

PARTE 11 Investigación de laboratorio del síndrome de anticuerpos antifosfolípidos (SAF)

Silmara Montalvão

TEMAS TRATADOS

- ✓ Clasificación y criterios diagnósticos para SAF
- ✓ Anticuerpos antifosfolípidos
- ✓ Anticoagulante lúpico

Un grupo heterogéneo de anticuerpos que pueden causar prolongación de la prueba de TTPA son los anticuerpos antifosfolípidos, que generalmente reaccionan con epítomos en proteínas que están conjugadas con fosfolípidos cargados negativamente. Muchos de estos anticuerpos requieren beta-2-glicoproteína 1, una proteína que se une a los fosfolípidos. Otros pueden dirigirse contra la protrombina. La identificación adecuada de estos anticuerpos permitirá caracterizar el síndrome de anticuerpos antifosfolípidos (SAF) (Ruiz-Irastorza et al, 2010; Schreiber et al, 2018). Es importante tener en cuenta que estos anticuerpos pueden interferir en las reacciones de coagulación en el laboratorio, prolongando las pruebas dependientes de fosfolípidos como el TTAP y, en ocasiones, el TP, pero no se asocian a sangrado, salvo en algunos casos raros en los que hay una importante deficiencia de protrombina adquirida. Paradójicamente, estos anticuerpos están claramente asociados a la trombosis venosa y arterial por mecanismos poco conocidos. En los centros de diagnóstico de trastornos hemorrágicos es necesario poder detectar estos anticuerpos mediante pruebas específicas para la investigación de pacientes con TTPA prolongado (Barbosa et al, 2019). En la actualidad existen guías específicas para la correcta realización de las pruebas utilizadas para el diagnóstico de laboratorio del SAF que pueden utilizarse para actualizar la información de laboratorio, véase más abajo.

- Devreese, K.M.J.; de Groot, P.G.; de Laat, B.; Erkan, D.; Favaloro, E.J.; Mackie, I.; Martinuzzo, M.; Ortel, T.L.; Pengo, V.; Rand, J.H.; et al. Guía del Comité Científico y de Normalización para los anticuerpos anticoagulantes/antifosfolípidos del lupus de la Sociedad Internacional de Trombosis y Hemostasia: Actualización de las guías para la detección e interpretación de anticoagulantes lúpicos. *J. Trombo. Hemosta.* 2020; 18, 2828-2839.
- Devreese KM, Pierangeli SS, de Laat B, Tripodi A, Atsumi T, Ortel TL; Subcomité de Anticoagulantes/Fosfolípidos/Anticuerpos Dependientes del Lupus. Pruebas de anticuerpos antifosfolípidos con ensayos en fase sólida: orientación del SSC del ISTH. *J Hemosta de trombo.* 2014; 12(5): 792-795.
- Vandeveldel A, Gris JC, Moore GW, Musial J, Zuily S, Wahl D, Devreese KMJ. Hacia una interpretación armonizada de la detección de anticuerpos anticardiolipina y anti-P2-glicoproteína I para el diagnóstico del síndrome antifosfolípido utilizando intervalos de nivel definidos y cocientes de probabilidad: comunicación del Subcomité de Anticoagulantes/Antifosfolípidos Lúpicos del ISTH SSC. *J Hemosta de trombo.* 2024: S1538-7836(24)00236-8.

Clasificación y criterios diagnósticos para el SAF: Dado que se hizo evidente que los anticuerpos antifosfolípidos se asociaban significativamente con la trombosis vascular y la morbilidad del embarazo, la necesidad de criterios de consenso para el SAF dio lugar a los criterios de Sydney. Tabla 38 (Miyakis et al, 2006). Los pacientes se clasifican como portadores de SAF cuando se produce un evento clínico junto con al menos un criterio de laboratorio positivo. Los criterios de laboratorio para definir el SAF son la presencia de anticoagulante lúpico, aCL IgG/IgM o a2GPI IgG/IgM, presente de forma persistente durante al menos 12 semanas. Actualmente, se está llevando a cabo una novedosa iniciativa internacional para

desarrollar nuevos criterios de clasificación de SAF. Los criterios de laboratorio propuestos incluyen solo los anticuerpos de los criterios actuales (anticoagulante lúpico, aCL IgG/IgM y a2GPI IgG/IgM).

