

Deteción de anticoagulante lúpico en mujeres con complicaciones obstétricas: sensibilidad y especificidad de las pruebas.

Lupus anticoagulant detection in women with obstetric complications: Sensitivity and Specificity of the test

Avigliano AL, Grand BE.

Unidad de Hematología y Hemostasia. Consultorio de Hematología, Hemostasia y Trombosis. Stambouliau Laboratorio. CABA, Argentina

andavigliano@gmail.com

Fecha de recepción: 04/06/2015
Fecha de aprobación: 06/08/2015



ARTÍCULO ORIGINAL

HEMATOLOGÍA: 112 - 117
Volumen 19 n° 2
Mayo - Agosto 2015

Resumen

El anticoagulante lúpico (AL) es uno de los criterios de laboratorio para el diagnóstico de síndrome antifosfolípido. Para detectar la presencia de AL, la Sociedad Internacional de Hemostasia y Trombosis (ISTH) recomienda realizar dos ensayos basados en principios diferentes. Nuestro perfil incluye el tiempo de veneno de víbora rúsel diluido (TVVRd), y dos reactivos diferentes de tiempo de tromboplastina parcial activado (TTPa). Trabajamos con un reactivo casero para el tiempo de neutralización con plaquetas (PNP) para el TTPa y TVVRd. El objetivo del estudio fue evaluar sensibilidad (S) y especificidad (E) de TTPa y TVVRd en mujeres con antecedentes de complicaciones obstétricas. 172/287 muestras (59.9%) fueron negativas, mientras que 115/287 muestras (40.1%) fueron positivas para AL. 44/115 muestras (38.26%) fueron positivas para los dos pruebas (TTPa y TVVRd), 60/115 mues-

tras (52.17 %) fueron positivas sólo para TVVRd y 11/115 muestras (9.57%) fueron positivas sólo para TTPa. AL se confirmó en 9/62 mujeres embarazadas (14.5 %), 7 (11.3%) presentaron TVVRd anormal, las 2 muestras restantes resultaron positivas para las dos pruebas. La S y E fueron 57.4 y 94.8 respectivamente para TTPa (Cefalina), 58.3 y 91.9 para PTT-LA, Stago y 87.0 y 100 para TVVRd. Nuestros resultados demuestran que a pesar de mostrar un bajo desempeño en relación a la sensibilidad, cuando se compararon con el TVVRd ambos TTPa permitieron la detección de AL en el 47.83% de los estudios positivos.

Palabras claves: anticoagulante lúpico, especificidad, sensibilidad,

Abstract

Lupus anticoagulant (LA) is one of the laboratory criteria for the diagnosis of antiphospholipid syndrome. To detect the presence of LA, ISTH recommends performing two assays based on different principles. Our LA profile includes dilute russell viper venom time (dRVVT) and two different activated partial thromboplastin time (aPTT) reagents. We performed a home made reagent for platelet neutralization procedure (PNP)-aPTT and dRVVT. The aim of the study was to evaluate sensitivity (S) and specificity (SP) of aPTT and dRVVT in women with a history of placenta mediated complications. 172/287 samples (59.9%) were negative, while 115/287 samples (40.1%) were positive for LA. 44/115 samples (38.26%) were positive for both tests (aPTT and dRVVT), 60/115 samples (52.17 %) were positive

only for dRVVT and 11/115 samples (9.57%) were positive only for aPTT. LA was confirmed in 9/62 pregnant women samples (14.5 %). 7 (11.3%) had abnormal dRVVT, the remaining 2 samples were positive for both tests. S and SP were 57.4 and 94.8 respectively for aPTT (Cephalin), 58.3 and 91.9 for aPTT (PTT-LA, Stago) and 87.0 and 100 for dRVVT. Our results demonstrated that despite showing a low performance regarding sensitivity when compared to dRVVT, both aPTT tests were able to detect LA in 47.83% of the positive studies.

Key words: lupus anticoagulant, specificity, sensitivity.

