

# Síndrome Antifosfolípido

## Diagnóstico de

### Laboratorio

*Pablo Martínez*  
*pamart@criba.edu.ar*



**Hospital Interzonal Dr. José  
Penna. Servicio de Hematología**

# Revelación de conflictos de interés

*Pablo Martínez*

**Síndrome Antifosfolípido: diagnóstico de Laboratorio**

**Relaciones financieras: No**

**Uso off-label o no aprobado: No**

# Síndrome Antifosfolípido (SAF)

El síndrome está definido por:

–un criterio clínico

–un criterio de laboratorio

# Síndrome Antifosfolípido (SAF)

*Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 4: 295–306

J Thromb Haemost 2006; 4: 295-306

## SPECIAL ARTICLE

### International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS)

S. MIYAKIS,\* M. D. LOCKSHIN,† T. ATSUMI,‡ D. W. BRANCH,§ R. L. BREY,¶ R. CERVERA,\*\*  
R. H. W. M. DERKSEN,†† P. G. DE GROOT,†† T. KOIKE,‡ P. L. MERONI,‡‡ G. REBER,§§  
Y. SHOENFELD,¶¶ A. TINCANI,\*\*\* P. G. VLACHOYIANNOPOULOS††† and S. A. KRILIS\*

# Anticuerpos Antifosfolípido: Definición

## Anticoagulante lúpico (LA)

Grupo heterogéneo de Inmunoglobulinas (Ig) capaces de prolongar pruebas de coagulación dependientes de fosfolípidos.

## Anticuerpos anticardiolipina (aCL) o Anticuerpos anti $\beta$ 2 glicoproteína I ( $a\beta$ 2GPI)

Grupo heterogéneo de Inmunoglobulinas (Ig) capaces de ligar complejos proteína-fosfolípidos fijados en fase sólida.

# Síndrome Antifosfolípido

## Criterios de diagnóstico

Criterio de Laboratorio:

Pruebas positivas, LA o aCL o a $\beta$ 2GPI, en dos oportunidades separados 12 semanas.

Criterio Clínico:

Trombosis venosa o arterial, complicaciones gestacionales.

