

Aspectos destacados del Taller de Laboratorio de Anticuerpos Antifosfolípidos XIII Congreso Argentino de Hemostasia y Trombosis, organizado por el GRUPO CAHT



LABORATORIO

Highlights of the Antiphospholipid Antibodies Workshop. XIII Argentine Congress on Haemostasis and Thrombosis (CAHT Group)

Adamczuk Y^{1,2}, Annetta E³, Bertolaccini ML⁴,
Blanco AN⁵, Duboscq C⁶, Mainetti G⁷, Martinuzzo M⁸,
Remotti L⁵, Rossi E⁹, Scazziotta A¹⁰

¹Laboratorio Central, Hospital General de Agudos Dr. Enrique Tornú.

²Laboratorio CentraLab.

³Laboratorio de Hemostasia y Trombosis, Servicio de Hematología y Oncología, Hospital de Pediatría Prof. Dr. JP Garrahan.

⁴King's College London | KCL · Academic Department of Vascular Surgery.

⁵División Hemostasia, Depto. de Hemostasia y Trombosis, IIHEMA-Academia Nacional de Medicina.

⁶Servicio Hematología y Hemoterapia, Hospital Británico.

⁷Laboratorio Central, Hospital Juan A Fernández, CABA.

⁸Laboratorio Central, Hospital Italiano de Buenos Aires, Instituto Universitario del Hospital Italiano.

⁹Sección Hemostasia, Laboratorio de Salud Pública, Sistema Provincial de Salud, Tucumán.

¹⁰Laboratorio de Hemostasia, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Hospital de Clínicas José de San Martín, Universidad de Buenos Aires.

ascazziotta@gmail.com // memartinuzzo@gmail.com

Fecha recepción: 26/11/2018

Fecha aprobación: 3/12/2018

HEMATOLOGÍA

Volumen 22 n° 3: 326-347

Septiembre - Diciembre 2018

Palabras claves: síndrome antifosfolípido, diagnóstico de anticoagulante lúpico, anticuerpos antifosfolípidos en fase sólida.

Keywords: antiphospholipid syndrome, lupus anticoagulant diagnosis, solid phase antiphospholipid antibodies.

La presente ficha técnica constituye el material abordado en el **Taller de Laboratorio de Anticuerpos Antifosfolípidos** durante el XIII Congreso Argentino de Hemostasia y Trombosis llevado a cabo en la Ciudad Autónoma de Buenos Aires el 27 de septiembre de 2018.

De acuerdo con el propósito de este taller, en la siguiente ficha técnica se tratarán temas importantes para tener en cuenta en las determinaciones de laboratorio, que son herramientas indispensables para el diagnóstico del síndrome antifosfolípido.

- 1) Introducción. Marta Martinuzzo. Alejandra Scuzziota
- 2) Variables pre analíticas. Momento del estudio. Gabriela Mainetti
- 3) Pruebas diagnósticas para anticoagulante lúpico, según las distintas Guías. Eliana Annetta
- 4) Utilidad del ensayo de mezcla. Selección del plasma normal. Cristina Duboscq
- 5) Control de calidad en la detección del anticoagulante lúpico. Cálculo de los valores de referencia de cada prueba. Yolanda Adamczuk
- 6) Interferencias en la detección del anticoagulante lúpico. Lucía Remotti
- 7) Etapa post analítica. Interpretación y modelo de informe. Alicia Blanco
- 8) Pruebas para la detección de anticuerpos antifosfolípidos en fase sólida. Eleonora Rossi
- 9) Comentarios. Marta Martinuzzo. Alejandra Scuzziota

1. Introducción

El síndrome antifosfolípido (APS) es un síndrome que, al igual que otras patologías de origen autoinmune, se define por criterios clínicos y de laboratorio para poder ser identificado (**Figura 1**).



Figura 1. Esquema simplificado del diagnóstico de APS

La presencia de anticuerpos antifosfolípidos (aPL) es reconocida como una causa de trombofilia adquirida que puede hallarse en pacientes con trombosis venosa o arterial (prevalencia de hasta 10% o mayor en el caso de accidente cerebrovascular) y como factor de riesgo de morbilidad obstétrica en las mujeres con APS. Generalmente es diagnosticado en pacientes menores de 50 años, afectando más a mujeres que a hombres^(1,2). Los criterios vigentes para la clasificación de APS definido⁽³⁾ se detallan en la **tabla 1**.

Las determinaciones incluidas en los criterios han tenido serios inconvenientes de estandarización, motivo por el cual a lo largo de los últimos años se han desarrollado guías y recomendaciones en el

seno del subcomité que aborda este tema en la ISTH (*Subcommittee on Lupus Anticoagulant/Antiphospholipid Antibody of the Scientific and Standardisation Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis*), así como en distintos entes regulatorios, grupos de expertos o sociedades científicas⁽⁵⁻¹¹⁾.

Definición de anticoagulante lúpico

El anticoagulante lúpico (LA) es categorizado como inhibidor de interferencia. Son generalmente autoanticuerpos con especificidad contra protrombina humana o beta 2 glicoproteína I (β_2 GPI), que prolongan las pruebas de coagulación dependientes de fosfolípidos (PL). Esta interferencia es un efecto *in vitro*, dado que los pacientes con LA no tienen problemas hemorrágicos. El mecanismo principal del efecto de interferencia se debe a la unión de los anticuerpos a estas proteínas, provocando su dimerización sobre la superficie fosfolipídica y aumentando su afinidad por PL. Esto, como consecuencia, disminuye por competición la disponibilidad de PL para las pruebas de coagulación, situación que se evidencia cuando se trabaja con reactivos con baja concentración fosfolipídica⁽⁴⁾ (**Figura 2**).

El LA representa la actividad de aPL que tiene capacidad de interferir en ensayos de coagulación, de manera fosfolípido dependiente “*in vitro*”, pero “*in vivo*” representa un factor de riesgo importante de complicaciones de APS, predominantemente trombóticas.

2. Anticoagulante lúpico: momento del estudio y variables preanalíticas

Para el correcto diagnóstico del LA es necesario seleccionar los pacientes a estudiar, realizar una extracción adecuada de la muestra de sangre y un estricto control de las variables preanalíticas. También se debe considerar la correcta validación y control de los ensayos y el cálculo de los valores de corte en cada laboratorio.

Selección de pacientes

Con respecto a la selección de los pacientes a estudiar, la ISTH establece que sólo se deben estudiar los pacientes con alta probabilidad de tener APS o aquellos que presentan una prolongación inexplicable del APTT⁽⁹⁾. La guía de la ISTH clasifica a los pacientes en 3 categorías de riesgo: bajo, moderado y alto, según sus características clínicas. Esta cla-

sificación fue considerada adecuada por la CLSI⁽⁷⁾.

1. Riesgo bajo: tromboembolismo venoso (TEV) o trombosis arterial (TA) en pacientes ancianos.
2. Riesgo moderado: APTT prolongado en sujeto asintomático, abortos tempranos espontáneos recurrentes, TEV en paciente joven.
3. Riesgo alto: TEV no provocado y TA inexplicable en paciente joven (menos de 50 años), trombosis

en sitios inusuales, pérdida de embarazo tardía y cualquier trombosis o morbilidad obstétrica en pacientes con enfermedades autoinmunes.

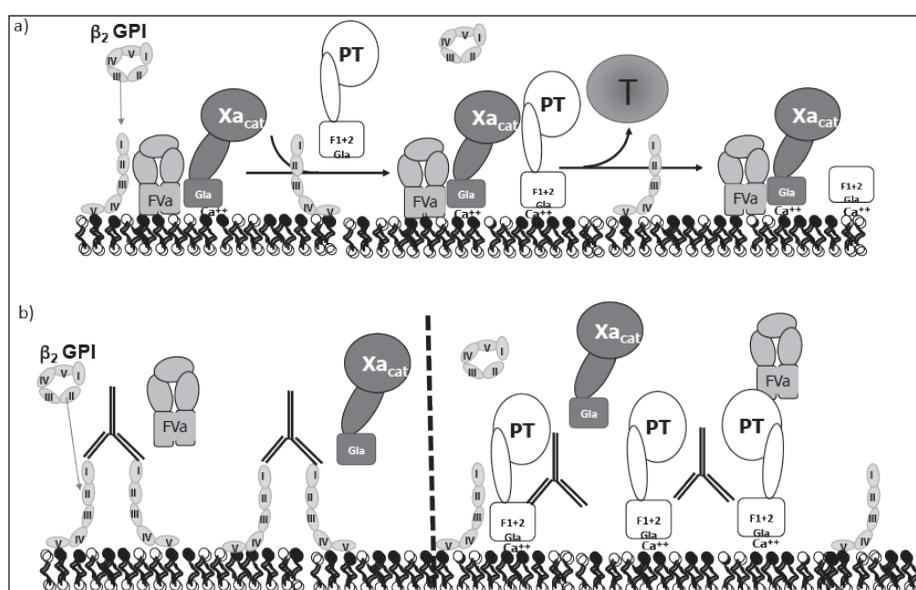
No se aconseja realizar el estudio en pacientes asintomáticos y tampoco en pacientes que no pertenezcan a ninguna de las 3 categorías mencionadas. De esta manera disminuye la posibilidad de obtener resultados falsos positivos para LA, que son bastante comunes, debido a la baja especificidad de los ensayos.

Tabla 1. Criterios incluidos en la clasificación diagnóstica de APS definido⁽³⁾

Criterios clínicos		Criterios de laboratorio
Trombosis vascular	Morbilidad obstétrica	Detección de anticuerpos aPL
Arterial	Una o más MUERTES FETALES de fetos morfológicamente normales > de 10 semanas de gestación	ANTICOAGULANTE LÚPICO realizado de acuerdo a guías de estandarización de la ISTH
Venosa	Uno o más nacimientos de un neonato prematuro morfológicamente normal, antes de la semana 34 de gestación por ECLAMPSIA, PREECLAMPSIA SEVERA O INSUFICIENCIA PLACENTARIA DOCUMENTADA	aCL (IgG y/o IgM), título moderado o alto (> 40 GPL o MPL, o >99° percentil) medidas por un ELISA estandarizado dependiente de β_2 GPI
De la microvasculatura	Tres o MÁS ABORTOS ESPONTÁNEOS consecutivos previos a la semana 10 de gestación en mujeres en las que las alteraciones hormonales y anatómicas, así como las alteraciones cromosómicas de la pareja, fueron excluidas.	Anti- β_2 GPI (IgG y/o IgM), (>99° percentil) medido por un ELISA estandarizado
Uno o más episodios en cualquier tejido u órgano, bien documentado (en caso de diagnóstico histopatológico que el vaso afectado no presente signos claros de inflamación o vasculitis)		Los resultados positivos deben ser repetidos en 2 oportunidades separadas por 12 semanas o más

ISTH (Sociedad Internacional de Trombosis y Hemostasia), aCL (anticuerpos anticardiolipina), ELISA (enzimoinmunoensayo), Ig (inmunoglobulina), β_2 GPI (beta 2 glicoproteína I)

Figura 2. Esquema adaptado de Molhoek JE y col⁽⁴⁾. Fenómeno que determina la actividad de LA debida a la competencia por los fosfolípidos aniónicos entre los factores de coagulación que forman los complejos enzimáticos de coagulación (en la figura se detalla la protrombinasa) y la β_2 GPI o la protrombina cuando son dimerizadas por los autoanticuerpos. Se esquematiza la situación en ausencia (a) o en presencia (b) de anticuerpos anti β_2 GPI o anti protrombina.



