

**Número especial sobre Hemostasia y Trombosis****Diagnóstico de laboratorio de anticuerpos antifosfolípidos / 2016***Laboratory diagnosis of the antiphospholipid antibodies / 2016**Diagnóstico laboratorial de anticorpos antifosfolípidos / 2016*► Ricardo Forastiero<sup>1</sup>

---

<sup>1</sup> PhD. Departamento de Fisiología, Universidad Favaloro, Buenos Aires, Argentina.

**Resumen**

Los anticuerpos antifosfolípidos (aFL) en pacientes con historia de complicaciones clínicas tromboticas tanto en territorio venoso como arterial y/o con morbilidad obstétrica definen al síndrome antifosfolípido (SAF). Los aFL en el plasma de pacientes pueden ser detectados como actividad de inhibidor lúpico (IL) a través de la prolongación de pruebas de coagulación dependientes de fosfolípidos o a través de ensayos en fase sólida como los ELISAs para anticuerpos anticardiolipina (aCL) o anti- $\beta_2$  glicoproteína I ( $\alpha\beta_2$ GPI). Para el diagnóstico de SAF se requiere que los aFL sean demostrados en al menos 2 oportunidades con un período no menor a 12 semanas entre ambas evaluaciones de laboratorio. Los aCL y/o  $\alpha\beta_2$ GPI de isotipo IgG y/o IgM deben estar presentes en títulos moderados o altos. En los últimos años se han publicado varias recomendaciones para la evaluación del IL y también de los aFL por métodos inmunológicos. En este artículo se mencionan las guías internacionales que existen al respecto para un diagnóstico correcto de los aFL en el laboratorio.

**Palabras claves:** anticuerpos antifosfolípidos \* síndrome antifosfolípido \* trombosis

**Summary**

*Antiphospholipid antibodies (aPL) in patients with a history of thrombotic clinical complications in both venous and arterial territory and/or obstetric morbidity define the antiphospholipid syndrome (APS). aPL in patients' plasma can be detected as lupus anticoagulant (LA) activity through the prolongation of phospholipid-dependent clotting tests or through solid-phase assays such as ELISAs for anti-cardiolipin antibodies (aCL) or anti- $\beta_2$  glycoprotein I ( $\alpha\beta_2$ GPI). Diagnosis of APS requires that aPL are demonstrated in at least 2 opportunities with no less than 12 weeks between two laboratory evaluations. aCL and  $\alpha\beta_2$ GPI of IgG and/or IgM isotypes must be present at moderate or high titers. In recent years, there have been several recommendations for the evaluation of LA*

**Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana**

Incorporada al Chemical Abstract Service.

Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957

ISSN 1851-6114 en línea

ISSN 1852-396X (CD-ROM)

and also aPL by immunological methods. This article describes the international guidelines available for a correct diagnosis of aPL in the laboratory.

**Keywords:** antiphospholipid antibodies \* antiphospholipid syndrome \* thrombosis

## Resumo

Anticorpos antifosfolípidos (aPL) em pacientes com história de complicações clínicas trombóticas em ambos os territórios venoso e arterial e/ou com morbidade obstétrica, definem a síndrome antifosfolípide (APS). Os aPL no plasma de pacientes pode ser detectado como atividade de inibidor lúpico (IL) por meio do prolongamento de testes de coagulação dependentes de fosfolípidos, ou por meio de ensaios em fase sólida, tais como ensaios ELISA para anticorpos anticardiolipina (aCL) ou anti- $\beta_2$  glicoproteína I ( $\alpha\beta_2$ GPI). Para o diagnóstico de APS requer que os aPL sejam demonstrados em pelo menos 2 oportunidades com um período de não menos de 12 semanas entre ambas as avaliações laboratoriais. aCL e/ou  $\alpha\beta_2$ GPI de isotipo IgG e/ou IgM têm de estar presentes em títulos moderados ou elevados. Nos últimos anos foram publicadas várias recomendações para a avaliação do IL e também dos aPL por métodos imunológicos. Este artigo menciona os guias internacionais que existem a esse respeito para um diagnóstico certo dos aPL no laboratório.

**Palavras chaves:** anticorpos antifosfolípidos \* síndrome antifosfolípide \* trombose

## Breve historia de los anticuerpos antifosfolípidos

Los primeros anticuerpos antifosfolípidos (aFL) o reaginas fueron detectados en 1906 a través de los ensayos usados para la evaluación de pacientes con sífilis. En el año 1941 se demostró que en el ensayo de VDRL para sífilis, el antígeno contenía principalmente cardiolipina como uno de sus componentes. Ya en esos primeros años, a través de la evaluación con ese ensayo se reconoció que muchos pacientes no padecían clínicamente de sífilis, pero tenían resultados positivos en el ensayo de laboratorio. A esas reacciones se las conocía como "falsos positivos biológicos para sífilis". En 1952 se publicó el hallazgo de un inhibidor que prolongaba los ensayos dependientes de fosfolípidos. Como esos pacientes tenían lupus eritematoso sistémico (LES) como enfermedad de base, se comenzó a denominar a esos inhibidores circulantes como inhibidor o anticoagulante lúpico (IL). El IL era detectado a través de la prolongación del APTT. A partir de ese momento se incrementó el número de pacientes reportados con IL y simultáneamente de reacciones falsas positivas para sífilis (1). La primera asociación clínica del IL fue reportada en 1954 en pacientes con complicaciones obstétricas. Un poco más tarde, en 1963, se publicó la asociación clínica entre IL y trombosis. También es importante recordar que se reportaron algunos pacientes con IL que tenían tendencia hemorrágica (2).