# Anticuerpos Antifosfolípido (AF) detectados en fase sólida

Pruebas recomendadas

- **aCL**

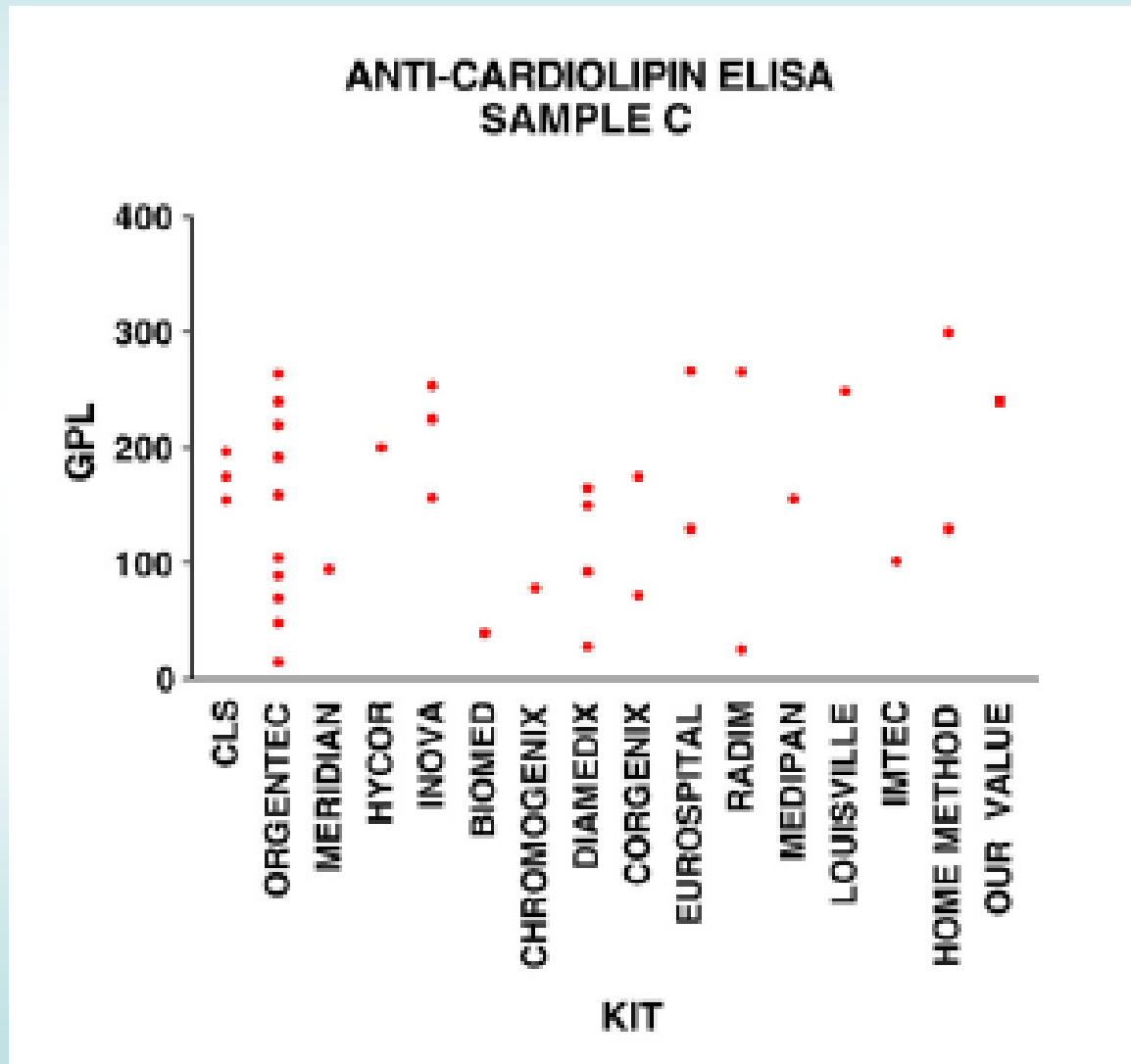
- **a $\beta$ 2GPI**

Isotipos recomendados

- **Inmunoglobulinas tipo G (Ig G)**

- **Inmunoglobulinas tipo M (Ig M)**

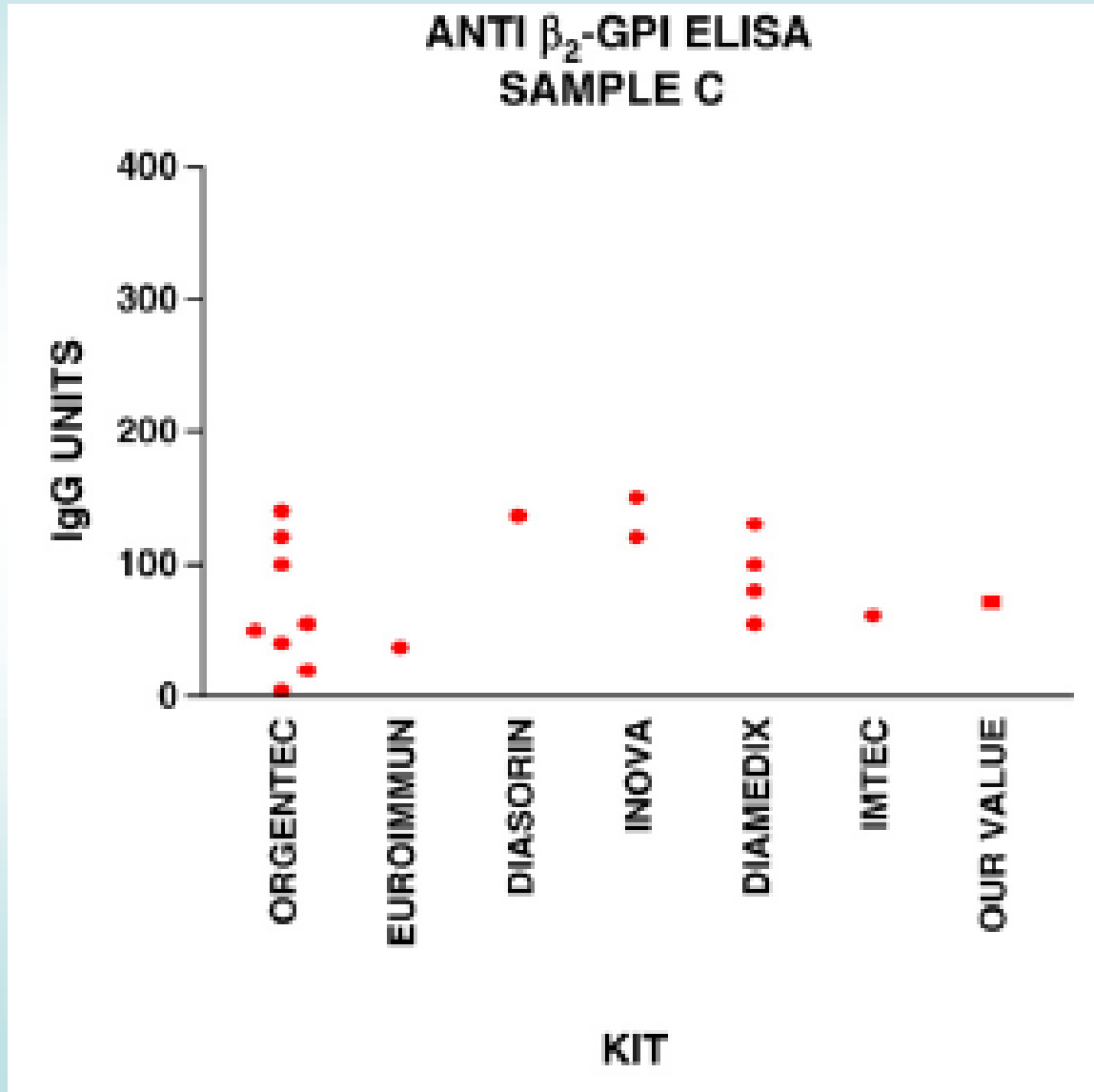
# Equipos comerciales



Pengo et al, Thrombosis  
Research (2007) 120,  
127-133



# Equipos comerciales



Pengo et al, Thrombosis  
Research (2007) 120,  
127-133

# Variables que afectan la calidad del ensayo de **aCL** y **a $\beta$ 2GPI**

- Características de la microplaca
- Calidad de la  $\beta$ 2GPI
- Calibradores
- Valores de referencia

# Ensayos en fase sólida:

- Distinguir anticuerpos asociados con la clínica característica de SAF de aquellos que carecen de importancia clínica

## The association between circulating antibodies against domain I of beta2-glycoprotein I and thrombosis: an international multicenter study

*J Thromb Haemost* 2009

B. DE LAAT,\* V. PENGO,† I. PABINGER,‡ J. MUSIAL,§ A. E. VOSKUYL,¶ I. E. M. BULTINK,¶  
A. RUFFATTI,\*\* B. ROZMAN,†† T. KVEDER,†† P. DE MOERLOOSE,‡‡ F. BOEHLLEN,§§ J. RAND,¶¶  
Z. ULCOVA-GALLOVA,\*\*\* K. MERTENS\* and P. G. DE GROOT†††

