

Validación del Nuevo Ensayo Tiempo de *Bothrops atrox* diluido (dBat) para la Detección de Anticoagulante Lúpico*

PILAR OVIEDO

Dpto. de Patología Clínica, Servicio de Hematología - Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen

RESUMEN

OBJETIVO: Validar un nuevo ensayo para detección de anticoagulante lúpico, el cual emplea el veneno crudo diluido del *Bothrops atrox* (dBat), comparado con cuatro ensayos de coagulación fosfolípido-dependientes: dRVVT, TTPa, TTI y TNP. **MATERIAL Y MÉTODOS:** Se evaluó 70 muestras de plasma citratado de pacientes con diagnóstico clínico de LES, síndrome antifosfolípido primario (SAFP), trombosis/embolia y sospecha de trombosis, hospitalizados en el Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen durante julio de 1998 y marzo de 1999. El dRVVT fue el análisis de referencia. **RESULTADOS:** Hubo 30 muestras positivas por dBat y dRVVT y uno o más de los restantes ensayos; 27 casos fueron negativos y hubo 13 casos en los que los resultados obtenidos por el dBat fueron discordantes respecto a los obtenidos por el dRVVT ($p > 0,05$). De los casos con LES el 47,8% fueron positivos para AL, de los de SAFP el 71,4%, de los casos de trombosis el 75% y de los casos con sospecha de trombosis el 47,8%. **CONCLUSIONES:** Por la alta concordancia entre el dBat con el dRVVT y el correlato con la clínica, así como por poseer una mayor validez con respecto a los ensayos TTPa, TTI y TNP, el nuevo ensayo dBat puede ser empleado en la detección de AL.

Palabras claves: Trombosis; Venenos de Crotálidos; Anticoagulantes; Lupus Eritematoso Sistémico; Factores de Coagulación Sanguínea.

DILUTED *Bothrops atrox* TIME (dBat). A NEW ASSAY TO DETECT LUPUS ANTICOAGULANT SUMMARY

OBJECTIVE: To validate a new assay for lupus anticoagulant (LA) that employs crude diluted venom of *Bothrops atrox* (dBat) comparing it with four phospholipid-dependent assays. **MATERIAL AND METHODS:** Citrated serum samples from 70 inpatients clinically diagnosed as having SLE, primary antiphospholipid syndrome (PAPS), thrombosis/embolism or suspected thrombosis from the Hospital Guillermo Almenara Irigoyen over 12 months, were assayed. dRVVT was used as comparative test for reference values. **RESULTS:** 30 samples were positive to dBat and dRVVT tests plus at least another one of the remain assays; 27 samples had negative results in all assays and there were 13 in which dBat results had not concordance with dRVVT results ($p > 0,05$). 47,8% of SLE, 71,4% of PAPS, 75% of thrombosis and 47,8% of suspected thrombosis cases were LA (+). **CONCLUSIONS:** The high concordance between dBat and dRVVT results, higher than those found with another tests, as well as their close relationship with clinical features, permit us to conclude that dBat assay can be used to detect LA.

Key words: Thrombosis; Crotalid Venoms; Anticoagulants; Lupus Erythematosus, Systemic; Blood Coagulation Factors.

* Trabajo presentado como Tesis para optar el Título Profesional de Licenciado Tecnólogo Médico en el Área de Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica, Facultad de Medicina-UNMSM. Trabajo ganador del Premio Hipólito Unanue - 1999.

Correspondencia:

Lic. Tec. Med. Pilar Jackeline Oviedo Donayre
Jr. Pataz Mz. T Lote 25
Urb. Los Pinares - Los Olivos. Lima 39, Perú
E-mail: bibmed@sanfer.unmsm.edu.pe

INTRODUCCIÓN

Las reacciones en cascada de la coagulación permanecen en un delicado equilibrio, cuando éste se rompe se llega a la formación de fibrina - trombo, lo cual puede deberse entre otras causas a la presencia de anticuerpos antifosfolípido tales como el anticoagulante lúpico (AL), que pueden generarse en patologías como el síndrome antifosfolípido (SAF) ya sea éste primario o secundario a lupus eritematoso sistémico (LES) principalmente. La presencia de AL condiciona el desarrollo de un estado trombofílico, más que hipercoagulable, por la recurrencia de la trombosis (¹⁻¹⁴), riesgo que puede ponerse de manifiesto por la detección de un marcador plasmático bien caracterizado como es el caso del AL (¹⁵⁻¹⁷). Fueron Conley y Hartman quienes en 1952 introdujeron este término para referirse a una "sustancia" presente en los pacientes con LES, que prolongaba los ensayos de coagulación.