Teniendo en cuenta la asociación entre VDRL e IL se pensó que los aFL podrían ser anticuerpos con especificidad contra la cardiolipina. A comienzos de la década del 80 se diseñó un RIA con la intención de eva-

luar la presencia de anticuerpos anticardiolipina (aCL). El ensayo de RIA fue rápidamente (1983) reemplazado inmovilizando cardiolipina en placas de ensayos de ELISA. Con la incorporación del ensayo de aCL, los pacientes comenzaron a ser evaluados para detectar aCL e IL. Desde ese momento se vio que muchos pacientes tenían ambos resultados positivos en forma simultánea, pero también había un grupo importante de pacientes que solo presentaban actividad de IL o de aCL. A partir de ese momento, los pacientes con esos aFL y que presentaban historia de complicaciones clínicas trombóticas u obstétricas, fueron denominados como pacientes con síndrome antifosfolípido (SAF) (3)(4). El SAF es una enfermedad autoinmune que se define por la presencia de aFL en el plasma de pacientes con complicaciones trombóticas tanto en territorio venoso como arterial y/o con morbilidad obstétrica (abortos a repetición, muerte fetal, retardo del crecimiento intrauterino, eclampsia, etc).

Un hecho fundamental en la historia de los aFL fue presentado en el año 1990 cuando se mostró evidencia que los aFL en realidad se unen a los fosfolípidos aniónicos en forma indirecta uniéndose primeramente a proteínas con alta afinidad por los fosfolípidos. Esa proteína se conoce como  $\beta_2$  glicoproteína I ( $\beta_2$ GPI) y fue reconocida como el principal antígeno de los aFL presentes en pacientes con enfermedades autoinmunes. Al año siguiente se demostró que la protrombina humana era el segundo antígeno en importancia hacia el cual estaban dirigidos algunos aFL. Rápidamente se diseñaron ensayos inmunológicos para detectar anticuerpos anti- $\beta_2$ GPI ( $\alpha\beta_2$ GPI) y anticuerpos anti-protrombina (aPT).

En 1999 se presentaron oficialmente los criterios clínicos y de laboratorio para diagnosticar el SAF. Son co-

nocidos como los criterios de SAF de Sapporo (ciudad de Japón donde se realizó la reunión de consenso entre expertos en el tema) (5).

Los aFL presentes en pacientes con SAF están dirigidos principalmente contra 2 proteínas plasmáticas:  $\beta_2$ GPI y protrombina. Por el contrario, los aFL que se encuentran en individuos con infecciones están dirigidos particularmente contra estructuras fosfolipídicas. La excepción más categórica es en lepra lepromatosa en donde los aFL están dirigidos en su mayoría contra  $\beta_2$ GPI. El aumento en la predisposición a la trombosis en pacientes con SAF se debe al fenotipo procoagulante inducido. Entre los mecanismos que contribuyen a ese fenotipo están la activación plaquetaria, endotelial y monocítica por acción de los aFL y las alteraciones en los sistemas antitrombóticos y fibrinolíticos. La inflamación juega un rol importante en las trombosis y es central en la injuria placentaria responsable de las complicaciones obstétricas.

Más recientemente, el consenso de expertos ha actualizado los criterios clínicos y de laboratorio para diagnosticar este síndrome (Tabla I). Los aFL en el

plasma de pacientes pueden ser detectados como actividad de IL a través de la prolongación de pruebas de coagulación dependientes de fosfolípidos o a través de ensayos en fase sólida como los ELISAs para aCL o  $a\beta_2$ GPI (incorporados a los criterios en 2006). Para el diagnóstico de SAF se requiere que los aFL sean demostrados en al menos 2 oportunidades con un período no menor a 12 semanas entre ambas evaluaciones de laboratorio. Los aCL y/o  $a\beta_2$ GPI de isotipo IgG y/o IgM deben estar presentes en títulos moderados o altos (6).

### Rol clínico del perfil de aFL

Con la evaluación de los 3 aFL incorporados a los criterios diagnósticos del SAF desde 2006 y al estudio por parte de diferentes grupos de investigadores de, además otros anticuerpos de la familia de aFL (no incluidos en los criterios de SAF), se ha observado que no todos los aFL tienen el mismo rol en el riesgo clínico (Tabla II). El IL es uno de los aFL con mayor asociación con el riesgo

Tabla I. Criterios de laboratorio del SAF (2006).

1. aCL (IgG y/o IgM)	Título moderado o alto (>40 GPL o MPL, o >99 percentilo), en al menos 2 oportunidades separadas más de 12 semanas, por ELISA estandarizado para medir aCL dependientes de $\beta_2$ GPI
2. Anticoagulante lúpico	En al menos 2 oportunidades separadas más de 12 semanas (guías ISTH)
3. $a\beta_2$ GPI (IgG y/o IgM)	(>99 percentilo) en al menos 2 oportunidades separadas más de 12 semanas, por ELISA estandarizado
Categorizar los pacientes de acuerdo al tipo de aFL presente:	
I	Cualquier combinación de aFL
IIa	Sólo IL
IIb	Sólo aCL
IIc	Sólo $a\beta_2$ GPI

Tabla II. Familia de anticuerpos antifosfolípidos y su prevalencia estimada en el síndrome antifosfolípido (SAF).