**Table 2** Association between aPL and thrombosis

	Odds ratio (95% confidence interval)
Anti-domain I IgG	<b>3.5 (2.3–5.4)*</b>
Non-domain I	0.4 (0.3–0.6)
Anti-beta2GPI IgG	
Anti-beta2GPI IgM	0.9 (0.6–1.3)
LAC	<b>1.8 (1.1–3.1)*</b>
aCL	1.1 (0.6–2.1)

# LA: Detección por el Laboratorio

*Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 7: 1737–1740

DOI: 10.1111/j.1538-7836.2009.03555.x

**OFFICIAL COMMUNICATION OF THE SSC**

## Update of the guidelines for lupus anticoagulant detection

V. PENGO,\* A. TRIPODI,† G. REBER,‡ J. H. RAND,§ T. L. ORTEL,¶ M. GALLI\*\* and P. G. DE GROOT††

\*Clinical Cardiology, Thrombosis Center, University Hospital, Padova; †Angelo Bianchi Bonomi Haemophilia and Thrombosis Centre, University and IRCCS Maggiore Hospital, Mangiagalli and Regina Elena Foundation, Milan, Italy; ‡Haemostasis Unit, Division of Angiology and Haemostasis, University Hospital, Geneva, Switzerland; §Hematology and Advanced Coagulation Laboratory, Montefiore Medical Center, Bronx, NY; ¶Division of Hematology, Duke University Medical Center, Durham, NC, USA; \*\*Department of Hematology, Ospedali Riuniti, Bergamo, Italy; and ††Department of Clinical Chemistry and Haematology, University Medical Centre, Utrecht, the Netherlands