El AL pertenece a una familia heterogénea de autoanticuerpos que pueden ser IgG o IgM, que reaccionan con fosfolípidos (FL) aniónicos y están dirigidos contra proteínas que tienen determinantes antigénicos escondidos (cofactores) que se expresan dependiendo de condiciones bioquímicas particulares (¹⁸⁻²¹); siendo la denominación entonces de anticuerpos antifosfolípido-proteína (APA) y/o antifosfolípido-cofactor (^{1,11,18,20,22-25}). El AL se uniría con alta afinidad a los FL aniónicos que forman complejos con las proteínas plasmáticas protrombina y β 2-GPI. Esta última, considerada actualmente como el cofactor más importante para estos anticuerpos, pertenece a la familia de proteínas de control del complemento, tiene un peso molecular de 50 kDa, y entre sus actividades se encuentra la de inhibir la fase de contacto de la coagulación (^{10,26-29}), inhibir la generación del FXa e inhibir la agregación plaquetaria (^{10,16-17}). Los anti β 2-GPI interferirían con la β 2-GPI, resultando en generación de FXa (⁹) con lo cual se generaría la formación de coágulos. La detección de estos anticuerpos sería más específica que la de anticuerpos anticardiolipina, los cuales pueden generarse incluso en enfermedades de tipo infeccioso (anticuerpos antifosfolípido no inmunes), y están menos relacionados con la trombosis (^{30,34}). Otros anticuerpos anti-FL son los que interfieren en la vía de la proteína C (^{7,11,24,35}), los antianexinas, los anticélula endotelial y los anticuerpos anti AT-III (^{7,10,22,36,37}).

Para el diagnóstico de AL se emplean ensayos como: Tiempo de Veneno de Víbora de Russell diluido (dRVVT) considerado como prueba de referencia (^{38,39-41}); Tiempo

de Tromboplastina Parcial activado (TTPa); Prueba de Inhibición con Tromboplastina (TTI); Prueba de Neutralización con Plaquetas (PNP o TNP); otras pruebas basadas en venenos de víboras emplean el extracto de *Pseudonaja textilis* (Textarín), el extracto de *Echis carinatus* (Ecarín), capaz de activar protrombina acarboxilada, y el veneno de la serpiente de Taipán: *Oxyuranus scutellatus* (^{1,42-45}).

El *Bothrops atrox* o "jergón de la selva" es un crotárido que habita en la selva de nuestro país, por debajo de los 1400 msnm, así como en las selvas de otros países sudamericanos. Su veneno es una secreción viscosa, amarilla por la presencia de riboflavina, posee un elevado contenido proteico (75%) que lo hace complejo, con alta actividad enzimática, asimismo contiene fosfolípidos y trazas de minerales (^{46,47}). Posee además un activador del FX que existe en dos formas, las cuales difieren por sus cargas eléctricas; ambas son proteínas de 77 kDa de peso molecular, constituidas por una cadena pesada de 59 kDa y una o dos cadenas ligeras de 15-16 kDa unidas por puentes disulfuro. La activación es Ca^{2+} dependiente, convierte al FX en el FXa similar al veneno de víbora de Russell, pero a diferencia de éste, el veneno de *B. atrox* corta al FXa en dos fragmentos sin ninguna pérdida de actividad (^{43,48,50}); posee también una enzima similar a trombina (EST) y una enzima activadora de protrombina (^{46,48,51}).

En el presente trabajo, se ha querido evaluar el empleo del veneno crudo liofilizado de *Bothrops atrox* frente a los ensayos dRVVT, TNP, TTPa y TTI, a fin de determinar si puede servir como una alternativa al empleo de tales análisis.

MATERIALES Y MÉTODOS

Es un estudio de tipo transversal, comparativo, analítico; la recolección de los datos fue ambispectiva. Se recolectó y evaluó un total de 90 muestras de plasma citratado de pacientes con diagnóstico confirmado de LES, SAF y aquellos en los que hubiera sospecha de trombosis. Se incluyó en el estudio a los pacientes que cumplieran con los criterios diagnósticos, no discriminando a aquellos que recibieran tratamiento con corticoides o con anticoagulantes de acuerdo con estudios anteriores (⁵²). Para la estandarización de los ensayos y como control interno, se recolectó 40 muestras de plasma citratado de donantes aparentemente sanos del Servicio de Banco de Sangre. Se extrajo la sangre

en tubos con citrato trisódico al 3,8% (proporción 1:10), para obtener plasma pobre en plaquetas (<5000 plaquetas/ μ L), se centrifugó a 3500 rpm por 10 minutos y los plasmas se alicuotaron y congelaron a -70°C . En las muestras que se emplearon como control interno, se realizó el perfil básico de coagulación: Tiempo de Protrombina (TP), TTPa, Tiempo de Trombina (TT) y dosaje de fibrinógeno. Luego de obtener los valores se alicuotó y congeló a -70°C . Parte de estas muestras se evaluaron simultáneamente por cinco ensayos de coagulación fosfolípido-dependientes: dRVVT, TTPa, TTI, TNP y el nuevo ensayo dBat, en una prueba piloto para obtener los valores referenciales. Cada día de trabajo se validó los ensayos haciendo uso de los plasmas normales. Todas las muestras se procesaron por duplicado.