Anticuerpo	Incluido en los criterios del SAF	Prevalencia (%)
Inhibidor lúpico	Sí	~55
Anticardiolipina IgG/IgM	Sí	~80
Anti- $\beta_2$ glicoproteína I IgG/IgM	Sí	~40
Anticardiolipina IgA	No	10-40
Anti- $\beta_2$ glicoproteína I IgA	No	10-40
Anti-protrombina	No	~30
Anti-fosfatidilserina/protrombina	No	~50
Anti-fosfatidiletanolamina	No	~50
Anti-fosfatidilserina	No	~60
Anti-ácido fosfatídico	No	~70
Anti-fosfatidilinositol	No	~70
Anti-dominio I $\beta_2$ glicoproteína I	No	~40

trombótico. Dentro de los aFL detectados inmunológicamente, la presencia de  $\alpha\beta_2$ GPI parece ser un mejor marcador que la de aCL (7). En particular, cuando los aFL son del isotipo IgG. El riesgo tromboembólico asociado a aCL y  $\alpha\beta_2$ GPI se incrementa en forma paralela con el título de anticuerpos y cuando los pacientes tienen combinación de aFL. Distintos trabajos publicados en los últimos años han remarcado, a través de estudios prospectivos, que el perfil de positividad de los aFL es importante para definir el riesgo clínico de los pacientes. El concepto actual es que la triple positividad (IL +  $\alpha\beta_2$ GPI + aCL) confiere un mayor riesgo al desarrollo del primer evento de trombosis o a la recurrencia tromboembólica (8-11). El perfil de aFL inicial es también importante en definir el comportamiento a futuro de positividad en los pacientes. El 98% de los pacientes con triple positividad confirman su patrón de resultados a los 12 meses, mientras que aquellos con doble positividad lo hacen en el 84% de los casos y aquellos con simple positividad solamente en el 40% de los casos (12). El riesgo de eventos clínicos aumenta progresivamente con el número de ensayos positivos de aFL y la positividad múltiple en aFL parece ser el único perfil que identifica pacientes de alto riesgo de trombosis. En base a estos hallazgos se ha propuesto recategorizar a los pacientes con aFL tanto con enfermedad trombotica como en mujeres con complicaciones obstétricas (13-15).

Es probable que la triple positividad sea debido a los  $\alpha\beta_2$ GPI dirigidos contra el dominio I de la  $\beta_2$ GPI. La detección de los  $\alpha\beta_2$ GPI-D1 parece ser un nuevo y excelente biomarcador de riesgo y evaluación de SAF (16)(17). La familia de aFL, como se mencionó antes, incluye además otros anticuerpos tales como aPT y anti-complejo PT-fosfatidilserina (aPT/PS) (1)(18). La triple positividad para IL, IgG  $\alpha\beta_2$ GPI, e IgGaPT demostró el mayor riesgo anual de trombosis en un estudio prospectivo llevado a cabo en este hospital (10) y los aPT-IgG en pacientes con LES demostraron ser un predictor muy útil de trombosis (19). Recientemente se evaluó el potencial clínico de la combinación de 6 tipos de aFL y se halló que el perfil que identifica pacientes con el riesgo más alto de SAF es aquel que combina AL +  $\alpha\beta_2$ GPI + aPS/PT en pacientes con LES (20). Considerando el conocimiento actual y los diferentes perfiles de aFL se propone incluir en la definición del SAF la categorización del riesgo clínico (Tabla III).

Tabla III. Nueva propuesta de categorización del SAF.

SAF	Al menos triple positividad de aFL (riesgo clínico alto)
Probable SAF	Doble positividad de aFL (riesgo clínico moderado)
Posible o no-SAF	Simple positividad (riesgo clínico bajo)

## Laboratorio para el estudio del anticoagulante lúpico

El IL se diagnostica en el laboratorio a través de diversas pruebas de coagulación. Las mismas han evolucionado en el tiempo y se han añadido pruebas con mayor sensibilidad para su detección. Los criterios diagnósticos han sido principalmente propuestos por la subcomisión (*Lupus Anticoagulant / Phospholipid-dependent Antibodies of the Scientific and Standardization Committee*) de la Sociedad Internacional de Hemostasia y Trombosis (ISTH), en base a la experiencia acumulada y a los resultados de distintas reuniones de trabajo, así como a programas de intercambio de muestras a los distintos centros mundiales expertos en el tema (21). Los criterios de 1995 confirmados en el 2005 requieren el cumplimiento de cuatro etapas secuenciales:

1. prolongación de los ensayos de coagulación dependientes de fosfolípidos (pruebas de detección),
2. demostración de la presencia de un inhibidor a través de mezclas con plasma normal,
3. evidencia de la dependencia de fosfolípidos que tiene el inhibidor (pruebas confirmatorias),
4. descartar o discernir la presencia de otras coagulopatías que puedan provocar confusión en el diagnóstico.

El diagnóstico de IL requiere la prolongación de al menos una prueba de detección, efecto inhibitorio en los ensayos de mezcla y al menos una prueba de confirmación positiva.

En el año 2009 se publicó una guía actualizada para la realización del IL que no reemplaza las anteriores sino más bien tiene el objetivo de reforzar algunos conceptos de la práctica diaria (22). Se enfatizan varios aspectos como la selección de pacientes para minimizar los pedidos inapropiados de IL, los métodos de procesamiento de las muestras de sangre, la elección de ensayos de detección se limita al tiempo de veneno de víbora de Russell diluido (dRVVT) y tiempo de trombo-plastina parcial activado (APTT) sensible al IL, el cálculo de los puntos de corte recomendados para cada etapa del diagnóstico de laboratorio y la interpretación de los resultados en situaciones generales y particulares.

### PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA A ESTUDIAR

Un punto importante es que el paciente debe estar libre de medicación al momento de la toma de muestra. Particularmente en lo que se refiere a la ingesta de anticoagulantes directos del tipo de antitrombóticos o anti-factor Xa o la administración de heparinas. En el caso de estar bajo esos tratamientos se debe recomendar al médico tratante la suspensión por al menos de 72 horas previas o antes de la próxima inyección en el caso de heparina.

La sangre debe ser extraída con jeringa seca (sin heparina) por punción venosa con estasis venoso mínimo, o en caso de no poseer acceso venoso por punción arterial directa no traumática. Se debe recolectar en tubos plásticos que contengan citrato de sodio 0,11M en proporción de 1 parte de anticoagulante por cada 9 de sangre. Para la obtención del plasma pobre en plaquetas, la sangre se debe centrifugar durante 10 min a 2000-2500g (4000-5500 rpm). El plasma obtenido se trasvasa a otro tubo plástico y se recentrifuga durante 15 min a la misma velocidad. Trasvasar el plasma obtenido en esta etapa (recuento plaquetario  $<10 \times 10^9/L$ ) a otro tubo y guardarlo a temperatura ambiente hasta ser procesado ( $<2$  horas). No se recomienda guardarlo en heladera (excepto cuando la temperatura del laboratorio sea  $>30$  °C), para evitar posibles activaciones que pueden ocurrir en frío y la precipitación de crioglobulinas o criofibrinógeno. En caso de no procesar la muestra en el momento, y asegurándose de que el recuento plaquetario del plasma sea inferior a  $5 \times 10^9/L$ , la muestra puede ser conservada a  $-80$  °C. La recomendación es utilizar los plasmas frescos para el diagnóstico de IL.

La preparación del *pool* de plasmas normales es muy importante para evitar falsos negativos. Debe hacerse de la misma forma que el plasma de los pacientes, utilizando por lo menos 20 sujetos sanos con estudios básicos de coagulación normales. Es importante considerar que para calcular los valores de referencia de las distintas pruebas se deben procesar por lo menos 20-30 plasmas de sujetos normales sin historia de manifestaciones hemorrágicas ni trombóticas. El rango normal de las pruebas debe establecerse en cada laboratorio pues los resultados son dependientes del reactivo conjuntamente con el instrumento de detección. Es importante aclarar que a todo paciente al que se le esté investigando la presencia de un IL se le debe realizar un coagulograma básico para la mejor interpretación de los resultados. Este debe incluir la determinación del tiempo de trombina para excluir la presencia de heparina.

#### PRUEBAS DE DETECCIÓN

Los ensayos recomendados son el dRVVT y el APTT. Con respecto a los reactivos a utilizar es importante seleccionar aquellos que poseen una alta sensibilidad para la detección de IL.

Para el dRVVT existe una gran variabilidad de preparaciones. La prueba es sensible a la deficiencia de factores II, V y X, así como a la hipofibrinogenemia marcada. También se ve influenciada por heparina, sea no fraccionada o de bajo peso molecular (debido a su actividad anti-Xa), cuando se utiliza el método desarrollado o equipo comercial que no contiene inhibidor de heparina. Presenta además resultados alterados en el caso de inhibidores anti-factor V y en algunos inhibidores anti-factor VIII.

En el caso del APTT, la variabilidad es aún mayor y se ha demostrado que los reactivos que poseen mayor sensibilidad son los que utilizan cerebro animal como fuente de fosfolípidos y sílica o ácido elálgico como activador, mientras que la sensibilidad es menor para los que utilizan fosfolípidos de soja y kaolín/celite como activador (23). Es importante seleccionar reactivos que presenten un mayor grado de prolongación (mayor razón de tiempos del paciente con respecto al del *pool* normal) y detecten la mayor cantidad de IL (sensibilidad).

Una prueba extra que se puede añadir al panel es el tiempo de protrombina (TP) diluido (dPT) basada en la comparación del TP a dos concentraciones diferentes del reactivo de tromboplastina (estándar y diluida 1:500). La prueba es importante realizarla solo si se utiliza tromboplastina recombinante diluida. En ese caso se logra disponer de una prueba extra de detección (dPT) con gran sensibilidad al IL. El resultado se debe calcular:  $(TP \text{ seg paciente} / TP \text{ seg } pool \text{ normal})$  con tromboplastina diluida dividido por  $(TP \text{ seg paciente} / TP \text{ seg } pool \text{ normal})$  con tromboplastina sin diluir. Una razón  $<1,30$  es considerada normal y  $\geq 1,30$  es considerada alterada. La utilización del índice independiza a la prueba de las variaciones que puedan existir entre el TP del paciente y del normal, además de las que se puedan registrar dependiendo del lote de reactivo. En caso de que el paciente no tenga un TP normal se debe realizar la prueba con la mezcla de plasma de paciente y normal (1:1) y el normal, y calcular el índice con estos dos plasmas. La presencia de heparina la altera ya que el inhibidor de heparina que posee el reactivo comercial también se diluye. Los inhibidores anti-factor V pueden prolongar al dPT.