Momento del estudio

En cuanto al momento adecuado para estudiar el LA, se debe considerar que no es un estudio de urgencia, salvo que se sospeche APS catastrófico, en cuyo caso se deberá proceder a realizar el ensayo de LA, debido a la gravedad y la rápida progresión de esta patología con alta mortalidad, cuyo diagnóstico puede cambiar la conducta terapéutica. No es conveniente estudiar el LA durante el episodio agudo (por ejemplo, durante un evento tromboembólico reciente) debido al aumento de citoquinas inflamatorias que activan el sistema de coagulación y al aumento de FVIII y fibrinógeno que son reactantes de fase aguda. Estas circunstancias generalmente producen acortamientos de los tiempos de las pruebas de coagulación y pueden obtenerse resultados falsos negativos para LA. Por este motivo se aconseja esperar como mínimo 3 meses para realizar el estudio. El embarazo y el puerperio no son momentos adecuados para estudiar el LA (sobre todo en el segundo y tercer trimestre de embarazo), ya que en este período se produce un estado fisiológico de hipercoagulabilidad por aumento en la síntesis de factores de la coagulación, sobre todo el FVIII y el fibrinógeno, que pueden duplicar o triplicar sus valores. Aquí también existe la posibilidad de obtener resultados falsos negativos por el acortamiento de los tiempos de los ensayos. Por otro lado, se debe tener en cuenta que tanto los pacientes con TEV como algunas pacientes embarazadas se encuentran recibiendo heparina de bajo peso molecular (LMWH), que puede ocasionar resultados falsos positivos para LA, como se verá en la sección interferencias.

Tampoco se aconseja el estudio de LA luego de una cirugía reciente ni durante procesos infecciosos o en pacientes recientemente inmunizados (pediátricos que hayan recibido vacunación reciente).

Con respecto a las drogas anticoagulantes, no se deben estudiar pacientes que se encuentren recibiendo anticoagulación con heparina no fraccionada (UFH), LMWH, ni anticoagulantes orales directos (DOACs) como será tratado en la sección interferencias. Si el paciente está recibiendo dicumarínicos antagonistas de la vitamina K (VKA) se tendrá en cuenta el grado de anticoagulación: si el INR es mayor a 3 no se debe procesar, si el INR se encuentra entre 1,5 y 3 se procesará como mezcla de partes iguales de plasma del paciente y *pool* de plasmas normales, y si el INR es menor a 1,5 se procesará la

muestra pura. Si el paciente está recibiendo LMWH y debe ser estudiado, se deberá tomar la muestra de sangre antes de la próxima aplicación de la misma (o sea después de 12 o de 24 horas de la última aplicación, según si la indicación es de 2 o 1 dosis diaria de LMWH). Se recomienda no estudiar pacientes que están medicados con hidroxiclороquina en altas dosis, corticoides, anticonceptivos orales o terapia de remplazo hormonal, porque pueden producir resultados falsos negativos para LA. En cambio, no interfieren ni la aspirina, el clopidogrel ni otros antiagregantes plaquetarios.

Variables preanalíticas

Existe consenso de las 3 guías (ISTH 2009, BCSH 2012, CLSI 2014) en cuanto a las variables preanalíticas, que deben ser estrictamente controladas para un correcto diagnóstico de LA.

Las variables preanalíticas incluyen:

- A) Preparación del paciente y toma de muestra
- B) Preparación del plasma
- C) Transporte y almacenamiento

A) Preparación del paciente y toma de muestra

Previo al estudio el paciente debe ser interrogado y se deben registrar todos los antecedentes clínicos de importancia y toda la medicación que se encuentre recibiendo, no sólo los anticoagulantes. El paciente no debe ingerir lácteos ni grasas por lo menos 4 horas previas a la extracción de sangre. Idealmente la muestra no debe tomarse de vías o catéteres que puedan asistir al paciente. La extracción de sangre debe ser limpia, los tubos que ya poseen el anticoagulante se deben llenar escurriendo la sangre por las paredes o por sistemas de vacío. Una vez llenos deben mezclarse con inversión suave y sin agitación para evitar activación plaquetaria y del sistema de coagulación que pueda neutralizar el efecto del inhibidor, basado en las condiciones de extracción y procesamiento del plasma según guía H21-A5 2008⁽¹³⁾. El tubo se debe llenar con sangre hasta el enrase, se acepta hasta un 80% del mismo en pacientes anémicos. El anticoagulante que se utiliza es citrato de sodio 3,2% en proporción 1:9 anticoagulante:sangre; esta proporción debe ser corregida en caso de que el hematocrito del paciente sea mayor a 55%, ya que el exceso de citrato de sodio puede provo-

car prolongación de los tiempos de coagulación en las distintas pruebas con efecto inhibitorio. El volumen mínimo de plasma necesario para el ensayo es de 1 ml, por lo tanto se deberán extraer 3 tubos con citrato para poder obtener dicho volumen de plasma.

B) Preparación del plasma

Para la obtención del plasma pobre en plaquetas (PPP) se debe realizar doble centrifugación de 15 minutos cada una a velocidad de 3000 a 3500 rpm (1500-2000g) (**Figura 3**). No se debe filtrar, ya que en los filtros se pueden perder algunos factores de coagulación (FV, FVIII, FIX, FXII y FvW), lo que produciría prolongación de los tiempos de los ensayos (resultados falsos positivos para LA). Tampoco usar ultracentrifugación, ya que se pueden generar micropartículas que interfieren con los ensayos de LA, dando falsos negativos. Siempre utilizar tubos plásticos y al separar el plasma dejar alrededor de 0,5 ml por encima del paquete globular. Los tubos tienen que estar permanentemente tapados para evitar la disolución del CO₂, que produciría cambios en el pH del plasma y alteración de las pruebas. Es muy importante realizar controles periódicos del recuento de plaquetas residuales en el plasma pobre en plaquetas, que debe ser inferior a $10 \times 10^9/L$.

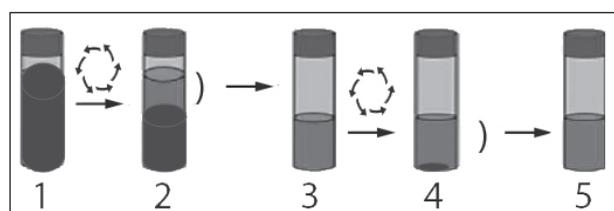


Figura 3. Descripción del proceso de obtención del plasma pobre en plaquetas para el estudio de LA: 1- sangre entera; 2- resultado de la primera centrifugación; 3- PPP; 4- resultado de la segunda centrifugación, 5- PPP con plaquetas $< 10 \times 10^9/L$

C) Transporte y almacenamiento

Preferentemente se deben realizar los estudios sobre muestras frescas, hasta 4 horas de haber sido extraídas, fundamentalmente en el primer estudio. Las muestras se deben conservar a temperatura ambiente, no en heladera ni baño de hielo para evitar la activación del FVII. Si los plasmas no se pueden procesar en fresco, se debe trabajar sobre muestras congeladas y desconge-

las apropiadamente. El plasma se debe congelar rápidamente en el *freezer* a $-70^{\circ}C$ y descongelar por inmersión completa del tubo a $37^{\circ}C$ por no más de 5 minutos. Si las condiciones de congelamiento y descongelamiento no se respetan se pueden producir resultados falsos negativos para LA por la presencia de plaquetas residuales, y resultados falsos positivos para LA por el deterioro de los factores de coagulación.

Los tubos de sangre se pueden transportar a través de tubo neumático siempre y cuando se los envuelva para evitar excesiva agitación y la consiguiente activación de la muestra. Si se debe trasladar la muestra para procesar en otro centro, en lo posible enviar muestras de plasma frescas (ya doblemente centrifugadas y separadas del paquete globular) a temperatura ambiente y antes de las 4 horas de haber sido extraídas. Siempre se deben acompañar de datos clínicos del paciente.

3. Pruebas diagnósticas para la detección de anticoagulante lúpico

Las pruebas clásicas como el tiempo de protrombina (TP), tiempo de tromboplastina parcial activado (APTT) y tiempo de trombina (TT) deben realizarse previo a la evaluación del LA⁽⁵⁾. Estas pruebas no sólo colaboran en el tamizaje, sino que aportan información acerca de la integridad de la muestra, ayudan a determinar la presencia de agentes farmacológicos y permiten detectar o descartar otras alteraciones de la coagulación presentes en el plasma que puedan mimetizar, enmascarar o coexistir con la presencia de un LA (**Tabla 2**).

El TT es la prueba de elección para descartar presencia de heparina o inhibidores directos de trombina. Si el TT es muy prolongado no debería realizarse el estudio de LA debido a que la presencia de heparina podría dar falsos positivos (Ver sección de interferencias).

Los criterios diagnósticos de anticoagulante lúpico⁽⁴⁾ se basan en:

- Prolongación de los ensayos de coagulación dependientes de fosfolípidos
- Evidencia del efecto inhibitorio a través de los ensayos de mezcla (aspecto que será tratado especialmente en la Sección 4. Utilidad del ensayo de mezcla)
- Demostración de la dependencia de fosfolípidos del inhibidor

Tabla 2. Aporte de las pruebas básicas de coagulación para el diagnóstico de LA

Tiempo de protrombina (PT)	Tiempo de trombotoplastina parcial activado (APTT)	Tiempo de trombina (TT)
Deficiencia de factores de vía extrínseca y vía final común Inhibidores específicos Antagonistas de vitamina K Inhibidores directos de IIa Inhibidores directos e indirectos de FXa	Deficiencia de factores de vía intrínseca y vía final común Inhibidores específicos Heparina Antagonistas de vitamina K Inhibidores directos de IIa Inhibidores directos e indirectos de FXa	Heparina Inhibidores directos de IIa Disfibrinogenemia Hipofibrinogenemia Afibrinogenemia

Disponemos de tres guías publicadas por grupos de expertos, que se han actualizado durante las últimas décadas con el objetivo de ofrecer las mejores prácticas en el laboratorio para evaluar LA.

- Guía de la Sociedad Internacional de Hemostasia y Trombosis (ISTH 2009)⁽⁶⁾
- Comité Británico para Estándares Clínicos en Hematología (BCSH 2012)⁽⁸⁾
- Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI 2014)⁽⁷⁾

La heterogeneidad de los anticuerpos que conforman el APS, la ausencia de material de referencia, la variabilidad de reactivos y analizadores y las diversas interpretaciones dificultan la posibilidad de una estrategia diagnóstica única y es por esta razón que las diferentes guías discrepan en algunas de sus recomendaciones⁽¹³⁾.

Para investigar la presencia de LA en el laboratorio contamos con pruebas de tamizaje y pruebas confirmatorias.

Ensayos de tamizaje

El objetivo es demostrar la prolongación de los ensayos de coagulación dependientes de fosfolípidos. Las tres guías coinciden en que se deben realizar dos pruebas de tamizaje sensibles, con diferentes principios analíticos, debido a la evidencia de que no hay ninguna prueba 100% sensible.

