

ANÁLISIS DE ANTICOAGULANTE LÚPICO EN CATLAB

INTRODUCCIÓN:

El anticoagulante Lúpico (AL) o anticoagulante tipo lupus, es un test de coagulación en el que se investiga la presencia de anticuerpos que pueden interferir en las reacciones de coagulación mediadas por fosfolípidos y que suponen un factor de riesgo para enfermedades tromboembólicas.

En las reacciones de coagulación los fosfolípidos intervienen en distintas etapas: como constitutivos de las plaquetas o la superficie subendotelial que son activadores de los procesos hemostáticos o como constituyentes o cofactores de las reacciones entre factores activados (VIIa, VIIIa, Xa, Va) que tienen como resultado la formación de fibrina.

Los anticuerpos antifosfolípido (AAF) son un grupo heterogéneo de anticuerpos que van dirigidos contra fosfolípidos de carga negativa o contra complejos formados entre fosfolípidos y proteínas (por ejemplo, beta-2-glicoproteína 1 o factores de la coagulación como la Protrombina). Este término incluye uno o todos los anticuerpos detectados por ELISA y los test de anticoagulante tipo lupus.

CLÍNICA:

El síndrome antifosfolípido es un trastorno pretrombótico que puede afectar tanto al territorio venoso como al arterial, en cualquier localización aunque con mayor frecuencia en el sistema venoso profundo de extremidades inferiores y en SNC.

Existe un subtipo, el síndrome antifosfolípido catastrófico caracterizado por afectación generalizada de pequeños vasos, con fallo de múltiples órganos y sistemas y una alta mortalidad.

Las manifestaciones obstétricas del síndrome antifosfolípido incluyen la muerte fetal intraútero inexplicada tras la 10ª semana de gestación, partos pretérmino antes de la semana 35 por eclampsia o pre-eclampsia y tres o más abortos consecutivos inexplicados antes de la 10ª semana.

En la determinación en el laboratorio del síndrome antifosfolípido se considera la presencia persistente (>12s) de títulos elevados de autoanticuerpos IgG o IgM antiB2GPI y/o Anticardiolipina o de anticoagulante tipo lupus.

Para establecer el diagnóstico de síndrome antifosfolípido ha de existir al menos un criterio clínico y un criterio de laboratorio.

Catlab Informa

Frecuencia

- 3.1% de pacientes <70 años con trombosis venosa profunda tiene AL +
 - 0.9% en controles (OR 3.6)
- Estudio caso/control AVC en mujer <50 a
 - 17% AL +, 0.7% en controles (OR 43)
 - El riesgo se incrementaba con ACO o tabaco (OR 201 y 87)
- 1% mujeres tiene abortos recurrentes
 - 10-15% de ellas AL +

El Anticoagulante tipo lupus o Anticoagulante Lúpico es una interferencia en el proceso de coagulación in vitro, en las pruebas dependientes de fosfolípidos, que alarga el tiempo de coagulación y no corrige con plasma normal. Como hemos comentado antes no está asociada con mayor riesgo hemorrágico sino con fenómenos trombóticos.

En nuestro laboratorio el estudio de anticoagulante tipo lupus se solicita

- cuando existen pruebas de coagulación básica alteradas (TTPa) que no corrigen con plasma normal después de descartar presencia de anticoagulantes farmacológicos: heparina, inhibidores directos
- en los perfiles de estudio de trombosis,
- en determinadas enfermedades autoinmunes (LES, por ejemplo)
- en el estudio de abortos de repetición e infertilidad.

Los test de laboratorio se basan en la prolongación in vitro de tiempo de coagulación en test dependientes de fosfolípidos. En situaciones de baja concentración de fosfolípidos el Ac interferirá en la reacción: tiempos alargados y habrá corrección tras añadir exceso de fosfolípidos, son los test confirmatorios.

El estudio de anticoagulante tipo Lupus se basa en diversas recomendaciones y guías de sociedades internacionales: The International Society on Haemostasis and Thrombosis (ISTH), British Committee for Standards in Haematology (BCSH), The Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).

En las publicadas en 2014 existe acuerdo general en aspectos sobre

- Preparación de la muestra: muy importante. Se ha de realizar una doble centrifugación del plasma para eliminar plaquetas de la muestra.

Catlab Informa

- Uso de dVVRT en el panel de diagnóstico
- Uso de Ratios Normalizados
- Demostrar dependencia de fosfolípidos (test confirmatorios)
- Uso de test de mezclas para demostrar inhibición aunque determinadas situaciones lo hacen innecesario.
- Se recomienda Informes interpretativos
- Ante un resultado positivo se ha de realizar un nuevo test en 12 semanas para comprobar este resultado.