Una prueba más reciente es la denominada tiempo de coagulación con sílica (SCT) que puede realizarse en coagulómetro y es un ensayo muy sensible para IL.

En todos los casos los puntos de corte de cada ensayo de detección deben calcularse en una serie de plasmas normales y determinar el percentilo 99 de distribución. Se considera alterado el resultado cuando se obtienen valores más prolongados que el percentilo 99 normal.

#### ENSAYOS DE MEZCLA

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 percentilo 99 de la distribución normal o al que se determine a través del índice de actividad anticoagulante (ICA), también conocido como Índice de Rosner. El cálculo del mismo es como se indica:

$$\text{ICA} = [(\text{Tiempo en seg de la mezcla} - \text{Tiempo en seg del normal}) / \text{Tiempo en seg del paciente}] \times 100$$

El ICA es conceptualmente más adecuado ya que el valor obtenido con el plasma del paciente a evaluar interviene en el cálculo y, por lo tanto, en la interpretación del resultado de la mezcla.

Los resultados son sugestivos de la presencia de un inhibidor cuando los tiempos de coagulación son mayores que el punto de corte del ICA que fueron determinados en cada laboratorio con plasmas normales. Como una guía, estos valores son aproximadamente 12-15%.

#### PRUEBAS DE CONFIRMACIÓN

Estas pruebas son las que confirman la naturaleza dependiente de fosfolípidos del efecto inhibitorio, y necesitan ser altamente específicas ya que son las que diagnosticarán la presencia de IL. Se basan fundamentalmente en la corrección de los tiempos de coagulación de las pruebas utilizadas en la detección mediante la utilización de altas concentraciones de fosfolípidos, o aquellos con estructura de fase hexagonal. La utilización 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.

Existen en el mercado algunos ensayos comerciales que se basan en dRVVT con fosfolípidos concentrados o en el ensayo de SCT con alta concentración de fosfolípidos. El concepto es el reemplazo de los fosfolípidos diluidos por una suspensión más concentrada de fosfolípidos del mismo origen.

En el caso de confirmación cuando el APTT es la prueba de detección prolongada se puede usar:

1. el ensayo que utiliza fosfatidiletanolamina en fase hexagonal IL,
2. la comparación con el resultado obtenido usando un reactivo de APTT que sea insensible al IL,
3. PNP con las limitaciones que se mencionaron anteriormente.

Una manera de expresar los resultados para las distintas pruebas es a través de la razón entre los tiempos hallados en el ensayo de detección y el ensayo confirmatorio. La recomendación es calcular el Índice de confirmación (IC) para cada ensayo de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{IC} = [(\text{Tiempo en ensayo de detección} - \text{Tiempo en ensayo de confirmación}) / \text{Tiempo en ensayo de detección}] \times 100$$

Se considera la presencia de IL cuando el resultado del IC en % es mayor que el obtenido y definido como

punto de corte. Este último se calcula como en los casos anteriores como el percentilo 99 de la distribución normal realizando ambas pruebas en una serie de plasmas normales (24).

#### EXPRESIÓN DE RESULTADOS

La sugerencia en común para todas las pruebas de detección, mezclas y confirmatorias es expresar los resultados como la razón de tiempos del paciente respecto al resultado obtenido en el *pool* normal.

Deben informarse todos los resultados cuantitativos, tiempos e índices, pero además una interpretación final si los resultados son o no compatibles con la presencia de IL. Esto es importante especialmente para médicos no hematólogos que no están familiarizados con los informes de estudios de coagulación de este tipo. Se recomienda no informar resultados dudosos para evitar interpretaciones erradas, en estos casos se sugiere una repetición del estudio en el tiempo.

Se debe considerar la presencia de un IL débil cuando se obtiene prolongación de solo una de las 2 ó 3 pruebas de detección usadas (APTT, dRVVT o dPT) o las prolongaciones de las pruebas no son muy pronunciadas, aunque alcance para definir la presencia del IL. Hay que considerar que la expresión en las pruebas de coagulación de los aFL está directamente relacionada a la concentración de los anticuerpos (aCL y/o aβ<sub>2</sub>GPI) en sangre. La mayoría de los casos de pacientes con IL débil dan resultados negativos en los ensayos de aCL y aβ<sub>2</sub>GPI. En la experiencia de los autores y también en lo recientemente publicado, los IL sin aCL y aβ<sub>2</sub>GPI tienden a ser transitorios y se negativizan a los 6-12 meses. El significado clínico de los IL débiles es por lo tanto de escasa relevancia y con bajo potencial como factor de riesgo (25).

#### Laboratorio para el estudio inmunológico de aCL y aβ<sub>2</sub>GPI

Los ensayos para detectar aCL y aβ<sub>2</sub>GPI mostraban en general una estandarización no muy adecuada hasta hace pocos años atrás. Había y aún persisten diversos problemas analíticos y post-analíticos (26-28). Las unidades de expresión recomendadas son GPL y MPL para aCL de isotipo IgG e IgM. Para aβ<sub>2</sub>GPI las unidades de consenso son UI/ml y han sido validados por el *Institutefor Reference Materials and Measurement*. Los calibradores son poli o monoclonales (29). La mayoría de los métodos usados en los laboratorios son ELISAs pero nuevas tecnologías están actualmente disponibles con la ventaja de la automatización. En el último *workshop* de aFL todos los ensayos (clásicos y nuevos) evaluados tuvieron excelente sensibilidad y especificidad clínica (30).