Tabla 38. Criterios de Sydney 2006 para clasificar el SAF

Criterios clínicos	Criterios de laboratorio
1. Trombosis vascular	1. Anticoagulante lúpico
Venoso, arterial o microvascular;	>2 resultados positivos
Confirmado por criterios objetivos validados;	Con al menos 12 semanas de diferencia
No hay evidencia de inflamación en la pared de los vasos	
Y/o	
2. Morbilidad del embarazo	2. Anticuerpo anticardiolipina IgG y/o IgM
>1 muerte fetal inexplicable _10th semana de gestación o;	Suero y plasma
>1 parto prematuro <semana 34 de gestación debido a: Eclampsia o preeclampsia severa, insuficiencia placentaria;	Título medio o alto (>40 GPL o MPL, o >percentil 99).
>3 abortos consecutivos inexplicables <10a semana de gestación.	Medido por ELISA estandarizado
	>2 resultados positivos
	Con al menos 12 semanas de diferencia
Y/o	
	3. Anticuerpo antiβ2-glicoproteína I IgG y/o IgM
	Suero y plasma
	Título medio o alto (>40 GPL o MPL, o >percentil 99).
	Medido por ELISA estandarizado
	>2 resultados positivos
	Con al menos 12 semanas de diferencia

Anticoagulante para el lupus

¿Cómo elegir la prueba? El anticoagulante lúpico se puede detectar mediante diferentes pruebas de coagulación dependientes de fosfolípidos. La actualización más reciente de las guías de la ISTH sobre la detección de anticoagulantes lúpicos recomienda el uso de dos pruebas en paralelo, el tiempo de veneno de víbora de Russell diluido (dRWT) y el TTPA (Devreese et al, 2020). El dRWT es más específico, mientras que el TTPA es más sensible para el anticoagulante lúpico (dependiendo en gran medida del reactivo utilizado). Los dos ensayos son complementarios porque los anticuerpos no siempre reaccionan en ambos ensayos. El ensayo dRWT se basa en la activación directa de FX por una enzima presente en el veneno de las víboras de Russell. El ensayo TTPA se basa en la activación de la vía de contacto (intrínseca) de la cascada de coagulación. La selección de los reactivos adecuados para las pruebas de anticoagulación lúpica es importante, ya que hay varios reactivos disponibles, especialmente para el TTAP (Favaloro et al, 2019). Es necesario abordar dos temas en la selección del reactivo TTPA, la elección del agente activador y la composición y concentración de fosfolípidos. Como alternativa al TTPA, la prueba de tiempo de coagulación de sílice (SCT) se puede utilizar para las pruebas de anticoagulantes lúpicos. El desempeño de los ensayos de anticoagulantes lúpicos debe ser validado o verificado antes de su implementación en la práctica clínica. Parte del proceso de verificación debe incluir el análisis de muestras con anticoagulante de lupus conocido y valores medios bien caracterizados (Gardiner et al, 2021a; Gardiner et al, 2021b).

¿Cómo se realiza la prueba? La evaluación de los anticoagulantes lúpicos consta de un procedimiento de tres pasos: cribado, mezcla y confirmación (Devreese et al, 2020). La PPP es necesaria para evitar

resultados falsos negativos debido a la interacción de fosfolípidos y plaquetas. La etapa de cribado incluye pruebas con reactivos dRWT y TTPA a bajas concentraciones de fosfolípidos. La deficiencia de factores de coagulación o inhibidores distintos del anticoagulante lúpico pueden dar positivo en la prueba de detección, por lo que es necesario mezclar y realizar una prueba de confirmación. El procedimiento escalonado puede reducir costes, ya que evita realizar innecesariamente la etapa de mezcla y confirmación si la etapa de cribado es negativa. En la etapa de confirmación, un exceso de fosfolípidos aniónico añadido al reactivo de prueba y el exceso de fosfolípidos pueden reducir o neutralizar los anticuerpos. En las pruebas de dRWT, los ensayos de cribado y confirmación se llevan a cabo en paralelo, y el resultado de la etapa de confirmación se expresa como una relación normalizada según el cálculo: $[(\text{resultado del cribado del paciente}) / (\text{resultado del cribado del grupo})] / [(\text{resultado de confirmación del paciente}) / (\text{resultado de confirmación del grupo})]$. En la etapa de mezcla, la prueba de cribado se realiza en una mezcla de plasma del paciente 1:1 y grupo de plasma normal. La prueba de mezcla se expresa como la relación normalizada $[(\text{mezcla de cribado}) / (\text{cribado de plasma normal combinado})]$. Cuando se prolonga el tiempo de coagulación en el ensayo de confirmación, se puede realizar un paso de mezcla adicional con los reactivos de confirmación (mezcla de confirmación), y la proporción es más robusta y menos afectada por la interferencia de deficiencias congénitas o adquiridas de factores. Existen ensayos integrados que llevan a cabo las tres etapas en un solo procedimiento. En estos ensayos, las pruebas de cribado y confirmatorias se realizan en paralelo en el plasma del paciente mezclado con PNP y los resultados se expresan principalmente como la diferencia entre las dos pruebas.