Para el dBat, el veneno crudo liofilizado se resuspendió en buffer tris salino (TBS) pH 7,4, se centrifugó a 3500 rpm por 10 minutos para eliminar impurezas y del sobrenadante se hicieron las diluciones. Para el ensayo se incubó la muestra en baño María a 37°C con el reactivo de TTPa diluido más el veneno diluido por 30", luego se añadió Ca_2Cl y se tomó el tiempo de formación del coágulo. Los tiempos iguales o mayores a 28" se consideraron positivos para la presencia de AL. El dRVVT se hizo de acuerdo a lo reportado por Thiagarajan y col (^{38,40}), se empleó veneno de víbora de Russell (SIGMA Corporation); el plasma se incubó a 37°C por 30" con el reactivo de TTPa diluido más el veneno diluido, se añadió Ca_2Cl y se tomó el tiempo de formación del coágulo. Un valor igual o mayor a 30" hizo sospechar la presencia de AL, en este caso se hizo los ensayos de corrección con plasma normal en proporción 1:1, si había corrección (tiempo inferior a los 30") se descartaba la presencia del inhibidor, en caso contrario se confirmaba. Para el TTPa se incubó el plasma con el reactivo de tromboplastina parcial activado por 3 minutos a 37°C , se añadió Cl_2Ca y se tomó el tiempo de formación del coágulo, si fue mayor o igual a 40" se procedió a la corrección con plasma normal en proporción 1:1, si había corrección se descartaba la presencia de AL, en caso contrario se trataba de un posible AL. El TTI se hizo de acuerdo al Manual de la CLATH (⁴⁰). Se realizó un TP convencional y un TP con tromboplastina diluida, tanto de la muestra problema como del plasma control. Usando la proporción de Rosner se obtuvo la relación, si era mayor o igual a 1,25 se consideró positivo, se comparó 2 tromboplastinas: humana y recombinante. El TNP se hizo siguiendo la técnica de Triplett (⁵³), se incubó la muestra con el reactivo de TTPa

más el lisado plaquetario por 5 minutos, se añadió Cl_2Ca y se tomó el tiempo de formación del coágulo, si se producía un acortamiento mayor o igual a 7" con respecto al TTPa se repetía el ensayo sustituyendo el lisado plaquetario por TBS, si no había acortamiento -dado por reacciones inespecíficas- se daba el resultado como positivo para AL.

Se obtuvo el promedio simple por cada muestra. El test de McNemar fue empleado para saber si existía desacuerdos significativos entre los cinco ensayos; se empleó el análisis de correlación de Pearson; la valoración de la validez de una prueba se realiza por la comparación de los resultados obtenidos por el nuevo método con los de la prueba que goza de mayor aceptación: dRVVT. Los parámetros de la validez interna son: sensibilidad, especificidad y razón de probabilidad diagnóstica (RPD), que indica el número de veces en que el resultado de una prueba diagnóstica aumenta o disminuye la probabilidad pre-test de presentar la enfermedad; la validez externa evalúa el significado real de un resultado negativo o positivo obtenido tras aplicar la prueba a un paciente, los parámetros que emplea son los valores predictivos positivo (VPP) y negativo (VPN). Otros parámetros estadísticos que se emplearon fueron las medidas de tendencia central, *t* de Student para datos no pareados y *t* de Student para datos pareados (^{54,56}).

RESULTADOS

De las 90 muestras recolectadas y procesadas, sólo en 70 pudo completarse el estudio por los cinco ensayos, quedando eliminadas 20. En el trabajo se evaluó dos reactivos de tromboplastina -con plasmas normales-, empleando la prueba *t* de Student para datos independientes no se encontró diferencia estadísticamente significativa ($t = -0,99$) por lo que ambos reactivos podían ser usados indistintamente; se decidió entonces trabajar las muestras restantes con tromboplastina recombinante. Igualmente, se evaluó dos reactivos de tromboplastina parcial y no se halló diferencia estadísticamente significativa en los resultados obtenidos por ambos reactivos ($t = -0,69$). Los resultados agrupados por ensayo se muestran en la Tabla N° 1.

De las 70 muestras, 30 fueron positivas, por el nuevo ensayo dBat y el dRVVT más uno, dos o tres ensayos; 27 casos fueron negativos y 13 casos tuvieron resultado discordante por ambos ensayos que emplean venenos.

Tabla N° 1.- Resultados de la detección de anticoagulante lúpico por cinco ensayos de coagulación.
HNGAI, Julio 1998 - Marzo 1999.

Resultado	Ensayos									
	dBat		dRVVT		TTI		TTPa		TNP	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Positivo	34	49	39	56	23	33	15	21	15	21
Negativo	36	51	31	44	38	54	55	79	55	79
Dudoso *	-	-	-	-	9	13	-	-	-	-
Total	70	100	70	100	70	100	70	100	70	100

*Cuando la relación fue igual a 1,2.

