

# Estudio interlaboratorio de los ensayos para anticuerpos antifosfolípidos

Comité de Síndrome Antifosfolípido del Grupo Cooperativo Latinoamericano de Hemostasia y Trombosis (CLAHT)

Ricardo R. Forastiero<sup>1</sup>, Alicia N. Blanco<sup>2</sup>, Ana M. Otero<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Hematología, Hemostasia y Trombosis, Universidad Favaloro, Fundación Favaloro;

<sup>2</sup>Departamento de Hemostasia y Trombosis, Instituto de Investigaciones Hematológicas "Mariano R. Castex" Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires, Argentina;

<sup>3</sup>Departamento de Hematología, Hospital Italiano, Montevideo, Uruguay

Correspondencia: Dr. Ricardo R. Forastiero, Hematología, Universidad Favaloro, Fundación Favaloro, Solís 453, C1078AAI, Buenos Aires, Argentina, TE: +54 11 4378-1145, FAX: +54 11 4381-0323, e-mail: forastiero@favaloro.edu.ar

Fecha de recepción: 04-04-02  
Fecha de aprobación: 07-06-02



ARTÍCULO ORIGINAL

HEMATOLOGIA, Vol. 6 N° 2: 27-35  
Mayo-Agosto, 2002

## RESUMEN

La presencia de anticuerpos antifosfolípidos (aFL) en pacientes con trombosis venosa y/o arterial, pérdidas fetales o abortos recurrentes caracteriza al síndrome antifosfolípido (SAF). Los aFL son evaluados por métodos convencionales como ensayos de coagulación para la actividad de anticoagulante lúpico (AL) y ensayos inmunológicos para los anticuerpos anticardiolipina (aCL). Aún existen muchos inconvenientes cuando se comparan los resultados informados por distintos laboratorios a pesar de los avances logrados en la estandarización de estos ensayos. El comité de Síndrome Antifosfolípido del grupo CLAHT realizó un estudio interlaboratorio que consistió en dos etapas: 1) distribución de un cuestionario para conocer la metodología utilizada por los centros participantes en la evaluación de los aFL, 2) distribución y análisis de 12 muestras de sueros para determinar la concordancia de los resultados de aCL dados por los participantes con aquellos considerados de referencia y determinados por el centro coordinador. Se recibieron en la primera etapa 27 respuestas y en la segunda, los resultados de 20 de los 24 centros que acordaron participar. Se observó una gran dispersión de los resultados para aCL IgG e IgM (principalmente usando equipos comerciales) en comparación con los de referencia (ELISA desarrollado), considerando tanto los valores en unidades como en títulos. La concordancia entre los resultados mejoró significativamente cuando los datos de aCL de los participantes eran agrupados como resultado negativo (título negativo o positivo débil) o positivo (título positivo moderado o alto) para el SAF. Esto remarca la necesidad de una mejor estandarización y de urgentes recomendaciones internacionales para la realización del ensayo de aCL, parte fundamental de los criterios de laboratorio para el SAF.

**Palabras clave:** anticuerpos anticardiolipina, anticoagulante lúpico, síndrome antifosfolípido, anticuerpos antifosfolípidos

## INTRODUCCIÓN

El síndrome antifosfolípido (SAF)<sup>1</sup> puede ser primario o secundario a lupus eritematoso sistémico (LES) y ha sido reconocido formalmente desde comienzos de la década de los años 80<sup>2</sup>; intervienen en él varias especialidades médicas como hematología, obstetricia, reumatología, inmunología, etc. La presencia de los anticuerpos antifosfolípidos (aFL) en pacientes con trombosis venosa y/o arterial, pérdidas fetales o abortos recurrentes caracteriza al SAF, de allí el interés creciente en su detección, la cual requiere de la evaluación de la actividad del anticoagulante lúpico (AL) por ensayos de coagulación y de la presencia de los anticuerpos anticardiolipina (aCL) por ensayos inmunológicos. La importancia de estos ensayos radica en que un resultado positivo en alguno de ellos es el criterio de laboratorio necesario para definir el SAF en asociación con al menos uno de los criterios clínicos previamente mencionados<sup>1</sup>.

Los aFL se detectan no solamente en pacientes con SAF sino también en pacientes con infecciones, neoplasias, en asociación con ciertas drogas y aún en individuos sanos. En la última década hubo un gran avance en el campo de los aFL al demostrarse que los de tipo autoinmune (detectados principalmente en el SAF y el LES) están dirigidos en su mayoría contra proteínas con alta afinidad por fosfolípidos, como la  $\beta_2$  glicoproteína I ( $\beta_2$ GPI) y la protrombina<sup>3</sup>. Esto condujo al desarrollo de ensayos inmunológicos para detectar anticuerpos anti- $\beta_2$ GPI (a $\beta_2$ GPI) y anti-protrombina (anti-PT) con el objetivo de determinar los anticuerpos con mayor especificidad para el SAF.

La metodología para la detección del AL ha sido estandarizada y el Subcomité Científico de Estandarización (SSC) del AL/aFL de la Sociedad Internacional de Hemostasia y Trombosis (ISTH) ha publicado los criterios que deben seguirse para evaluar correctamente el diagnóstico del AL<sup>4</sup>. A pesar de estos criterios, existen aún ciertos problemas dado que no todos los laboratorios siguen las recomendaciones y también, por la diversidad en la especificidad y sensibilidad de los ensayos de coagulación aplicados para tal estudio<sup>5-8</sup>.