Introducción

Los abortos recurrentes y las complicaciones vasculoplacentarias como la muerte fetal, la restricción en el crecimiento intrauterino idiopático y la preeclampsia antes de semana 34, son criterios clínicos obstétricos del Síndrome Antifosfolípido (SAF) ⁽¹⁾, su adecuado diagnóstico es un prerrequisito para el óptimo manejo clínico. El "anticoagulante lúpico" (AL) es uno de los criterios de laboratorio utilizado en el diagnóstico del SAF.⁽²⁾

El término AL se utiliza para denominar una serie de anticuerpos heterogéneos de subclase IgG o IgM que inhiben ensayos de coagulación dependientes de fosfolípidos a través de la unión de éstos a proteínas específicas tales como β 2-glicoproteína I o protrombina.⁽³⁾

El subcomité de AL y anticuerpos dependientes de fosfolípidos de la Sociedad Internacional de Trombosis y Hemostasia (ISTH), publicó recomendaciones y criterios metodológicos de laboratorio que incluyen:⁽⁴⁾

1. Prueba de "tamizaje" que demuestre la prolongación de un tiempo de coagulación dependiente de fosfolípidos.

2. Prueba de mezcla que confirme la presencia de un inhibidor.
3. La confirmación de que el inhibidor es dependiente de fosfolípidos y la exclusión de otras coagulopatías.

Para detectar la presencia de AL, el Subcomité Científico de la ISTH recomienda la realización de dos pruebas basadas en principios diferentes. En nuestro laboratorio el perfil comprende el tiempo de veneno de víbora Russel diluido (TVVRd) y el uso de dos pruebas de tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPa).^(4, 6)

En relación a la sensibilidad (S) y especificidad (E) para la detección del AL, son numerosas las publicaciones que mencionan su dependencia a los distintos reactivos, los valores de corte y la interpretación de los resultados. Por otra parte, el grado de corrección de los estudios de mezcla depende también de la S del reactivo y de la concentración de factores de coagulación presentes en el plasma control negativo utilizado. Considerando que estas variaciones en los resultados de las pruebas pueden afectar decisiones clínicas durante el tratamiento, es recomendable que

los laboratorios determinen de forma individual la S y E de sus reactivos en uso. Este procedimiento puede mejorar la interpretación de resultados y disminuir el informe de resultados falsos negativos y falsos positivos.

Objetivo

Evaluar la S y E de los ensayos de TVVRd y TTPa en mujeres con historia de abortos recurrentes y complicaciones vasculoplacentarias (preeclampsia, muerte fetal, restricción en el crecimiento intrauterino idiopático).

Materiales

Diseño del estudio:

Todas las pacientes estudiadas tenían solicitud de anticoagulante lúpico en la orden médica. Cuando la paciente llega al laboratorio, se recepciona la orden y se transcriben los test solicitados, los datos demográficos, las observaciones y el diagnóstico clínico presuntivo al sistema informático del laboratorio. La paciente ingresa luego al box de extracciones donde el técnico extraccionista visualiza en la pantalla de su computadora todos los datos ingresados, datos a los que también tiene acceso a través del sistema informático del laboratorio el bioquímico que procesa la muestra. Para realizar este estudio, se extrajeron de dicha base de datos los resultados de anticoagulante lúpico estudiados en un total de 247 pacientes y 287 muestras. Del total de las 247 muestras, 62 fueron recolectadas durante el embarazo.

Métodos

Las muestras se recolectaron en un período de 10 meses y se procesaron por duplicado durante un período de 3 meses.

Estudios de Laboratorio: Las pruebas de tamizaje y mezclas se procesaron en un coagulómetro STA Compact (Stago), para efectuar las pruebas de neutralización con plaquetas se utilizó un coagulómetro ST Art (Stago).

Pruebas de tamizaje:

-El TTPa se procesó usando PTT-LA (Stago) y un reactivo con cefalina diluida de fabricación casera.

-El TVVR se procesó con un veneno de víbora de Russel (VVRd) (Stago) y cefalina diluida.

-Pruebas de Mezclas: El plasma control negativo se preparó de acuerdo a las recomendaciones de la ISTH para las pruebas de mezclas, y el Índice de Rosner y % de corrección se utilizaron como criterios de interpretación.

-Pruebas confirmatorias: Se preparó una prueba de fabricación casera para el ensayo de neutralización con plaquetas (PNP)-TTPa y TVVRd.

Evaluación estadística: Se realizó por el método de ROC (Receiver Operating Characteristic) usando el Software EP Evaluator 9.9

Resultados

El 59.9% (172/287) de las muestras (59.9%) fueron negativas, mientras que el 40.1 % (115/287) fueron positivas para AL.