Para saber si el nuevo ensayo dBat es válido para el diagnóstico de AL, se empleó la prueba de concordancia: test de McNemar, tomando al dRVVT como ensayo de referencia y tolerando un 5% de error. Se encontró que entre el dBat y el dRVVT no existió diferencia estadísticamente significativa ($p = 1,92$), todo lo opuesto con respecto a los otros ensayos donde sí, se encontró diferencia estadísticamente significativa ($p = 3,84$). Al comparar los ensayos TTPa, TNP y TTI entre sí se encontró que entre éstos no existió diferencia estadísticamente significativa, dado que su capacidad de detección es baja. Se evaluó el nuevo ensayo dBat frente a los ensayos TTPa, TTI y TNP, se encontró que aparentemente no existía diferencia entre el ensayo dBat y el TTI ($p = 1,69$) pero con los otros 2 ensayos sí existió diferencia estadísticamente significativa ($p = 11,65$ y $p = 15,69$ respectivamente). Al emplear el coeficiente

de correlación de Pearson, se encontró que existía una asociación moderada entre el dBat y el dRVVT ($r = 0,55$), ya que los puntos de corte para cada ensayo diferían (28" dBat y 30" dRVVT).

Los parámetros de validez interna y externa de los cuatro ensayos comparados con el dRVVT se muestran en la Tabla N° 2. Para los ensayos evaluados, los valores de RPD obtenidos figuran en la Tabla N° 3.

El mayor porcentaje de positividad se dio en el grupo etáreo de 21-40 años, viéndose que el 73,3% fueron casos femeninos. La patología más frecuente fue el LES (47,8%), pero el mayor porcentaje de positividad se vio en los pacientes con SAEP (71,4%), embolia/trombosis venosa profunda (75%) y otras patologías autoinmunes (47,8%); la trombosis afectó mayormente al miembro inferior (4 casos) y como embolismo pulmonar (3 casos); se tuvo además casos de infarto al miocardio y accidente cerebrovascular positivos para AL. Finalmente, otros antecedentes de laboratorio fueron el hallazgo de anticuerpos antinucleares y anticuerpos anti DNAs, así como TP elevado sin causa aparente.

Tabla N° 2.- Validez de los ensayos para detección de AL frente al dRVVT
HNGAI, Julio 1998 - Marzo 1999.

Ensayo	Sensibilidad %	Especificidad %	VPP %	VPN %
dBat	76,9	87,1	88,2	75,0
TTI	44,1	70,4	80,0	50,9
TTPa	30,8	90,3	65,2	50,0
TNP	23,1	80,7	60,0	45,5

DISCUSIÓN

La heterogeneidad del AL hace difícil su diagnóstico y ello explica la gran variedad de estrategias usadas para tal fin. Se decidió trabajar con un nivel de corte que incluya $\pm 2DE$, con la finalidad de no obtener falsos positivos, y no permitir la pérdida de aquellos AL débilmente reactivos por un nivel de corte muy amplio;

Tabla N° 3.- RPD de 4 ensayos para detección de AL. HNGAI, Julio 1998 - Marzo 1999.

Ensayo	RPD+	RPD-	Probabilidad	
			Pre-Test %	Post-Test %
<i>dBat</i>	5,97	0,26	30	72,0
TTPa	3,18	0,77	30	57,8
TTI	1,49	0,79	30	39,0
TNP	1,19	0,95	30	33,9

RPD: Razón de probabilidad diagnóstica.

RPD+: Razón de probabilidad diagnóstica positiva.

RPD-: Razón de probabilidad diagnóstica negativa.

al aplicar la prueba *t* de Student, se encontró que existía diferencia estadísticamente significativa entre los valores positivos y negativos, lo cual corrobora el nivel de corte elegido.

Se observó el fenómeno "cofactor" para el dRVVT (2 casos) y para el *dBat* (1 caso) similar a lo reportado en otros estudios (^{38,40}), lo cual confirma la dependencia de FL que presentan estos anticuerpos. El porcentaje de detección de AL por el dRVVT fue 56%, para el *dBat* 49% y no alcanzó el 30% con los otros ensayos.

La mayor cantidad de resultados positivos para el ensayo *dBat* coincidieron con 2 o más ensayos (22 casos), lo cual indica que el resultado obtenido no es producto del azar; si bien es cierto en 8 casos existió coincidencia sólo con el dRVVT, cierto es también que este ensayo posee un mayor rendimiento diagnóstico.

En el TTI no se encontró diferencia entre ambos tipos de tromboplastina (humana y recombinante), similar a reportes anteriores (⁵⁷), pero discrepa ante otros autores (^{11,40}), quienes señalan que el reactivo recombinante detecta más positivos por poseer un menor grado de contaminación con factores de coagulación. Se ha observado que si bien este reactivo contiene un neutralizante de heparina, parece ser que al diluirse se pierde esta capacidad y el ensayo falsamente se prolonga, como sucede con una tromboplastina de origen humano. El TTI no mostró discordancia con respecto al *dBat* en el test de McNemar, lo cual supondría una sensibilidad similar, sin embargo la especificidad es baja cuando se compara al dRVVT, lo cual se ha comprobado en aquellos casos

negativos por los cuatro ensayos restantes y positivos por el TTI (10 casos, más 4 "dudosos"), por lo que al igual que lo concluido por Triplett (⁴²) y Exner (⁵⁸) no debe emplearse el TTI para búsqueda de AL, otra desventaja es la falta de detección de AL clase IgM.