Desde 1983 y durante algunos años se realizaron grandes esfuerzos para estandarizar los procedimientos y los reactivos necesarios para el ensayo de ELISA que se utiliza para la detección de aCL<sup>9,10</sup>. Para disminuir la variabilidad interlaboratorio se trataron de incorporar unidades de medición (unidades antifosfolípidos) para los tres isotipos de inmunoglobulinas: IgG (uGPL), IgM (uMPL) e IgA (uAPL). La concordancia de los resultados entre laboratorios es mejor aún si los resultados son informados además en grados de positividad según el título<sup>10</sup>. Esto es relevante porque los criterios para SAF indican que los aCL deben ser de título moderado o alto. Existen actualmente muchos inconvenientes para comparar los resultados provistos por diferentes laboratorios a pesar de los avances logrados en la estandarización del ELISA desarrollado para aCL. A esto se suma que ante la gran demanda del ensayo, se han incorporado al mercado varios equipos comerciales con diferente reactividad a los aCL. En varias publicaciones se ha mostrado esta falta de concordancia entre los resultados informados por distintos centros para un mismo suero<sup>11-15</sup>.

El objetivo de este trabajo cooperativo con la participación de algunos países latinoamericanos ha sido: 1) conocer mediante un extenso cuestionario la metodología usada por los laboratorios participantes para evaluar el AL y los aCL, 2) realizar un estudio interlaboratorio para evaluar los resultados de aCL informados por los participantes en una serie de sueros provistos por el centro coordinador.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *I. Cuestionario sobre metodología para aFL (Primera etapa del estudio)*

El Comité de Síndrome Antifosfolípido preparó un cuestionario para conocer la metodología aplicada por los laboratorios para realizar el diagnóstico del AL y la detección de aCL. El mismo fue distribuido durante el año 2000 a través de correo común o electrónico a los centros hematológicos interesados en participar. El cuestionario comprendió 3 seccio-

nes de preguntas: 22 relacionadas al diagnóstico del AL, 10 a los ensayos inmunológicos para aCL, además de 9 preguntas referidas a aspectos generales de los ensayos para el SAF y a la realización de otros ensayos para anticuerpos anti-proteínas con afinidad por fosfolípidos.

**Ensayos para AL:** El cuestionario incluyó las variables preanalíticas consideradas en la preparación de los plasmas a estudiar, los tipos y número de pruebas de detección utilizadas, las condiciones para realizar las mezclas con plasma normal, los ensayos de confirmación y los criterios usados para definir la presencia del AL.

**Ensayos para aCL:** El cuestionario incluyó los tipos de ensayos (ELISA desarrollado o equipos comerciales) utilizados para la determinación de aCL, los detalles técnicos de los métodos desarrollados (tipo de placas de ELISA, composición de las soluciones de bloqueo y diluyentes de los sueros, concentración de antígeno y antisueros), y datos sobre la expresión de los resultados (tipo de calibradores y sueros controles, definición de los puntos de corte de los ELISA y rangos de positividad).

### *II. Distribución y análisis de muestras para detección de aFL (Segunda etapa del estudio)*

La distribución de un conjunto de 12 sueros entre los participantes de la primera etapa del estudio que manifestaron su intención de intervenir en la segunda fase del mismo, se realizó a finales del año 2000. Cada participante recibió 12 fracciones de 300µl de suero cada una.

**Muestras analizadas:** Se utilizaron 11 sueros de pacientes y un pool normal. Los datos clínicos y de laboratorio de los pacientes se muestran en la Tabla 1. Los resultados por ELISA de los aCL corresponden al valor promedio obtenido en tres ocasiones diferentes aplicando el ensayo desarrollado de referencia<sup>10</sup>, utilizando estándares internacionales (Louisville APL Diagnostics, Inc, USA). Los sueros y los resultados fueron obtenidos en el laboratorio de uno de los autores, siendo considerados como valores de referencia a los fines del análisis del estudio interlaboratorio. Los títulos de referencia corresponden al siguiente criterio: negativo (<10 uGPL, MPL o APL), positivo débil (11-20 uGPL, MPL o APL), positivo moderado (21-80 uGPL, MPL o APL) y positivo fuerte (>80 uGPL, MPL o APL). Los resultados de aβ<sub>2</sub>GPI y de anti-PT fueron obtenidos mediante ensayos desarrollados de ELISA previamente publicados<sup>16</sup>.

**Informe de los centros participantes:** Las muestras fueron procesadas siguiendo la metodología habitual para cada centro y desconociendo los resulta-

TABLA 1  
 Datos clínicos de los 11 pacientes y resultados de laboratorio con ensayos de referencia de las 12 muestras usadas en el estudio

Muestra	Edad (años)	Sexo	Diagnóstico clínico	SAF	AL	IgG uGPL	aCL				a $\beta_2$ GPI (títulos)		anti-PT (títulos)		
							Título	IgM uMPL	Título	IgA uAPL	IgG	IgM	IgG	IgM	
1	44	F	TVP / TA	Si	+	68.3	M	5.8	N	2.2	N	D	N	M	N
2	41	F	LES	No	+	119.8	F	30.9	M	8.7	N	F	M	F	N
3	51	F	Livedo reticularis / CO	Si	-	2.0	N	55.0	M	2.7	N	N	M	N	D
4	38	F	LES / ACV	Si	+	21.3	M	37.2	M	41.5	M	N	M	M	N
5	26	F	TEP / TVP	Si	+	19.5	D	4.0	N	5.2	N	N	N	N	D
6	35	F	TVP / CO	Si	+	99.6	F	1.0	N	6.1	N	M	N	N	N
7	64	F	TA	Si	+	34.5	M	4.9	N	2.3	N	N	N	M	N
8	44	F	CO /obstrucción fístula	Si	+	10.7	D	1.1	N	1.7	N	N	M	N	M
9	16	M	TV esplénica	Si	+	9.2	N	1.2	N	1.5	N	N	N	N	N
10	48	M	asintomático	No	+	13.2	D	2.0	N	0.9	N	N	N	N	N
11	50	F	asintomático	No	+	16.9	D	4.7	N	4.7	N	N	N	M	M
12	-	-	Pool normal	-	-	3.3	N	2.4	N	2.5	N	N	N	N	N

