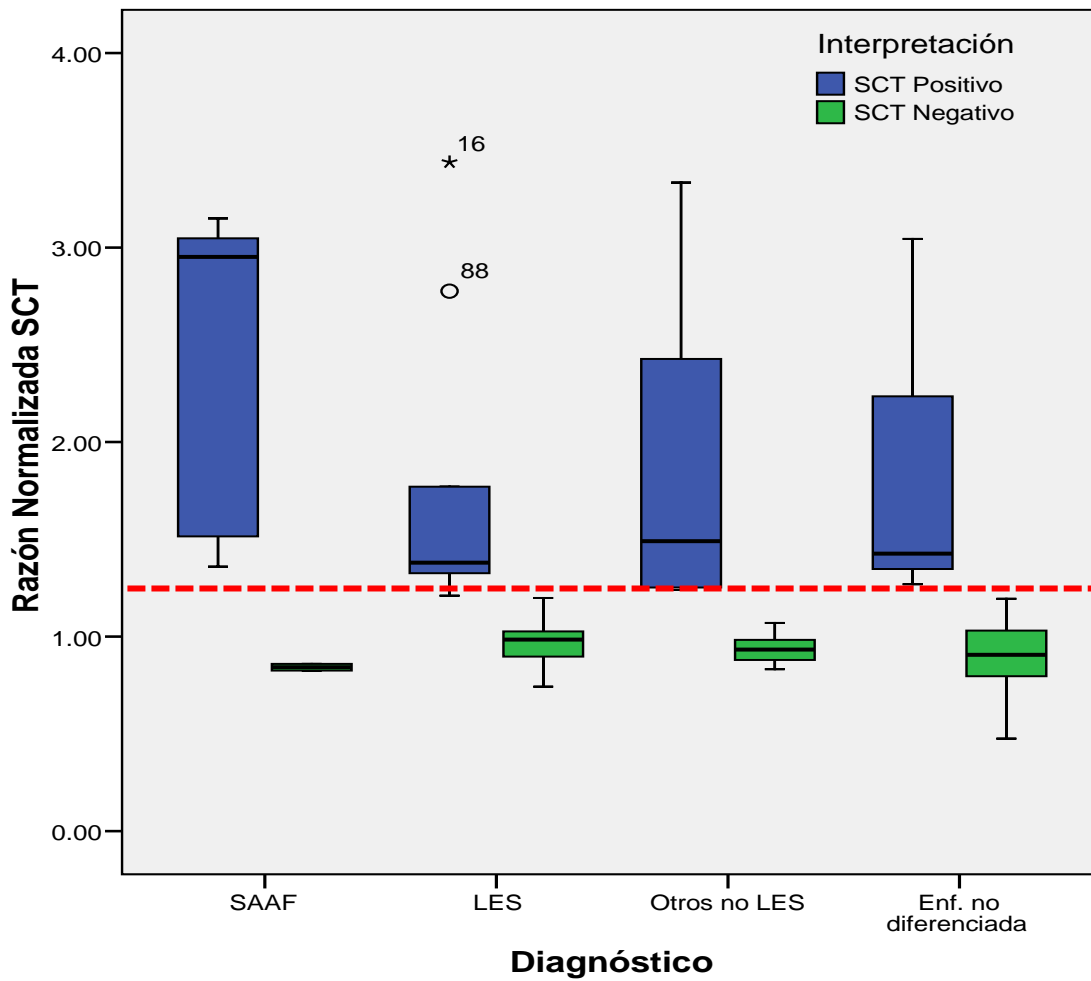


Figura 4. Razón Normalizada para SCT por grupo de estudio.



Al confrontar la interpretación final de los resultados obtenidos para cada prueba, se encontraron diferencias. En la **tabla 4**, se muestran los resultados positivos de acuerdo a la técnica original y la que se introdujo (SCT).