Respecto al TNP, sólo se obtuvo 21% de positividad, coincidente a lo reportado por Roussi (⁵⁷), pero diferente a lo reportado por Finazzi (⁵⁹). Hubo casos en que no se produjo un acortamiento sino todo lo contrario, lo cual generó la obtención de resultados negativos que harían sospechar un déficit de factores, pero en este punto carecería de sustento clínico ya que no se ha tenido pacientes con estas alteraciones. Al respecto, Dahlbäck (⁴⁴) encontró que el AL aislado de un paciente fallaba en corregir el TTPa al añadirse el lisado plaquetario, es decir el AL tuvo capacidad para inhibir la generación de trombina aún en presencia de un exceso de FL. Relacionado al TTPa, el bajo porcentaje de positividad (21%) coincidiría con lo reportado por Jhons (16%) (⁵²), debido a la alta concentración de fosfatidilserina en el reactivo, lo que lo hace insensible al AL (^{37,42}); Galli (³⁵), Triplett (⁴²) y Bick (⁹) demostraron que el TTPa no detecta AL anti $\beta 2$ -GPI, ni antiprotrombina, por lo que no debe emplearse para detección de AL. Hubo casos donde el TTPa fue 40" luego de realizar la corrección con plasma normal, lo cual sería compatible con AL débilmente reactivos, ya sea por encontrarse en bajos títulos o porque poseen poca avidéz (⁵¹), igualmente hubo muestras positivas por el dRVVT que corrigieron en el TTPa y esto debido al empleo de reactivos poco sensibles (TTPa). Así también se observó que a dosis profilácticas de heparina el TTPa no se prolonga, contrario a lo que sucede a dosis plenas, lo cual discrepa con lo reportado por Thiagarajan (³⁸).

Respecto al dRVVT, el porcentaje de positivos para AL en la población estudiada fue 56%, que es superior a lo reportado por otras series (⁵²). Roussi (⁵⁷) en base a una evaluación de los resultados obtenidos por diferentes laboratorios en la detección de AL (en Francia), encontró una positividad del 100% para este ensayo.

Se decidió emplear el veneno de *Bothrops atrox* por su conocida actividad anticoagulante, porque proviene de un ejemplar que habita en nuestra selva, lo que haría fácil su disponibilidad debido a un menor costo económico y porque de él se obtiene un mayor volumen de veneno en comparación con otras especies que se tienen en cautiverio. A nivel molecular, porque posee una enzima con actividad sobre el factor X, además de una EST

y una enzima activadora de protrombina (⁴⁶⁻⁵¹). Para el ensayo se empleó TBS pH 7,4 porque este tampón proporciona un pH óptimo para la actividad enzimática. La dilución del veneno se explica porque los venenos pueden ser anticoagulantes a altas concentraciones y coagulantes a bajas concentraciones; esto debido a que a altas concentraciones aumenta la fibrinólisis, lo que bloquea la observación del coágulo y le da el carácter de anticoagulante, mientras que a bajas concentraciones las enzimas actúan normalmente hasta la formación de fibrina y se comporta como coagulante. De los resultados obtenidos en muestras warfarinizadas, se postula la posibilidad de que el veneno de *B. atrox* sea capaz de activar protrombina acarboxilada como el Ecarín (^{1,42,45}) lo cual, de acuerdo a lo expresado por Harris (²³), detectaría anticuerpos antiprotrombina; en este sentido, los resultados obtenidos por el dRVVT son un tanto conflictivos ya que con este tratamiento los tiempos del dRVVT se prolongan (⁹). En 4 pacientes que recibían heparina, el resultado obtenido por el dRVVT puede haberse visto interferido por esta medicación, sin embargo, con el empleo del dBat por presencia de la EST que es insensible a heparina (⁴⁷), se postula que se confirmaría o descartaría la presencia de AL ya que la prolongación del ensayo sólo se debería al AL. Para los casos en que se ha obtenido un resultado negativo por el dBat aun recibiendo heparina, una explicación sería la ausencia de AL en la muestra o bien una menor dosis que la de los casos positivos. Se descartaría la posibilidad de que la positividad del dBat sea debida a PDF, ya que éstos se expresan en lisis sistémica: CID (¹⁵), y no se ha tenido casos al respecto; que se trate de disfibrinogenemias es una posibilidad que se da hasta en un 10% con trombosis (^{2,3}) —ya que por lo general estos pacientes sangran— pero estos cuadros son congénitos y no se ha tenido, según indican los antecedentes familiares, ningún caso de este tipo.

El 80,7% de los casos fueron femeninos, con un 73,3% de positividad; la relación mujer/varón en el SAFP fue 4:1, lo que concuerda con Vivancos (⁶⁰), pero discrepa de lo reportado por Lockshin (¹⁷) quien señala una relación 3:1; en tanto que para LES la relación fue 9:2 que difiere de lo reportado por Hugues de 2:1 para SAFP y de 9:1 para el LES (⁶), y es similar a lo anotado por Koopman (⁴). De los casos de LES, el 47,8% fueron positivos para AL, lo cual coincidiría con lo reportado por otros autores (^{7,19,54}), quienes señalan una positividad cercana al 50%. Referente al SAFP hubo un 71,4% de positividad, lo que es ligeramente superior a lo reporta-