La ISTH recomienda realizar sólo dos pruebas para minimizar los falsos positivos, mientras que las guías BCSH y CLSI sugieren realizar al menos dos pruebas.

Las tres guías coinciden en que las pruebas de elección en primera línea son APTT y tiempo de veneno de víbora de Russell diluido (DRVVT).

APTT: es un ensayo en dos etapas que consiste en la activación *in vitro* de la coagulación a través de la fase de contacto (con activadores de carga negativa y una fuente de fosfolípidos) y posterior recalcificación del plasma. Mide el efecto que tienen estos anticuerpos sobre los complejos tenasa intrínseca y protrombinasa de la vía final común de la coagulación.

Los diferentes reactivos comerciales difieren en:

- Tipo de producto usado para activar el sistema de contacto: sílica micronizada, sílica coloidal, caolín y ácido eláico
- Origen del material para obtener los fosfolípidos: cerebro de conejo, cerebro bovino, placenta, vegetal (soja), lípidos sintéticos en liposomas
- Tipo y proporción de fosfolípidos presentes: fosfatidilinositol, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina.
- Concentración de fosfolípidos
- Configuración de los fosfolípidos: liposomas, micelas, o unidos a proteínas.

El reactivo de APTT recomendado (ISTH) es aquél con baja concentración de fosfolípidos y sílica como activador⁽⁶⁾.

Respecto del tiempo de coagulación con sílica (SCT), es una variante del tiempo de coagulación activado con caolín (KCT), desarrollada para ser automatizada. Es un reactivo comercial que utiliza la misma vía de activación que el APTT con fosfolípidos muy diluidos en la etapa de tamizaje y concentrados en la confirmatoria, empleando sílica como activador.

DRVVT: mide el efecto que tiene el LA sobre el complejo protrombinasa. El veneno posee una fracción enzimática que activa directamente el FXa en presencia de fosfolípidos.

Los diferentes reactivos comerciales difieren en:

- Fracción de veneno utilizada: los que contiene sólo activador de FX y los que también poseen un activador de FV
- Origen y concentración de fosfolípidos
- Presencia de neutralizantes de heparina (la mayoría de los reactivos comerciales lo contienen)

En la **tabla 3** se presentan las características de otros ensayos de tamizaje adicionales que no son recomendados por las guías de la ISTH, pero algunos de ellos son mencionados como de posible utilidad en las otras guías.

Tabla 3. Pruebas de tamizaje adicionales

Tiempo de tromboplastina diluida (dPT)	Tiempo de veneno de víbora de Taipán	Tiempo de coagulación con caolín (KCT)
<p>Debe realizarse únicamente con tromboplastina recombinante</p> <p>Si se utiliza preparado localmente en el laboratorio, debe tener controles de calidad y validación adecuados, como todo reactivo hecho en el laboratorio</p> <p>Hay reactivos comerciales, pero no están disponibles en Argentina</p>	<p>El veneno tiene una fracción similar FXa y similar FVa que activa directamente al FII (independientemente de si el FII está en su forma carboxilada o no carboxilada) en presencia de fosfolípidos y calcio</p> <p>Es de especial utilidad en la evaluación de pacientes en tratamiento con antagonistas de vitamina K y con inhibidores directos del FXa</p> <p>Aún no está disponible en Argentina</p>	<p>Dificultades técnicas</p> <p>Largos tiempos de incubación</p> <p>Reactivo particulado que no posibilita la automatización</p> <p>Pobre reproducibilidad</p> <p>Muy sensible a las plaquetas residuales del plasma dando falsos negativos</p> <p>No tiene disponible un ensayo confirmatorio</p> <p>Se desaconseja su uso</p>

Interpretación de los ensayos de tamizaje. Para poder determinar si una prueba de tamizaje es prolongada disponemos de dos estrategias: comparar el tiempo en segundos de la prueba con el rango de re-

ferencia (Ej.: APTT) o utilizar la razón normatizada de la prueba tamizaje utilizando en el denominador el tiempo de la prueba de tamizaje de la media de normales o del pool de plasmas normales (PPN).

$$\text{Razón de la prueba de tamizaje} = \frac{\text{Tiempo de la prueba de tamizaje del paciente}}{\text{Tiempo de la prueba de tamizaje media normales (seg) o PPN}}$$

En ambos casos se deben comparar los valores obtenidos con los valores de corte locales. (Ver sección control de calidad - cálculo de puntos de corte).

Ensayos confirmatorios. El fundamento es realizar la misma prueba de tamizaje que dio alterada, agregando un exceso de fosfolípidos de modo de neutralizar el efecto LA.

Las tres guías (ISTH/BCSH y CLSI) coinciden en que el ensayo confirmatorio debe realizarse sobre la prueba de tamizaje que dio alterada. Los ensayos de tamizaje y confirmatorios deben ser de la misma marca comercial y del mismo sistema cuando se utilicen reactivos apareados (sistemas integrados). No es correcto utilizar un reactivo de tamizaje de una marca y uno confirmatorio de otra, debido a que el cálculo de la corrección y la interpretación serán erróneos.

Los ensayos confirmatorios disponibles son:

- **Ensayo de neutralización con fosfolípidos en fase hexagonal:** es un kit comercial integrado. Contiene neutralizante de heparina. Como se realiza la confirmación sobre una mezcla con PPN (provisto por el fabricante), se minimizan los falsos positivos por VKA.
- **SCT confirmatorio:** reactivo comercial con exceso de fosfolípidos en bicapa.
- **DRVVT confirmatorio:** reactivo comercial con exceso de fosfolípidos en bicapa.
- **Ecarin:** transforma la protrombina en meizotrombina, independientemente de la concentración de fosfolípidos. Es el ensayo confirmatorio utilizado para la prueba del tiempo de veneno de víbora de Taipán⁽¹⁴⁾.
- **Prueba de neutralización con plaquetas (PNP):** es un reactivo hecho en el laboratorio. Se debe te-

ner en cuenta: la variabilidad interlote, el deterioro que sufre el reactivo (debe conservarse a -70°C), los posibles falsos positivos en caso de inhibidores de factor V (por unión al FV plaquetario) y en presencia de heparina (por unión al factor plaquetario 4). La ISTH desaconseja su utilización. La CLSI acepta su uso con verificación y validación previa a la implementación y validación interlote.

Interpretación de los ensayos confirmatorios

Ensayo de neutralización con fosfolípidos en fase hexagonal: se utiliza un delta de tiempo que se calcula del siguiente modo:

Delta (seg): Tubo 1 - Tubo 2 (**Figura 4**)

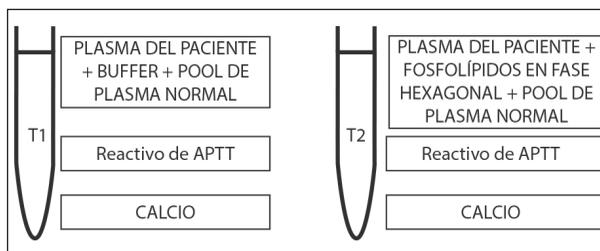


Figura 4. Descripción del ensayo integrado que utiliza PL hexagonales como confirmatorio

Para DRVVT, SCT, dPT y PNP podemos utilizar la razón normalizada *screen/confirm* o bien el porcentaje de corrección confirmatorio

$$\text{a) Razón normalizada } screen/confirm = \frac{\text{Razón de la prueba de tamizaje}}{\text{Razón confirmatoria}}$$

$$\text{siendo la Razón confirmatoria} = \frac{\text{Tiempo confirmatorio paciente (seg)}}{\text{Tiempo confirmatorio media normales (seg) o PPN}}$$

$$\text{b) \% Corrección confirmatorio} = \frac{\text{Razón de la prueba de tamizaje} - \text{Razón confirmatoria}}{\text{Razón de la prueba de tamizaje}} \times 100$$

En todos los casos, para poder interpretar si la prueba confirmatoria acorta o no con el agregado de fosfolípidos, se deben comparar los resultados obtenidos con los valores de corte locales.

Cálculo de los valores de corte

Es imprescindible establecer valores de corte locales para cada una de las etapas de diagnóstico del LA, de modo de poder realizar una correcta interpretación de las pruebas. La variabilidad de los reactivos utilizados requiere el cálculo de intervalos de referencia locales específicos para la dupla reactivo-analizador utilizada⁽¹⁵⁾. Esto es importante debido a que, aunque se utilicen el mismo reactivo y el mismo instrumento, los puntos de corte calculados difieren en distintos laboratorios⁽¹⁶⁾.

4. Utilidad del ensayo de mezcla. Selección del plasma normal

¿Qué es el ensayo de mezcla?

El ensayo de mezcla consiste en realizar la prueba de coagulación que da prolongada (en la muestra del paciente) en la mezcla de 1 volumen de plasma del paciente (PP) con 1 volumen de PPN y ver si el tiempo de coagulación permanece prolongado o normaliza. (**Figura 5**)⁽⁶⁻⁸⁾.

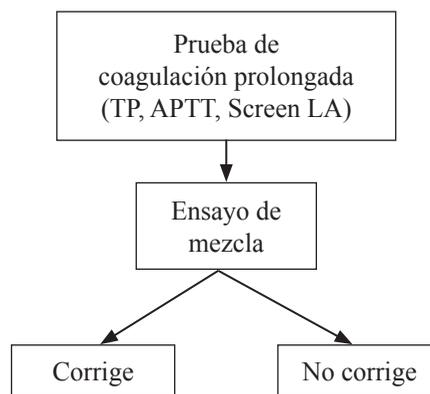


Figura 5. Esquema del ensayo de mezcla. Screen LA: pruebas específicas de tamizaje para LA

Las guías de la CLSI 2012, ISTH 2009 y BSH 2012⁽⁶⁻⁸⁾ coinciden en que la mezcla debe ser en proporción 1:1 y procesarse inmediatamente. La guía de la CLSI-H60⁽⁷⁾ sugiere hacer ensayo de tamizaje, ensayo confirmatorio y mezcla en ese orden, es decir no interrumpe el algoritmo si la mezcla corrige por el agregado de PPN.

Las dos cuestiones más importantes respecto al ensayo de mezcla son: a) qué PPN se va a utilizar para realizar el ensayo y b) cómo establecer si el ensayo corrige o no corrige.

Pool de plasma normal para realizar los ensayos de mezcla

El PPN es plasma citratado pobre en plaquetas (recuento de plaquetas menor a $10 \times 10^9/L$) de 20 o más (igual cantidad de hombres y mujeres) donantes de sangre cuidadosamente seleccionados. No se recomienda utilizar muestras de pacientes con resultados de PT y APTT normales^(7,17-18).

Los requerimientos para el PPN son: que la actividad de cada uno de los factores de coagulación sea de aproximadamente 100 UI/dL y que los tiempos de coagulación de los ensayos sean cercanos a la media del valor referencia del sistema utilizado, o sea que las pruebas de LA del PPN deben ser negativas. Se prepara, se fracciona y se conserva a $-70^\circ C$. Se descongela sumergiendo la alícuota 5 min en baño a $37^\circ C$ antes de ser utilizado.