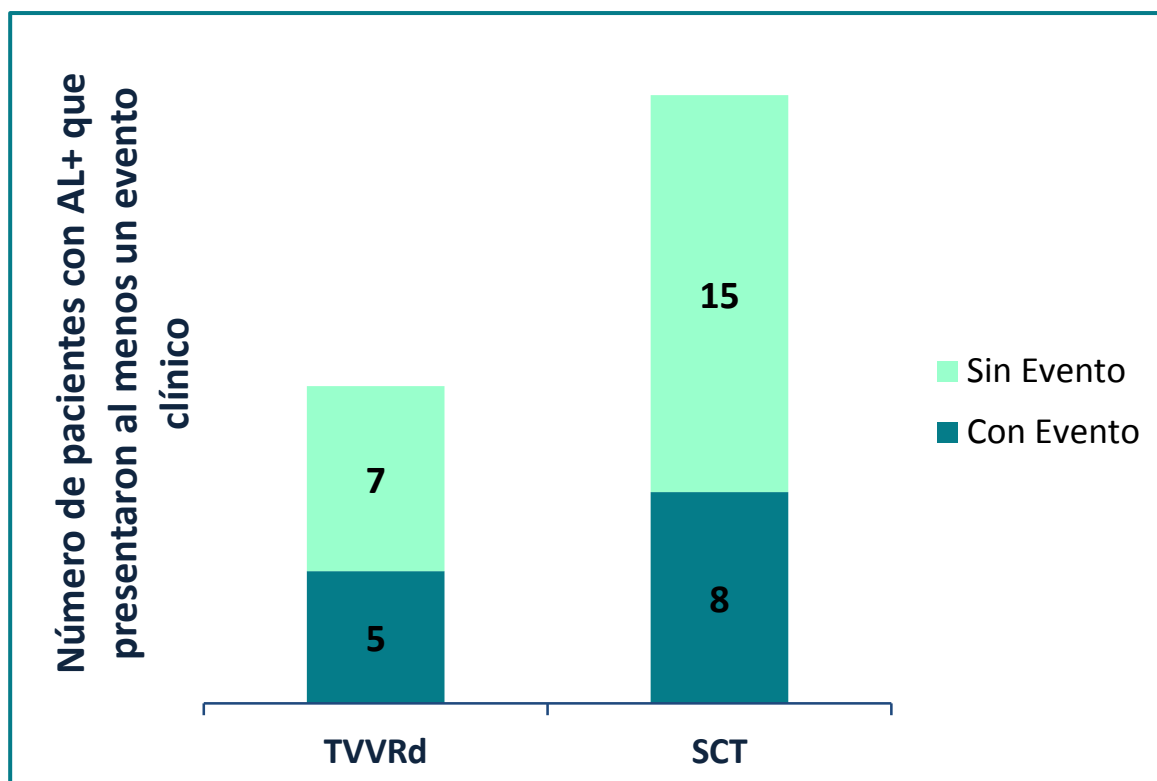
Tabla 4. Pacientes clasificados como AL+ por prueba y grupo de estudio.

| | SAAF | LES | No LES | Enf ND |
|----------------------------|-------------|--------------|--------------|--------------|
| Pacientes del grupo | n= 7 | n= 27 | n= 16 | n= 42 |
| TVVRd positivos | 3/7 | 4/27 | 2/16 | 3/42 |
| SCT positivos | 5/7 | 9/27 | 6/16 | 3/42 |

TVVRd: Tiempo de Veneno de Víbora de Russell diluido.; SCT: Tiempo de Coagulación con Sílica, RN: Razón Normalizada; SAAF: Síndrome de Anticuerpos Antifosfolípidos; LES: Lupus Eritematoso Sistémico; END: Enfermedad No Diferenciada.

En la **Figura 5** se muestra la distribución de los eventos clínicos asociados al SAAF en los pacientes que dieron resultado positivo para AL en ambas pruebas.

Figura 5. Eventos Clínicos relacionados con SAAF.