En nuestro laboratorio en el periodo 2008-2013 el estudio de anticoagulante lúpico se realizaba mediante el análisis con un reactivo muy sensible al AL, la mezcla de la muestra con plasma normal, y el uso de un ratio (Test de Rosner) para valorar si existía corrección. Si este screening era positivo se pasaba al test confirmatorio (STACLOT-LA), en el que se añadían fosfolípidos hexagonales y comparaba el tiempo de coagulación con y sin fosfolípidos. Si la diferencia entre los dos tiempos era inferior a 8 segundos (no había corrección) el resultado era negativo, sin embargo si la diferencia era superior a 8 segundos el test se consideraba positivo.

En 2013 se sustituyó este test por el dVVRT, test del veneno de víbora de Russell diluído (screening y confirmatorio). En el test de screening se establecía un ratio entre el tiempo de coagulación de la muestra y el tiempo de referencia obtenido con plasmas normales. Si este ratio era superior a 1.2 el screening se consideraba positivo.

En el test confirmatorio se establecía un ratio de forma similar, pero el resultado del test viene dado por el ratio normalizado (RN): $\text{ratio Screen/ratio Confirm}$. Si este RN es superior a 1.2 el anticoagulante lúpico se considera positivo.

En 2014, siguiendo las guías que recomiendan la utilización de dos test de screening, añadimos el Silica Clotting Time (SCT). En este test también se obtienen un ratio de screening y uno confirmatorio y el resultado global se expresa en ratio normalizado. Si es superior a 1.2 se considera positivo.

PERFIL ACTUAL DE ANÁLISIS:

dVVRT (tiempo de veneno de víbora de Russell diluído)

- Screening: reactivo dVVRT screen.
 - Ratio Screening: $\text{tiempo de coagulación muestra (seg) / tiempo de referencia screening (seg)}$.
 - Positivo si $\text{ratio} > 1.20$
- Test confirmatorio, dVVRT confirm. Reactivo con aporte de fosfolípidos.

Catlab Informa

- Ratio confirmatorio: tiempo de coagulación muestra (seg)/ tiempo de referencia confirm (seg).
- Ratio normalizado: Ratio Screen/Ratio confirm. Positivo si $RN > 1.20$

SCT (Silica Clotting Time)

- SCT Screen: concentración baja en fosfolípidos. Altamente sensible a la presencia del AL alargando el tiempo de coagulación en presencia de éste.
- SCT confirm: alta concentración de fosfolípidos en el SCT Confirm, neutraliza el AL y acorta los tiempos de coagulación.
 - Silica Clotting Time, en presencia de calcio, activa directamente la vía intrínseca de la coagulación.
 - No son alterados por deficiencias en el Factor VII o inhibidores.
 - No existe interferencia por niveles de heparina hasta 0,4 U/mL ya que es neutralizada por Polibrene.
 - Insensible a la antivitamina-K, es decir, resultados válidos
 - en las muestras de pacientes tratados con warfarina o sintrom.
- Ratio normalizado: Ratio screen/ratio confirm. Si > 1.20 se considera positivo

Todo el estudio se hace en muestra congelada en la actualidad, con lo que el procesado de las muestras se realiza en las mismas condiciones para todas.

ANÁLISIS DE RESULTADOS

Hemos analizado los resultados de los test de anticoagulante lúpico efectuados en 2015 en nuestro laboratorio:

Desde Enero a Noviembre de 2015 efectuamos 1435 test de anticoagulante Lúpico. En la tabla 1 presentamos la distribución de resultados para cada test y la relación con aPTT alargado o con INR elevado.

Catlab Informa

	N (%)	aPTT > 1.25	INR>1.5
SCT- dVVRT -	1150 (80.1)	2	103
SCT+ dVVRT -	58 (4)	0	0
SCT- dVVRT +	146 (10.1)	71	59
SCT+ dVVRT +	81 (4.6)	73	6
TOTAL	1435	146	168

Tabla 1: resultado de los test y su relación con las pruebas de coagulación de rutina

Dentro del grupo de SCT- dVVRT+ encontramos algunos casos en los que el INR era superior a 1.5, en pacientes presumiblemente en tratamiento con sintrom. La interferencia por heparina se descartaba por la realización de tiempo de trombina en los pacientes con aPTT alargado. Los resultados de aPTT alargados con INR y tiempo de trombina normal se consideraron relacionados con la presencia de anticoagulante Lúpico.

