
TÓPICOS ABORDADOS

- ✓ Classificação e Critérios Diagnósticos de SAF
 - ✓ Anticoagulante Lúpico
 - ✓ Anticorpos Antifosfolípídios
-

Um grupo heterogêneo de anticorpos que podem causar prolongamento do teste de TTPA são os anticorpos antifosfolípídios, que geralmente reagem com epítomos em proteínas que são complexadas com fosfolípídios carregados negativamente. Muitos desses anticorpos requerem beta-2-glicoproteína 1, uma proteína que se liga a fosfolípídios. Outros podem ser direcionados contra a protrombina. A identificação adequada desses anticorpos permitirá a caracterização da síndrome do anticorpo antifosfolípideo (SAF) (Ruiz-Irastorza et al, 2010; Schreiber et al, 2018). É importante notar que esses anticorpos podem interferir nas reações de coagulação no laboratório, prolongando testes dependentes de fosfolípídios, como o TTPA e, ocasionalmente o TP, mas não estão associados a sangramento, exceto em alguns casos raros em que há deficiência de protrombina adquirida significativa. Paradoxalmente, esses anticorpos estão claramente associados a trombose venosa e arterial por mecanismos que não são bem compreendidos. Em centros de diagnóstico de distúrbios hemorrágicos, é necessário detectar esses anticorpos por meio de testes específicos para a investigação de pacientes com TTPA prolongado (Barbosa et al, 2019). Atualmente, existem diretrizes específicas para a realização correta dos testes utilizados no diagnóstico laboratorial de SAF, que podem ser usadas para atualizar as informações laboratoriais (veja abaixo).

- 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. Guidance from the Scientific and Standardization Committee for lupus anticoagulant/antiphospholipid antibodies of the International Society on Thrombosis and Haemostasis: Update of the guidelines for lupus anticoagulant detection and interpretation. J. Thromb. Haemost. 2020; 18, 2828–2839.
- Devreese KM, Pierangeli SS, de Laat B, Tripodi A, Atsumi T, Ortel TL; Subcommittee on Lupus Anticoagulant/Phospholipid/Dependent Antibodies. Testing for antiphospholipid antibodies with solid phase assays: guidance from the SSC of the ISTH. J Thromb Haemost. 2014; 12(5): 792-795.
- Vandeveld A, Gris JC, Moore GW, Musiał J, Zuily S, Wahl D, Devreese KMJ. Toward harmonized interpretation of anticardiolipin and anti-β2-glycoprotein I antibody detection for diagnosis of antiphospholipid syndrome using defined level intervals and likelihood ratios: communication from the ISTH SSC Subcommittee on Lupus Anticoagulant/Antiphospholipid Antibodies. J Thromb Haemost. 2024: S1538-7836(24)00236-8.

Classificação e Critérios Diagnósticos de SAF: desde que ficou claro que os anticorpos antifosfolípídios estavam significativamente associados a trombose vascular e morbidade gestacional, a necessidade de critérios de consenso para SAF resultou nos critérios de Sydney, Tabela 38 (Miyakis et al, 2006). Os pacientes são classificados como portadores de SAF quando um evento clínico ocorre junto com pelo menos um critério laboratorial positivo. Os critérios laboratoriais para definição de SAF são a presença de anticoagulante lúpico, aCL IgG/IgM ou a2GPI IgG/IgM, persistentemente presente por no mínimo 12 semanas. Atualmente, uma nova iniciativa internacional está sendo realizada no sentido de desenvolver novos critérios para classificar SAF. Os critérios laboratoriais propostos incluem apenas os anticorpos dos critérios vigentes (anticoagulante lúpico, aCL IgG/IgM e a2GPI IgG/IgM).