De no poder preparar y conservar el PPN como se mencionó, la otra opción que las guías sugieren es utilizar plasmas normales comerciales liofilizados. Se debe verificar que tengan el nivel de actividad de factores de coagulación necesarios. La CLSI⁽⁷⁾ desaconseja el uso de los controles normales liofilizados para la prueba de mezcla.

$$ICA = \frac{(\text{Screening 1:1 mezcla seg} - \text{Screening PPN seg})}{\text{screening PP seg}} \times 100$$

donde el valor del *screening* PPN es el tiempo expresado en segundos del ensayo de *screening* del PPN que se usa para la mezcla. La CLSI⁽⁷⁾, en cambio, sugiere utilizar la media del valor de referencia. Cabe aclarar que la media del valor de referencia y el resultado del ensayo del PPN no deberían diferir significativamente si el PPN fue bien preparado y conservado, pero se han relatado variaciones si se usan PPN comerciales⁽¹⁹⁾.

EL PUNTO DE CORTE DEBE ESTABLECERSE LOCALMENTE, ya que depende fuertemente del método de detección, del reactivo y del coagulómetro. Los diferentes trabajos que evalúan la especificidad y sensibilidad de utilizar valores de referencia de la mezcla vs ICA muestran resultados controvertidos. Cada laboratorio debe decidir con qué parámetro trabajar.

Efecto cofactor

En 1959 se describieron algunos pacientes que tenían LA positivo que prolongaban ligeramente los ensayos de tamizaje o daban normales, pero cuando

¿Cómo evaluar si el ensayo corrige o no?

La guía de la CLSI sugiere comparar el resultado del ensayo de mezcla con el valor de referencia de la mezcla CALCULADO LOCALMENTE. Es importante el cálculo en cada laboratorio, ya que se observan diferencias aun entre laboratorios que utilizan reactivos y modelos de coagulómetros iguales^(15,16). El valor de referencia de la mezcla se realiza mezclando cada uno de 40 normales con un PPN y registrando el resultado del ensayo en cuestión. Luego se calcula la media ± 2 SD según CLSI-H60⁽⁷⁾. La ISTH⁽⁶⁾, en cambio, sugiere calcular el percentil 99 de la distribución de los ensayos de mezcla de al menos 40 normales, como se describe en la sección de control de calidad.

También se puede establecer la razón normalizada del ensayo de mezcla *screening* como el valor del ensayo de *screening* de la mezcla expresado en segundos dividido la media del rango de referencia de la mezcla de ese ensayo.

La otra forma de evaluar si el ensayo corrige es calcular el **índice de anticoagulante circulante (ICA) o índice de Rosner**, que toma el grado de corrección de la muestra en relación al valor basal del paciente.

se realizaba el ensayo de mezcla se prolongaban aún más los tiempos de coagulación. A esta situación se la llamó efecto cofactor. Actualmente se sabe que este cofactor es la protrombina o la $\beta 2GPI$. Este cofactor, ausente parcial o totalmente en el plasma del paciente, lo aporta el PPN, y de esa manera los anticuerpos presentes en el PP pueden evidenciar su efecto y los tiempos de coagulación son mayores en el ensayo de mezcla. La frecuencia de aparición de este efecto cofactor hasta el momento es desconocida.

La *Task Force* APL en 2014 sugiere que en pacientes con alta sospecha clínica de APS debe ser realizado el ensayo de mezcla aun cuando el resultado en la prueba de tamizaje sea normal. En ese caso sugiere realizar el ensayo de tamizaje en la mezcla y, si da prolongado (evidencia el efecto cofactor), realizar el confirmatorio en la mezcla⁽¹⁰⁾.

¿Mezcla sí o no?

Los resultados de los trabajos que investigan la utilidad del ensayo de mezcla en el algoritmo de diag-

nóstico del LA son controvertidos. Aquellos autores que están a favor del ensayo de mezcla dicen que la principal ventaja es detectar LA en pacientes que presentan el efecto cofactor. Sugieren que es una prueba más y que aumenta la especificidad. Aquellos que están en contra de su realización argumen-

tan que el ensayo de mezcla consume tiempo y los resultados son muy dependientes de la calidad del PPN. Por otro lado, si se frena el algoritmo en la situación en la cual el ensayo de mezcla corrige, se podrían perder LA débiles por efecto dilucional⁽²⁰⁾ (Figura 6).

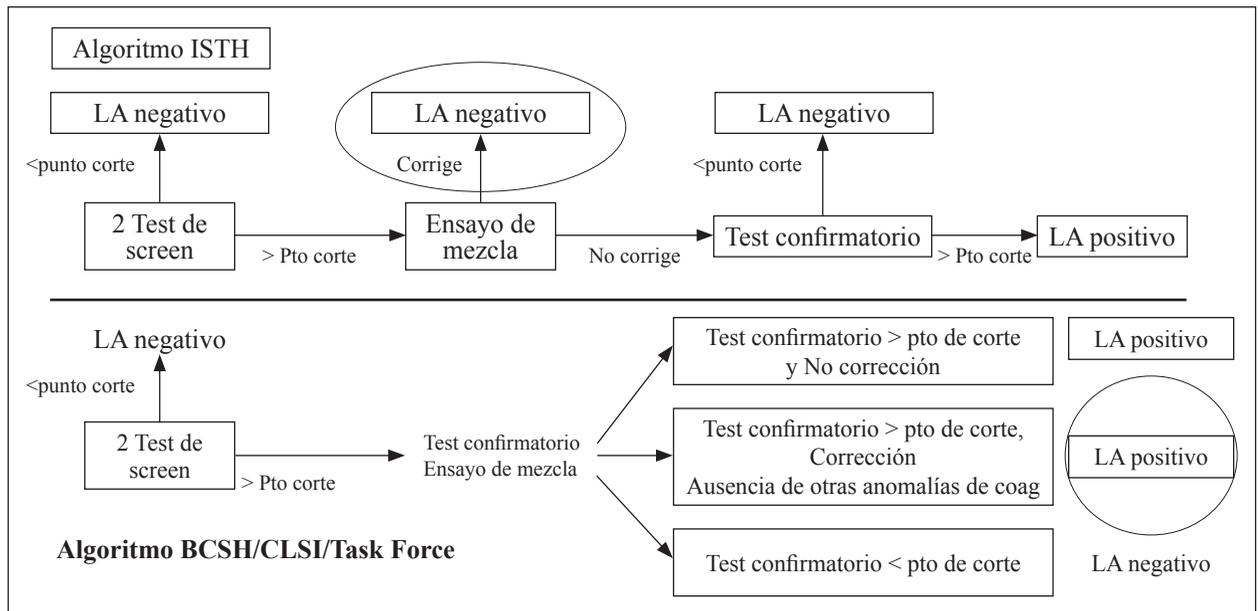


Figura 6. Esquema de los diferentes algoritmos con referencia a los ensayos de mezcla de las tres guías de diagnóstico adaptado de Duboscq C y col⁽²¹⁾.

La pregunta si la realización de la mezcla es esencial o no en la detección del anticoagulante lúpico NO ha sido resuelta hasta el momento.

Los autores de este trabajo concuerdan en que realizar la mezcla es de utilidad, porque aporta mayor especificidad, pero NO se debe basar la decisión de un LA negativo por un ensayo de mezcla que corrige. La guía CLSI-H60, la guía del BCSH y la Task Force del síndrome antifosfolípido en el año 2014^(7-8,10) sugieren que si un paciente tiene prolongado un ensayo de tamizaje y ese ensayo acorta en presencia de fosfolípidos concentrados, en ausencia de otra coagulopatía congénita, adquirida o presencia de medicación anticoagulante, EL LA ES POSITIVO aunque el ensayo de mezcla corrija. Es decir, hacen más hincapié en comprobar la dependencia de fosfolípidos que en el efecto inhibitorio de las pruebas.

5. Control de la calidad en la detección de anticuerpos antifosfolípidos

La Buenas Prácticas de Laboratorio indican que todas las pruebas del laboratorio de análisis clínicos

deben ser validados y/o verificados previo a ser utilizados para procesar muestras de pacientes.

Este procedimiento incluye también a las pruebas utilizadas para la detección de aPL, en el caso del LA tanto para las pruebas de tamizaje, pruebas de mezcla como para las pruebas confirmatorias y para los anticuerpos en fase sólida, aCL y anti β_2 GPI.

El cálculo de puntos de corte a partir de muestras normales ha demostrado mejorar la especificidad del diagnóstico de LA⁽²¹⁾.

La validación y/o verificación del desempeño analítico de los aPL incluyen estudios de:

1. Precisión
2. Veracidad y/o comparación de métodos
3. Intervalos de referencia (IR) y puntos de corte (*cut-off*)
4. Especificidad analítica: si bien no se realiza el estudio de interferencias, es muy importante conocer los interferentes que puedan afectar las pruebas, no sólo las drogas (por ejemplo, diferentes anticoagulantes) sino también aquellos que

interfieren de acuerdo con el método de detección utilizado, como es el caso de la bilirrubina, hemoglobina, triglicéridos y otros.

La sensibilidad y especificidad diagnóstica no es mandatorio realizarlas dada la dificultad de obtener las muestras.

Se debe recordar que el intervalo analítico de medición (AMR o linealidad) no aplica para ser realizado en pruebas coagulométricas.

Validación y/o verificación de los ensayos para diagnóstico de LA

1. Precisión

Para el estudio de precisión se sugiere la utilización del protocolo propuesto por la CLSI en su guía EP15 A3⁽²²⁾. Aunque también podría utilizarse la versión anterior de la guía EP15 A2 (2006).

2. Veracidad/comparación de métodos

Veracidad: si se utiliza el protocolo EP15 A3, se podrán utilizar los resultados recolectados de varios días para realizar la estimación del sesgo comparando el valor obtenido con un valor asignado (*target*) extraído de un programa interlaboratorial o de un programa de evaluación externa de la calidad. No se recomienda el uso de materiales de control de la calidad internos, excepto que se tenga información del grupo par.

Estudio de comparación de métodos: se recomienda la utilización del protocolo EP09 - A3⁽²³⁾. Este protocolo propone realizar una comparación con el método/instrumento a remplazar utilizando 40 muestras distribuidas en todo el intervalo de medición, aunque podrían ser también 20, bien seleccionadas.

En el caso de no poder realizar esta comparación, se podrían enviar muestras a un laboratorio de referencia que utilice nuestro método y realizar la comparación con el mismo.

3. Intervalos de referencia (IR) y puntos de corte (*cut off*): existen diferentes propuestas según la guía que se consulte:

ISTH (*International Society on Thrombosis and Haemostasis*) 2009⁽⁶⁾

BCSH (*British Committee for Standards in Haematology Guidelines*) 2012⁽⁸⁾

CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) H60 A 2014⁽⁷⁾

Si bien las mismas poseen diferencias, todas coinciden en que los puntos de corte y los IR deben

ser calculados localmente por cada laboratorio teniendo en cuenta las diferentes combinaciones de reactivos y coagulómetros utilizados. Estos cálculos deben realizarse tanto para las pruebas de tamizaje, como para las de mezclas y confirmatorias. Además, se deben calcular los puntos de corte para los porcentajes de corrección y para las razones normalizadas *screen/confirm*.