---

To cite this article: Pengo V, Tripodi A, Reber G, Rand JH, Ortel TL, Galli M, de Groot PG. Update of the guidelines for lupus anticoagulant detection. *J Thromb Haemost* 2009; 7: 1737–40.

# Medición del LA

- Quiénes deben ser estudiados?
- Variables preanalíticas
- Que pruebas están recomendadas?
- Cuál es el criterio diagnóstico?
- Cuándo es posible el estudio?
- Cómo informar el resultado?

# Medición del LA

- Quiénes deben ser estudiados?
- Variables preanalíticas
- Que pruebas están recomendadas?
- Cuál es el criterio diagnóstico?
- Cuándo es posible el estudio?
- Cómo informar el resultado?

# Medición del LA: a quiénes?

- APTT prolongado inexplicado en el curso de un laboratorio de rutina.
- Alta probabilidad de SAF de acuerdo a sus características clínicas.

# Medición del LA: probabilidad clínica baja o moderada

- Baja probabilidad:
  - Tromboembolismo venoso (TEV) o arterial en pacientes mayores de 50 años.
- Probabilidad moderada:
  - Pérdidas gestacionales espontáneas tempranas recurrentes,
  - TEV provocado en pacientes menores de 50 años



# LA: alta probabilidad clínica

- TEV no provocado o trombosis arterial inexplicada en pacientes jóvenes (menores de 50 años).
- Trombosis en sitios inusuales.
- Pérdidas gestacionales tardías.
- Cualquier trombosis o morbilidad gestacional relacionada a una enfermedad autoinmune

# Medición del LA: a quiénes NO

- Búsquedas generalizadas en pacientes asintomáticos o en pacientes con clínica diferente a las anteriormente mencionadas, están contraindicadas, ya que incrementan el riesgo de obtener resultados falsos positivos.

# Medición del LA: es imperativo confirmar el diagnóstico!

- Una vez que el paciente ha sido identificado como positivo para **LA**, la prueba debe ser repetida en una segunda ocasión a partir de las doce semanas de la prueba inicial.
- Aplicable para **aCL** y **a $\beta$ 2GPI**

# Medición del LA

- Quiénes deben ser estudiados?
- **Variables pre analíticas**
- Que pruebas están recomendadas?
- Cuál es el criterio diagnóstico?
- Cuándo es posible el estudio?
- Cómo informar el resultado?

# Medición del LA: variables pre analíticas

- Las plaquetas residuales pueden afectar las pruebas dependientes de fosfolípidos, especialmente luego del congelamiento-descongelamiento.
- Recomendación: doble centrifugación

# Medición del LA: variables pre analíticas

- Estabilidad de los factores de la coagulación.
- Recomendación:
  - Congelamiento rápido del plasma si la determinación de LA es pospuesta.
  - El plasma debe ser descongelado rápidamente a 37°C.

# Medición del LA

- Quiénes deben ser estudiados?
- Variables pre analíticas
- **Que pruebas están recomendadas?**
- Cuál es el criterio diagnóstico?
- Cuándo es posible el estudio?
- Cómo informar el resultado?