De las 1435 solicitudes, solamente 1038 (72.3%) incluyeron solicitud de anticuerpos antifosfolípidos.

El 80% de estos AAF fueron negativos, pero si alguno de los test de AL era positivo encontramos que al menos uno de los AAF era positivo en un 40% de los casos.

En la tabla 2 mostramos los diferentes AAF positivos para cada subgrupo de resultados de AL.

	N	INR >1.5	TTPR >1.25	IgG ACA +	IgM ACA +	IgG AB2GPI +	IgM AB2GPI +	AAF + todos	AAF - todos
SCT- dVVRT -	840	42	87	41	106	32	32	0	683
SCT+ dVVRT -	43	0	21	6	2	18	13	0	33

Catlab Informa

SCT- dVVRT +	90	32	34	6	17	1	16	1	62
SCT+ dVVRT +	65	6	57	23	14	4	4	5	29
TOTAL	1038	80	199	76	139	55	65	6	807

Tabla2: resultados de AL, valores prolongados de test de rutina y resultados positivos de AAF

En los pacientes en tratamiento con Sintrom® y con INR >1.5 y <3 se recomienda realizar un test de mezclas para eliminar la interferencia por déficit de factores de vía extrínseca provocados por el tratamiento. Con valores de INR >3 algunos autores no recomiendan determinar AL.

39 muestras, no incluidas en la serie previa de pacientes, se analizaron tras mezcla con pool de plasma. Los criterios para realizar este test fueron valores elevados de los test de screening y confirmatorio tanto de SCT como de dVVRT con Ratios normalizados negativos y también los test de anticoagulante Lúpico analizados si el INR era superior a 1.5. Resultados en tabla 3:

17 muestras tenían resultado positivo para dVVRT y solo una para SCT. De las 16 muestras con SCT-dRVVT+ e INR >1.5, 15 dieron un resultado negativo tras el test de mezclas, y por lo tanto se consideraron negativas.

Solamente una muestra considerada negativa con SCT y dVVRT dio resultado positivo tras la mezcla con plasma.

APTT-R	INR	SCT NR	SCT-M NR (mezcla)	dVVRT NR	dVVRT-M NR (mezcla)
2,53	6,38	0,66	0,54	0,80	0,85
1,46	4,39	0,97	0,83	1,17	1,41
1,7	3,95	0,96	0,80	1,28	0,93
1,75	3,55	0,99	0,82	1,48	1,01
1,85	3,43	0,85	0,78	1,39	1,07

Catlab Informa

1,49	3,31	1,09	0,86	1,29	0,89
1,38	3,20	0,96	0,82	1,11	1,01
1,75	3,18	1,05	0,84	1,60	1,36
1,48	3,02	1,11	0,85	1,16	1,00
1,5	2,96	1,03	0,96	0,99	0,91
2,25	2,95	2,84	1,99	2,83	2,34
1,71	2,93	0,88	0,77	1,52	1,15
1,4	2,86	0,95	0,82	1,29	0,89
1,8	2,80	0,83	0,78	1,11	0,87
1,6	2,75	0,86	0,79	1,36	1,09
1,12	2,74	0,82	0,76	1,03	0,96
Cont..					
APTT-R	INR	SCT NR	SCT-M NR (mezcla)	dVVRT NR	dVVRT-M NR (mezcla)
1,52	2,66	0,76	0,75	1,23	1,06
1,63	2,63	0,90	0,80	1,63	1,00
1,54	2,59	0,90	0,78	1,06	0,93
1,34	2,51	0,91	0,79	1,22	0,98
1,82	2,49	1,14	0,96	1,01	0,89
1,75	2,46	0,97	0,82	1,47	1,13
1,28	2,43	0,97	0,84	1,46	1,06
1,53	2,42	1,05	0,84	1,20	1,19
1,27	2,36	0,89	0,78	0,99	0,91
1,4	2,21	0,93	0,89	1,38	1,02

Catlab Informa

1,29	2,21	1,19	0,99	0,97	0,89
1,14	2,09	1,01	0,84	1,29	1,03
1,41	2,04	1,12	0,98	1,17	0,90
1,37	1,89	1,14	1,03	0,92	0,87
1,16	1,82	1,03	0,96	0,99	0,86
1,36	1,55	0,88	0,83	1,12	1,03
1,16	1,38	0,94	0,86	1,09	1,09
1,03	1,26	0,94	0,87	1,09	1,05
1,18	1,14	0,84	0,80	1,02	0,96
1,61	1,12	0,97	0,92	0,99	0,90
1,36	1,11	0,84	0,77	1,01	0,89
1,42	1	1,07	1,09	0,96	1,18
1,07	0,99	0,75	0,75	0,98	1,03