ISTH 2009: cada laboratorio debe calcular sus propios puntos de corte para las pruebas de tamizaje, mezclas y confirmatorias. Propone la utilización de 40 donantes adultos sanos menores de 50 años. Se utilizará como punto de corte el percentil 99.

La razón se calculará utilizando como denominador el PPN

BCSH 2012: no comparte el concepto de la ISTH de calcular los IR con 40 individuos normales, ya que considera que para establecer o validar un intervalo de referencia se deberían procesar muestras de 120-200 adultos sanos. Se podrán utilizar entre 20 y 60 adultos sanos cuando se requiera verificar un IR previamente establecido por el laboratorio o el validado por el fabricante.

Propone utilizar el percentil 97,5 para el cálculo del punto de corte.

La razón se calculará utilizando el PPN en el denominador.

CLSI 2014: es la que más información provee con respecto a los cálculos. Cómo se alinea con la guía EP28 - A3c⁽²⁴⁾: propone realizar el cálculo de IR y del punto de corte utilizando al menos 40 individuos normales sanos; en el caso de que se requiera verificar el propuesto por el fabricante, utilizar 20 individuos sanos.

Si la distribución es normal (gaussiana), para el cálculo del IR se utilizará la media $X \pm 2 SD$, donde $X + 2 SD$ será el punto de corte.

La razón se calcula utilizando la media calculada para los intervalos de referencia en el denominador. Cualquiera sea la guía utilizada, las muestras se deben procesar en al menos 3 jornadas de trabajo para minimizar el sesgo. Se utilizará el mismo PPN para realizar las mezclas, el cual deberá ser fraccionado y conservado a $-70^{\circ} C$. Ya que no todos los laboratorios disponen de un congelador de estas características, se podrían conservar a $-20^{\circ} C$ pero por un período no mayor a 2 semanas.

En la **tabla 4** se propone una manera de calcular los puntos de corte.

Tabla 4. Ejemplo de planilla de recolección de datos para el cálculo de los puntos de corte de las pruebas de coagulación utilizadas en el diagnóstico de LA

Muestras	APTT	APTT Mezcla	SCT screen	SCT screen Razón	SCT screen Mezcla	ICA SCT	SCT confirm	RN SCT confirm	% de corrección SCT confirm	DRVVT Screen	DRVVT Screen Razón	DRVVT Screen Mezcla	ICA DRVVT	DRVVT Confirm	RN DRVVT confirm	% de corrección DRVVT confirm
1	30,3	29,2	34,1	1,05	32,9	1,5	34,1	0,9	-4,9	51,5	1,59	37,4	10,3	33,7	1,3	24,2
2	29,4	30,0	33,6	1,02	32,2	-0,6	35,7	0,9	-11,4	30,9	0,94	29,8	-7,6	28,3	0,9	-8,6
3	30,2	29,6	35,4	1,08	34	4,5	33,4	1,0	1,1	31	0,96	29,9	-7,1	27	1,0	-0,9
4	34	31,6	45,1	1,35	37,4	1,11	35,3	1,0	17,9	35,3	1,1	31,9	-0,6	27,9	1,1	8,4
.....																
.....																
.....																
40																
Media																
P 99																
P 97,5																

Control estadístico interno de la calidad

Todas las pruebas deben ser controladas en cada corrida para asegurar la estabilidad a través del tiempo. Para las pruebas de LA se debe procesar un control negativo y un control positivo con cada corrida analítica. La recomendación es utilizar controles comerciales. Si bien se desalienta el uso de *pool* preparado en el laboratorio, fundamentalmente por seguridad del operador, podrían utilizarse como control negativo un *pool* normal y como positivo un *pool* preparado con muestras positivas de pacientes. Para el caso de controles comerciales, se deben seguir estrictamente las recomendaciones del fabricante en cuanto a la estabilidad y conservación de los mismos. Los intervalos propuestos por el fabricante sólo deben servir como guía, por lo tanto cada laboratorio debe calcular sus propios intervalos siguiendo las recomendaciones de las diferentes guías. Para el caso de *pool* preparado en el laboratorio, también deben calcularse los intervalos de referencia. Se deberán conservar en alícuotas preferentemente a -70°C o a -20°C (no más de 15 días).

Para las pruebas en fase sólida se procesarán un control positivo y uno negativo en cada corrida analítica. Se recomienda usar los controles provistos por el fabricante.

En todos los casos, ya sea pruebas para LA o en fase sólida, se deberá establecer media y desvíos estándar, realizar un seguimiento de los resultados de control para observar tendencias y realizar las acciones correctivas necesarias en caso de desvíos.

Participación en Programas de Evaluación Externa de la Calidad

Como para cualquier prueba del laboratorio de aná-

lisis clínicos, se recomienda la participación en un Programa de Evaluación Externa de la Calidad. Existen una serie de programas llevados a cabo por organizaciones internacionales. Para acceder a ellos se deberá consultar si los mismos poseen distribuidores en nuestro país o si deberían solicitarse directamente al proveedor del programa en el país de origen, a fin de poder realizar los trámites de autorización para el ingreso de los mismos al país.

Los programas disponibles son:

- *College of American Pathologists (CAP)*: posee un programa exclusivo para LA: CGS1 con 2 encuestas anuales. Para anticuerpos en fase sólida: el módulo ACL (incluye aCL IgG, IgM e IgA y aβ2GPI IgG, IgM e IgA). Además, el módulo APS que posee los analitos del ACL, incorpora anti fosfatidilserina - protrombina IgG, M y A).
- *ECAT Foundation (The Netherlands)*: son 4 encuestas por año, cada encuesta posee muestras para LA, aCL y aβ2GPI
- *QUARILIS (STAGO)*: 3 encuestas al año sólo para LA.
- *NEQAS (UK)*: 6 encuestas anuales sólo para LA
- **Control interlaboratorial**: en el caso de que no fuera posible acceder a un programa comercial, se podrían realizar comparaciones interlaboratoriales con un laboratorio de referencia con una gran trayectoria en la especialidad. El requisito es que dicho laboratorio participe en un programa de evaluación externa de la calidad. La recomendación es enviar al menos 3 muestras, dentro de las mismas, una positiva y una negativa. Se recomienda realizar este ejercicio al menos 2 veces al año.

6. Interferencias en la detección del anticoagulante lúpico.

Hay ciertas situaciones/condiciones que afectan la determinación del LA. Es importante conocer estas interferencias para poder interpretar cuidadosamente los resultados a fin de alcanzar el diagnóstico correcto.

De manera arbitraria, y para poder referirnos a cada una de ellas, las agrupamos de la siguiente manera:

- Drogas (UFH, LMWH, VKA, DOACs)
- Otros inhibidores de interferencia: paraproteínas, heparinoides, productos de degradación de fibrinógeno/fibrina PDF/pdf
- Inhibidores específicos (aFVIII, aFV, otros)
- Deficiencias de factores
- Reactantes de fase aguda (FVIII, fibrinógeno y PCR elevados)

Detallaremos, a continuación, el efecto de las mismas en cada etapa de la determinación del AL (pruebas de tamizaje, mezclas y confirmatorias).

Heparina no fraccionada

- Pruebas de tamizaje: prolonga los tiempos de coagulación.
- Pruebas de mezcla y confirmatorias: FALSOS POSITIVOS.

Evaluar su presencia mediante la determinación del TT o la actividad anti FXa (especialmente cuando la muestra no fuera tomada por el laboratorio).

Cuando se utilizan reactivos con sustancias neutralizantes de heparina, el efecto observado dependerá de la concentración de la droga, presentando alto riesgo de falso positivo si la concentración excede la capacidad neutralizante. En general, la neutralización es efectiva sólo hasta cierto nivel de UFH (0,8-1,0 U/mL)⁽²⁵⁾.

No se debe realizar la determinación de LA cuando la UFH se administre en dosis terapéuticas, (especialmente si los reactivos no tienen sustancias que la neutralicen).

Las guías internacionales se expiden al respecto de la siguiente manera:

- BSCH 2012: no evaluar LA en pacientes que reciben dosis terapéuticas⁽⁸⁾
- ISTH 2009 y CLSI 2014: precaución al interpretar los resultados⁽⁶⁻⁷⁾

Heparina de bajo peso molecular

- Pruebas de tamizaje: no prolonga apreciablemente los tiempos de coagulación, puede afectarlas si la concentración es elevada llegando a dar falsos positivos en mezcla y confirmatorios, especialmente en el DRVVT⁽²⁶⁾.

Evaluar su presencia mediante la determinación de actividad anti FXa.

Los reactivos con sustancias neutralizantes de heparina son en general efectivos en el rango de dosis profilácticas.

La toma de muestra se debe realizar al menos 12 horas (preferentemente 24) después de la última dosis.

Antagonistas de la vitamina K

Pruebas de tamizaje: la deficiencia funcional de factores vitamina K dependientes prolonga los tiempos de coagulación.

Si la prolongación es muy marcada, se pueden obtener FALSOS POSITIVOS en los ensayos de mezcla (no corrección) y confirmatorios (positivo).

Se presenta dificultad en la interpretación de las pruebas de tamizaje, mezclas y confirmatorias.

Las guías internacionales proveen las siguientes recomendaciones:

- **ISTH 2009:**
 - realizar en plasma del paciente si INR < 1,5
 - realizar sobre mezcla 1:1 con PPN si INR 1,5-3,0 (tener en cuenta el efecto de la dilución)
- **BSCH 2012 y CLSI 2014:**
 - realizar pruebas de tamizaje y confirmatorias sobre la mezcla 1:1 con PPN (sin restricciones en los valores de INR)
 - resultados negativos en las pruebas de mezcla no excluyen la presencia de LA debido al efecto de la dilución
 - tiempo de coagulación con veneno de Taipan y su confirmatorio, el tiempo de coagulación con Ecarin (TSVT/ET) o con lisados plaquetarios (TSVT/PPN) es indicado como una opción en pacientes con VKA⁽²⁵⁾.

Anticoagulantes orales directos

a- Inhibidores directos de trombina (DTI)

- Pruebas de tamizaje: prolongan los tiempos de coagulación (APTT y DRVVT, siendo ésta última muy sensible).
- Pruebas de mezcla: no corrigen.

- Ensayos confirmatorios: FALSOS POSITIVOS (especialmente en DRVVT).

Evaluar su presencia realizando el TT y/o verificando la medicación que recibe el paciente⁽²⁶⁻²⁸⁾.

b- Inhibidores directos de FXa (aFXa)

- Interfieren más en el DRVVT que en el APTT y tienen un efecto variado sobre los ensayos basados en PT.
- Pruebas de tamizaje: prolongan los tiempos de coagulación (principalmente rivaroxabán). DRVVT es la prueba más afectada.
- Pruebas de mezcla: no corrigen.
- Ensayos confirmatorios: FALSOS POSITIVOS.
- Evaluar su presencia realizando la determinación de la actividad anti FXa y/o verificando la medicación que recibe el paciente.
- TSVT/ET estaría indicado como opción en estos pacientes⁽²⁷⁻²⁸⁾.

c- Eliminación del efecto de DOACs

En un estudio reciente⁽²⁹⁾ se evaluó el uso de DOAC Stop® (Haematex Research, Sidney) en muestras que contenían DOACs, encontrando que luego del tratamiento:

- la mayoría de los DOACs pudieron ser removidos del plasma.
- el tratamiento con DOAC Stop® no afectó significativamente los resultados de DRVVT y APTT en muestras LA positivas.