En ese congreso de aFL que se llevó a cabo en Galveston, EE.UU. en 2010 hubo varios ensayos que se probaron en un *workshop* de laboratorio. Entre ellos dos ensayos totalmente automatizados (*Fluoroenzymeimmunoassay* *Chemiluminescentimmunoassay*) para la detección individual de aCL y a $\beta_2$ GPI (IgG e IgM). Además, un ensayo que utiliza microesferas recubiertas con diferentes antígenos que permite la detección simultánea de aCL y a $\beta_2$ GPI (IgG, IgM e IgA). Este último es totalmente automatizado (Multiplex immunoassays BioPlex 2200) y brinda los resultados en 30 minutos.

Todos los ensayos evaluados tuvieron excelente sensibilidad y especificidad clínica y muy buena reproducibilidad y excelente comparación de resultados con los ensayos de referencia (ELISA) para aFL.

En lo que respecta al isotipo de inmunoglobulina, la recomendación es la evaluación de IgG e IgM (31-33). El isotipo IgA solo debería usarse cuando el paciente tiene muy alta sospecha clínica de SAF o en individuos de raza negra en los cuales el isotipo IgA puede ser más frecuente que el IgG e IgM.

El tema de los puntos de corte de los ensayos inmunológicos sigue siendo controvertido (Tabla IV). La última recomendación sugiere calcular el percentilo 99 de la distribución de resultados en población normal. Valores por encima de ese punto de corte se interpretarían como positivos. Sin embargo, para el ensayo de aCL la mejor recomendación es usar el punto de corte de 40 unidades GPL o MPL para definir el SAF. Esto está basado principalmente en el estudio italiano de diseño prospectivo de 1996 que demostró por primera vez que el riesgo tromboembólico solo se asociaba a valores de aCL mayores a 40 unidades (34). Valores entre el punto de corte negativo (<percentilo 99) y 40 unidades se deben informar como indeterminados (significación clínica incierta). Esto es similar a lo que anteriormente se denominaba "título positivo bajo". Además, debería determinarse el punto de corte clínico o sea aquel que tiene implicancia en el diagnóstico del SAF (Tabla IV). Este se establece usando un grupo control que incluya pacientes con enfermedades relacionadas (en este caso al SAF o sea trombosis o complicaciones obstétricas).

Con el grupo completo de pacientes con SAF y aquellos sin SAF (no-SAF) se calculan luego la sensibilidad, especificidad y OR con el objetivo de identificar los óptimos puntos de corte (clínico) (25).

Algo importante que se sugiere incluir en los informes son ciertas recomendaciones o interpretaciones (33). Por ejemplo, indicar que el riesgo clínico se asocia en particular con un ensayo determinado o con un isotipo de inmunoglobulina (IgG indica más riesgo que IgM). También que el riesgo clínico se incrementa con la combinación de ensayos de aFL positivos. Finalmente se sugiere incluir una leyenda que recomiende la repetición del ensayo en un tiempo determinado y la realización de otros ensayos (IL o a $\beta_2$ GPI si el informe es de aCL).

#### CONCEPTOS ACTUALES

Con posterioridad al 2006 cuando se presentaron los últimos criterios para el diagnóstico del SAF, hubo una serie de nuevos conocimientos en esta área:

1. No todos los a $\beta_2$ GPI son patogénicos (relevancia de anticuerpos anti-dominio I).
2. El título de a $\beta_2$ GPI se relaciona a la capacidad de producir actividad de IL.
3. El concepto de que el perfil de aFL es útil en definir el riesgo de eventos clínicos relacionados al SAF.
4. Varios estudios clínicos prospectivos remarcan la relevancia clínica de los anticuerpos aPT y/o aPS/PT.

La  $\beta_2$ GPI pertenece a la superfamilia de proteínas que controlan el complemento y posee 5 dominios Sushi ubicándose el epitope que reconocen los a $\beta_2$ GPI presentes en los pacientes con SAF fundamentalmente en el dominio I de la molécula, mientras que los de pacientes con aFL pero sin complicaciones clínicas tromboembólicas reconocen epitopes ubicados en los restantes 4 dominios (II, III, IV y V). En los individuos que cursan infecciones crónicas (tipo lepra) o bajo tratamiento con ciertas drogas se detecta también a $\beta_2$ GPI y en general reconocen el dominio V de la proteína.

Tabla IV. Puntos de corte y grados de positividad.

<i>Punto de corte normal</i>	Percentilo 99 (método no paramétrico)	Utilizar sueros de individuos sanos sin historia de trombosis ni complicaciones obstétricas
<i>Punto de corte clínico</i>	Calcular el punto óptimo que indique la mejor sensibilidad, especificidad y OR para SAF	Grupo control que incluya pacientes con enfermedades relacionadas (en este caso al SAF o sea trombosis o complicaciones obstétricas)
<i>Título</i>		
<i>negativo</i>	< percentilo 99 normal	
<i>indeterminado</i>	> percentilo 99 normal < punto de corte clínico	
<i>positivo</i>	> punto de corte clínico	

Por este motivo la detección de  $\alpha\beta_2$ GPI anti-dominio I se propone como una alternativa para caracterizar a los anticuerpos patogénicos. En un estudio internacional multicéntrico que incluyó 442 pacientes con  $\alpha\beta_2$ GPI, se concluyó que la presencia de  $\alpha\beta_2$ GPI-anti-dominio I de isotipo IgG se asociaba a los eventos de trombosis y complicaciones obstétricas (17). Hasta el momento hay solo un equipo comercial para la evaluación de  $\alpha\beta_2$ GPI-anti-dominio I de EE.UU. y tuvo muy buena *performance* durante el *workshop* de laboratorio.