Tabela 38. Critérios de Sydney de 2006 para classificação da SAF

Critérios clínicos	Critérios laboratoriais
1. Trombose vascular	1. Anticoagulante lúpico
Venosa, arterial ou microvascular;	≥2 resultados positivos
Confirmada por critérios objetivos validados;	Pelo menos 12 semanas de intervalo
Nenhuma evidência de inflamação na parede do vaso	
E/ou	
2. Morbidade gestacional	2. Anticorpo anticardiolipina IgG e/ou IgM
≥1 morte fetal inexplicada _10ª semana de gestação ou;	Soro e plasma
≥1 parto prematuro <34ª semana de gestação por: eclâmpsia ou pré-eclâmpsia grave, insuficiência placentária;	Título médio ou alto (>40 GPL ou MPL, ou >99º percentil),
≥3 abortos consecutivos inexplicados <10ª semana de gestação.	Medido por ELISA padronizado
	≥2 resultados positivos
	Pelo menos 12 semanas de intervalo
E/ou	
	3. Anticorpo anti-β2 glicoproteína I IgG e/ou IgM
	Soro e plasma
	Título médio ou alto (>40 GPL ou MPL, ou >99º percentil),
	Medido por ELISA padronizado
	≥2 resultados positivos
	Pelo menos 12 semanas de intervalo

Anticoagulante lúpico

Como escolher o teste? O anticoagulante lúpico pode ser detectado por diferentes testes de coagulação dependentes de fosfolipídios. A atualização mais recente das diretrizes da ISTH sobre detecção de anticoagulante lúpico recomenda o uso de dois testes em paralelo: o tempo de veneno de víbora de Russell diluído (dRVVT) e o TTPA (Devreese et al, 2020). O dRVVT é mais específico, enquanto o TTPA é mais sensível para o anticoagulante lúpico (dependendo muito do reagente utilizado). Os dois ensaios são complementares, pois os anticorpos nem sempre reagem em ambos. O ensaio de dRVVT baseia-se na ativação direta do FX por uma enzima presente no veneno das víboras de Russell. O ensaio de TTPA baseia-se na ativação da via de contato (intrínseca) da cascata de coagulação. A seleção de reagentes apropriados para fins de teste de anticoagulante lúpico é importante, visto que existem diversos reagentes disponíveis, especialmente para TTPA (Favaloro et al, 2019). Dois tópicos na seleção do reagente de TTPA precisam ser abordados: a escolha do agente ativador e a composição e concentração dos fosfolipídios. Como alternativa ao TTPA, o teste de tempo de coagulação de sílica (SCT) pode ser usado para teste de anticoagulante lúpico. O desempenho dos ensaios de anticoagulante lúpico deve ser validado ou verificado antes da implementação na prática clínica. Parte do processo de verificação deve incluir o teste de amostras com anticoagulante lúpico conhecido e valores médios bem caracterizados (Gardiner et al, 2021a; Gardiner et al, 2021b).

Como o teste é realizado? A avaliação do anticoagulante lúpico consiste em um procedimento de três etapas: triagem, mistura e confirmação (Devreese et al, 2020). O PPP é necessário para evitar resultados falso-negativos em razão da interação de fosfolipídios e plaquetas. A etapa de triagem inclui testes com reagentes de dRVVT e TTPA em baixas concentrações de fosfolipídios. Deficiência de fator de coagulação ou inibidores diferentes do anticoagulante lúpico podem provocar um teste de triagem positivo, por isso uma etapa de teste de mistura e de confirmação é necessária. O procedimento em etapas pode reduzir custos, pois evita a realização desnecessária da etapa de mistura e confirmação se a etapa de triagem for negativa. Na etapa de confirmação, um excesso de fosfolipídio aniônico é adicionado ao reagente de teste, e o excesso de fosfolipídio pode reduzir ou neutralizar os anticorpos.