Sexo: M masculino, F femenino; TVP trombosis venosa profunda; TA trombosis arterial; LES lupus eritematoso sistémico; CO complicaciones obstétricas; ACV accidente cerebrovascular; TEP tromboembolismo pulmonar; SAF síndrome antifosfolípido; AL anticoagulante lúpico; aCL anticuerpos anticardiolipina; a $\beta_2$ GPI anticuerpos anti- $\beta_2$  glicoproteína I; anti-PT anticuerpos antiprotrombina; Títulos: N negativo, D positivo débil, M positivo moderado, F positivo fuerte

dos mostrados en la Tabla 1. Los datos de aCL IgG e IgM fueron reportados al comité en forma cuantitativa (unidades GPL o MPL) y semicuantitativa (rangos de positividad) de acuerdo al criterio utilizado en cada laboratorio. Algunos centros evaluaron también el isotipo IgA.

**Análisis de los resultados:** Los valores recibidos fueron analizados por el comité y comparados en términos de unidades y de rangos de positividad, con los datos considerados de referencia. Se utilizó la prueba de Fisher y se consideró estadísticamente significativo un valor de  $p < 0.05$ .

## RESULTADOS

### 1. Cuestionario sobre metodología para aFL

Veintisiete laboratorios respondieron al cuestionario sobre la metodología usada para evaluar aFL: 26 completaron la encuesta sobre AL y 24 la de aCL. La lista de los centros y el país de origen están indicados en el texto.

#### Ensayos para la detección del AL

- **Variables preanalíticas:** La mayoría de los centros siguen las recomendaciones internacionales para la preparación de los plasmas de los pacientes y del pool normal usado en los ensayos de corrección. El 100% de los participantes utiliza doble centrifugación para obtener plasma pobre en

plaquetas. Sin embargo, 14/26 (54%) de los centros realizan los estudios en muestras de plasmas de pacientes previamente congeladas.

- **Pruebas de detección:** El 15% (4/26) y el 85% (22/26) de los participantes usa, respectivamente, 2 o más de 2 ensayos diferentes para la detección del AL. El 69% (18/26) realiza los estudios en coagulómetros automáticos o semiautomáticos. Entre los ensayos utilizados predomina el APTT (25/26) con reactivos de reconocida sensibilidad para el AL, particularmente el PTT-LA de Diagnostica Stago o el reactivo casero con cefalina-caolín. El tiempo de veneno de víbora Russell diluido (dRVVT) es empleado por 25/26 participantes. El 50% de ellos utiliza el reactivo casero con cefalina y veneno de Sigma, el otro 50% usa reactivos comerciales (LAC-screen, IL o DVV-test, American Diagnostics). El tiempo de protrombina con tromboplastina diluida (dPT) es usado en 17 de los 26 centros, el 59% de los cuales utiliza tromboplastina de origen recombinante (Innovin, Dade Behring). El tiempo de coagulación con caolín (KCT) es utilizado por el 69% (18/26) de los laboratorios.
- **Ensayos de corrección:** El 85% de los participantes utilizan para las pruebas de mezclas, pool de plasmas normales preparados en el propio laboratorio, empleando más de 5-10 plasmas normales en el 86% de los casos. Los ensayos de mezclas son realizados principalmente para el APTT y el dRVVT, en la proporción 1:1 en el 96% de los

centros. El 69% de los laboratorios realizan la prueba de incubación (1-2 horas a 37°C) para evaluar el efecto inhibitorio tiempo y temperatura dependiente.

- **Ensayos de confirmación:** La variedad de ensayos usados en esta etapa es más amplia. La prueba de neutralización con plaquetas (PNP) es utilizada en el 77% de los casos en el APTT, el 62% en el dRVVT y el 23% en el dPT. El lisado plaquetario es fundamentalmente de preparación casera. La prueba de neutralización con fosfolípidos hexagonales del APTT (StacLOT-LA, Stago) es empleada por el 50% de los centros. El 46% usa la prueba con alta concentración de fosfolípidos del dRVVT empleando reactivos comerciales (LAC-confirm, IL o DVV-confirm, American Diagnostics). El 39% de los laboratorios realizan la comparación del tiempo de protrombina con el reactivo estándar con el dPT (TTI) y sólo el 8% utiliza el tiempo de Textarin/Ecarin (Stago).
- **Criterios para definir el AL:** La mayoría (>80%) de los centros utiliza los criterios recomendados por el SSC sobre AL/aFL de la ISTH.