Desempeño de las pruebas TVVRd Y SCT

Se calcularon los valores de sensibilidad, especificidad, Valor Predictivo Negativo (VPN) y Valor Predictivo Positivo (VPP) para cada una de las pruebas con base en los resultados asignados como Verdadero Positivo (VP), Verdadero Negativo (VN), Falso Negativo (FN) y Falso Positivo (FP) los cuales fueron 8, 41, 15 y 28 para SCT respectivamente y para TVVRd 5, 49, 7 y 31 respectivamente.

Tabla 5. Se muestran los valores de especificidad, sensibilidad, valor predictivo negativo y valor predictivo positivo para cada prueba.

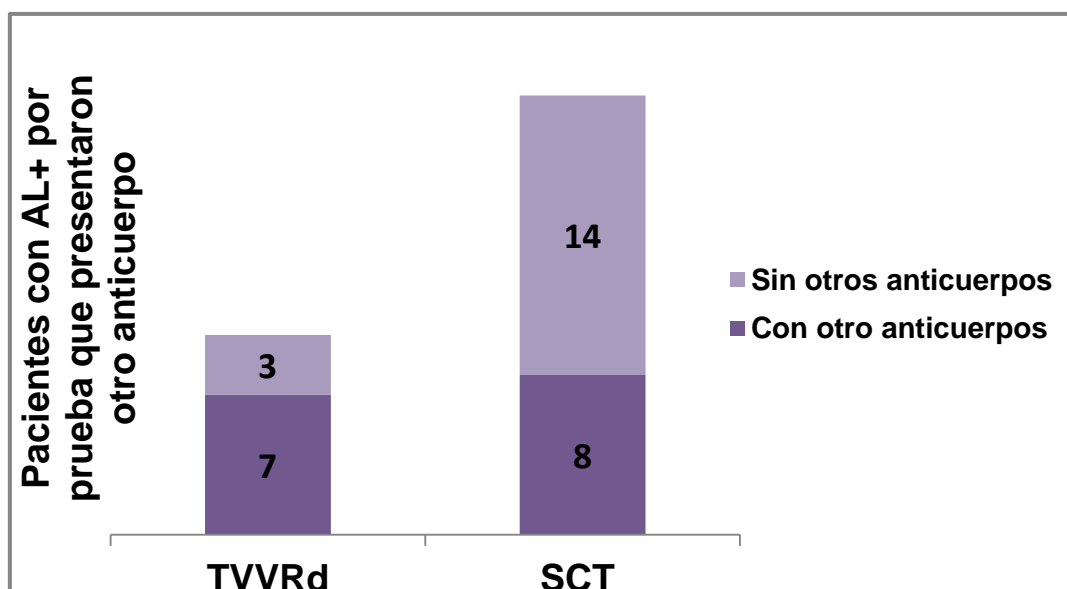
| | Especificidad (%) | Sensibilidad (%) | VPP (%) | VPN (%) |
|-------|-------------------|------------------|---------|---------|
| SCT | 73.2 | 22.2 | 34.8 | 59.4 |
| TVVRd | 81.5 | 13.8 | 41.6 | 61.2 |

TVVRd: Tiempo de Veneno de Víbora de Russell diluido.; SCT: Tiempo de Coagulación con Sílica; VPP: Valor Predictivo Positivo; VPN: Valor Predictivo Negativo.

Determinación de otros anticuerpos

De los 92 pacientes medidos, sólo a 86 se les determinó otro anticuerpo diferente a AL de acuerdo al expediente electrónico, en la **Figura 6** se muestran, por prueba, el número de pacientes con AL+ que además presentaron algún otro anticuerpo.

Figura 6. Pacientes con AL+ con y sin otros anticuerpos.