Otros inhibidores de interferencia: paraproteínas, heparinoides, PDF/pdf

Alteran principalmente el TT, aunque existen paraproteínas que pueden interferir en todas las pruebas de coagulación, aun sin interferir el TT.

- Pruebas de tamizaje: pueden prolongar los tiempos de coagulación.
- Pruebas de mezcla: no corrigen.
- Pruebas confirmatorias: no neutralizan (excepto heparinoides que pueden neutralizar con PNP o paraproteínas que expresen actividad LA/aPL)^(7,30).

Inhibidores específicos (aFVIII, aFV, otros)

- Pruebas de tamizaje: prolongan los tiempos de coagulación de las pruebas en la cuales interviene el factor inhibido.
- Pruebas de mezcla: no corrigen.

- En general no deberían observarse FALSOS POSITIVOS, excepto:

- en presencia de aFV, cuando se realiza confirmatorio con PNP.

- en ensayos de APTT, si se utiliza “delta de tiempos” como punto de corte⁽³⁰⁻³¹⁾.

Datos complementarios de utilidad en la evaluación

- El conocimiento de la historia clínica contribuye a aclarar las posibles causas responsables de las pruebas alteradas.
- La determinación de la actividad de factores de la vía alterada. Evaluar paralelismo.
- Realizar ensayo de mezcla con PPN con incubación por 1 hora a 37° C en caso de sospecha de aFVIII.

Deficiencias

- Pruebas de tamizaje: prolongan los tiempos de coagulación de las pruebas en la cuales interviene el factor deficiente.
- Pruebas de mezcla: corrigen.
- Pruebas confirmatorias: se pueden obtener FALSOS POSITIVOS si la deficiencia es severa y la prolongación es muy marcada, y en APTT, especialmente si se utilizan “delta de tiempos” como punto de corte.

Reactantes de fase aguda

- Aumento de FVIII, fibrinógeno:
 - acortan los tiempos de coagulación de las pruebas de tamizaje: FALSOS NEGATIVOS
- PCR⁽³²⁾:
 - prologa los tiempos de coagulación de las pruebas de tamizaje.
 - pruebas de mezcla y confirmatorias: FALSOS POSITIVOS.

La evaluación de LA no se recomienda

- durante o cercano al evento trombótico agudo.
- en presencia de otros procesos (infecciones o procesos inflamatorios agudos) con aumento de reactantes de fase aguda.

Es importante tener presente que es factible la coexistencia de un LA con otros anticuerpos o inhibidores específicos de factores de la coagulación, que pueden combinarse además con déficit de factor/es, complicando aun más el diagnóstico.

Es crítico poner en evidencia las características propias de cada inhibidor y realizar una interpretación adecuada de los resultados, descartando posibles interferencias, para arribar a un diagnóstico correcto^(6-8,33).

7. Etapa postanalítica. Interpretación y modelo de informe.

La etapa postanalítica requiere que un profesional calificado, con conocimiento del comportamiento de las diferentes pruebas que componen el conjunto de ensayos realizados para detectar la presencia del LA, analice paso a paso los datos crudos y los cálculos consiguientes. De esta forma, el mismo podrá integrar los resultados obtenidos y dar una interpretación racional que permita llegar al diagnóstico de laboratorio correcto, que deberá reflejarse en el informe de los resultados.

En general, las diferentes guías y recomendaciones

de sociedades científicas o entes regulatorios (ISTH 2009, BCSH 2012, CSLI 2014)^(5-7,10,13,25) coinciden en las características y los contenidos del informe. El mismo debe incluir el nombre de las pruebas, el resultado de las mismas expresado en valores numéricos, con sus valores de referencia o de corte establecidos en el laboratorio, y la interpretación de cada una de ellas, acorde a los resultados obtenidos. En el informe debe constar, además, en forma clara y precisa, la conclusión respecto a la detección o no del LA, así como la sugerencia, en caso de ser positivo, de realizar nuevamente los estudios para confirmar la persistencia del anticuerpo, lo cual se relaciona al riesgo de manifestaciones o complicaciones clínicas. Si los resultados no son categóricos, se propone indicar que no permiten confirmar la presencia de LA y sugerir reevaluar, evitando el uso de la expresión “resultado indeterminado”. La **tabla 5** muestra un esquema de informe.

Tabla 5. Esquema de informe de resultados de LA

Prueba	Resultado	Valor de referencia o valor de corte*	Interpretación
APTT	Numérico		Normal/Anormal
PT	Numérico		Normal/Anormal
TT	Numérico		Normal/Anormal
DRVVT	Numérico		Normal/Anormal
SCT	Numérico		Normal/Anormal
APTT/PNP	Numérico		Negativo/Positivo
DRVTT screen/confirm	Numérico		Negativo/Positivo
SCT screen/confirm	Numérico		Negativo/Positivo
APTT mezcla	Numérico		Corrige/No corrige
DRVVT mezcla	Numérico		Corrige/No corrige
SCT mezcla	Numérico		Corrige/No corrige
APTT mezcla/PNP	Numérico		Negativo/Positivo
DRVVT mezcla/confirm o PNP	Numérico		Negativo/Positivo
SCT mezcla/confirm	Numérico		Negativo/Positivo
APTT/P+N/PL hexagonales	Numérico		Negativo/Positivo
Conclusiones:			
(*) Estimados en el laboratorio. Interpretación: anormal, no corrige o positivo cuando los valores de las pruebas son > al valor de corte correspondiente.			

La investigación del LA incluye dos pruebas⁽⁵⁾ o al menos dos pruebas^(6,7) sensibles al inhibidor, que evalúen diferentes vías de activación. Ambas deben ser debidamente interpretadas, de modo independiente, aplicando los algoritmos correspondientes^(13,25). Para las conclusiones finales el hecho de detectar al menos una prueba anormal/no corrige/positiva^(4,5) (**Figura 7**) o anormal/positiva-valor en rango de referencia⁽⁶⁾ (**Figura 8**), según el algoritmo aplicado, será considerado como compatible con la presencia de LA. Todo esto, sin dejar de analizar los resultados de las pruebas de rutina (TT, PT o APTT) y de la actividad de factores (en caso que correspondiera) para considerar o descartar posibles defectos concomitantes o realizar un adecuado diagnóstico diferencial^(4-7,10,13,25,31).

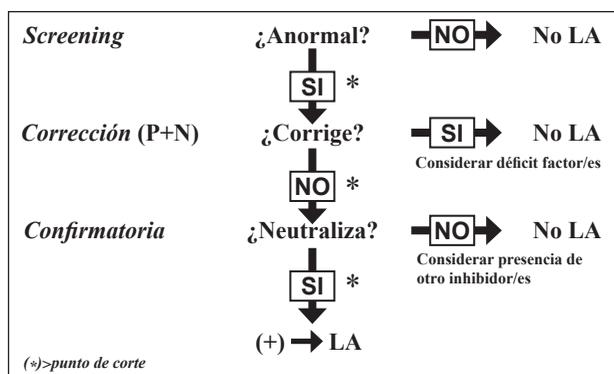


Figura 7. Algoritmo acorde a las guías y recomendaciones ISTH 1995-2009-2018

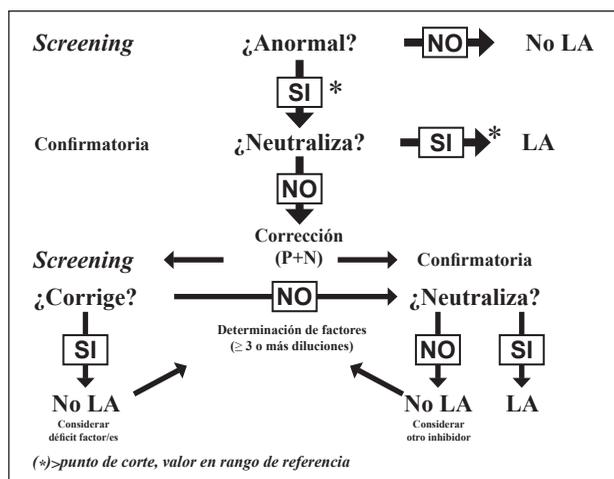


Figura 8. Algoritmo acorde a las guías y recomendaciones CSLI 2014

La realización de la prueba de mezcla en toda prueba anormal/alterada es un punto de controversia, como ya fue descrito en la sección 4-Utilidad del ensayo de mezcla. Según las guías de la ISTH^(4,5),

es decisiva; para las guías de la BCSH⁽⁷⁾ mejora la especificidad, pero un resultado negativo no descarta LA; según las guías de la CSLI⁽⁶⁾ puede omitirse en circunstancias determinadas (prueba de tamizaje prolongada, confirmatoria que neutraliza completamente el efecto, dando un valor dentro del rango de referencia de la prueba de tamizaje y sin evidencias de otras causas de prolongación de la coagulación). La interpretación de los datos en el informe es clave. Las **tablas 6 y 7** resumen las conclusiones y sugerencias acorde a los mismos^(4-7,10,13,25).

Además de analizar si los datos son compatibles o no con la presencia de LA, al momento de interpretar los resultados es importante considerar el diagnóstico diferencial con otro tipo de inhibidor o la presencia de defectos concomitantes^(4,31,33,34). Estas consideraciones se esquematizan en la **tabla 8**. La determinación de la actividad de factores en diluciones progresivas (3 diluciones) y el análisis de su comportamiento contribuyen al diagnóstico de estos casos.

En las conclusiones, además de sugerir el seguimiento en el tiempo de las pruebas de LA, es conveniente recomendar, si correspondiera, la realización de pruebas adicionales útiles o necesarias para aclarar aspectos diagnósticos. También puede sugerirse, como parte de la evaluación del APS, la realización de ensayos en fase sólida para anticuerpos antifosfolípidos (aCL y/o a β 2GPI).

8. Pruebas para la detección de anticuerpos antifosfolípidos en fase sólida

La detección de los aPL en fase sólida comenzó en la década de los 80 con el desarrollo de un radio inmuno ensayo para detectar aCL y rápidamente se implementó la técnica de ELISA. A finales de los años 90 se evidenció que los aPL están dirigidos contra proteínas de alta afinidad por los PL aniónicos, siendo las más relevantes la β 2GPI (principal antígeno de los aPL de individuos con enfermedad autoinmune) y la protrombina.

Como ha sido revisado⁽³⁵⁾, en 1999 en la ciudad de Sapporo (Japón) se realizó el Consenso de Expertos y por primera vez se establecieron los criterios clínicos y de laboratorio del APS. Estos criterios de laboratorio fueron revisados por los expertos en el 2006⁽³⁾ y se estableció que se deben realizar dos pruebas en fase sólida, y estos criterios se mantienen hasta la actualidad:

1. aCL isotipos IgG e IgM
2. anti β 2GPI IgG e IgM.