# Medición del LA: pruebas diagnósticas

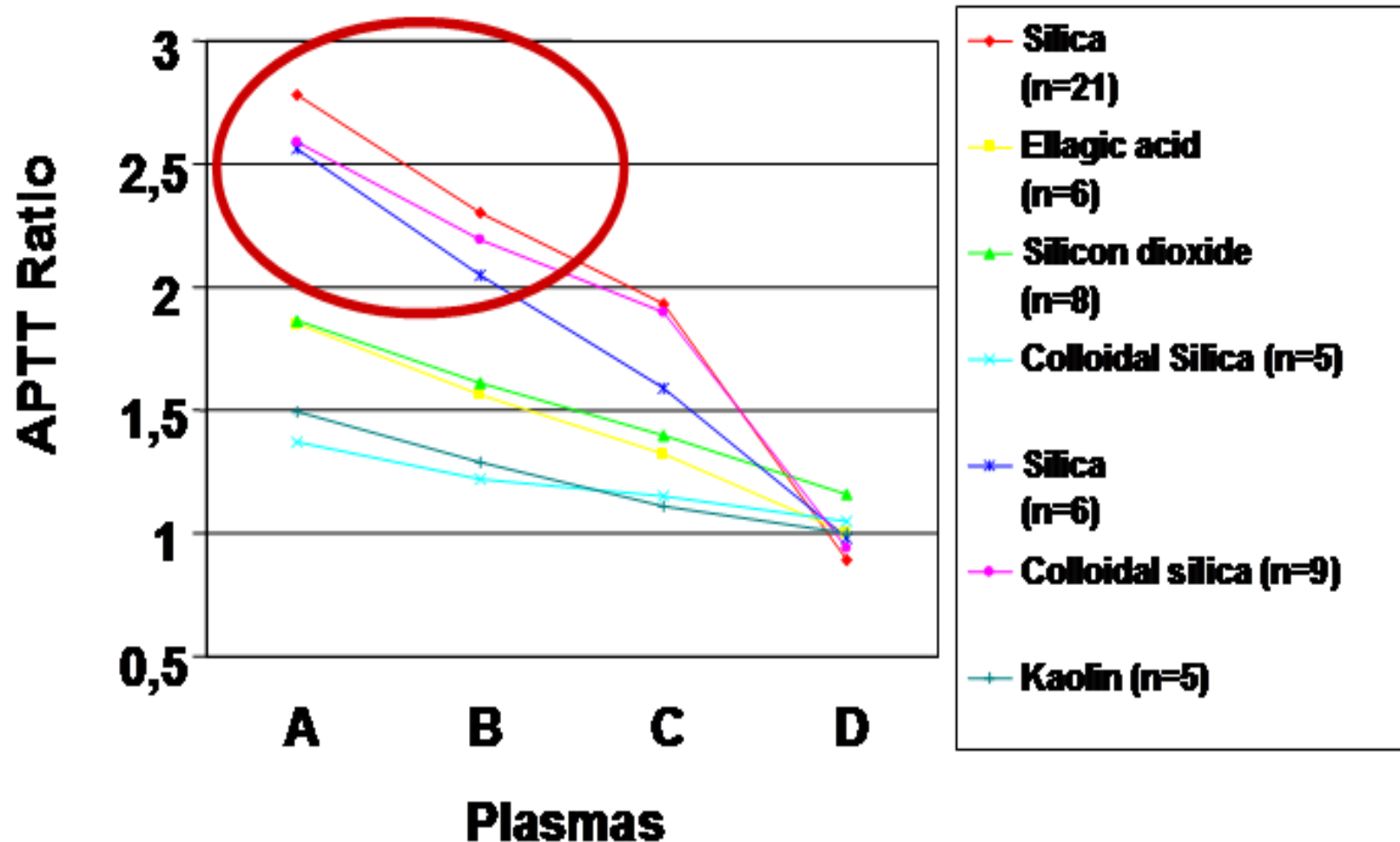
- Tiempo de veneno de víbora de Russell diluído (dRVVT).
- aPTT sensible (baja concentración de fosfolípidos y sílica como activador).

**LA debe ser considerado si al menos uno de los dos test da positivo**



# APTT Responsiveness to LA

Tripodi et al, Clin Chem 2003



# Medición del LA

- Quiénes deben ser estudiados?
- Variables pre analíticas
- Que pruebas están recomendadas?
- **Cuál es el criterio diagnóstico?**
- Cuándo es posible el estudio?
- Cómo informar el resultado?

# Medición del LA: criterio diagnóstico

- No está disponible una prueba específica para detectar el LA...

Por lo tanto, el diagnóstico debe estar basado en...