#### Ensayos para aCL

- **Métodos:** Todos los participantes (24/24) usan ensayos de ELISA para evaluar la presencia de aCL. El método desarrollado es utilizado por 5 laboratorios (21%) y los 19 restantes usan equipos comerciales de acuerdo al método indicado por el fabricante: The Binding Site (n=9), Louisville APHL Diagnostics (n=4), Inova Diagnostics (n=2), Cogent Diagnostic (n=1), Diasorin (n=1), Kallestad (n=1), y uno no especificado. Analizando el protocolo de los ELISA desarrollados se observa que sólo 2 de los 5 laboratorios usa el mismo tipo de placa de poliestireno que la utilizada en el ensayo de Harris<sup>10</sup>. Los otros 3 laboratorios utilizan placas de diferente marca comercial con distinto tipo de superficie plástica (poliestireno o cloruro de polivinilo). La concentración de cardiolipina bovina en etanol para la inmovilización a la placa varió entre 1.5 a 3 µg/pocillo. Las soluciones utilizadas en la etapa de bloqueo son suero bovino adulto (n=3) o fetal (n=2) al 10% en tampón fosfato. Estas mismas soluciones son empleadas para la dilución de las muestras, excepto en un laboratorio que usa dilución al 1% de suero fetal bovino; las muestras de suero son diluidas 1:50 (n=4) o 1:100 (n=1).
- **Calibración:** 22 de los 24 (96%) laboratorios realiza la curva de calibración en cada ensayo, 1 centro indicó no usar calibración y otro no dio información. El 91% (20/22) de los centros usa estándares comerciales. En los ensayos desarro-

llados, 3 laboratorios utilizan el conjunto de estándares comerciales (IgG e IgM) de Louisville para aCL y los 2 restantes usan estándares propios. Todos los centros excepto uno, emplean sueros controles en cada ensayo. El 100% de los participantes evalúa ambos isotipos IgG e IgM; en cambio, sólo 4 determinan el isotipo IgA.

- **Resultados:** Los resultados son informados en unidades GPL, MPL o APL en 22 de los 24 centros participantes. Quince laboratorios reportan además los resultados en títulos o grados de positividad, en tanto 2, no dieron información respecto a la expresión de los resultados. Los valores de corte usados por los participantes varían entre menos de 10-15 unidades para el valor negativo, de 10-15 a 20-40 unidades para el positivo débil, de 21-41 a 25-80 unidades para el positivo moderado y mayor de 25-80 para el positivo fuerte.

**Aspectos generales:** aproximadamente el 70% de los centros indicaron que detectan al menos un estudio positivo para AL por mes, en los estudios de rutina. El 80% de los laboratorios incluyen ambos ensayos (AL y aCL) dentro del estudio de trombofilia, el 16% sólo AL y el 4% sólo aCL. Dos centros informaron que usan las pruebas de ELISA para detectar aFL totales; otros 2 laboratorios reportan que detectan los anticuerpos dirigidos contra otros fosfolípidos aniónicos (fosfatidilserina, fosfatidilinositol, fosfatidiletanolamina, etc.). El 38% (9/24) usa además ensayos para evaluar la presencia de anticuerpos anti-proteínas con afinidad por fosfolípidos: ab2GPI (n=9) y anti-PT (n=4). Para aβ<sub>2</sub>GPI, emplean métodos desarrollados 3 laboratorios y equipos comerciales los 6 restantes [The Binding Site (n=2), Varelisa (n=2), Inova (n=1), Genesis (n=1)]. Todos los participantes utilizan ELISA desarrollados para anti-PT.

#### II. Distribución y análisis de muestras para detección de aFL

Veinticuatro centros respondieron afirmativamente a la pregunta de participar en la evaluación de sueros incógnitas para aCL. Los sueros fueron distribuidos y se recibieron los resultados provenientes de 20 laboratorios. Para el isotipo IgG, 1 laboratorio envió resultados obtenidos mediante tres métodos diferentes y por lo tanto hubo 22 datos para analizar de este isotipo. Los métodos usados por los participantes fueron: The Binding Site (n=10), APHL (n=4), ELISA desarrollado (IgG n=3, IgM n=2), Inova (n=2), Cogent (IgG n=2, IgM n=1) y Diasorin (n=1).

La Figura 1 muestra la distribución de los resultados en unidades GPL o MPL obtenidos para cada

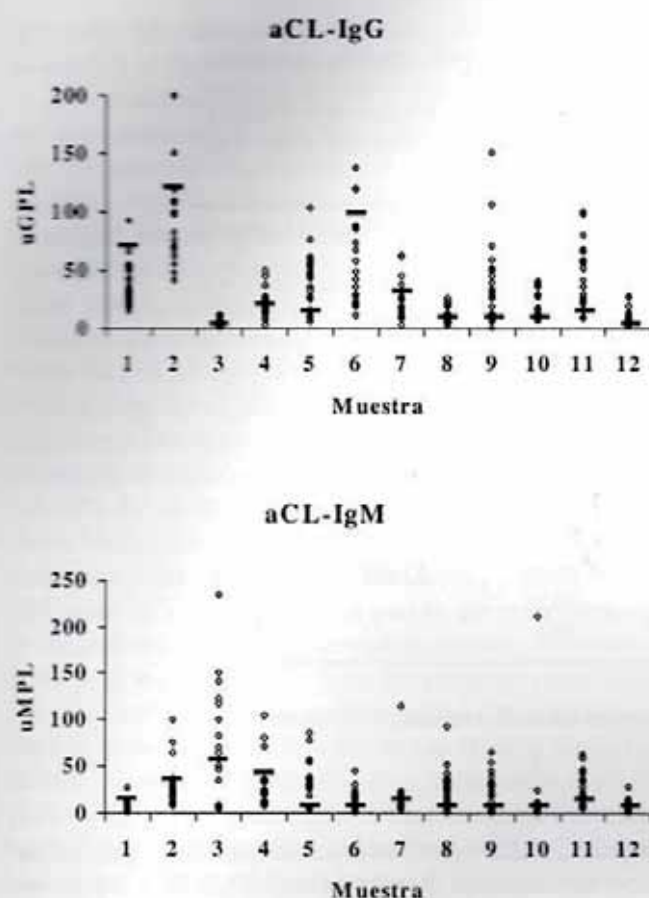


Fig. 1. Distribución de los resultados de anticuerpos anticardiolipina informados por los diferentes centros participantes en las 12 muestras de suero usadas en el estudio. Los aCL son informados en unidades para IgG (uGPL) o para IgM (uMPL). La línea horizontal indica el valor promedio obtenido en el centro coordinador para cada muestra y cada isotipo.