ANÁLISIS DE RESULTADOS

Técnica a introducir: Tiempo de Coagulación con Sílica

La evaluación de la precisión para las pruebas de SCT de escrutinio y confirmatoria (**tabla 2**) mostró que la prueba tiene una buena reproducibilidad en las mediciones intra-corrída o para controles comerciales y para el *pool*, ya que el C.V. obtenido en cada uno fue <5% lo que asegura la homogeneidad de los resultados, ya que de acuerdo con la literatura, valores de CV de hasta 10% indican una buena precisión pues la dispersión de los datos es baja. La determinación del punto de corte para la prueba global de SCT se obtuvo por el percentil 99 que se encontró al realizar las determinaciones del SCT de escrutinio y confirmatorio en las muestras de 40 sujetos sanos, donde $p_{99} = 1.21$, este valor es primordial al momento del informe e interpretación de los resultados, porque determina de manera objetiva qué valores se consideran positivos (>1.21) y qué valores se consideran negativos (≥ 1.21). De acuerdo a las guías internacionales, es indispensable que cada laboratorio establezca su propio punto de corte considerando su población normal y las variables que participan al desplazar una prueba desde su lugar de diseño hasta nuestros laboratorios. Dada la naturaleza del anticoagulante lúpico, algunos pacientes con SAAF podrían tener valores cercanos o incluso sobre el punto de corte, a esto se le conoce como anticoagulante lúpico débil, este comportamiento puede ocurrir con cualquier prueba diseñada para detectar anticoagulante lúpico, es una desventaja que aplica a todas las pruebas para la detección de AL ya que aún no se encuentra la verdadera prueba “estándar de oro”, sin embargo, el investigador Forastiero R. en su trabajo sobre puntos de corte para AAFL hizo mención sobre el llamado “punto de corte clínico” el cual se establece usando un grupo control en el que se incluyen pacientes con la enfermedad, en este caso SAAF, con el objetivo de establecer un punto de corte óptimo. Si consideramos esto, podríamos esclarecer la interpretación de aquellos resultados que llamamos AL débil lo

que también puede aplicarse en las pruebas inmunológicas para detección de aCL y a- β 2GP1 indicando los grados de positividad de las pruebas como moderado o fuerte.

Resultados en pacientes

En la población evaluada predominó la población femenina, debido a que las enfermedades de la colágena suelen ser más frecuentes en las mujeres; la edad fue ligeramente mayor en este grupo, aunque la población total, puede considerarse joven.

Con lo que respecta a los valores de los índices normalizados obtenidos en cada prueba (**tabla 3**) se observa que tanto para la prueba de TVVRd como para la de SCT los hombres mostraron un índice ligeramente más alto en comparación con el de las mujeres, lo que sugiere que los tiempos fueron más prolongados en el grupo de los hombres, esto se puede apreciar más en las pruebas de escrutinio de ambos ensayos ya que debido a la baja concentración de FL los tiempos se alargan. Es importante destacar que de acuerdo con lo reportado en la literatura, los niveles de Fibrinógeno y FVIII son más elevados en mujeres que en hombres, aunado a eso, la edad también provoca un aumento en su concentración. Tomando en cuenta lo anterior puede considerarse como una de las razones que acortan los tiempos de coagulación en las mujeres y por lo tanto los índices normalizados son menores en ellas.

Resultados de la prueba de SCT con respecto a la enfermedad

Con base en los diferentes diagnósticos, se clasificaron a los pacientes en cuatro grupos de estudio: PSAAF, PLES, CEA y PSDC, de esta manera, fue posible hacer una comparación en cuanto a los índices obtenidos para cada prueba con respecto al diagnóstico. En la **figura 3** se muestra la distribución de los resultados de acuerdo al punto de corte de la fase inicial de la **prueba de TVVRd** (prueba de escrutinio), la línea punteada