Un “**criterio diagnóstico**”

# LA: Criterio diagnóstico

- Screening
  - Prolongación de uno (o mas) pruebas de coagulación dependientes de fosfolípidos
- Pruebas de mezcla
  - Evidenciar que la prolongación es debida a la presencia de un inhibidor
- Confirmación
  - Evidenciar que el inhibidor está dirigido hacia los fosfolípidos

# Reglas generales para la interpretación de los resultados

- Determinar valores de corte locales
- Utilizar plasmas control positivos y negativos para validar el valor de corte local

# Screening Interpretación

- Los resultados de los test de screening sugieren la presencia de LA cuando los tiempos de coagulación son mas prolongados que el valor de corte local.

# Pruebas de mezcla

## Recomendaciones

- El pool de plasmas normales (PPN) preferentemente preparado en el momento.
- La proporción paciente:PPN debe ser 1:1 y la prueba debe ser efectuada sin preincubación dentro de los 30 minutos.

# Pruebas de mezcla

## Puntos de corte

- Efectuar la prueba con la mezcla de al menos 40 dadores sanos y PPN en proporción 1:1 sin preincubar
- Tomar el punto de corte como el valor por encima del percentil 99 de la distribución.
- Alternativamente el punto de corte puede ser el índice de anticoagulante circulante (IAC) definido como:

$$\gg \text{IAC} = [(\text{TC}_{\text{MIX}} - \text{TC}_{\text{PPN}}) / \text{TC}_{\text{PT}}] \cdot 100$$

Mix: mezcla

PT plasma de dadores sanos



# Pruebas de mezcla

## Interpretación

- Los resultados de los test de mezclas sugieren LA cuando:
  - Los tiempos de coagulación son mayores que el punto de corte.
    -
  - Cuando el IAC es mayor que el valor de corte local.

# Confirmación

- Incrementar la concentración de fosfolípidos en los test de screening.
- Efectuar la prueba con al menos 40 dadores sanos a baja (screen) y alta (confirm) concentración de fosfolípidos.
- Tomar el punto de corte como el valor medio de los porcentajes de corrección individuales definidos por la ecuación:

$$\gg \%C = [(TC_{\text{screen}} - TC_{\text{confirm}}) / TC_{\text{screen}}] \cdot 100$$

# Interpretación

Los resultados son confirmatorios de LA si el porcentaje de corrección está por encima de valor de corte local.

# Medición del LA

- Quiénes deben ser estudiados?
- Variables preanalíticas
- Que pruebas están recomendadas?
- Cuál es el criterio diagnóstico?
- **Cuándo es posible el estudio?**
- Cómo informar el resultado?

# Medición del LA: Fase aguda de eventos tromboembólicos

- Precaución en la interpretación de los resultados
  - Pacientes pueden estar tratados con heparina o antagonistas de la vitamina K (AVK).
  - Reactantes de fase aguda pueden estar incrementados (ejemplo: factor VIII).

# Efecto de los AVK

- Efectuar las pruebas en una o dos semanas luego de discontinuar la terapia o cuando el RIN es menor a 1.5.
- La rotación a HBPM es una alternativa válida.
- Si el RIN esta entre 1.5 y 3.0 la opción es diluir 1:1 con PPN.

# Efecto de la Heparina

- No es posible detectar el LA si la concentración de heparina excede la capacidad neutralizante del reactivo.
- El tiempo de trombina ayuda
- Screening para LA tratados con HBPM es posible

# Efecto de otras drogas

- El efecto de inhibidores directos del factor IIa o del factor Xa es desconocido.
- No hay interferencia por aspirina o clopidogrel.



# LA: cómo informarlo?

- Los resultados del screening, ensayos de mezcla y confirmatorios deberían ser normalizados.
- El informe debería incluir los resultados analíticos y una conclusión (presencia/ausencia de LA).
- No efectuar comentarios como borderline o dudoso (repetir el test en una semana)

# Recomendación final

- Un resultado de LA debe ser siempre considerado en el contexto de un perfil completo de laboratorio que incluya:
  - Anticuerpos anticardiolipina
  - Anticuerpos anti  $\beta$ 2 glicoproteína I

# Triple positividad

- La triple positividad (LA + títulos moderados o altos de aCL y a $\beta$ 2GPI), identifica a pacientes con alto riesgo de trombosis.