una de las 12 muestras. Como puede observarse, la gran dispersión de los datos hace imposible una comparación directa de los resultados en unidades. Se procedió entonces a analizar los datos, considerando los resultados de cada muestra expresados en títulos, de acuerdo a la interpretación dada por cada participante. El grado de concordancia individual de cada muestra con el título obtenido en el centro coordinador osciló entre 14-95% para el isotipo IgG y entre 10-90% para IgM. El grado de concordancia general (agrupando las muestras con el mismo título) con el título obtenido en el centro coordinador osciló entre 23.8-66.7% para el isotipo IgG y entre 23.3-51.1% para IgM. Tomando en cuenta la información obtenida en el análisis del cuestionario que respondieron los participantes y los diferentes criterios usados por los centros para definir los títulos de aCL, se procedió a reanalizar los datos asignándoles un título de acuerdo a los rangos de referencia mencionados en materiales y métodos. Sin embargo el grado de concordancia no mejoró significativamente (datos no mostrados).

Posteriormente, decidimos evaluar si mejoraba la concordancia al analizar los datos de un modo simplificado, agrupando los títulos informados por los laboratorios como resultados positivos o negativos para el diagnóstico del SAF (Tablas 2 y 3). Se observó que el grado de concordancia con los títulos obtenidos en el centro coordinador mejoraba tanto en forma individual como general. Para aCL-IgG, la concordancia general fue significativamente ma-

TABLA 2

Grado de concordancia entre los títulos informados por los participantes agrupados en resultado negativo para SAF (título negativo o positivo débil) y resultado positivo para SAF (título positivo moderado o fuerte) y los datos considerados de referencia para el ensayo de aCL-IgG. Para el isotipo IgG se obtuvieron 22 resultados de cada muestra.

Muestra	Título de referencia	Concordancia individual		Concordancia general			
		$n_1/n_2$	%	$n_1/n_2$	%		
3	N	22/22	100.0	51/66	77.3		
	N	9/22	40.9				
	N	20/22	90.9				
5	D	8/22	36.4			51/88	57.9
	D	20/22	90.9				
	D	17/22	77.3				
10	D	17/22	77.3	34/66	51.5		
	D	6/22	27.3				
	D	6/22	27.3				
11	D	6/22	27.3			39/44	88.6
	D	6/22	27.3				
	D	6/22	27.3				
1	M	16/22	72.7	39/44	88.6		
	M	9/22	40.9				
	M	9/22	40.9				
2	F	22/22	100.0			39/44	88.6
	F	22/22	100.0				
	F	17/22	77.3				

Títulos: N negativo, D positivo débil, M positivo moderado, F positivo fuerte  
 $n_1$ : número de resultados concordantes,  $n_2$ : número total de resultados obtenidos

TABLA 3

Grado de concordancia entre los títulos informados por los participantes agrupados en resultado negativo para SAF (título negativo o positivo débil) y resultado positivo para SAF (título positivo moderado o fuerte) y los datos considerados de referencia para el ensayo de aCL-IgM. Para el isotipo IgM se obtuvieron 20 resultados de cada muestra.

Muestra	Título de referencia	Concordancia individual		Concordancia general			
		$n_1/n_2$	%	$n_1/n_2$	%		
1	N	19/20	95.0	128/180	71.1		
5	N	7/20	35.0				
6	N	16/20	80.0				
7	N	19/20	95.0				
8	N	10/20	50.0				
9	N	10/20	50.0				
10	N	19/20	95.0				
11	N	8/20	40.0				
12	N	20/20	100.0				
2	M	11/20	55.0			32/60	53.3
3	M	15/20	75.0				
4	M	6/20	30.0				

Títulos: N negativo, M positivo moderado

$n_1$ : número de resultados concordantes,  $n_2$ : número total de resultados obtenidos

yor para las muestras con título positivo débil (23.8% vs 57.9%,  $p < 0.0001$ ) o fuerte (56.8% vs 88.6%,  $p < 0.002$ ) y no alcanzó significación estadística para aquellas con título negativo (66.7% vs 77.3%) o positivo moderado (42.4% vs 51.5%). Para aCL-IgM, la concordancia general mejoró significativamente para las muestras con título negativo (51.1% vs 71.1%,  $p < 0.0002$ ) y para aquellas con título positivo moderado (23.3% vs 53.3%,  $p < 0.002$ ).

## DISCUSIÓN

El diagnóstico del SAF requiere de criterios clínicos definidos (trombosis y/o pérdidas inexplicables de embarazo) en asociación con la presencia persistente en el tiempo de aFL evaluados por ensayos convencionales (AL y/o aCL a título moderado o alto)<sup>1,2</sup>. En una revisión reciente de la literatura se muestra la gran diversidad encontrada por distintos autores en la prevalencia de aFL en la población normal, pacientes con LES o con SAF<sup>17</sup>. Esta diversidad puede ser explicada por diferencias en la selección de los individuos, el origen étnico y también por el tipo de métodos usados para evaluar a los aFL.