en rojo muestra el valor del punto de corte. Los datos en azul, fueron clasificados como AL+ al final del estudio (prueba de escrutinio + prueba en mezcla + prueba confirmatoria). Los resultados de los grupos de estudio representados en color verde corresponden a los clasificados como AL- al final del estudio (prueba de escrutinio + algunos prueba en mezcla + algunos prueba confirmatoria), se puede apreciar que hubo varios datos de los coloreados en verde que sobrepasaron el punto de corte, lo que puede deberse a diferentes condiciones que alargan el VVRd y no necesariamente la presencia de AAFL ya que al final, a pesar de que en algunos se tuvieron que realizar las tres pruebas, no fueron clasificados como AL+. De acuerdo con las guías internacionales, es necesario realizar ensayos de mezcla que nos permitan descartar deficiencias moderadas de ciertos factores que puedan ser los causantes de la prolongación en las pruebas de escrutinio, si el alargamiento original se compensa con la mezcla, no se continúa a la prueba confirmatoria; en algunos casos, es necesario realizar las tres pruebas y a pesar de ello no se cubre con los criterios de positividad, que sólo se cumplen cuando la prueba se acorta con el reactivo que contiene exceso de fosfolípidos y con ello demuestra la dependencia de los mismos. Los pacientes con SAAF y LES fueron los que mostraron un índice normalizado muy por arriba del punto de corte, los pacientes de los otros grupos que resultaron positivos, mostraron un comportamiento más homogéneo sin valores muy elevados.

Por su parte, en la **Figura 4** se muestra la distribución de los valores de la Razón Normalizada del **Tiempo de Coagulación con Sílica (SCT)** por grupos de enfermedad, en los pacientes con resultado AL+ (en azul) y con resultado AL- (en verde). En este caso, puede observarse que los valores de la Razón Normalizada, tienen una distribución menos homogénea y pueden alcanzar valores muy por arriba del punto de corte, mostrando un comportamiento semejante en la mayoría de los pacientes que presentaron AL+.

Desempeño de las pruebas.

Con base en los resultados obtenidos de sensibilidad y especificidad (**tabla 5**) se puede decir que de las dos pruebas, la que mostró una mejor *sensibilidad* fue la de SCT, esto quiere decir que su capacidad para detectar la enfermedad es mejor en comparación con el ensayo de TVVRd; en cuanto a la *especificidad*, se determinó que la prueba de TVVRd fue más específica lo que significa que logra descartar a los pacientes que no tienen la enfermedad. En febrero de 2018 **Ahuja** y colaboradores realizaron un estudio en el que determinaron la sensibilidad de diferentes ensayos para detección de AL, encontraron una sensibilidad del 90% para la prueba de TVVRd en una muestra de más de 500 pacientes, en su estudio mencionan que haciendo uso de pruebas combinadas: TVVRd + TTPa (sensible a AL+) la sensibilidad aumenta hasta 100%⁴⁰. En otro trabajo del 2018, Arikrishnan y colaboradores establecieron los puntos de corte para las pruebas de detección de AL en un Centro de Atención de la India con una n=100, ellos obtuvieron una sensibilidad baja para la prueba de TTPa (11.1%), TTPa sensible a AL (22.2%) y en el caso del TVVRd la sensibilidad aumentó hasta el 94%⁴¹; el tamaño de la muestra en nuestro trabajo es similar, por su parte, la prueba de SCT, que se basa en la activación de la vía intrínseca como una prueba de TTPa de rutina, la sensibilidad también fue baja. En contraste con la prueba de TVVRd, ya que ellos obtuvieron un valor muy alto, mientras que en nuestro caso, la sensibilidad fue aún más baja que en la prueba de SCT. Entre otras, las causas posibles podrían ser: el tamaño de la muestra y ciertas condiciones asociadas a estados agudos o de comorbilidades, que elevan proteínas que favorecen resultados falsos de AL+, como el factor reumatoide (FR), proteína C reactiva (PCR), entre otros; una ventaja de nuestro trabajo es que vigilamos la ausencia de anticoagulantes que pueden favorecer falsos positivos, sin embargo, no pudimos descartar que los pacientes no se encontraran en condiciones agudas. Sin embargo, la prueba de SCT mostró una mayor

sensibilidad que el TVVRd. Por otra parte, la prueba de SCT muestra una menor *especificidad* por lo que en algún caso podría favorecer el diagnóstico de falsos positivos con respecto al TVVRd, circunstancia que para algunos autores es preferible con respecto a un falso negativo, puesto que se buscaría la protección del paciente a través de la anticoagulación, si por otra parte se incurriera en falsos negativos, con mucha seguridad los pacientes tendrían eventos de repetición que pondrían en riesgo su vida.