Sin embargo, distintos grupos de expertos publican sus recomendaciones y el Subcomité de Anticoagulante lúpico/Anticuerpos antifosfolípidos de la Sociedad Internacional de Hemostasia y Trombosis de 2018 recomienda como pruebas de laboratorio en fase sólida⁽¹¹⁾:

- **aCL isotipo IgG/IgM** con un ensayo dependiente de β 2GPI en plasma o suero, medidos en fase sólida (ELISA o sistemas automatizados), títulos mayores al percentil 99 de la población normal, siguiendo las recomendaciones del 2014 de este mismo subcomité⁽⁹⁾.
Indica que la β 2GPI debe ser de origen humano.
- **Anti β 2GPI isotipo IgG/IgM** en plasma o sue-

ro, medidos por ensayos en fase sólida (ELISA o sistemas automatizados), títulos mayores al percentil 99 de la población normal. Siguiendo las recomendaciones del mismo subcomité del 2014⁽⁹⁾.

Tradicionalmente los ensayos de fase sólida se realizan por ELISA, pero se desarrollaron otras técnicas automatizadas con diferentes soportes (micropartículas magnéticas, microesferas) y otros sistemas de detección (quimioluminiscencia, citometría de flujo, sistemas múltiples). Estos sistemas automatizados presentan excelente sensibilidad y especificidad clínica, aportando la ventaja de disminuir la variación interlaboratorio y el tiempo de procesamiento, ya que algunos permiten realizar determinaciones individuales y otros permiten la detección simultánea de aCL y anti β 2GPI.

Tabla 6. Interpretación y conclusiones en caso de prueba de tamizaje anormal (prolongada)

Prueba	Interpretación
De tamizaje	Anormal
Confirmatoria	Positivo-Valor en rango de referencia
Mezcla de tamizaje	Puede no realizarse ⁽⁶⁾
Mezcla confirmatoria	Puede no realizarse ⁽⁶⁾
Conclusiones: resultados compatibles con la presencia de LA. Se sugiere evaluar la persistencia del efecto luego de 12 semanas.	
Prueba	Interpretación
De tamizaje	Anormal
Confirmatoria	Positivo-Valor fuera del rango de referencia
Mezcla de tamizaje	No corrige
Mezcla confirmatoria	Positivo
Conclusiones: resultados compatibles con la presencia de LA. Se sugiere evaluar la persistencia del efecto luego de 12 semanas.	
Prueba	Interpretación
De tamizaje	Anormal
Confirmatoria	Positivo-Valor fuera del rango de referencia
Mezcla de tamizaje	Puede no realizarse ⁽⁶⁾
Mezcla confirmatoria	Positivo-Valor en rango de referencia
Conclusiones: resultados compatibles con la presencia de LA. Se sugiere evaluar la persistencia del efecto luego de 12 semanas.	

Tabla 7. Interpretación y conclusiones en caso de prueba de tamizaje normal (no prolongada)

Prueba	Interpretación
De tamizaje	Normal
Confirmatoria	--
Mezcla de tamizaje	Normal
Mezcla confirmatoria	--
Conclusiones: no se detecta la presencia de LA.	

Tabla 8. Diagnóstico diferencial con otro tipo de inhibidor o defectos concomitantes

Tamizaje	Confirmatorio	Mezcla de tamizaje	Mezcla confirmatoria	Interpretación
Normal	--	--	--	No se detecta LA
Anormal	Positivo/Neutraliza	--	--	LA
Anormal	Positivo/Neutraliza	No corrige	Positivo/Neutraliza	LA
Anormal	No normaliza (Neutraliza, efecto parcial)	Efecto parcial (Acorta, no normaliza)	Positivo/Neutraliza	LA + déficit de factor/es
Anormal	No normaliza (Neutraliza, efecto parcial)	No corrige	Positivo/ No normaliza (Neutraliza, efecto parcial)	LA + otro tipo de inhibidor
Anormal	Negativo/No neutraliza	No corrige	Negativo/No neutraliza	Otro tipo de inhibidor

En la **tabla 9** se detallan las recomendaciones de dicho comité para los ensayos en fase sólida⁽³⁾.

Con respecto a los puntos de corte se recomienda que cada laboratorio establezca los mismos a partir del percentil 99 de la distribución de resultados en la población normal, como está especificado en la **tabla 10**. Para las aCL está ampliamente instaurada la utilización de punto de corte de 40 GPL o MPL para definir APS por su asociación con el riesgo tromboembólico⁽³⁶⁾.

Se sugiere que los informes, además de detallar los resultados analíticos y puntos de corte, incluyan interpretaciones, por ejemplo, que el isotipo IgG está asociado a mayor riesgo clínico, que títulos moderado o altos se correlacionan mejor con la clínica, así como también recomendaciones como la repetición del ensayo a las 12 semanas para confirmar la persistencia del anticuerpo, etc.

Establecer un perfil de positividad de los aPL colabora en la estratificación del riesgo del paciente, por lo cual se propuso una categorización para el APS⁽³⁷⁾ (**Tabla 11**). El APS es motivo de constante investigación y se está evaluando la utilización de otros anticuerpos para la detección del síndrome. Entre ellos cobraron importancia los anti β_2 GPI dominio I cuyo isotipo IgG se asocia fuertemente con trombosis y los anticuerpos anti complejo protrombina/fosfatidil serina (aPS/PT) altamente específico para manifestaciones de APS pero con menor sensibilidad que los ensayos incluidos en los criterios. Se están llevando a cabo estudios clínicos adicionales para evaluar su inclusión como criterios secundarios del diagnóstico de laboratorio de APS. Sin embargo, las recomendacio-

nes y guías del 2018 de la ISTH no recomiendan aún la determinación rutinaria de otros anticuerpos⁽¹¹⁾.

9. Comentarios finales

El APS se define a partir de criterios clínicos que son muy frecuentes en la población (trombosis y morbilidad obstétrica), que no son específicos del mismo y pueden tener múltiples causas. Es por ello que los criterios de laboratorio adquieren una relevancia central en su diagnóstico. El diagnóstico de APS requiere que al menos una prueba incluida en los criterios diagnósticos⁽³⁾ sea positiva. La responsabilidad del laboratorio es por ello muy grande, dado que la emisión de un resultado redundante en una decisión de manejo clínico y de tratamiento en los pacientes. Por ello es importante prevenir el subdiagnóstico debido a la utilización de pruebas con baja sensibilidad, pero fundamentalmente EVITAR EL SOBREDIAGNÓSTICO que puede llevar a tratamientos anticoagulantes de duración indefinida con el consecuente riesgo hemorrágico. Las causas de un diagnóstico erróneo, en general sobrediagnóstico, pueden resumirse en: mala selección del paciente a estudiar, así como del momento del estudio, con pedidos indiscriminados de los mismos, incorrecta selección de reactivos y ejecución de los ensayos de tamizaje, mezcla y confirmatorios, cálculo inapropiado de los puntos de corte, falta de control de calidad de los ensayos, desconocimiento de las limitaciones e interferencias que afectan en los ensayos, ausencia de verificación de persistencia en el tiempo y una interpretación inadecuada de los resultados.

A manera de resumen final se proporciona un algoritmo general (Figura 9).

Creemos que este taller, que refleja de alguna manera una opinión consensuada basada en las evidencias

de la literatura y la experiencia de sus participantes, puede ser de utilidad para el diagnóstico del APS en nuestro medio.

Tabla 9. Recomendaciones para la óptima detección de laboratorio de aPL en fase sólida. Adaptación de Devreese K y col⁽¹¹⁾

Pacientes	Menores 50 años con trombosis venosa o arterial sin factor desencadenante, o en sitios inusuales o complicaciones trombóticas o del embarazo asociada con enfermedad autoinmune
Muestra	Suero. Conservado 2 a 3 días a 4-8°C o mayor tiempo a -20/-70°C. Puede ser plasma citratado pobre en plaquetas (siempre que el fabricante lo indique) conservado congelado a -20/-70°C. Descongelar una sola vez
Elección de la prueba	aCL Ig G/M y anti β_2 GPI utilizando β_2 GPI humana
Características	Imprecisión: <20% para los ELISAS y <10% para los sistemas automatizados. Control de calidad interno en cada corrida, uno negativo y otro positivo cercano al punto de corte. Por lo menos un control que no pertenezca al kit (paciente control o comercial). Rechazar la corrida si uno de los controles no cae dentro del rango. Se recomienda fuertemente participar de un control de calidad externo. Se debe establecer el límite de detección máximo (generalmente dato que aporta el fabricante). Las muestras con resultados mayores al límite de detección de la prueba deben ser informadas como “mayores al límite de detección”. De la misma manera se informarán las muestras “menores al límite de detección”. Para la interpretación se debe considerar la imprecisión del método en los valores cercanos al punto de corte.
Interferencias	Factor reumatoideo alto puede elevar falsamente aCL y anti β_2 GPI IgM. Evitar las muestras lipémicas, ictericas o muy hemolizadas. Se pueden obtener falsos positivos por anticuerpos heterófilos, anticuerpos humanos anti-animales o altos niveles de inmunoglobulinas.
Corrida simple vs duplicada	ELISA manual: calibradores, controles y muestras se deben procesar por duplicado. Sistemas automatizados: si imprecisión es < 10%, pacientes y controles simple, pero calibradores por duplicado.
Estándares y calibradores	Si es posible definir la trazabilidad al estándar primario. Se puede utilizar estándares secundarios. Se recomienda realizar la curva en cada corrida con varios puntos, idealmente 6. Rechazar la curva si el r^2 da menor a 0,90. Los sistemas automatizados no requieren curva en cada corrida.
Expresión de los resultados	Dado que no se disponen de unidades internacionales universales, los resultados se expresan de acuerdo a los calibradores utilizados por cada fabricante.
Puntos de corte	Se recomienda determinar o validar los puntos de corte locales de acuerdo con la combinación equipo/reactivos
Informe e interpretación de los resultados	Informar el resultado analítico y un comentario interpretativo. Se deben interpretar de manera integrada considerando el contexto clínico del paciente, y el resultado de las tres pruebas: LA, aCL y anti β_2 GPI. Considerar un diagnóstico positivo luego de la posterior confirmación a las 12 semanas y si tiene relevancia clínica.

Tabla 10. Punto de corte clínico y grados de positividad. Adaptado de Forastiero R⁽³⁵⁾

Valor de referencia	Percentil 99 (método no paramétrico), calcular con 120 normales o verificar el del fabricante con al menos 20.	Suero de personas sanas sin antecedentes de trombosis ni complicaciones obstétricas.
Punto de corte clínico	Calcular el punto óptimo que indique la mejor sensibilidad, especificidad y OR para APS.	Grupo control que incluya pacientes con enfermedades relacionadas a APS (trombosis venosa o arterial o complicaciones obstétricas).
Título	Negativo	Menor al percentil 99 normal.
	Indeterminado	Mayor al percentil 99 normal y menor al punto de corte clínico.
	Positivo	Mayor al punto de corte clínico.