Valores de corte: Para interpretar los resultados de los anticoagulantes lúpicos, es necesario determinar valores de corte para definir la positividad en todos los estadios. En primer lugar, los laboratorios deben determinar los valores de corte utilizando una población de individuos sanos con al menos 120 personas, determinando el punto de corte como el percentil 99 después de rechazar los valores atípicos (Devreese et al, 2020). Sin embargo, el número de 120 individuos normales para calcular los valores de corte puede ser difícil de obtener para muchos laboratorios. Un enfoque que requiere menos voluntarios es la transferencia de los valores de corte recomendados por el fabricante. Esto supone que los puntos de corte de fabricación se basan en una gran población de referencia sana con datos demográficos adecuados, un método estadístico correcto y una combinación correcta de reactivo e instrumento (Castellone, 2017). Cuando se cumplen estas condiciones, los valores de corte del fabricante deben verificarse antes de la transferencia mediante la prueba de 20 voluntarios sanos que representen la demografía de la población local. Después de rechazar los valores atípicos y reemplazarlos con nuevos resultados de voluntarios sanos, los resultados (población libre de valores atípicos) deben compararse con el valor de corte sugerido.

Interferencias y limitaciones: La proteína C reactiva interfiere in vitro con la prueba de TTPA a través de su afinidad por los fosfolípidos, lo que conduce a resultados falsos positivos. Aunque este efecto no se ha observado para el ensayo dRWT, puede variar entre los reactivos. Además, el aumento de la actividad coagulante del FVIII se relaciona con un TTAP más corto que da resultados falsos negativos. Los niveles elevados de FVIII se pueden observar durante el embarazo, la cirugía, la inflamación, la malignidad y otras afecciones. No se recomiendan las pruebas de anticoagulación lúpica durante el evento trombotico o durante el tratamiento anticoagulante (Devreese et al, 2020). Las guías más recientes de la ISTH no aconsejan la dilución previa de las muestras para las pruebas de anticoagulación del lupus en presencia de AVK (Devreese et al, 2020). Los ACOD inhiben directamente la trombina (p. ej., dabigatrán) o el FXa (p. ej., apixabán, betrixabán, edoxabán y rivaroxabán), con diversos efectos sobre las pruebas de coagulación, lo que lleva a la interpretación de resultados falsos negativos y falsos positivos. El TTAP y el TP deben realizarse antes de iniciar la prueba de anticoagulación lúpica para tener más información sobre la muestra, pero esto no excluye la presencia de ACOD o HBPM.

Anticuerpos antifosfolípidos:

¿Cómo elijo la prueba? Los anticuerpos anticardiolipina y anti-beta-2-glicoproteína¹ se identifican mediante inmunoensayos en fase sólida. Los criterios de clasificación del SAF indican la medición de estos anticuerpos mediante ELISA estandarizado. Sin embargo, se han puesto a disposición técnicas de detección

alternativas para las pruebas de anticuerpos, como la quimioluminiscencia, la enzima de fluorescencia y los inmunoensayos de flujo múltiple (Devreese et al, 2014). En comparación con los métodos manuales tradicionales de ELISA, las técnicas más nuevas son más fáciles de usar y muestran una mejor precisión. Los ensayos difieren en cuanto a la fase sólida, el principio de detección, el recubrimiento, la fuente de antígenos y anticuerpos, los agentes bloqueantes para evitar la fijación inespecífica, el protocolo de dilución, la calibración y las unidades (Devreese et al, 2014). Se recomienda realizar las pruebas de seguimiento del paciente en el mismo laboratorio, ya que las plataformas no se pueden utilizar indistintamente.

