

Puntos de corte de ensayos para anticuerpos antifosfolípidos y valor clínico del Inhibidor Lúpico Débil

Forastiero R.R.

*Departamento de Fisiología.
Universidad Favaloro, CABA.*

rforastiero@favaloro.edu.ar

*Fecha de recepción: 30/04/2013
Fecha de aprobación: 15/05/2013*



YO
OPINO

HEMATOLOGÍA, Vol. 17 N°2: 142-146
Mayo - Agosto 2013

RESUMEN

El síndrome antifosfolípido (SAF) es una enfermedad autoinmune que se define por la presencia de anticuerpos antifosfolípidos (aFL) en el plasma de pacientes con complicaciones trombóticas y/o con morbilidad obstétrica. Los aFL son detectados como actividad de anticoagulante lúpico (AL) o a través de ensayos en fase sólida como anticuerpos anticardiolipina (aCL) o anti- β 2 glicoproteína I ($\alpha\beta$ 2GPI). La interpretación de los resultados aCL y $\alpha\beta$ 2GPI depende, entre otros aspectos, de la definición de los puntos de corte.

Es importante establecer el punto de corte normal y además el punto de corte clínico o sea aquel que tiene implicancia en el diagnóstico del SAF. Valores de los ELISAs por encima del punto de corte normal pero menores que el punto de corte clínico, al igual que la presencia de AL con actividad débil, tienen poca o nula significación clínica.

Palabras claves: anticuerpos antifosfolípidos, anticoagulante lúpico, síndrome antifosfolípido, trombosis

ABSTRACT

The antiphospholipid syndrome (APS) is an autoimmune disease defined by the presence of antiphospholipid antibodies (aPL) in patients with thrombotic complications and/or pregnancy morbidity. aPL are detected as lupus anticoagulant (LA) or anticardiolipin (aCL) or anti- β 2 glycoprotein I antibodies ($\alpha\beta$ 2GPI) by solid-phase assays. The interpretation of aCL and $\alpha\beta$ 2GPI results depends on the cut-off points of the assays.

It is important to establish the normal cut-off as well as the clinical cut-off point which is related to the APS diagnosis. Values above the normal cut-off but below the clinical cut-off point as well as the presence of weak LA have very little clinical significance.

Key words: antiphospholipid antibodies, lupus anticoagulant, antiphospholipid syndrome, thrombosis

DEFINICIÓN Y CRITERIOS DE LABORATORIO DEL SÍNDROME ANITFOSFOLIPIDO

El síndrome antifosfolípido (SAF) es una enfermedad autoinmune que se define por la presencia de anticuerpos antifosfolípidos (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). Recientemente el consenso de expertos ha actualizado los criterios clínicos y de laboratorio para diagnosticar este síndrome^{1,2}. Los aFL en el plasma de

pacientes pueden ser detectados como actividad de anticoagulante lúpico (AL) 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-β₂ glicoproteína I (aβ₂GPI). 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 del laboratorio. Los aCL y/o aβ₂GPI de isotipo IgG y/o IgM deben estar presentes en títulos moderados o altos (Tabla 1).

Tabla 1: Criterios de laboratorio del SAF (2006)

1. aCL (IgG y/o IgM)	título moderado o alto (>40 GPL o MPL, o >99th percentilo), en al menos 2 oportunidades separadas más de 12 semanas, por ELISA estandarizado para medir aCL dependientes de β ₂ GPI
2. Anticoagulante lúpico	en al menos 2 oportunidades separadas más de 12 semanas (guías ISTH)
3. aβ₂GPI (IgG y/o IgM)	(>99th 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 AL
IIb	sólo aCL
IIc	sólo aβ ₂ GPI

DEFINICIÓN DE PUNTOS DE CORTE Y GRADOS DE POSITIVIDAD

Anticuerpos antifosfolípidos por ensayos inmunológicos

Los ensayos para detectar aCL y aβ₂GPI muestran en general una estandarización no muy adecuada. Hay problemas analíticos como por ejemplo el tipo y origen de los antígenos usados, el método de calibración, el tipo de calibradores, los puntos de corte, etc. Además hay problemas post-analíticos como la manera de informar los resultados y la interpretación de los mismos. En distintos estudios multicéntricos realizados en los últimos años se corrobora la falta de concordancia entre los resultados usando distintos equipos comerciales³⁻⁵. Uno de los principales inconvenientes es la falta de disponibilidad de calibradores para ser usados en todos los ensayos comerciales para aCL y aβ₂GPI. Uno de los grupos de trabajo del 13th International Congress on aPL publico recientemente sus recomendaciones en este tema e inicio los acuerdos con una organización europea de materiales de referencia para la

producción de calibradores policlonales y monoclonales para usar en ambos ensayos⁶. Las unidades de expresión recomendadas son GPL y MPL para aCL de isotipo IgG e IgM. Para aβ₂GPI no hay aun unidades de consenso pero se está en proceso de obtener unidades internacionales.