El hecho que los aFL pueden hallarse también frecuentemente en pacientes con infecciones, a pesar de no presentar complicaciones trombóticas, contribuye a la confusión en la interpretación de un resultado positivo en los ensayos convencionales para aFL<sup>18,19</sup>. Actualmente se reconoce que aquellos aFL asociados con infecciones (sífilis, HIV, etc.) están di-

rigidos contra estructuras fosfolípídicas y que los de tipo autoinmune (presentes en LES, SAF y lepra) reaccionan principalmente con proteínas ( $\beta_2$ GPI y protrombina) con alta afinidad por fosfolípidos<sup>18-21</sup>. Es importante la incorporación de ensayos para detectar específicamente anticuerpos dirigidos contra estas proteínas, para una mejor caracterización de los aFL; sin embargo, cabe recordar que estos ensayos más específicos, no están aún incorporados en los criterios de laboratorio para definir el SAF<sup>1</sup>.

Los participantes en este estudio cooperativo utilizan ensayos con reconocida sensibilidad para la detección y confirmación del AL. En general siguen las recomendaciones dadas por la ISTH<sup>4</sup>. Sin embargo es de remarcar el alto porcentaje (55%) de centros que realizan los estudios en muestras de plasmas conservados en congelación. Si bien es factible realizar los estudios de AL en plasmas congelados<sup>22</sup>, es preciso considerar la posibilidad de informar un dato falso negativo en pacientes con actividad de AL de tipo débil. Las plaquetas presentes en el plasma, aún en muy baja concentración ( $1 \times 10^9/l$ ), luego del congelamiento y descongelamiento pueden neutralizar el efecto del AL en pruebas como el KCT<sup>8</sup>. Estudios multicéntricos llevados a cabo recientemente indican un alto grado de discordancia entre los laboratorios al evaluar plasmas con AL de actividad débil. Es probable que en el futuro cercano se puedan utilizar plasmas calibradores preparados con anticuerpos monoclonales con actividad dirigida contra  $\beta_2$ GPI o protrombina, como estándares para

que cada laboratorio pueda seleccionar los mejores ensayos a utilizar en el diagnóstico del AL<sup>23</sup>.

Los problemas referidos a la falta de concordancia interlaboratorio para los resultados de aFL, son aún mayores al analizar el ensayo para aCL; varios estudios multicéntricos recientemente publicados muestran este inconveniente<sup>11-14</sup>. Las conclusiones del presente estudio coinciden con aquellas obtenidas en otros países, reflejando la existencia de problemas similares para obtener datos satisfactorios. Los resultados de dos programas de control de calidad, desarrollados en Australia en un lapso de 4 años, publicados por Favalaro y col.<sup>12</sup>, mostraron una elevada variación interlaboratorio y falta de consenso en más del 50% de las muestras evaluadas. En nuestro estudio los grados de concordancia para cada muestra oscilaron entre 14%-95% para aCL-IgG y entre 10%-90% para aCL-IgM. Desde el punto de vista clínico, la importancia del resultado radica fundamentalmente en si el mismo cumple o no los criterios para SAF. Por ese motivo agrupamos los datos de aCL de los participantes en negativo (título negativo o positivo débil) o positivo (título positivo moderado o alto) para SAF, encontrando que si bien el consenso mejoraba significativamente tanto para aCL IgG como para IgM, el nivel alcanzado no es óptimo. Esto indica que el resultado de aCL de un paciente puede ser positivo en un laboratorio y negativo en otro, de tal manera que el paciente tendría criterios de SAF o no de acuerdo al método y al laboratorio donde se realiza el estudio. Surge de estos resultados la importancia de realizar los ensayos en forma estandarizada y utilizando pruebas o equipos de probada sensibilidad. Además, es necesario tener presente que la detección de aCL debe hacerse al menos en dos oportunidades distintas separadas en el tiempo<sup>24</sup>, como es recomendado en los criterios para SAF<sup>1</sup>, dada la posibilidad de efectos transitorios, por ejemplo en pacientes con procesos infecciosos.

Las causas probables de la falta de consenso general son varias, y principalmente inherentes a las diferencias en la metodología usada para detectar aCL. Tincani y col.<sup>11</sup>, han propuesto recientemente un protocolo "consenso" para determinar los aCL por un ensayo desarrollado. El método incluye las características de los ensayos utilizados por 6 de los 24 laboratorios europeos que tenían la mejor concordancia en los resultados. El mismo no difiere del propuesto inicialmente por Harris EN<sup>10</sup> y que fuera utilizado como referencia en nuestro estudio. Esto refuerza la idea de la necesidad de seguir ciertas recomendaciones para lograr concordancia entre los resultados obtenidos por los distintos laboratorios<sup>15</sup>. La incorporación al mercado de gran diversidad de equipos comerciales ha incrementado la falta de con-

senso. En el estudio de Rever y col.<sup>13</sup> se compararon 9 equipos diferentes para aCL y se concluyó que sólo se observaba concordancia entre los equipos en menos del 60% de las muestras analizadas. Estos datos coinciden con lo observado en el presente estudio.

La utilización de calibradores es fundamental pero sin embargo hay discrepancias en la selección de los mismos. El estudio europeo<sup>11</sup> sugiere reemplazar a los estándares comerciales de Louisville (anticuerpos policlonales de pacientes con SAF) por los anticuerpos monoclonales aCL o  $\beta_2$ GPI (aún no comercializados). A pesar que la mayoría de los equipos comerciales indican que sus calibradores fueron estandarizados contra los de Louisville, al ensayar estos estándares en dichos equipos se observó que en muchos casos los resultados no coincidían con los valores preestablecidos<sup>13</sup>. Estas observaciones fueron también corroboradas por uno de los autores utilizando algunos equipos comerciales (RRF, comunicación personal).