Tabla 3: resultados de los test de mezclas en anticoagulante tipo lupus

CONCLUSIONES y RECOMENDACIONES DE SOLICITUD:

- El 80% de los test de anticoagulante Lúpico solicitados dieron resultado negativo.
- Un 20% dio resultado por alguno de los test, recordemos que según las guías si uno de los test tiene un resultado positivo el Anticoagulante Lúpico se considera positivo.
- Los pacientes en tratamiento anticoagulante con antivitamina K (dicumarínicos, warfarina, Sintrom) pueden dar resultados falsamente positivos, por lo que se recomienda retirar el tratamiento previo al análisis (al menos una semana).
- Niveles elevados de heparinemia pueden interferir en los test. Lo detectaríamos por un tiempo de trombina alargado e incluiríamos en el informe una recomendación de retirada del tratamiento.
- En relación a los nuevos anticoagulantes (Dabigatran, Rivaroxaban, Apixaban...) interfieren de forma total con estos test. No es posible valorar el anticoagulante tipo Lupus en pacientes sometidos a estos tratamientos, con el

Catlab Informa

aggravante de que con los test de rutina no somos capaces de detectarlos en muchos casos. Se han de retirar SIEMPRE antes de la realización del análisis.

- Solo un 72% de los estudios de anticoagulante Lúpico incluían estudio de anticuerpos antifosfolípidos, serían estudios incompletos.
- Un resultado positivo (la primera vez) se ha de confirmar en 12 semanas.

INFORMES DE LABORATORIO:

En la actualidad se informan las dos técnicas: dVVRT y SCT.

En el dVVRT, si el screening es negativo, se informa el ratio y se incluye un comentario: Negativo. Si el screening es positivo se realiza el test confirmatorio y el Ratio Normalizado. Se informa el valor numérico de este Ratio normalizado y el comentario: Positivo, Negativo, o valor dudoso atribuído al tratamiento anticoagulante.

Perfil d'estudi d'Anticoagulant tipus lupus Cribratge d'VVRT	1.18 Negatiu Ratis inferiors a 1.2 es consideren Negatius	
SCT (Silica Clotting Time) Rati Normalitzat	1.01 Negatiu	(0.0 - 1.2)

Perfil d'estudi d'Anticoagulant tipus lupus Cribratge d'VVRT	1.24 Positiu Ratis inferiors a 1.2 es consideren Negatius	
Confirmatori d'Anticoagulant lúpico (dVVRT) Rati Normalitzat	1.12 Negatiu	(0.0 - 1.2)
SCT (Silica Clotting Time) Rati Normalitzat	1.04 Negatiu	(0.0 - 1.2)

El SCT es un test integrado y se informa directamente el Ratio Normalizado con su comentario Positivo/Negativo.

Catlab Informa

Perfil d'estudi d'Anticoagulant tipus lupus		
Cribratge d'WRT	0.98	
	Negatiu	
	Ratis inferiors a 1.2 es consideren Negatius	
Confirmatori d'Anticoagulant lúpico (dVVRT)		
Rati Normalitzat	0.93	(0.0 - 1.2)
	Negatiu	
SCT (Silica Clotting Time)		
Rati Normalitzat	1.61	(0.0 - 1.2)
	Positiu	

Si se realizan test de mezclas y el resultado del Ratio Normalizado se considera dudoso se informará en estos comentarios.

Si cualquiera de los test realizados, dVVRT y SCT, obtiene un resultado positivo, el Anticoagulante Lúpico se considera positivo.

Los anticuerpos antifosfolípidos (IgG e IgM antiB2GPI y Anticardiolipina) se analizan por fluoroimmunoanálisis y se informan de manera independiente.

Estamos trabajando con la sección de informática e Inmunología para elaborar un informe integrado de este perfil en el que consten las determinaciones de Anticoagulante Lúpico, los anticuerpos antifosfolípido y un comentario interpretativo.

Teresa Villalba

Responsable Hematologia

CATLAB

Tel. 93.748.56.00 - ext. 35038 / 660.67.63.01

tvillalba@catlab.cat

www.catlab.cat