¿Cómo realizar la prueba? El suero o PPP se pueden utilizar para las pruebas de aCL y a2GPI (Devreese et al, 2018). La necesidad de realizar la prueba por duplicado depende de las características de rendimiento del ensayo. Las pruebas duplicadas se recomiendan especialmente para los ELISA manuales o si la imprecisión entre y durante la corrida del ensayo es del >10% (Devreese et al, 2014). En cada tirada, el material de control de calidad interno debe analizarse a los niveles de título relevantes. Las curvas de calibración deben determinarse en cada corrida de ELISA o para cada lote de reactivos en sistemas automatizados. Cada calibración debe evaluarse y rechazarse cuando no cumple con los requisitos del fabricante o cuando el coeficiente de correlación entre los valores de prueba y los valores objetivo es inferior a 0,90 (Devreese et al, 2014). Desafortunadamente, no hay uniformidad en el material de referencia para la calibración de pruebas. Se están realizando esfuerzos para desarrollar nuevos estándares monoclonales y policlonales para aCL y a2GPI con el objetivo de crear estándares de la OMS con UI/ml como unidad universal.

Valores de corte y perfil de anticuerpos: Los 40 GPL/M μ L como punto de corte de aCL se basaron en estudios que mostraron una mejor correlación de este punto con el SAF (Levine et al, 1997). Sin embargo, puede haber una marcada diferencia entre 40 GPL/M μ L y el percentil 99 para aCL (Vandeveldt et al, 2024). Y el ISTH-SSC no recomienda usar 40 GPL/M μ L como punto de corte. Se recomienda calcular un valor de corte específico del laboratorio para la positividad basado en un percentil 99 no paramétrico de al menos 120 sujetos de referencia. Se recomienda el rechazo de valores atípicos con el método de Dixon/Reed para evitar la sobreestimación de los valores de corte. La transferencia de los puntos de corte del fabricante después de la verificación en 20 o más sujetos de referencia es una alternativa válida si el punto de corte del fabricante se calcula sobre una población de referencia suficientemente grande y se ha aplicado una metodología estadística adecuada. Cada resultado de aCL y a2GPI por encima del punto de corte debe notificarse como positivo, acompañado del valor numérico y del valor de corte interno (Vandeveldt et al, 2024). La positividad en una de las pruebas (anticoagulante lúpico, aCL IgG, aCL IgM, a2GPI IgG o a2GPI IgM) es suficiente para diagnosticar el SAF. Se ha sugerido la interpretación combinada de diferentes μ L como perfiles de anticuerpos para identificar a los pacientes de alto riesgo, en comparación con la evaluación individual. En los portadores asintomáticos de μ L, la doble y triple positividad fue un factor de riesgo para el desarrollo de eventos trombóticos, pero la positividad única de aCL o a2GPI no lo fue (Mustonen et al, 2014).

Interferencias: La presencia de factor reumatoide puede causar resultados falsos positivos de aCL IgM y a2GPI IgM (Devreese et al, 2014; Forastiero et al, 2014). A diferencia de los ensayos de anticoagulantes lúpicos, las pruebas de anticuerpos con inmunoensayos de fase sólida no están sujetas a la interferencia analítica de los reactivos del reactor de fase aguda ni a la terapia anticoagulante. Sin embargo, se observa un aumento transitorio de aCL y a2GPI en condiciones inflamatorias (Exner et al, 2020; Laureano y Crowthe, 2018).

Referencias

Barbosa ACN, Montalvao SAL, Barbosa KGN, Colella MP, Annichino-Bizzacchi JM, Ozelo MC, De Paula EV. TTPA prolongada de etiología desconocida: una evaluación sistemática de las causas y el uso de recursos de laboratorio en una unidad académica de hemostasia ambulatoria. *Res Pract Thromb Haemost* 2019; 3(4): 749-757.

Castellone DD. Establecimiento de intervalos de referencia en el laboratorio de coagulación. *Int J Lab Hematol* 2017; 39 Suppl 1: 121-127.

Devreese KMJ, de Groot PG, de Laat B, Erkan D, Favaloro EJ, Mackie I et al. Guía del Comité Científico y de Normalización para anticuerpos anticoagulantes/antifosfolípidos contra el lupus de la Sociedad Internacional de Trombosis y Hemostasia: Actualización de las guías para la detección e interpretación de anticoagulantes lúpicos. *J Thromb Haemost* 2020; 18(11): 2828-2839.

Devreese KMJ, Ortel TL, Pengo V, de Laat B. Criterios de laboratorio para el síndrome antifosfolípido: Comunicación del SSC del ISTH. *J Thromb Haemost* 2018; 16(4): 809-813.

Devreese KM, Pierangeli SS, de Laat B, Tripodi A, Atsumi T, Ortel TL. Pruebas de anticuerpos antifosfolípidos con ensayos en fase sólida: Guía del SSC de la ISTH. *J Thromb Haemost* 2014; 12(5): 792-795.