Determinación de otros anticuerpos

De la población estudiada al 78.7% se le solicitó la determinación de los anticuerpos anti-fosfolípidos de fase sólida anti-IgG y anti-IgM, tanto del tipo aCL y anti-β2GP1. De acuerdo con la **Figura 6**, de los 22 AL+ que detectó la prueba de SCT, 8 fueron positivos para otros anticuerpos (47.6%); de los 10 que detectó el TVVRd, 7 tenían otro anticuerpo presente (57.1%), es importante destacar la importancia de la presencia de estos anticuerpos ya que de acuerdo con diversos autores como: Devreese K, Ortel T, Pengo, entre otros, estudios clínicos confirman que la doble o triple positividad en pacientes con SAAF indica un alto riesgo de recurrencia de trombosis y en portadores se incrementa el riesgo de desarrollar un primer evento trombótico sin olvidar que en SAAF también pueden presentarse diversos tipos de eventos clínicos que no necesariamente están relacionados con trombosis sino también de tipo ginecosbtréticos los cuales se encuentran más relacionados con la presencia de anti-β2GP1 (Tripodi, Pengo).

CONCLUSIONES

- ▶ La fase pre-analítica es primordial y determinante para asegurar la confiabilidad del resultado.
- ▶ El uso de una sola prueba para la detección de AL no es suficiente debido a la naturaleza heterogénea de los AAFL.
- ▶ Aunque la prueba de SCT muestra mejor sensibilidad con respecto a la de TVVRd, no es suficiente para captar la mayoría de los AL+.
- ▶ La prueba de SCT es capaz de detectar AL+ diferentes a los que detecta la prueba de TVVRd.
- ▶ La detección de AL no es una prueba de urgencia, por lo tanto no se debe solicitar si el paciente está pasando por algún evento agudo.
- ▶ La detección oportuna, no sólo de AL sino de cualquier otro AAFL, es indispensable para un diagnóstico correcto de SAAF.
- ▶ Es de gran importancia emitir un diagnóstico confiable de SAAF al paciente pues de éste va a depender su tratamiento.
- ▶ Existen condiciones propias de cada paciente que pueden provocar un AL transitorio por lo que siempre se debe corroborar la persistencia de éste a las 12 semanas de la primera determinación, excepto en la triple positividad en la misma muestra, bajo condiciones ideales.
- ▶ Es importante solicitar un perfil completo de AAFL cuando se sospecha de SAAF y no sólo AL y así poder clasificar a los pacientes de acuerdo a la positividad que presenten (Tipo I: Más de un criterio de laboratorio presente, cualquier combinación; Tipo IIa: Sólo AL presente; Tipo IIb: Sólo anti-CL presente; Tipo IIc: Sólo anti-β2GP1 presente).

- ▶ Cada laboratorio debe establecer sus propios puntos de corte tomando en cuenta la población, equipos y reactivos que maneje.
- ▶ Es necesario conocer la historia clínica del paciente así como el tratamiento que tengan ya que existen diversos medicamentos, no sólo los anticoagulantes, que provocan resultados falsos positivos.

REFERENCIAS

¹Favaloro and Richard. Antiphospholipid antibody testing for the antiphospholipid syndrome: a comprehensive practical review including a synopsis of challenges and recent guidelines. Print ISSN 0031-3025/Online ISSN 1465-3931. Royal College of Pathologists of Australasia. 2014.

²Santamaria Y. Mecanismos fisiopatológicos del síndrome antifosfolípido. MED. UIS. 2014; 27: 43-50.

³Zamora Y, et al. Deficiencia de proteínas C y S: marcadores de riesgo. Revista Cubana Hematología, Inmunología y Hemoterapia. 2013; 29 (1): 40-47.

⁴Chen PP, Giles I. Antibodies to serine proteases in the antiphospholipid syndrome. Current Rheumatology Reports. 2010 Feb; 12(1): pp45-52.

⁵Comarmond C, Cacoub P. Antiphospholipid syndrome: From pathogenesis to novel immunomodulatory therapies. Autoimmunity Reviews. 2013; 12: 752-757.