Tabla 11. Propuestas de categorización de APS. Adaptado de Forastiero R⁽³⁷⁾

APS	Triple positividad de aPL	Riesgo clínico alto
APS probable	Doble positividad de aPL	Riesgo clínico moderado
APS posible o no APS	Simple positividad	Riesgo clínico bajo

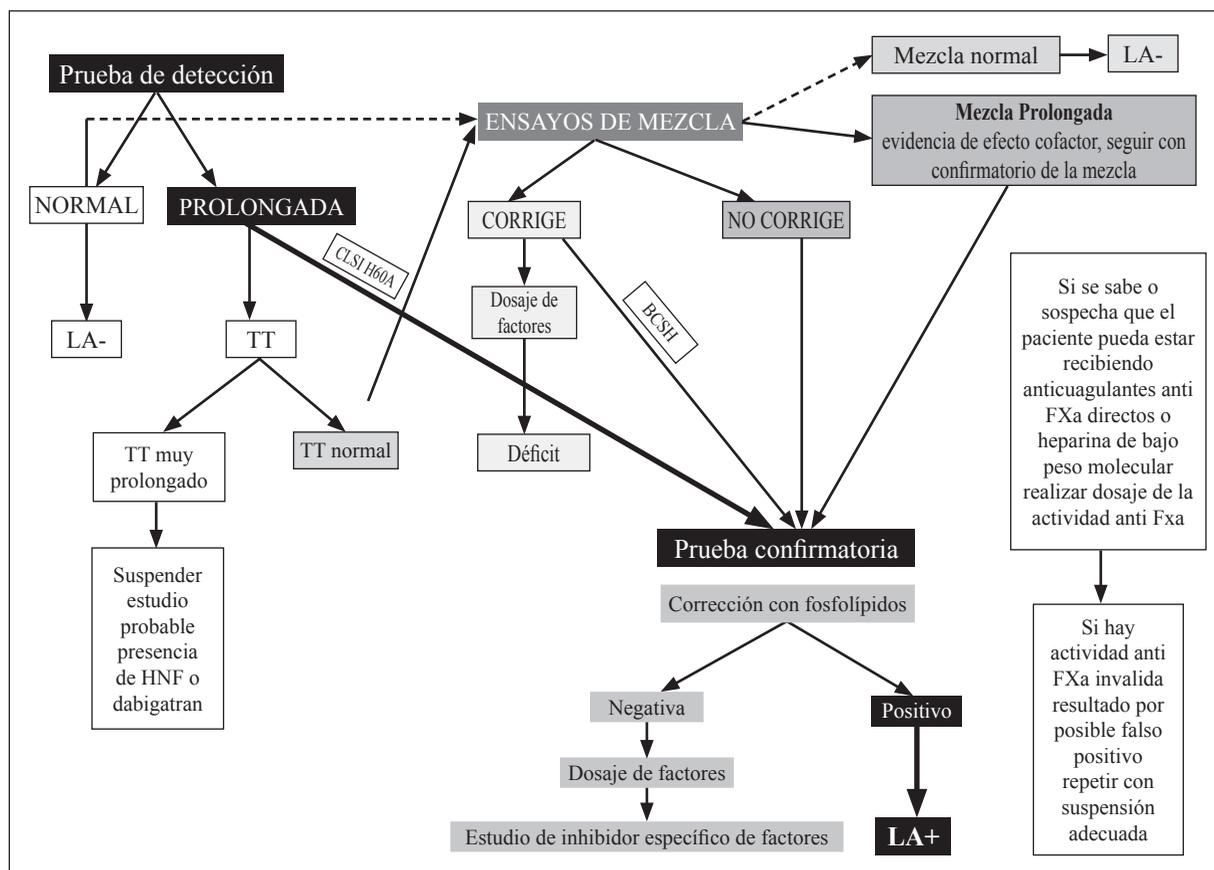


Figura 9. Algoritmo final que resume diagnóstico de LA

Declaración de conflictos de interés:

La Dra Marta Martinuzzo declara ser miembro del Scientific Advisory Committee of Instrumentation Laboratory 2016 y 2018 por los que recibió viáticos. El resto de los autores declara no poseer conflictos de interés.

Bibliografía

1. Cervera R, Piette JC, Font J y col. Euro-Phospholipid Project Group. Antiphospholipid syndrome: clinical and immunologic manifestations and patterns of disease expression in a cohort of 1,000 patients. *Arthritis Rheum.* 2002; 46:1019-1027.
2. Andreoli L, Chighizola CB, Banzato A, Pons-Estel GJ, Ramire de Jesus G, Erkan D. Estimated frequency of antiphospholipid antibodies in patients with pregnancy morbidity, stroke, myocardial infarction, and deep vein thrombosis: a critical review of the literature. *Arthritis Care Res (Hoboken).* 2013; 65:1869-1873.
3. Miyakis S, Lockshin MD, 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.
4. Brandt JT, 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 Standardization Committee of the ISTH. *Thromb Haemost.* 1995; 74:1185-90.
5. Pengo V, Tripodi A, Reber G y col. Subcommittee on Lupus Anticoagulant/ Antiphospholipid Antibody of the Scientific and Standardization 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 Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *J Thromb Haemost.* 2009; 7:1737-4.
6. Ledford-Kraemer M, Moore GW, Bottenus R y col. CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). Laboratory testing for the Lupus Anticoagulant: Approved Guideline. 2014; CLSI document H60-A.
7. Keeling D, Mackie I, Moore GW, Greer IA, Greaves M; British Committee for Standards in Haematology. Guidelines on the investigation and management of antiphospholipid syndrome. *Br J Haematol.* 2012; 157:47-58.
8. Devreese KM, Pierangeli SS, de Laat B, Tripodi A, Atsumi T, Ortel TL; Subcommittee on Lupus Anticoagulant/Phospholipid/Dependent Antibodies. Testing for antiphospholipid antibodies with solid phase assays: guidance from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost.* 2014; 12:792-5.
9. Bertolaccini ML, Amengual O, Andreol L y col. 14th International Congress on Antiphospholipid Antibodies Task Force. Report on antiphospholipid syndrome laboratory diagnostics and trends. *Autoimmun Rev.* 2014; 13:917-30.
10. Devreese KMJ, Ortel TL, Pengo V, de Laat B; Subcommittee on Lupus Anticoagulant/Antiphospholipid Antibodies. Laboratory criteria for antiphospholipid syndrome: communication from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost.* 2018; 16:809-813.
11. Molhoek JE, de Groot PG, Urbanus RT. The Lupus Anticoagulant Paradox. *Semin Thromb Hemost.* 2018; 44:445-452.
12. Adcock DM, Hoefner DM, Kottke-Marchant K, Marlar RA, Szamosi MA, Warunek DJ. Collection, transport and processing of blood specimens for testing plasma-based coagulation assays and molecular Hemostasis assays. Approved Guideline. Fifth Edition, 2008. H21-A5 Document.
13. Moore GW. Recent guidelines and recommendations for laboratory detection of lupus anticoagulants. *Semin Thromb Hemost.* 2014; 40:163-71.
14. Moore GW, Smith MP, Savidge GF. The Ecarin time is an improved confirmatory test for the Taiwan snake venom time in warfarinized patients with lupus anticoagulants. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2003; 14:307-312.
15. Gardiner C, MacKie IJ, Malia RG y col. The importance of locally derived reference ranges and standardized calculation of dilute Russell's viper venom time results in screening for lupus anticoagulant. *Br J Haematol.* 2000; 111:1230-5.
16. Tripodi A, Chantarangkul V, Cini M y col. Variability of cut-off values for the detection of lupus anticoagulants: results of an international multicenter multiplatform study. *J Thromb Haemost.* 2017; 15:1180-1190.
17. Kershaw G and Orellana D. Mixing tests: diagnostic aides in the investigation of prolonged prothrombin times and activated partial thromboplastin. *Semin Thromb Hemost.* 2013; 39:283-290.
18. Tripodi A and Chantarangkul. Lupus anticoagulant testing: activated partial thromboplastin (APTT)

- and Silica Clotting Time (SCT}. Hemostasis and Thrombosis, Methods and Protocols in Molecular Biology. 2017; 15:177-183.
19. Moore GW. Reference interval mean clotting times should not be used to calculate lupus anticoagulant mixing test ratios unless they match the normal pooled plasma clotting time. *Thromb Res.* 2017 Nov;159:16-18.
 20. Dubosq C, Ceresetto J, Bullorsky E y col. Diferencias en los resultados de la detección del inhibidor lúpico según el algoritmo diagnóstico utilizado. *Hematología.* 2017; 281-288.
 21. Martinuzzo ME, Cerrato GS, Varela M, Adameczuk YP, Forastiero RR. New guidelines for lupus anticoagulant: sensitivity and specificity of cut-off values calculated with plasmas from healthy controls in mixing and confirmatory tests. *Int J Lab Hematol.* 2012; 34: 208-213.
 22. Wayne P. A User Verification of Precision and Estimation of Bias; Approved Guideline. CLSI document EP15 – A3. Clinical and Laboratory Standards Institute; September 2014.
 23. CLSI EP9-A2 -. Method Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples; Approved Guideline Second Edition 2013.
 24. CLSI EP 28-A3c: Defining, establishing and verifying Reference Intervals in the Clinical laboratory; Approved Guideline – Third Edition. October 2010.
 25. Moore GW. Commonalities and contrasts in recent guidelines for lupus anticoagulant detection. *Int J Lab Hematol.* 2014; 36:364-373.
 26. Martinuzzo ME, Barrera LH, D'Adamo MA, Otaso JC, Gimenez MI, Oyhamburu J. Frequent False-positive results of lupus anticoagulant tests in plasmas of patients receiving the new oral anticoagulants and enoxaparin. *Int J Lab Hematol.* 2014, 36:144-150.
 27. Antovic A, Norberg EM, Berndtsson M y col. Effects of direct oral anticoagulants on lupus anticoagulant assays in a real-life setting. *Thromb Haemost.* 2017; 117: 1700-1704.
 28. Hoxha A, Banzato A, Ruffatti A y col. Detection of lupus anticoagulant in the era of direct oral anticoagulants. *Autoimmun Rev.* 2017; 16:173-178.
 29. Exner T, Michalopoulos N, Pearce J y col. Simple method for removing DOACs from plasma samples. *Thromb Res.* 2018; 163:117-122.
 30. Exner T. Conceptions and misconceptions in testing for lupus anticoagulants. *J Autoimmun.* 2000; 15:179-183.
 31. Rampersad AG, Boylan B, Miller CH y col. Distinguishing lupus anticoagulants from factor VIII inhibitors in haemophilic and non-haemophilic patients. *Haemophilia.* 2018; 24:807-814.
 32. Schouwens SM, Delanghe JR, Devreese KM. Lupus Anticoagulant (LAC) testing in patients with inflammatory status: does C-reactive protein interfere with LAC test results? *Thromb Res.* 2010; 125:102-104.
 33. Remotti L, Grosso SH, Ingratti MF y col. Inhibidor lúpico en pacientes sin complicaciones trombóticas u obstétricas. *Hematología.* 2016; 20:174-181.
 34. Blanco AN, Lazzari MA. Simultaneous occurrence of lupus anticoagulant and FVIII inhibitors in haemophilia. *Am J Hematol.* 1998; 58:248.
 35. Forastiero R. Diagnóstico de laboratorio de anticuerpos antifosfolípidos/2016 *Acta Biochim Latinoam.* 2016; 50:255-63.
 36. Garcia D, Erkan D. Diagnosis and Management of the Antiphospholipid Syndrome. *N Engl J Med.* 2018; 378:2010-21.
 37. Forastiero R. Desafíos en la interpretación del perfil de los anticuerpos antifosfolípidos. *Hematología.* 2018; 22:68-72.