Nos testes de dRVVT, os ensaios de triagem e confirmação são realizados em paralelo, e o resultado da etapa de confirmação é expresso como razão normalizada de acordo com o cálculo: $[(\text{resultado do paciente na triagem})/(\text{resultado do pool na triagem})]/[(\text{resultado do paciente na confirmação})/(\text{resultado do pool na confirmação})]$. Na etapa de mistura, o teste de triagem é realizado em uma mistura de plasma de paciente e pool de plasma normal na proporção 1:1. O teste de mistura é expresso como a razão normalizada $[(\text{mistura na triagem})/(\text{pool de plasma normal na triagem})]$. Quando o tempo de coagulação no ensaio de confirmação é prolongado, uma etapa de mistura adicional com os reagentes confirmatórios (mistura de confirmação) pode ser realizada, e a razão é mais robusta e menos afetada pela interferência de deficiências congênitas ou adquiridas de fatores. Existem ensaios integrados que realizam todas as três etapas em um único procedimento. Nesses ensaios, os testes de triagem e confirmatórios são realizados paralelamente no plasma de paciente misturado com PNP, e os resultados são geralmente expressos como a diferença entre os dois testes.

Valores de corte: para interpretar os resultados do anticoagulante lúpico, é necessário determinar valores de corte que definem positividade em todas as etapas. Primeiramente, os laboratórios devem determinar os valores de corte em uma população de indivíduos saudáveis de pelo menos 120 pessoas, definindo o ponto de corte como o percentil 99 após a rejeição de valores discrepantes (Devreese et al, 2020). No entanto, o número de 120 indivíduos normais para calcular os valores de corte pode ser difícil de obter para muitos laboratórios. Uma abordagem que requer menos voluntários é a transferência dos valores de corte recomendados pelo fabricante. Isso pressupõe que os pontos de corte do fabricante se baseiam em uma grande população de referência sadia com dados demográficos adequados, um método estatístico correto e uma combinação correta de reagentes e instrumentos (Castellone, 2017). Quando essas condições forem atendidas, os valores de corte do fabricante devem ser verificados antes da transferência, testando 20 voluntários saudáveis que representem a demografia da população local. Após rejeitar valores discrepantes e substituí-los por novos resultados de voluntários saudáveis, os resultados (da população sem valores discrepantes) devem ser comparados com o valor de corte sugerido.

Interferências e limitações: a proteína C reativa interfere *in vitro* no teste de TTPA por meio de sua afinidade por fosfolípidios, levando a resultados falso-positivos. Embora esse efeito não tenha sido observado no ensaio de dRVVT, ele pode variar entre os reagentes. Além disso, o aumento da atividade coagulante do FVIII está associado a um TTPA mais curto, gerando resultados falso-negativos. Níveis elevados de FVIII podem ser observados durante a gravidez, cirurgia, inflamação, malignidade e outras condições. O teste de anticoagulante lúpico durante o evento trombótico ou durante o tratamento anticoagulante não é recomendado (Devreese et al, 2020). As diretrizes mais recentes da ISTH não recomendam a pré-diluição de amostras para teste de anticoagulante lúpico na presença de AVKs (Devreese et al, 2020). Os DOACs inibem diretamente a trombina (por exemplo, dabigatrana) ou o FXa (por exemplo, apixabana, betrixabana, edoxabana e rivaroxabana) com vários efeitos nos testes de coagulação, levando à interpretação de resultados falso-negativos e falso-positivos. O TTPA e o TP devem ser realizados antes do início do teste de anticoagulante lúpico para obter mais informações sobre a amostra, mas isso não exclui a presença de DOACs ou HBPM.

Anticorpos Antifosfolípidios:

Como escolher o teste? Os anticorpos anticardiolipina e antibeta-2-glicoproteína 1 são identificados por imunoenaios de fase sólida. Os critérios de classificação da SAF indicam a medição desses anticorpos por ELISA padronizado. Contudo, técnicas alternativas de detecção para testes de anticorpos, como quimioluminescência, enzima fluorescente e imunoenaios de fluxo multiplex, estão disponíveis (Devreese et al, 2014). Em comparação com os métodos tradicionais de ELISA manual, as técnicas mais recentes são mais fáceis de usar e demonstram melhor precisão. Os ensaios diferem em termos de fase sólida, princípio de detecção, revestimento, fonte de antígenos e anticorpos, agentes bloqueadores para evitar ligações não específicas, protocolo de diluição, calibração e unidades (Devreese et al, 2014). Recomenda-se realizar os testes de acompanhamento do paciente no mesmo laboratório, visto que as plataformas não podem ser usadas de forma intercambiável.