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 congreso de aFL que se llevó a cabo en Galveston, USA en 2010 hubo varios ensayos que se probaron en un workshop de laboratorio. Entre ellos dos ensayos totalmente automatizados (Fluoroenzyme immunoassay y Chemiluminescent immunoassay) para la detección individual de aCL y aβ₂GPI (IgG e IgM). Además un ensayo que utiliza microesferas recubiertas con diferentes antígenos que permite la detección simultanea de aCL y aβ₂GPI (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 sensibili-

dad y especificidad clínica. Muy buena reproducibilidad y excelente comparación de resultados con los ensayos de referencia para aFL⁷.

El tema de los puntos de corte de los ensayos inmunológicos sigue siendo controvertido. La última recomendación sugiere calcular el percentilo 99 de la distribución de resultados en población normal². 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 1996⁸ que demostró por primera vez que el riesgo tromboembólico solo se asociaba a valores de aCL mayores a 40 unidades. Valores entre el punto de corte negativo (< percentilo 99) y 40 unidades se deben informar como indeterminados (significación clínica incierta)⁹. Esto es similar a lo que anteriormente se denominaba “título positivo bajo” (Tabla 2).

Tabla 2: Algunas consideraciones respecto a los puntos de corte y grados de positividad

Punto de corte normal	percentilo 99 (método no paramétrico)	utilizar sueros de individuos sanos sin historia de trombosis ni complicaciones obstétricas
Punto de corte clínico	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)
Título		
negativo		< percentilo 99 normal
indeterminado		> percentilo 99 normal < punto de corte clínico
positivo		> punto de corte clínico

El rango de normalidad o referencia debe ser determinado en cada laboratorio con población normal (30-50 sueros) y así chequear si el punto de corte negativo/positivo (percentilo 99) propio se correlaciona con el recomendado en el equipo comercial en uso^{10,11}. Además debería determinarse el punto de corte clínico el cual 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)¹¹.

Este último concepto es fundamental a la hora de informar e interpretar los resultados. El informe debe contener los resultados numéricos en unidades pero además los rangos semicuantitativos que incluyen la interpretación de esos resultados. De esta manera se deben incluir los grados de positividad como negativo, indeterminado y positivo. El grado positivo puede indicarse además como moderado o fuerte.

El riesgo tromboembólico asociado a aCL y aβ2GPI se incrementa en forma paralela con el título de anticuerpos. En un estudio canadiense¹² se encontró que títulos de aCL IgG <21 GPL se asociaban a bajo (7%) riesgo de trombosis, mientras que

títulos entre 21-65 GPL se asociaban a un riesgo mayor (20%) que se incrementaba aún más (75%) con título de aCL IgG >65 GPL.

En manera similar, el riesgo tromboembólico se incrementa 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 (AL + aβ2GPI + aCL) confiere un mayor riesgo al desarrollo del primer evento de trombosis o a la recurrencia tromboembólica¹³⁻¹⁵. En base a estos hallazgos se ha propuesto una nueva modificación (Tabla 3) en como categorizar a los pacientes con aFL tanto con enfermedad trombotica como mujeres con complicaciones obstétricas¹⁶.

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 casos¹⁷.

Algo importante que se sugiere incluir en los informes son ciertas recomendaciones o interpretaciones. Por ejemplo indicar que el riesgo clínico se asocia en particular con un ensayo determinado o

Tabla 3: Nueva propuesta de categorización del SAF

Pacientes con enfermedad tromboembólica		Riesgo clínico
SAF	Triple positividad (AL, aCL y a β ₂ GPI)	Alto
Probable SAF	Doble positividad (aCL y a β ₂ GPI sin AL)	Moderado
No SAF	Simple positividad (solo AL o aCL o a β ₂ GPI)	Bajo
Pacientes con complicaciones obstétricas		
SAF	Triple positividad (AL, aCL y a β ₂ GPI)	
Probable SAF	Doble positividad (aCL y a β ₂ GPI sin AL) o simple positividad	

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 (AL o a β 2GPI si el informe es de aCL)^{9,18}.

Anticoagulante lupico

En el año 2009 se publicó una guía para la realización del AL ya que las últimas eran del año 1995¹⁹. Estas últimas no reemplazan las anteriores sino más bien tienen el objetivo de reforzar algunos conceptos de la práctica diaria. El Subcomité científico de estandarización de anticoagulante lupico/aFL de la ISTH enfatiza varios aspectos a tener en cuenta:

- la selección de pacientes para minimizar los pedidos inapropiados de AL
- los métodos de procesamiento de las muestras de sangre
- la elección de ensayos de detección se limita al dRVVT y APTT sensible a AL
- el cálculo de los puntos de corte recomendados para cada etapa del diagnóstico de laboratorio
- la interpretación de los resultados en situaciones generales y particulares

Estas nuevas guías fueron validadas recientemente en lo que respecta a la sensibilidad y especificidad de los puntos de corte tanto de los ensayos de detección como de los confirmatorios²⁰.