do por Vivancos (68%). Un aspecto a remarcar es que los pacientes estuvieron recibiendo corticoterapia pero pese a ello se pudo detectar el AL, lo cual indica que este tratamiento no necesariamente en todos los casos lo negativiza, siendo los casos negativos los que recibieron en promedio las más altas dosis. Hubo 13 casos de trombosis, el 76,9% fueron positivos para AL, localizándose en el territorio venoso, coincidente con cifras reportadas anteriormente (^{7,9,13,19}). De los 13 casos con resultado discordante entre el dRVVT y el dBat, 4 casos fueron positivos por el dBat con diagnóstico de SAFP, PTI y LES, patologías en las que se ha demostrado la presencia de AL (^{6,9,11,18,20,21,59-61}), quienes además tenían datos de laboratorio y antecedentes familiares de enfermedad autoinmune; sólo 1 paciente recibía terapia anticoagulante y 3 recibían prednisona. ¿Qué puede haber sucedido que no permitió su detección por el dRVVT? Una probable explicación sería una mayor sensibilidad del nuevo ensayo dBat que estaría condicionada no sólo por la presencia de la enzima con actividad sobre el FX, sino también por la enzima que activa protrombina y la EST. De los 9 casos positivos por el dRVVT, 5 se encontraban recibiendo prednisona, 2 heparina y 2 sin tratamiento, de estos ninguno tuvo antecedentes de laboratorio, ni familiares compatibles con AL; ¿qué puede haber sucedido para que el dBat no los pueda detectar? Una razón sería que en los pacientes anticoagulados hay una prolongación a causa de estos fármacos más no por AL, en los demás casos sería posible algún tipo de interferencia que pueda haberse dado *in vitro* si es que verdaderamente poseían el AL.

Estos resultados por tanto, reflejarían un buen rendimiento diagnóstico, más aún si tenemos en cuenta que el hallazgo de AL no es frecuente en la población. Actualmente se opta por expresar los resultados como Razón de Probabilidad Diagnóstica (RPD), conocida también como OR. El dBat incrementaría la probabilidad de hallazgo de un resultado positivo en un 42%, por lo que la incertidumbre pre-test disminuiría a un 28% en el post-test, a diferencia de lo que sucede en los ensayos TTI y TNP en donde la incertidumbre prácticamente no varía ya que las RPD+ entre 1 y 2 o entre 0,5 y 1 apenas si alteran la duda inicial.

Finalmente, creo que son necesarias más investigaciones en las que se pueda contar con una mayor casuística, y realizar el análisis a nivel molecular que permita asegurar qué clase de AL es la que se detecta por el dBat y contra qué blancos antigénicos está dirigida.

CONCLUSIONES

1. No existe diferencia estadísticamente significativa al comparar los resultados obtenidos por el ensayo dRVVT (referencial) con los del nuevo ensayo dBat, por lo que ambos pueden ser empleados indistintamente para diagnóstico de AL.
2. El nuevo ensayo dBat presenta una mayor validez como prueba diagnóstica para detección de anticoagulante lúpico en comparación a los ensayos TTPa, TTI y TNP. La terapéutica con corticoides, y anticoagulantes no es obstáculo para que el dBat pueda discriminar una muestra como positiva o negativa.
3. El porcentaje de positividad para AL por el nuevo ensayo dBat, fue 49%; habiendo sido para LES 47,8%, para SAF 71,4%, trombosis venosa/embolia 75% y otras patologías en general 47,8%.
4. Se observó mayor positividad para AL en el sexo femenino siendo la proporción mujer/hombre 2,75:1, que según patologías fue de 9:2 en el caso de LES y de 4:1 para SAF. El grupo etáreo de 21-40 años fue en el que se presentó el mayor número de casos.
5. La mayor frecuencia de eventos trombóticos se dio en el sistema venoso (61,5%) de extremidades (5 casos) y como embolismo pulmonar (3 casos).

AGRADECIMIENTO

A los Drs. Sergio Alvizuri y Manuel Fernández, así como a el Lic. Eduardo Verástegui por la asesoría brindada en la realización del presente trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