Como realizar o teste? Soro ou PPP podem ser utilizados para testes de aCL e a2GPI (Devreese et al, 2018). A necessidade de realizar o teste em duplicata depende das características de desempenho do ensaio. O teste em duplicata é especialmente recomendado no caso de ELISAs manuais ou se a imprecisão inter e intraexecução do

ensaio for >10% (Devreese et al, 2014). Em cada execução, material de controle de qualidade interno precisa ser analisado em níveis de título relevantes. Curvas de calibração precisam ser determinadas em cada execução de ELISA ou para cada lote de reagentes em sistemas automatizados. Cada calibração deve ser avaliada e rejeitada quando não atender aos requisitos do fabricante ou quando o coeficiente de correlação entre os valores de teste e os valores alvo for menor que 0,90 (Devreese et al, 2014). Infelizmente, não há uniformidade no material de referência para calibração de testes. Esforços estão sendo feitos para desenvolver novos padrões monoclonais e policlonais para aCL e a2GPI, com o objetivo de criar padrões da OMS com UI/mL como unidade universal.

Valores de corte e perfil de anticorpos: o valor de 40 GPL/MPL como ponto de corte para aCL foi baseado em estudos que mostram melhor correlação deste ponto com a SAF (Levine et al, 1997). Porém, pode haver uma diferença acentuada entre 40 GPL/MPL e o percentil 99 para aCL (Vandeveldt et al, 2024). E a ISTH-SSC não recomenda o uso de 40 GPL/MPL como ponto de corte. Recomenda-se calcular um valor de corte para positividade específico do laboratório com base em um percentil 99 não paramétrico de pelo menos 120 indivíduos de referência. A rejeição de valores discrepantes com o método de Dixon/Reed é recomendada para evitar a superestimação dos valores de corte. Transferir os pontos de corte do fabricante após verificação em 20 ou mais indivíduos de referência é uma alternativa válida se o ponto de corte do fabricante for calculado em uma população de referência suficientemente grande e uma metodologia estatística apropriada tiver sido aplicada. Cada resultado de aCL e a2GPI acima do ponto de corte deve ser relatado como positivo, acompanhado do valor numérico e do valor de corte interno (Vandeveldt et al, 2024). Positividade em um dos testes (anticoagulante lúpico, aCL IgG, aCL IgM, a2GPI IgG ou a2GPI IgM) é suficiente para diagnosticar a SAF. A interpretação combinada de diferentes aPL como perfis de anticorpos foi sugerida para identificar pacientes de alto risco, em comparação com a avaliação individual. Em portadores assintomáticos de aPL, positividade dupla e tripla foi um fator de risco para o desenvolvimento de eventos trombóticos, mas positividade única de aCL ou a2GPI não foi (Mustonen et al, 2014).

Interferências: a presença do fator reumatoide pode gerar resultados falso-positivos de aCL IgM e a2GPI IgM (Devreese et al, 2014; Forastiero et al, 2014). Ao contrário dos ensaios de anticoagulante lúpico, o teste de anticorpos com imunoenaios de fase sólida não está sujeito a interferência analítica de reagentes de fase aguda ou terapia anticoagulante. No entanto, aumento transitório de aCL e a2GPI é observado em condições inflamatórias (Exner et al, 2020; Laureano e Crowthe, 2018).