Los pacientes con los títulos más altos de  $\alpha\beta_2$ GPI son los que presentan actividad de IL dependiente de  $\beta_2$ GPI mientras que aquellos con títulos de  $\alpha\beta_2$ GPI más bajos no tienen actividad de IL.

El perfil de positividad de los distintos ensayos usados para detectar aFL es importante para definir el riesgo clínico de los pacientes. El concepto actual es que la triple positividad (IL+a $\beta_2$ GPI+aCL) confiere un mayor riesgo al desarrollo del primer evento de trombosis o a la recurrencia tromboembólica.

Los aPT no están aún incluidos como criterios de laboratorio para el SAF pero hay algunos estudios prospectivos recientes que remarcan que su presencia se asocia a un mayor riesgo tromboembólico. Seguramente hacen falta más estudios antes que estos anticuerpos se incorporen al panel de anticuerpos para el diagnóstico de SAF (33). La evaluación de aPS/PT podría ayudar a definir pacientes de riesgo. Hay algunos ensayos comerciales para la detección de aPS/PT y en un ensayo internacional demostró ser un marcador de confirmación de la presencia de IL y además se asoció fuertemente a la presencia de SAF y en particular el isotipo IgG (35).

Sin embargo, es importante recordar que por ahora solo IL, aCL y  $\alpha\beta_2$ GPI permanecen como criterios de laboratorio para definir el perfil de riesgo de los pacientes con aFL.

#### CORRESPONDENCIA

RICARDO FORASTIERO  
 Universidad Favaloro  
 Solís 453  
 (C1078AAI) CIUDAD AUTÓNOMA DE BUENOS AIRES,  
 Argentina  
 Tel: +54 11 4378 1145, Fax: +54 11 4378 1349  
 E-mail: rforastiero@favaloro.edu.ar

#### Referencias bibliográficas

- Forastiero R. Antigen specificity of antiphospholipid syndrome-related antiphospholipid antibodies. *Open Autoimmunity J* 2010; 2: 21-7.
- Conley CL, Hartmann RC. A hemorrhagic disorder caused by circulating anticoagulant in patients with disseminated lupus erythematosus. *J Clin Invest* 1952; 31: 621-2.
- Levine JS, Branch DW, Rauch J. The antiphospholipid syndrome. *NEJM* 2002; 346: 752-63.
- Ruiz-Irastorza G, Crowther M, Branch W, Khamashta MA. Antiphospholipid syndrome. *Lancet* 2010; 376: 1498-509.
- Wilson W, Gharavi A, Koike T, Lockshin M, Branch W, Piette J, *et al.* International consensus statement on the preliminary classification criteria for definite antiphospholipid syndrome. *Arthritis Rheum* 1999; 42: 1309-11.
- Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, Branch DW, Brey RL, Cervera R, *et al.* International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost* 2006; 4: 295-306.
- Forastiero R, Martinuzzo M. Antigen specificity and clinical relevance of antiphospholipid syndrome-related autoantibodies. *Curr Rheumatol Rev* 2005; 1: 177-87.
- Hernández-Molina G, Espericueta-Arriola G, Cabral AR. The role of lupus anticoagulant and triple marker positivity as risk factors for rethrombosis in patients with primary antiphospholipid syndrome. *Clin Exp Rheumatol* 2013; 31: 382-8.
- Pengo V, Ruffatti A, Legnani C, Gresele P, Barcellona D, Erba N, *et al.* Clinical course of high-risk patients diagnosed with antiphospholipid syndrome. *J Thromb Haemost* 2010; 8: 237-42.
- Forastiero R, Martinuzzo M, Pombo G, Puente D, Rossi A, Calebrin L, *et al.* A prospective study of antibodies to  $\beta_2$  glycoprotein I and prothrombin and risk of thrombosis. *J Thromb Haemost* 2005; 3: 1231-8.
- Pengo V, Ruffatti A, Legnani C, Testa S, Fierro T, Marongiu F, *et al.* Incidence of a first thromboembolic event in asymptomatic carriers of high-risk antiphospholipid antibody profile: a multicenter prospective study. *Blood* 2011; 118: 4714-8.
- Pengo V, Ruffatti A, Del Ross T, Tonello M, Cuffaro S, Hoxha A, *et al.* Confirmation of the initial of the antiphospholipid antibody positivity depends on antiphospholipid antibody profile. *J Thromb Haemost* 2013; 11: 1053-8.
- Pengo V, Banzato A, Bison E, Denas G, Padayattil S, Ruffatti A. Antiphospholipid syndrome: critical analysis of the diagnostic path. *Lupus* 2010; 19: 428-31.
- Forastiero R. Multiple antiphospholipid antibodies positivity and antiphospholipid syndrome criteria re-evaluation. *Lupus* 2014; 23: 1252-4.
- Forastiero R, Martinuzzo M. The emerging role of multiple antiphospholipid antibodies positivity in patients with antiphospholipid syndrome. *Expert Rev Clin Immunol* 2015; 11: 1255-63.
- de Groot P, Urbanus R. The significance of autoantibodies against to  $\beta_2$ glycoprotein I. *Blood* 2012; 120: 266-74.
- de Laat B, Pengo V, Pabinger I, Musial J, Voskuyl AE, Bultink IE, *et al.* The association between circulating antibodies against domain I of beta2-glycoprotein I and thrombosis: an international multicenter study. *J Thromb Haemost* 2009; 7: 1767-73.