⁶Dan L, Longo. Diagnosis and Management of the Antiphospholipid Syndrome. The New England Journal of Medicine. May 24, 2018.

⁷ Núñez C, Cabiedes J. Mecanismos patogénicos de los anticuerpos antifosfolípidos. Reumatol Clín. 2011; 7: 72-76.

⁸Tripodi A, de Groot PG, Pengo

V. Antiphospholipid syndrome: laboratory detection, mechanisms of action and treatment. J. Intern Med. 2011 Aug; 270 (2): 110-22.

⁹ Abreu M, Danowski A, Wahl D, Amigo M, Tektonidou M, Pacheco M, et al. The relevance of "non-criteria" clinical manifestations of antiphospholipid syndrome: 14th International Congress on Antiphospholipid Antibodies Technical Task Force Report on Antiphospholipid Syndrome Clinical Features. Autoimmunity Reviews Elsevier. 2015; 14: 401-414.

¹⁰Gómez-Puerta J, Cervera R. Diagnosis and classification of the antiphospholipid syndrome. Journal of Autoimmunity Elsevier. 2014; 20-25.

¹¹Pierangeli S. Síndrome antifosfolípido: mecanismos patogénicos, diagnóstico y tratamiento. Medicina y Laboratorio, Volumen 14 No. 3-4. Universidad de Antioquia Edimeco. 2008. Pp. 112-113.

¹²Devreese K, Ortel T, Pengo V, De Laat B. Laboratory criteria for antiphospholipid syndrome: communication from the SSC of the ISTH. J Thromb Haemost. 2018; 16: 1-5.

¹³Forastiero R. Diagnóstico de laboratorio de anticuerpos antifosfolípidos/2016. Departamento de fisiología, Universidad Favaloro, Buenos Aires Argentina. Pp: 256-257.

¹⁴ Patricia A. et al. Determinación de anticuerpos anti-β2glicoproteína 1 en pacientes con síndrome antifosfolípido. IATREIA Vol 17/ No.4/ Diciembre 2004.