En nuestro estudio observamos que había un alto grado de sobreestimación de los resultados en comparación con los considerados de referencia y esto era más evidente para el isotipo IgM, particularmente en algunas muestras. Consideramos que la unión no específica podría ser responsable de los resultados sobreestimados; dado que la unión inespecífica no puede ser descontada en los equipos comerciales como sí ocurre al utilizar los ensayos desarrollados<sup>11</sup>. Otra de las causas que contribuyen a la falta de consenso es que los laboratorios usan valores arbitrarios de unidades aFL para definir los puntos de corte de los ensayos o los rangos de positividad al informar los datos en forma semicuantitativa, como se observa en el presente estudio y en otros previamente publicados<sup>11-13</sup>. Se ha demostrado además que existen diferencias en el contenido de  $\beta_2$ GPI de las placas de ELISA o en las soluciones utilizadas como diluyente de las muestras en los diferentes equipos<sup>13</sup>. Esta variabilidad podría ser uno de los factores que contribuya en cierto grado a la falta de concordancia de los resultados, especialmente considerando que los aFL son heterogéneos y en un mismo paciente pueden coexistir aCL dependientes e independientes de  $\beta_2$ GPI. Es probable que ciertos ensayos presenten mayor sensibilidad para alguno de los dos tipos de aCL.

En conclusión, la realización de este estudio multicéntrico en algunos países de Latinoamérica nos permitió conocer los métodos y los criterios que utilizan los laboratorios participantes para evaluar la presencia del AL y de los aCL. A través del estudio interlaboratorio de 12 sueros para la detección de aCL se constató la falta de consenso entre los centros al informar los resultados de un mismo suero.

Esto remarca la necesidad de una mejor estandarización del ensayo de aCL y de urgentes recomendaciones por parte del SSC de AL/aFL de la ISTH para la realización de este ensayo que forma parte de los criterios de laboratorio para el SAF.

## PARTICIPANTES

*Argentina:* Bertoti G y Parise F (Policlínico Bancario, Buenos Aires); Blanco A (Laboratorio Aixalá-Blanco, Buenos Aires); Cambiasso S (Hospital Alvarez, Buenos Aires); Bierfass G y Carballo O (Hospital Durand, Buenos Aires); de Larrañaga G (Hospital Muñiz, Buenos Aires); Avigliano A, Ventura A y Grand B (Consultorio de Hematología Clínica, Buenos Aires); Alberto F y Lazzari M (Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires); Forastiero R y Martinuzzo M (Fundación Favaloro, Buenos Aires); Salviú J y Nadal M (Centro de Hematología Pavlosky, Buenos Aires); Vázquez A (Hospital General de Niños Dr. Gutiérrez, Buenos Aires); Vilaseca A (Clínica San Camilo, Buenos Aires); Viola M (Hospital de Agudos E Tornú, Buenos Aires); González Achával G y del Val L (Instituto Modelo de Cardiología, Córdoba); Guglielmone H (LACE, Córdoba); Villafañe S y Menso E (Hospital Nacional de Clínicas, Córdoba); Debonis A (Fundación Mainetti, La Plata); Vidal O (Hospital Italiano, La Plata); García D y Paoletti E (Clínica 25 de Mayo, Universidad Fasta, Mar del Plata); Detarsio G, Harraca M y Bearzoti S (Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Rosario); Fornasiero L (Instituto Cardiovascular, Rosario); Stafuza M y Rasselli S (Hospital Perrando y Laboratorio Central de Salud Pública, Resistencia); Díaz de Anaya E (Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia, San Miguel de Tucumán). *Chile:* Palomo I (Universidad de Talca, Talca). *Cuba:* Torres Iribar W (Hospital Hermanos Ameijeiras, La Habana). *México:* Ruiz Argüelles G (Clínica Ruiz, Puebla). *Uruguay:* Otero A y Attarian D (Hospital Italiano, Montevideo). *Venezuela:* Pérez Requejo J (Centro Policlínico, Valencia).

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Dr. Jaime Bortz (Biocientífica SA, Buenos Aires, Argentina) por el financiamiento del envío de las muestras al exterior, y a los demás integrantes del Comité de Expertos en Síndrome Antifosfolípido del Grupo CLAHT: Dr. Luis O. Carreras, Dr. Donato Alarcón Segovia, Dr. Guillermo Ruiz Argüelles y Dr. Wilfredo Torres Iribar, por la colaboración y la asistencia prestada. Estudio incluido en el proyecto CID-002-99 de la Universidad Favaloro.

## ABSTRACT

The antiphospholipid syndrome (APS) is characterized by venous or arterial thrombosis, and/or fetal loss or recurrent abortions in patients with positive tests for antiphospholipid antibodies (aPL). The evaluation of aPL includes clotting assays for lupus anticoagulant (LA) activity and immunoassays for detection of anticardiolipin antibodies (aCL). Several attempts were made to standardize these assays, but problems in obtaining comparable results still exist. To get knowledge about this point in Latin America, the Committee on APS from the CLAHT Group performed an inter-laboratory survey in two steps. The first was to distribute a questionnaire focussing on the detailed methodology for LA and aCL applied to patients with suspicion of APS, and the second was the distribution of 12 blind sera in order to compare the aCL results obtained by the different centers with those determined by the committee. Twenty-seven laboratories fulfilled the questionnaire and 20 of 24 centers, which accepted to participate, sent their results on aCL. There was an impressive scattering of values for aCL IgG and IgM (mainly obtained by commercial kits) from the different laboratories compared to those obtained in the coordinator center by the standard in house ELISA method. The consensus improved when results were compared considering negative (negative or low positivity for aCL) and positive (medium or high positivity for aCL) criteria for APS. Our data show that due to the lack of reproducibility observed for aCL, further efforts to improve assay methodologies and international guidelines are needed particularly considering that LA as well as aCL are the laboratory criteria for APS.