En lo que respecta a lo que llamamos AL débil no hay consenso en cómo definirlo y en realidad surge en el laboratorio como una impresión diagnóstica basada en los resultados obtenidos. Entre las causas posibles están la calidad no adecuada del plasma pobre en plaquetas, la sensibilidad de los reactivos y

por supuesto las propiedades del anticuerpo²¹. Desde mi punto de vista se debe considerar la presencia de un AL débil cuando se obtiene prolongación de solo una de las 2 o 3 pruebas de detección usadas (APTT, dRVVT o tiempo de protrombina con tromboplastina diluida) o las prolongaciones de las pruebas no son muy pronunciadas aunque alcance para definir la presencia del AL. 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 a β 2GPI) en sangre. La mayoría de los casos de pacientes con AL débil dan resultados negativos en los ensayos de aCL y a β 2GPI.

En nuestra experiencia y también en lo recientemente publicado, los AL sin aCL y a β 2GPI tienden a ser transitorios y se negativizan a los 6-12 meses^{13,17}. El significado clínico de los AL débiles es por lo tanto de escasa relevancia y con bajo potencial como factor de riesgo. En la interpretación de los resultados de los ensayos inmunológicos como en los de coagulación es fundamental el criterio y la experiencia del profesional que informa los datos.

CONCLUSIONES

La interpretación de los resultados de los ensayos inmunológicos para aCL y a β 2GPI depende, entre otros aspectos, de la definición de los puntos de corte. Es importante establecer el punto de corte normal pero además el punto de corte clínico o sea aquel que tiene implicancia en el diagnóstico del SAF. Valores de los ELISAs por encima del punto de corte normal pero menores que el punto de corte clínico, al igual que la presencia de AL con actividad débil, tienen poca o nula significación clínica. 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.

Declaración de conflictos de intereses

El autor declara no poseer conflictos de intereses

BIBLIOGRAFÍA

- Levine JS, Branch DW, Rauch J. The antiphospholipid syndrome. *NEJM* 2002; 346: 752-63.
- Miyakis S, Lockshin D, Atsumi T y col. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost* 2006; 4: 295-306.
- Forastiero RR, Blanco AN, Otero AM. Estudio interlaboratorio de los ensayos para anticuerpos antifosfolípidos. *Hematología* 2002; 6: 27-35.
- Favaloro E, Wong R, Silvestrini R y col. 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.
- Reber G, Tincani A, Sanmarco M y col. 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.
- Pierangeli SS, Favaloro EJ, Lakos G y col. Standards and reference materials for the anticardiolipin and anti-B2 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.
- Forastiero R, Papalardo E, Watkins M y col. 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* 2013; (en prensa).
- Finazzi G, Brancaccio V, Moia M y col. 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.
- Lakos G, Favaloro E, Harris EN y col. International consensus guidelines on anticardiolipin and anti-B2-glycoprotein I testing. Report from the 13th International Congress on Antiphospholipid Antibodies. *Arthritis Rheum* 2012; 64: 1-10.
- Montaruli B, De Luna E, Mengozzi G y col. Anticardiolipin and anti-B2-glycoprotein I antibodies: normal reference in northwest Italy. *Lupus* 2012; 21: 799-801.
- Devreese K. Anticardiolipin and anti-B2-glycoprotein I cut-off values in the diagnosis of antiphospholipid syndrome: more than calculating the in-house 99th percentiles, even for new automated assays. *Thromb Res* 2011; 128:598-600.
- Neville C, Rauch J, Kassis J y col. Thromboembolic risk in patients with high titre anticardiolipin and multiple antiphospholipid antibodies. *Thromb Haemost* 2003; 90: 108-115.
- Forastiero R, Martinuzzo M, Pombo G y col. A prospective study of antibodies to B2 glycoprotein I and prothrombin and risk of thrombosis. *J Thromb Haemost* 2005; 3: 1231-8.
- Pengo V, Ruffatti A, Legnani C y col. Clinical course of high-risk patients diagnosed with antiphospholipid syndrome. *J Thromb Haemost* 2010; 8: 237-42.
- Pengo V, Ruffatti A, Legnani C y col. 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, Banzato A, Bison E, Denas G, Padayattil S, Ruffatti A. Antiphospholipid syndrome: critical analysis of the diagnostic path. *Lupus* 2010; 19: 428-31.
- Pengo V, Ruffatti A, Del Ross T y col. Confirmation of the initial of the antiphospholipid antibody positivity depends on antiphospholipid antibody profile. *J Thromb Haemost* 2013 (en prensa).
- Wong RC, Gilis D, Adelstein S y col. Consensus guidelines on anti-cardiolipin antibody testing and reporting. *Pathology* 2004; 36: 63-8.
- Pengo V, Tripodi A, Reber G y col. 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.
- 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.
- Pierangeli S, de Groot PG, Dlott J y col. 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.