-
- ¹⁵Lakos G, et al. International Consensus Guidelines on Anticardiolipin and Anti-2 Glycoprotein I Testing. *ARTHRITIS & RHEUMATISM* Vol. 64, No. 1, January 2012, pp1-10.
- ¹⁶InmunoConcepts. Sistema de análisis de anticuerpos anticardiolipina de tipo IgG e IgM RELISA, p: 6
- ¹⁷Salazar L. Detección de anticoagulante Lúpico en pacientes con trastornos trombóticos. *RevCost Ciencias Médicas*. 1995; 1, 2: 15-21.
- ¹⁸Iglesias A, Restrepo J, Toro C, Rondón F, Caballero C, Yunez A, et al. La historia del síndrome antifosfolípido. *RevColombReumatol*. 2008; 15: 150-167.
- ¹⁹Dlott J, Roubey R. Drug-Induced Lupus Anticoagulants and AntiphospholipidAntibodies. *CurrRheumatol Rep*. 2012; 14: 71–78.
- ²⁰MooreG.Recent Guidelines and Recommendations for Laboratory Detection of Lupus Anticoagulants.*SeminThrombHemost*.2014; 40: 163-171.
- ²¹Forastiero R. Puntos de corte de ensayos para anticuerpos antifosfolípidos y valor clínico del inhibidor lúpico débil. *Hematología*.Vol 17 No. 2.Agosto 2013.Pp: 142-146
- ²²Favaloro EJ, Funk DM. Pre-analytical variables in coagulation testing associated with diagnostic errors in hemostasis.*Lab Med*; 2012, 43(2):1-10.
- ²³Retamales Castelletto. Recomendaciones para la etapa pre-analítica, analítica y post-analítica en las pruebas de coagulación.Dependiente Laboratorio Biomédico Nacional y de Referencia. Instituto de Salud Pública de Chile.2014
- ²⁴Denis-Magdelaine A, Flahault A, Verdy E. Sensitivity of sixteen APTT reagents for the presence of lupus anticoagulants. *Haemostasis* 1995; 25: 98-105.
- ²⁵Detarsio G, Soler C, Paredes J, Milani A, Ordi-Ros J. Anticoagulante Lúpico: Sensibilidad de 19 reactivos comerciales de tiempo de tromboplastina parcial activado. *ActaBioquímClínLatinoam* 2007; 41: 533-9.
- ²⁶H60-A Laboratory Testing for the Lupus Anticoagulant; Approved Guideline.Clinical and Laboratory Standards Institute.April 2014.
- ²⁷Derksen RH, Out HJ ET AL. Detection of the lupus anticoagulant in pregnancy. *ClinExp Rheumatol*.10 (3) 323-324. 1992.
- ²⁸Thiagarajan et al.The use of the Dilute Russell Viper Venom Time for the diagnosis of Lupus Anticoagulants.*Blood*, Vol 68, No 4, October 1986.
- ²⁹Pengo V, Bison E, Banzato A, Zoppellaro G, Jose SP, Denas G. Lupus Anticoagulant Testing: Diluted Russell Viper Venom Time (dRVVT). *Methods Mol Biol*. 2017; 1646:169176.
- ³⁰ Martinez Alan P et al. Antiphospholipid syndrome: analysis of dilute Russell’s viper venom time titer. *Blood Coagulation and Fibrinolysis* 2016.
- ³¹ Sociedad Colombiana de Patología Clínica. Anticoagulante lúpico-DRVVT: ensayo del veneno de víbora de Russell diluido. *Medicina y Laboratorio* Vol. 2, No 11-12, 2015.
- ³²Flieder T, Weiser M, Eller T, Dittrich M, von Bargen K, Alban S, et al. Interference of DOACs in different DRVVT assays for diagnosis of lupus anticoagulants.*Thrombosis Research*. 2018; 165 101–106.
- ³³Martinuzzo E, Barrera L, D’adamo M, Otaso J, Gimenez M, Oyhamburu J. Frequent False-positive results of lupus anticoagulant tests in plasmas of patients receiving the new oral anticoagulants and enoxaparin. *IntJnlLabHem*. 2013: 1-7.
- ³⁴Kordich L. Manual de Trombosis y Hemostasia 2da Edición, Grupo Cooperativo Latinoamericano de Hemostasia y Trombosis, Argentina 1990. Pp; 350-355.
- ³⁵Forastiero R. Autoanticuerpos anti-beta2glicoproteína I y anti-protrombina humana. Su rol en la fisiopatología del síndrome antifosfolípido. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.1997.

-
- ³⁶Triplett, D.A., et al. The Textarin/Ecarin ratio: a confirmatory test for lupus anticoagulants. *ThrombHaemost*, 70, 925-931.1993.
- ³⁷Guerrero B. Generalidades del sistema de la coagulación y pruebas para su estudio. *Invest Clín*. 2015; 56: 432-454.
- ³⁸Tripodi, et al. Silica clotting time (sct) as a screening and confirmatory test for detection of the lupus anticoagulants. *Thrombosis research*.1992; 67: 355-365.
- ³⁹Favaloro and Giuseppe Lippi. Lupus Anticoagulant Testing: Activated Partial Thromboplastin Time (APTT) and Silica Clotting Time (SCT). *Hemostasis and Thrombosis: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*. 2017; 16:46.
- ⁴⁰ Ankur Ahuja, Seema T, Hara P, Renu S, Venkatesan S, et al. Utility of Lupus Anticoagulant Assays (APTT-LA, KCT, DPT and DRVVT) IN Detection of Antiphospholipis Syndrome (ASP) in High Risk Pregnancy Cases. *Indian J Hematol Blood Transfuns*. 2018.
- ⁴¹ Arikrishnan R, Vir Singh, Rakhee K. Assessment of Normative and Deriving Cut-off Values for Lupues Anticoagulant Testing: An Experience from a Tertiary Care Center in Southern India. *Indian J Hematol Blood Transfuns*. 2019: 35(3): 485-488.