- 1) **Grupo CLAH.** XIV. Congreso Internacional de Hemostasis y Trombosis del grupo CLAH; 1995 Nov 21-24, Punta del Este, Uruguay.
- 2) **Schafer A.** Estados de hipercoagulabilidad: de la genética molecular a la práctica clínica. *Lancet* 1995; 26(5): 309-12.
- 3) **Paramo J, Rocha W.** Hipercoagulabilidad y estados trombofílicos. *Sangre* 1991; 36(6): 477-86.
- 4) **Koopman J.** Arthritis and allied conditions. A textbook of Rheumatology T-II. 13ª ed Williams and Wilkins; 1997.
- 5) **Instituto de Análisis Clínicos.** Investigación de anticuerpos antifosfolípidos. Se consigue en: <http://www.argenet.com.ar/hernan/docs/investig.html>
- 6) **Hugues G.** El Síndrome antifosfolípido: 10 años de estudio. *Lancet* 1994; 24(1): 24-7.
- 7) **Petri M.** Patogenia y tratamiento del Síndrome de anticuerpos antifosfolípidos. *Clin Med N A* 1997; (1): 145-69.
- 8) **Rosove M, Brewer P.** Antiphospholipid thrombosis: Clinical course after the first event in 70 patients. *Ann Intern Med* 1992; 117: 303-8.
- 9) **Bick R, Baker W.** Síndrome antifosfolípido y de trombosis. *Clin Med N A* 1994; 94(3): 685-703.
- 10) **Roubey R.** Immunology of the antiphospholipid antibody syndrome. *Arthritis Rheum* 1996; 39(9): 1444-59.
- 11) **Triplet D.** Lupus anticoagulant/antiphospholipid-protein antibodies: the great imposters. *Lupus* 1996; 5: 431-5.
- 12) **Ghirardello A, Doria A, Visco P.** Are antiphospholipid antibodies (aPL) specific tools for the diagnosis of aPL syndrome in SLE? *Lupus* 93; 2(6): 400.
- 13) **Ginsberg J.** Antiphospholipid antibodies and venous thromboembolism. *Blood* 1995; 86(10): 3685-91.
- 14) **Cuadrado M.** Thrombosis in Primary antiphospholipid Syndrome. *Arthritis Rheum* 1997; 40(5): 834-41.
- 15) **Rocha E.** Marcadores plasmáticos de estados pretrombóticos. XIV Congreso Nacional de la Soc. Española de Trombosis y Hemostasia 1998; 11 (Suppl 1): 84-90.
- 16) **Lockshin M.** Anticuerpos antifosfolípido. Niños coágulos de sangre y biología. *JAMA (edic esp)* 1997; 6(10): 444-7.
- 17) **Lockshin M.** Antiphospholipid antibody syndrome. *JAMA* 1992; 268(11): 1453-4.
- 18) **Petri M.** Diagnosis of antiphospholipid antibodies. *Rheum Dis Clin North Am* 1994; 20(2): 443-69.
- 19) **Devine D, Bridgen M.** The antiphospholipid syndrome. *Postgrad Med* 1996; 99(6): 105-25.
- 20) **Cañas C.** Síndrome antifosfolípido cofactor. *Acta Med Colomb* 1997; 22(4): 188-98.
- 21) **Guzman R, Beltran M, Roa G.** Vasculitis en el Síndrome antifosfolípido. *Acta Med Colomb* 1998; 23(4): 180-4.
- 22) **Roubey R.** Autoantibodies to phospholipid-binding plasma proteins: A new view of lupus anticoagulants and others Antiphospholipid autoantibodies. *Blood* 1994; 84(9): 2854-67.
- 23) **Harris N, Pierangeli S.** Functional effects of anticardiolipin antibodies. *Lupus* 1996; 5: 372-7.
- 24) **Love P, Santoro S.** Antiphospholipid antibodies: Anticardiolipin and the Lupus anticoagulant in Systemic Lupus Erythematosus (SLE) and in Non-SLE Disorders. *Ann Intern Med* 1990; 112: 682-98.
- 25) **Santiago M.** Anticuerpos antifosfolípidos em doemVas autoimunes e infecciosas: participaVão da β2-glicoproteína I. *Rev Bras Reumatol* 1997; 37(5): 282-6.
- 26) **Hassett J, Lewis F, Bontempó F.** Fletcher and Fitzgerald factor assay abnormalities in patients with lupus anticoagulants. *Blood* 1998; 92 (10 - 1 Suppl 2): 1296.
- 27) **Ieko M.** b2-glicoprotein I is necessary to inhibit protein C activity by monoclonal anticardiolipin antibodies. *Arthritis Rheum* 1999; 42(1): 167-74.
- 28) **Arvieux J.** Development of an ELISA for autoantibodies to prothrombin showing their prevalence in patients with lupus anticoagulant. *Thromb Haemos* 1995; 74(4): 1120-5.