La positividad de acuerdo con los ensayos utilizados mostró que en 44/115 muestras (38.26%) fueron positivas para ambas pruebas (TTPa and TVVRd), en 60/115 muestras (52.17%) fueron positivas sólo para la prueba de TVVRd y en 11/115 solamente para el aPTT.

En las mujeres estudiadas en el curso del embarazo el AL fue confirmado en 9/62 muestras (14.5%). En 7 (11.3%) el TVVRd fue anormal y las dos muestras restantes fueron positivas para los dos pruebas.

Para la interpretación de las pruebas de mezclas de los resultados positivos, se calculó el índice de Rosner, $RI = (Mezcla-N)/P \times 100$; $\times 100$ y el porcentaje de corrección $\%C = (P-Mezcla)/(P-N) \times 100$. (media 17.16%, 8.94 2SD). En la tablas 1 y 2 y en el gráfico 1 se describen los resultados del análisis de las curvas.

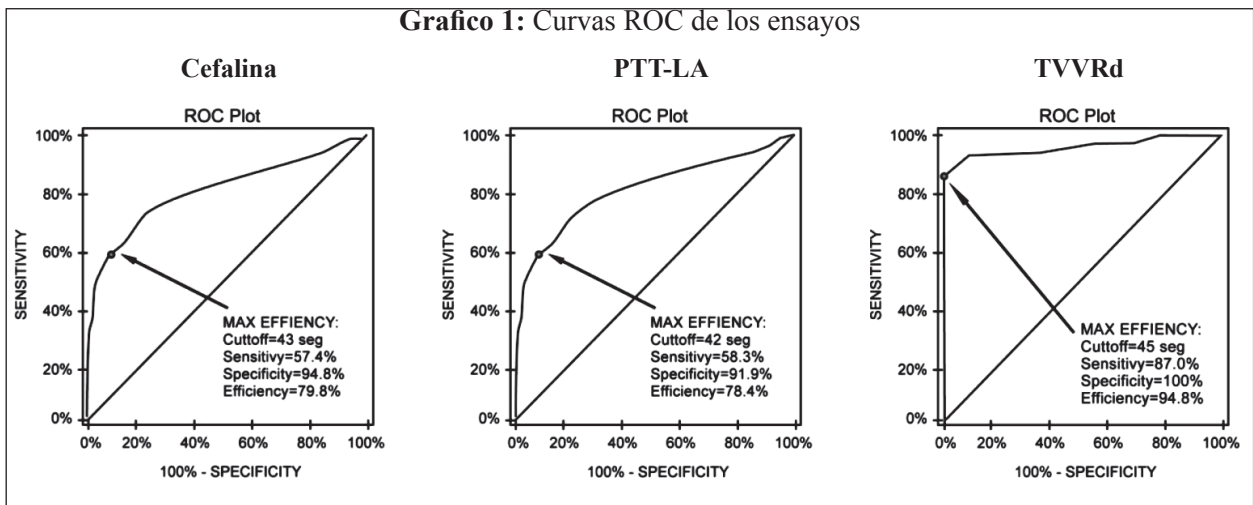
Tabla 1: Análisis de Curvas ROC (Receiver Operating Characteristic):

	Cefalina Casos Negativos	Cefalina Casos Positivos	PT T-LA Casos Negativos	PTT-LA Casos Positivos	TVVRd Casos Negativos	TVVRd Casos Positivos
Media	37.9	44.3	37.6	43.8	39.0	48.9
DS (desvío estándar)	2.6	6.7	2.6	6.4	2.8	5.1
Rango	32-47	32-70	32-47	32-68	32-44	37-68
Tamaño de la muestra	172	115	172	115	172	115
Prevalencia	59.9%	40.1%	59.9%	40.1%	59.9%	40.1%
Unidades	seg	seg	seg	seg	seg	seg
ABC (área bajo la curva)	0.812		0.813		0.964	