Exner T, Rigano J, Favaloro EJ. El efecto de los ACOD en las pruebas de laboratorio y su eliminación por carbón activado para limitar la interferencia en los ensayos funcionales. *Int J Lab Hematol* 2020; 42 Suppl 1: 41-48.

Favaloro EJ, Kershaw G, Mohammed S, Lippi G. Cómo optimizar las pruebas de tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPA): soluciones para establecer y verificar intervalos de referencia normales y evaluar la sensibilidad de los reactivos de TTPA a la heparina, el anticoagulante lúpico y los factores de coagulación. *Semin Thromb Hemost* 2019; 45(1): 22-35.

Forastiero R, Papalardo E, Watkins M, Nguyen H, Quirbach C, Jaskal K et al. Evaluación de diferentes inmunoensayos para la detección de anticuerpos antifosfolípidos: Informe de un taller húmedo durante el 13° Congreso Internacional de Anticuerpos Antifosfolípidos. *Clin Chim Acta* 2014; 428: 99-105.

Gardiner C, Coleman R, de Maat MPM, Dorgalaleh A, Echenagucia M, Gosselin RC, Ieko M, Kitchen S. Guía de laboratorio del Consejo Internacional de Normalización en Hematología (ICSH) para la evaluación de los sistemas de prueba de analizadores y reactivos de hemostasia. Parte 1: Problemas específicos del instrumento y pruebas de detección de coagulación de uso común. *Int J Lab Hematol* 2021; 43(2): 169-183.

Gardiner C, Coleman R, de Maat MPM, Dorgalaleh A, Echenagucia M, Gosselin RC, Ieko M, Kitchen S. Guía de laboratorio del Consejo Internacional de Normalización en Hematología (ICSH) para la verificación de los sistemas de prueba de analizadores y reactivos de hemostasia. Parte 2: Pruebas especializadas y ensayos calibrados. *Int J Lab Hematol* 2021; 43(5): 907-916.

Harris EN, Gharavi AE, Patel SP, Hughes GR. Evaluación de la prueba de anticuerpos anti-cardiolipina: Informe de un taller internacional celebrado el 4 de abril de 1986. *Clin Exp Immunol* 1987; 68(1): 215-222.

Laureano M, Crowther MA. Aps de mayor riesgo: ¿Nos atrevemos a hacer DOAC? *Sangre* 2018; 132(13): 1357-1358.

Levine SR, Salowich-Palm L, Sawaya KL, Perry M, Spencer HJ, Winkler HJ, Alam Z, Carey JL. Título de anticuerpos IgG anticardiolipina > 40 G μ L y el riesgo de eventos trombo-occlusivos posteriores y muerte. Un estudio de cohorte prospectivo. *Accidente cerebrovascular* 1997; 28(9): 1660-1665.

Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, Branch DW, Brey RL, Cervera R et al. Declaración de consenso internacional sobre una actualización de los criterios de clasificación para el síndrome antifosfolípido definitivo (SAF). *J Thromb Haemost* 2006; 4(2): 295-306.

Mustonen P, Lehtonen KV, Javela K, Puurunen M. Anticuerpo antifosfolípido persistente (aPL) en portadores asintomáticos como factor de riesgo para futuros eventos trombóticos: un estudio prospectivo a nivel nacional. *Lupus* 2014; 23(14): 1468-1476.

Ruiz-Irastorza G, Crowther M, Branch W, Khamashta MA. Síndrome antifosfolípido. *Lancet* 2010; 376(9751): 1498-1509.

Schreiber K, Sciascia S, de Groot PG, Devreese K, Jacobsen S, Ruiz-Irastorza G, Salmon JE, Shoenfeld Y, Shovman O, Hunt BJ. Síndrome antifosfolípido. *Nat Rev Dis Primers* 2018; 4: 17103.

Vandeveldt A, Gris JC, Moore GW, Musial J, Zully S, Wahl D, Devreese KMJ. Hacia una interpretación armonizada de la detección de anticuerpos anticardiolipina y anti- β 2-glicoproteína I para el diagnóstico del síndrome antifosfolípido utilizando intervalos de nivel definidos y cocientes de probabilidad: Comunicación del Subcomité de Anticoagulantes Lúpicos/Anticuerpos Antifosfolípidos del I STH SSC. *J Thromb Haemost* 2024; 22(8): 2345-2362.