	<i>n</i>	<i>Thrombosis (n)</i>	<i>Rate of thrombosis (% pat-year)</i>	<i>Multivariate Hazard ratio (95% CI)</i>	<i>p</i>
LA	30	2	1.6	reference	-
LA + aPT	34	5	5.5	1.59 (0.95-2.15)	0.22
LA + a $\beta$ <sub>2</sub> GPI	29	7	5.6	1.62 (1.00-2.39)	0.08
LA + aPT + a $\beta$ <sub>2</sub> GPI	49	19	8.4	2.60 (1.35-5.01)	0.004

# Mas aún...

<b>LA/aCL/a<math>\beta_2</math>GPI</b>	<b>APS</b>	<b>Non-APS</b>	<b>P OR (95%CI)</b>
<b>Type I (any combination)</b>	<b>61 (62.9%)</b>	<b>32 (35.5%)</b>	<b>0,0002 3.1 (1.7-5.6)</b>
<b>LA/aCL/a<math>\beta_2</math>GPI/aPT</b>			
<b>+/+/+/-</b>	<b>35 (36.1%)</b>	<b>12 (13.3%)</b>	<b>0,0004 3.7 (1.7-7.6)</b>
<b>+/+/+/+</b>	<b>26 (26.8%)</b>	<b>4 (4.4%)</b>	<b>&lt;0.0001 7.9 (2.6-23.6)</b>

# Nuevas propuestas para el diagnóstico de SAF

# Critical Update of the Antiphospholipid Syndrome Criteria

Vittorio Pengo<sup>\*,1</sup> and Amelia Ruffatti<sup>2</sup>

*The Open Autoimmunity Journal*, 2010, 2, 18-20

## Patients with **Thromboembolic Events**

- Consider triple positive patients (LA positive, IgG or IgM aCL >40 GPL, IgG or IgM a $\beta_2$ GPI >99<sup>th</sup> percentile) as a high risk population related to a single pathogenic autoantibody (definite APS).
- Consider double positivity (LA negative and aCL >40 GPL, a $\beta_2$ GPI >99<sup>th</sup> percentile, same isotype) as probably APS in low risk patients.
- Consider single positivity for LA, aCL or a $\beta_2$ GPI antibodies as non APS patients. More information from clinical studies on homogeneous cohort of patients with single positivity is needed.

# Critical Update of the Antiphospholipid Syndrome Criteria

Vittorio Pengo<sup>\*,1</sup> and Amelia Ruffatti<sup>2</sup>

*The Open Autoimmunity Journal*, 2010, 2, 18-20

## Patients with **Pregnancy Morbidity**

- Consider triple positive patients (LA positive, IgG or IgM aCL >40GPL, IgG or IgM a $\beta_2$ GPI >99<sup>th</sup> percentile) as a high risk population related to a single pathogenic autoantibody (definite APS).
- Consider double positivity (LA negative and aCL and a $\beta_2$ GPI >99<sup>th</sup> percentile, same isotype) or single positivity for aCL (>99<sup>th</sup> percentile) or for a $\beta_2$ GPI (>99<sup>th</sup> percentile) as possible obstetric APS. More information from clinical studies on homogeneous cohort of patients with single positivity is needed.

# 13th APLA Congress 2010 (Galveston, USA), propuestas 2010

- Anticuerpos anti complejo fosfatidilserina-protrombina (APS/PT) están asociados con el SAF y son tan prevalentes como las ACL
- En el futuro, el ensayo podría formar parte del diagnóstico del SAF



- **56<sup>th</sup> SSC Meeting, ISTH, Cairo, Egypt, May 2010**

- **Realizar un ensayo internacional multicéntrico para evaluar la utilidad del ensayo funcional de resistencia a la anexina A5 en el diagnóstico de pacientes con SAF**
- **Confirmar la relevancia clínica del ELISA a $\beta$ 2GPI anti-dominio I**

# Conclusiones

- Número de test positivos: relación directa con el riesgo
- El patrón de positividad múltiple: alto riesgo trombótico
- $\alpha\beta 2$ GPI anti-dominio I: epitope antigénico en SAF
- Anticuerpos anti complejo fosfatidilserina-protrombina: podrían incluirse en el diagnóstico

**“Si Ud. pretende agotar  
un tema, solamente  
conseguirá agotar a la  
audiencia”**

**Oscar Wilde**