Tabla 2: Curva ROC Abreviada

Número de especímenes														
	Cut off	Sensibilidad % 95%CI		Especificidad		Verd Pos	Falso Pos	Verd Neg	Falso Neg	Coeficiente de probabilidad		Valor Predictivo		
Cefalina	>=43	57.4	48.3-66.0	94.8	90.4-97.2	66	9	163	49	10.97	0.45	88.0	76.9	79.8
PTT-LA	>=42	58.3	49.1-66.9	91.9	86.8-95.1	67	14	158	48	7.16	0.45	82.7	76.7	78.4
TVVRd	>=45	87.0	79.8-91.9	100	97.8-100	100	0	172	15	--	0.13	100	92.0	94.8

Grafico 1: Curvas ROC de los ensayos



Discusión:

La detección del AL asociado a una complicación obstétrica define el SAF. Esto demuestra la importancia de su adecuada detección. El peso que cae sobre esta determinación es clínicamente tan importante entre los hematólogos que define la conducta terapéutica del paciente. Su detección depende de cómo las pruebas para detectarlo son efectuadas y cuál es la combinación de pruebas utilizadas. En nuestra práctica inicial con pacientes obstétricos encontramos que la prueba de veneno de víbora Russel diluido era la prueba positiva con mayor frecuencia cuando se busca el AL en embarazadas con hipertensión inducida por el embarazo y restricción en el crecimiento intrauterino.⁽⁷⁾ Este dato nos llevó a contestar el trabajo de Lockwood y col.⁽⁸⁾ quienes sólo utilizaban el tiempo de tromboplastina parcial activado para la detección del AL en patologías obstétricas. Han pasado ya casi 25 años de esta carta al editor⁽⁹⁾ y las dificultades en su determinación siguen estando presentes en las mesas de trabajo sobre SAF.^(3, 11) Existen afortunadamente en la actualidad

varias guías que recomiendan las pruebas a usar y cuál es la estandarización sugerida.⁽¹⁰⁾ Si bien hasta el momento al AL sigue estando como criterio en el mismo nivel que el resto de los anticuerpos detectados por ELISA, la presencia de un AL positivo desde un punto de vista clínico tiene un valor mucho más significativo. Sin embargo aún no podemos claramente saber cuál va a ser más patogénico que otro. Solo la positividad persistente es tomada como requisito. Tampoco se sabe porque hay pacientes con patologías obstétricas de importancia que nunca son positivos, otros que siempre lo son y un grupo que oscilan entre resultados positivos y negativos(en un mismo centro y con igual metodología).* Todo lo dicho con anterioridad destaca la importancia de que cada centro o laboratorio pueda conocer la sensibilidad y especificidad de las pruebas y determinar sus guías de trabajo. Varios reportes de la bibliografía vinculan las variaciones de sensibilidad del APTT al AL con la composición de los reactivos y su concentración de

fosfolípidos^(2,3) así como el impacto que esta variabilidad ocasiona en la detección del AL débil.^(2,4)

En este grupo de pacientes, los reactivos de APTT utilizados (cefalina y PTT-LA) mostraron una probabilidad similar de detección de enfermedad cuando está presente, (se refiere a sensibilidad clínica) (S 57.4% y 58.3% respectivamente) estos resultados explican el grado similar de falsos negativos para ambos ensayos (49% and 48% respectivamente). En relación a la probabilidad de que el resultado de la prueba sea negativa cuando la enfermedad no está presente, (se refiere a la especificidad del ensayo) los valores fueron 94.8% para cefalina y 91.9% para PTT-LA, resultados que evidencian bajo grado de resultados falsos positivos (9% y 14% respectivamente) Considerando que la interpretación de los ensayos de mezcla merece atención especial ya que es necesario obtener un buen desempeño para evitar perder la detección de AL débiles, decidimos, frente a resultados positivos, utilizar dos índices para su interpretación: el índice de Rosner y el porcentaje de corrección.

Nuestros resultados demuestran:

1. Alta prevalencia de plasmas con TVVRd positivo 104/115 (90.43%)
2. A pesar de que el TTPa muestra bajo desempeño con respecto a la sensibilidad cuando se compara con el TVVRd, ambos TTPa pudieron detectar AL en 47.83% de los estudios positivos.
3. De acuerdo a nuestra experiencia, considerando este cohorte inicial de pacientes seleccionados, el uso de TVVRd como primero, y TTPa como segundo test de tamizaje puede ayudar a mejorar el desempeño en el diagnóstico de AL.