**Key words:** anticardiolipin antibodies, lupus anticoagulant, antiphospholipid syndrome, antiphospholipid antibodies

## BIBLIOGRAFÍA

1. Wilson WA, Gharavi AE, Koike T, y col. International consensus statement on preliminary classification criteria for definite antiphospholipid syndrome. *Arthritis Rheum* 1999; 42: 1309-1311.
2. Hughes GRV, Harris EN, Gharavi AE. The anticardiolipin syndrome. *J Rheumatol* 1986; 13: 486-489.
3. Roubey RAS. Immunology of the antiphospholipid antibody syndrome. *Arthritis Rheum* 1996; 39: 1444-1454.
4. Brandt JT, Triplett DA, Alving B, Scharrer I. Criteria for the diagnosis of lupus anticoagulants: an update. *Thromb Haemost* 1995; 74: 1185-1190.
5. Forastiero RR, Cerrato G, Carreras LO. Evaluation of recently described tests for detection of the lupus anticoagulant. *Thromb Haemost* 1994; 72: 728-733.
6. Forastiero RR, Falcón C, Carreras LO. Comparison of various screening and confirmatory tests for the detection of the lupus anticoagulant. *Haemostasis* 1990; 20: 208-214.
7. Blanco AN, Grand BE, Pieroni G, Peñalva LB, Voto LS, Lazzari MA. Behavior of diluted activated partial thromboplastin time in pregnant women with a lupus anticoagulant. *Am J Clin Pathol* 1993; 100: 99-102.
8. Exner T. Conceptions and misconceptions in testing for lupus anticoagulants. *J Autoimmunity* 2000; 15: 179-183.
9. Harris EN, Gharavi AE, Boey ML, Mackworth-Young CG, Loizou S, Hughes GRV. Anticardiolipin antibodies: detection by radioimmunoassay and association with thrombosis in systemic lupus erythematosus. *Lancet* 1983; 2: 1211-1214.



10. Harris EN. The Second International Anti-Cardiolipin Standardization Workshop/The Kingston Anti-Phospholipid Antibody Study (KAPS) Group. *Am J Clin Pathol* 1990; 94: 476-484.
11. Tincani A, Alessi E, Samanico M, y col. Anticardiolipin antibody assay: a methodological analysis for a better consensus in routine determinations. *Thromb Haemost* 2001; 86: 575-583.
12. Favalese EJ, Silvestrini R, Mohamed A. Clinical utility of anticardiolipin antibody assays: high inter-laboratory variation and limited consensus by participants of external quality assurance programs signals a cautious approach. *Pathology* 1999; 31: 142-147.
13. Biber C, Arvink J, Comby E, y col. Multicenter evaluation of nine commercial kits for the quantitation of anticardiolipin antibodies. *Thromb Haemost* 1995; 73: 444-452.
14. Fontaine M, Homburger HA, Nichols WL. Persistent problems with standardization of immunoassays for anti-cardiolipin antibodies. *Thromb Haemost* 2001; 86: 1123-1124.
15. Gharavi AE, Pierangeli SS, Wilson WA. Anticardiolipin antibodies: importance, controversies, discrepancies; the need for guidelines and calibrators. *Clin Exp Rheumatol* 2001; 19: 237-239.
16. Forastiero RR, Martinuzzo ME, Cerrato GS, Kordich LC, Carreras LO. Relationship of anti  $\beta_2$  glycoprotein I and anti prothrombin antibodies to thrombosis and pregnancy loss in patients with antiphospholipid antibodies. *Thromb Haemost* 1997; 78: 1008-1014.
17. Petri M. Epidemiology of the antiphospholipid antibody syndrome. *J Autoimmunity* 2000; 15: 145-151.
18. Gharavi AE, Pierangeli SS. Infections and antiphospholipid antibodies. *Hughes Syndrome, Antiphospholipid Syndrome*. Khamashta MA (ed). 2000, p 135-143. Springer-Verlag London.
19. Carreras LO, Forastiero RR, Martinuzzo ME. Which are the best biological markers of the antiphospholipid syndrome? *J Autoimmunity* 2000; 15: 163-172.
20. Forastiero RR, Martinuzzo ME, Kordich LC, Carreras LO. Reactivity to  $\beta_2$  glycoprotein I clearly differentiates anticardiolipin antibodies from antiphospholipid syndrome and syphilis. *Thromb Haemost* 1996; 75: 717-720.
21. de Larrañaga G, Forastiero RR, Martinuzzo ME, y col. High prevalence of antiphospholipid antibodies in leprosy: evaluation of antigen reactivity. *Lupus* 2000; 9: 594-600.
22. Arnout J. Antiphospholipid syndrome: diagnostic aspects of lupus anticoagulants. *Thromb Haemost* 2001; 86: 83-91.
23. Arnout J, Meijer P, Vermeylen J. Lupus anticoagulant testing in Europe: an analysis of results from the first European Concerted Action on Thrombophilia (ECAT) survey using plasmas spiked with monoclonal antibodies against human  $\beta_2$ -glycoprotein I. *Thromb Haemost* 1999; 81: 929-934.
24. Pierangeli SS, Gharavi AE, Harris EN. Anticardiolipin testing. *Hughes Syndrome, Antiphospholipid Syndrome*. Khamashta MA (ed). 2000, p 205-213. Springer-Verlag London.