Referências

Barbosa ACN, Montalvão SAL, Barbosa KGN, Colella MP, Annichino-Bizzacchi JM, Ozelo MC, De Paula EV. Prolonged APTT of unknown etiology: A systematic evaluation of causes and laboratory resource use in an outpatient hemostasis academic unit. *Res Pract Thromb Haemost* 2019; 3(4): 749-757.

Castellone DD. Establishing reference intervals in the coagulation laboratory. *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. Guidance from the Scientific and Standardization Committee for lupus anticoagulant/antiphospholipid antibodies of the International Society on Thrombosis and Haemostasis: Update of the guidelines for lupus anticoagulant detection and interpretation. *J Thromb Haemost* 2020; 18(11): 2828-2839.

Devreese KMJ, Ortel TL, Pengo V, de Laat B. Laboratory criteria for antiphospholipid syndrome: Communication from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost* 2018; 16(4): 809-813.

Devreese KM, Pierangeli SS, de Laat B, Tripodi A, Atsumi T, Ortel TL. Testing for antiphospholipid antibodies with solid phase assays: Guidance from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost* 2014; 12(5): 792-795.

Exner T, Rigano J, Favaloro EJ. The effect of DOACs on laboratory tests and their removal by activated carbon to limit interference in functional assays. *Int J Lab Hematol* 2020; 42 Suppl 1: 41-48.

Favaloro EJ, Kershaw G, Mohammed S, Lippi G. How to optimize activated partial thromboplastin time (APTT) testing: Solutions to establishing and verifying normal reference intervals and assessing APTT reagents for sensitivity to heparin, lupus anticoagulant, and clotting factors. *Semin Thromb Hemost* 2019; 45(1): 22-35.

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.

Gardiner C, Coleman R, de Maat MPM, Dorgalaleh A, Echenagucia M, Gosselin RC, Ieko M, Kitchen S. International Council for Standardization in Haematology (ICSH) laboratory guidance for the evaluation of haemostasis analyser-reagent test systems. Part 1: Instrument-specific issues and commonly used coagulation screening tests. *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. International Council for Standardization in Haematology (ICSH) laboratory guidance for the verification of haemostasis analyser-reagent test systems. Part 2: Specialist tests and calibrated assays. *Int J Lab Hematol* 2021; 43(5): 907-916.

Harris EN, Gharavi AE, Patel SP, Hughes GR. Evaluation of the anti-cardiolipin antibody test: Report of an international workshop held 4 April 1986. *Clin Exp Immunol* 1987; 68(1): 215-222.

Laureano M, Crowther MA. Higher-risk aps: Do we dare to DOAC? *Blood* 2018; 132(13): 1357-1358.

Levine SR, Salowich-Palm L, Sawaya KL, Perry M, Spencer HJ, Winkler HJ, Alam Z, Carey JL. IgG anticardiolipin antibody titer > 40 GPL and the risk of subsequent thrombo-occlusive events and death. A prospective cohort study. *Stroke* 1997; 28(9): 1660-1665.

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(2): 295-306.

Mustonen P, Lehtonen KV, Javela K, Puurunen M. Persistent antiphospholipid antibody (aPL) in asymptomatic carriers as a risk factor for future thrombotic events: A nationwide prospective study. *Lupus* 2014; 23(14): 1468-1476.

Ruiz-Irastorza G, Crowther M, Branch W, Khamashta MA. Antiphospholipid syndrome. *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. Antiphospholipid syndrome. *Nat Rev Dis Primers* 2018; 4: 17103.

Vandevelde A, Gris JC, Moore GW, Musiał J, Zuily S, Wahl D, Devreese KMJ. Toward harmonized interpretation of anticardiolipin and anti- β 2-glycoprotein I antibody detection for diagnosis of antiphospholipid syndrome using defined level intervals and likelihood ratios: Communication from the ISTH SSC Subcommittee on Lupus Anticoagulant/Antiphospholipid Antibodies. *J Thromb Haemost* 2024; 22(8): 2345-2362.