Nos parece importante mencionar en relación al número de resultados positivos, que en nuestra opinión el alto grado de positividad del ensayo puede corresponder fundamentalmente a dos factores: en primer lugar a que la población estudiada está constituida por pacientes con patología obstétrica derivada por el especialista adecuadamente evaluados y que varias de las muestras ya eran positivas en otros centros; en segundo lugar, a que todos los AL con índice de Rosner entre 10 y 14 se informaron como positivos, es decir que esos AL "positivos límite"

aumentaron el número de positivos reportados. Este tema del AL débil es sin duda un tema de debate entre especialistas y su estandarización es de suma importancia para quienes trabajamos en la determinación de AL.

Conclusión

Algunos autores han recomendado la combinación de dos TTPa con diferente sensibilidad a AL para mejorar la capacidad de detección, siguiendo esta sugerencia, decidimos usar un reactivo de TTPa de fabricación casera como fuente de fosfolípidos con kaolin como activador y un reactivo comercial sensible (PTT-LA), ambos reactivos mostraron similar sensibilidad (S) y especificidad (E). Si bien la positividad es alta queda por evaluar su persistencia en el tiempo con una o más muestras.

**Nota al pie:* Avigliano A, Goñi MC, Grand B: Lupus anticoagulant in women with obstetric complications: persistence of results between samples. XXIII ISTH Congress & 57th Annual SSC Meeting July 23-28 2011 Kyoto, Japan

Declaración de conflictos de intereses

Los autores declaran no poseer conflictos de intereses

Bibliografía

1. Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, et al. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J ThrombHaemost* 2006; 4: 295-306.
2. Brandt JT1, Triplett DA, Alving B, Scharrer I. Criteria for the diagnosis of lupus anticoagulants: an update. On behalf of the Subcommittee on Lupus Anticoagulant/Antiphospholipid Antibody of the Scientific and Standardisation Committee of the ISTH. *ThrombHaemost.* 1995; 74(4):1185-90.
3. Moffat KA, Ledford-Kraemer MR y col. Are laboratories following published recommendations for lupus anticoagulant testing? An international evaluation of practices. *Thromb Haemost* 2009; 101:178-84.
4. Bertolaccini ML, Amengual O, Andreoli L y col. 14th International Congress on Antiphospholipid Antibodies Task Force. Report on antiphospholipid syndrome laboratory diagnostics and trend. *Autoimmun Rev* 2014; 13:917-930.

5. Tripodi A. Laboratory Testing for Lupus Anticoagulants: A Review of Issues Affecting Results. *Clinical Chemistry* 2007; 9: 1629-1635
6. Forastiero R R. Puntos de corte de ensayos para anticuerpos antifosfolípidos y valor clínico del inhibidor lúpico débil. *Hematología* 2013; 17:142-146
7. Grand B.; Blanco A.; Falco A.; Pieroni G.; Peñalba L.; Riveros D.; Voto L.; Margulies M.; Lazzari M. Inhibidor lúpico (IL) en hipertensión inducida por el embarazo (HIE) y retardo en el crecimiento intrauterino idiopático (RCIUI). *Medicina*, 1989; 49:437.
8. Lockwood CJ, Romero R, Feinberg RE, Clyne LP, Coster B, Hobbins JC. The prevalence and biologic significance of lupus anticoagulant and anticardiolipin antibodies in a general obstetric population. *Am J Obstet Gynecol.* 1989; 161(2):369-73.
9. Riveros D.; Grand B.; Blanco A. Voto L. Laboratory identification of the lupus anticoagulant in normal pregnancy and pregnancy induced hypertension. *Am. J. Obstet. Gynecol* 1990; 163:704-5.
10. Pengo V, Tripodi A, Reber G, Rand JH, Ortel TL, Galli M, and Col Subcommittee on Lupus Anticoagulant/Antiphospholipid Antibody of the Scientific and Standardisation Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis Update of the guidelines for lupus anticoagulant detection. Subcommittee on Lupus Anticoagulant/Antiphospholipid Antibody of the Scientific and Standardisation Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *JThrombHaemost.* 2009; 7(10):1737-40.
11. Deepa R. Jayakody Arachchillage; Samuel J. Machin; Ian J. Mackie; Hannah Cohen. Diagnosis and management of non-criteria obstetric antiphospholipid syndrome. *Thromb Haemost* 2015; 113: 13-19