18. Carreras LO, Forastiero RR, Martinuzzo ME. Which are the best biological markers of the antiphospholipid syndrome? *J Autoimmunity* 2000; 15: 163-72.
19. Bizzaro N, Ghirardello A, Zampieri S, Iaccarino L, Tozzoli R, Ruffatti A, *et al.* Anti-prothrombin antibodies predict thrombosis in patients with systemic lupus erythematosus: a 15-year longitudinal study. *J Thromb Haemost* 2007; 5: 1158-64.
20. Sciascia S, Murru V, Sanna G, Roccatello D, Khamashta MA, Bertolaccini ML. Clinical accuracy for diagnosis of antiphospholipid syndrome in systemic lupus erythematosus: evaluation of 23 possible combinations of antiphospholipid antibody specificities. *J Thromb Haemost* 2012; 10: 2512-8.
21. Brandt JT, Triplett DA, Alving B, Scharer I. Criteria for the diagnosis of lupus anticoagulants: an update. *Thromb Haemost* 1995; 74: 1185-90.
22. Pengo V, Tripodi A, Reber G, Rand JH, Ortel TL, Galli M, *et al.* On behalf of the Scientific and Standardization Committee on Lupus Anticoagulant/Phospholipid-dependent antibodies. Update of the Guidelines for Lupus Anticoagulant detection. *J Thromb Haemost* 2009; 7: 1737-40.
23. Denis-Magdelaine A, Flahault A, Verdy E. Sensitivity of sixteen APTT reagents for the presence of lupus anticoagulants. *Haemostasis* 1995; 25: 98-105.
24. Martinuzzo ME, Cerrato GS, Iglesias Varela ML, Adamczuk YP, Forastiero RR. New guidelines for LA: sensitivity and specificity of cut off values calculated with plasmas from healthy controls in mixing and confirmatory tests. *Int J Lab Hematol* 2012; 34: 208-13.
25. Forastiero R. Punto de corte de ensayos para anticuerpos antifosfolípidos y valor clínico del anticoagulante lúdico débil. *Hematología* 2013; 17: 142-6.
26. Forastiero RR, Blanco AN, Otero AM. Estudio interlaboratorio de los ensayos para anticuerpos antifosfolípidos. *Hematología* 2002; 6: 27-35.
27. Favalaro E, Wong R, Silvestrini R, McEvoy R, Jovanovich S, Roberts-Thomson P. A multilaboratory peer assessment quality assurance program-based evaluation on anticardiolipin antibody, and anti beta2-glycoprotein I antibody testing. *Sem Thromb Haemost* 2005; 31: 73-84.
28. Reber G, Tincani A, Sanmarco M, de Moerloose P, Boffa MC. Proposals for the measurement of anti-beta2-glycoprotein I antibodies. Standardization group of the European Forum on Antiphospholipid Antibodies. *J Thromb Haemost* 2004; 2: 1860-2.
29. Pierangeli SS, Favalaro EJ, Lakos G, Meroni PL, Tincani A, Wong RC, *et al.* Standards and reference materials for the anticardiolipin and anti- $\beta$ 2 glycoprotein I assays: a report of recommendations from the APL Task Force at the 13th International Congress on antiphospholipid antibodies. *Clin Chim Acta* 2012; 413: 358-60.
30. Forastiero R, Papalardo E, Watkins M, Nguyen H, Quirbach C, Jaskal K, *et al.* Evaluation of different Immunoassays for the detection of antiphospholipid antibodies: Report of a wet workshop during the 13th International Congress on Antiphospholipid Antibodies. *Clin Chim Acta* 2014; 428: 99-105.
31. Pierangeli S, de Groot PG, Diott J, Favalaro E, Harris EN, Lakos G, *et al.* Criteria aPL tests: report of a task force and preconference workshop at the 13th international congress on Antiphospholipid antibodies, Galveston, Texas, April 2010. *Lupus* 2011; 20: 182-90.
32. Lakos G, Favalaro E, Harris EN, Meroni PL, Tincani A, Wong RC, *et al.* International consensus guidelines on anticardiolipin and anti- $\beta$ 2-glycoprotein I testing. Report from the 13th International Congress on Antiphospholipid Antibodies. *Arthritis Rheum* 2012; 64: 1-10.
33. Bertolaccini ML, Amengual O, Andreoli L, Atsumi T, Chighizola CB, Forastiero R, *et al.* APS Task Force on Laboratory Diagnostics and Trends: report from the 14th International Congress on Antiphospholipid Antibodies, Rio de Janeiro, Brazil, September 2013. *Autoimmun Rev* 2014; 13: 917-30.
34. Finazzi G, Brancaccio V, Moia M, Ciaverella N, Mazzucconi MG, Schinco PC, *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: 530-6.
35. Amengual O, Forastiero R, Sugiura-Ogasawara M, Ootomo K, Oku K, *et al.* International multicenter study to assess the role of phosphatidyl serine-dependent anti-prothrombin antibodies for antiphospholipid syndrome diagnosis. *Arthritis Rheum* 2016 (in press).

**Recibido: 10 de abril de 2016.**

**Aceptado: 21 de abril de 2016.**