- 29) Laroche P. Advantage of using both anionic and zwitterionic phospholipid antigens for the detection of antiphospholipid antibodies. *Am J Clin Pathol* 1996; Oct: 549-53.
- 30) Cabral A, Amigo C, Cabiedes J. The antiphospholipid cofactor síndromes: A primary variant with antibodies to β 2-glycoprotein-I but no antibodies detectable in standard antiphospholipid assays. *Am J Med* 1996; 101: 472-81.
- 31) Ordi J. Anticuerpos anti β 2-glucoproteína I. Relación con los anticuerpos antifosfolípido y trombosis. *Med Clin* 1995; 104: 245-8.
- 32) Tsutsumi A. Antibodies to β 2-glycoprotein I and Clinical manifestations in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1996; 39(9): 1466-74.
- 33) Matsuda J, Saitoh N, Tsukamoto M. Prevalence of β 2-glycoprotein I dependent antiphospholipid antibodies. *Ann Rheum Dis* 1995; 54: 73-5.
- 34) Rote NS, Dostal Jhonson D, Branch DW. Antiphospholipid antibodies and recurrent pregnancy loss: correlation between the activated partial thromboplastin time and antibodies against phosphatidylserine and cardiolipin. *Am J Obstet Gynecol* 1990; 163(2): 575-84.
- 35) Galli M, Finazzi G, Bevers E. Kaolin clotting time and dilute Russell's viper venom time distinguish between prothrombin-dependent and β 2-glycoprotein I dependent antiphospholipid antibodies. *Blood* 1995; 86(2): 617-23.
- 36) Smith B, Cowchock S. Antiphospholipid antibodies. Clinical and laboratory considerations pathophysiology and treatment. *Imm Allergy Clin North Am* 1994; 14(4): 821-34.
- 37) Shibata S. Autoantibodies to heparin from patients with antiphospholipid antibody syndrome inhibit formation of antithrombin III-thrombin complexes. *Blood* 1994; 83(9): 2532-40.
- 38) Thiagarajan P, Pengo V, Shapiro S. The use of dilute Russell viper venom time for the diagnosis of lupus anticoagulants. *Blood* 1986; 68(4): 869-74.
- 39) Permpikul P, Rao M, Rapaport S. Functional and binding studies of the roles of prothrombin and β 2-glycoprotein I in the expression of lupus anticoagulant activity. *Blood* 1994; 83(10): 2878-92.
- 40) Grupo CLAHT. Manual de Hemostasia y Trombosis. 2da ed 1990.
- 41) Lynch A, Barlar R, Murphy J. Antiphospholipid antibodies in predicting adverse pregnancy outcome. *Ann Int Med* 1994; 120: 470-7.
- 42) Triplett DA. New diagnostic strategies for lupus anticoagulants and antiphospholipid antibodies. *Haemostasis* 1994; 24(3): 155-64.
- 43) Yamada D, Sekiya F, Morita T. Prothrombin and factor X activator activities in the venoms of viperidae snakes. *Toxicon* 1997; 35(11): 1581-9.
- 44) Dahlbäck B, Nilsson I, Frohm B. Inhibition of platelet prothrombinase activity by a lupus anticoagulant. *Blood* 1983; 62(1): 218-25.
- 45) Ball Memorial Hospital and University College London Medical School. Comparison of two tests for the detection of the lupus anticoagulant: The Taipán snake venom time and Textarin time. París: Stago Labs; 1997.
- 46) Loayza Z. Efecto del veneno de las serpientes *Lachesis muta* y *Bothrops atrox* sobre fibrinógeno bovino y sustratos sintéticos [Tesis para optar el Título de Licenciado en Biología]. Lima: Universidad Particular Ricardo Palma; 1983.
- 47) Yarleque M. Estudio comparativo de algunas propiedades bioquímicas en los venenos de las serpientes de las familias Crotalidae, Viperidae y Elapidae. [Tesis de Bachiller en Biología]. Lima: Universidad Particular Ricardo Palma; 1987.
- 48) Rosing J, Tans G. Estructural and functional properties of snake venom prothrombin activators. *Toxicon* 1992; 30(12): 1515-27.
- 49) Chen-Yuan Lee. Snake venoms. Edit. Board. 1979. pp 684-730.
- 50) Bon C, Hoffman H. Prothrombin and Factor X activator from *Bothrops atrox* venom. En: The 8th World Congress on animal plant and microbial toxins. *Toxicon* 1985; 23(4).
- 51) Cavinato R, Remold H, Kipnis T. Purification and variability in thrombin-like activity of *Bothrops atrox* venom from different geographic regions. *Toxicon* 1998; 34(2): 257-67.
- 52) Jhons S, Chamley L, Ockelford A. Comparison of tests for the lupus anticoagulant and antiphospholipid antibodies in SLE. *Clin Exp Rheumatol* 1994; 12(5): 523-6.
- 53) Triplett D, Brandt J, Kaczor F. Laboratory diagnosis of lupus inhibitors: A comparison of the tissue Thromboplastin Inhibition procedure with a new platelet neutralization procedure. *Am J Clin Pathol* 1983; 79(6): 678-82.
- 54) Galvez M. Valoración de Pruebas diagnósticas. *Piel* 1995; 10: 452-9.
- 55) Gonzales de Dios J. Conocimientos prácticos para elaborar un artículo científico (IV): Manejo de la Estadística. *Rev Esp Ped* 1998; 54(4): 340-5.
- 56) Conover W. Practical Nonparametric statistics. 2° ed. New York: Jhon Willey; 1980.
- 57) Roussi J, Roisin J, Coguel A. Lupus anticoagulants. First French Inyterlaboratory Etalonorme Survey. *Am J Clin Pathol* 1996; 105(6): 788-93.
- 58) Exner J. Comparison of two simple tests for the lupus anticoagulant. *Am J Clin Pathol* 1985; 83(2): 215-8.
- 59) Finazzi G. Natural history and risk factors for thrombosis in 360 patients with antiphospholipid antibodies: A four year prospective study from the Italian registry. *Am J Med* 1996; 100: 530-6.
- 60) Vivancos J. Antiphospholipid antibodies and venous thromboembolism. *Blood* 1995; 86(10): 3685-91.
- 61) Fleck R, Rapaport S, Mohan V. Anti-prothrombin antibodies and the lupus anticoagulant. *Blood* 1988; 72(2): 512-9.