

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRES
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUIMICAS
INSTITUTO DE SERVICIOS DE LABORATORIO DE DIAGNOSTICO E
INVESTIGACION EN SALUD
"SELADIS"**



**“OPTIMIZACION DE LA PRUEBA DE TIEMPO DE TROMBOPLASTINA
PARCIAL ACTIVADA (APTT) Y NEUTRALIZACION CON PLAQUETAS(PNP)
PARA LA DETECCION Y CONFIRMACION DEL ANTICOAGULANTE LUPICO
(AL)Y SU RELACION EN PACIENTES CON RIESGO DE TROMBOSIS”**

(Tesis de Especialidad para la obtención del Grado de Especialidad de diagnóstico de laboratorio en salud mención Hematología)

ELABORADO Por: Lic. ELIZABETH VANESSA DELGADO ARI

**ASESORAS: Dra. ZORKA CASTILLO VACANO
Dra. MONICA GUZMAN**

LA PAZ - BOLIVIA
2023

DEDICATORIA

Dedicado el presente trabajo a Dios, a mis queridos padres Daniel y Elizabeth que Dios los tenga en su gloria a mi hermano Erwin y a mi querido y recordado abuelito Demetrio, que son mi fortaleza y mi corazón, además de ser la luz en todo mi camino.

AGRADECIMIENTOS

A Dios porque nunca me abandonó a lo largo de mi camino.

Al Instituto SELADIS por haberme acogido durante mi especialidad.

A los docentes del instituto SELADIS por impartirme su conocimiento, enseñanza y amistad durante mi formación.

Agradezco con mucho cariño a mi asesora Dra. Zorka Castillo por su apoyo, dirección y dedicación en la realización de este trabajo.

A la Dra. Mónica Guzmán por su apoyo y asesoramiento en la realización de este trabajo.

A mi familia por su apoyo y cariño incondicional y a la memoria de mis padres.

A mi querido hermano por su ayuda en la diagramación de mi trabajo.

A mis amigas que siempre están junto a mí para que no me rinda.

Muchas Gracias.

TABLA DE CONTENIDO

I. INTRODUCCION	1
II. JUSTIFICACIÓN	2
III. ANTECEDENTES.....	4
IV. MARCO TEORICO.....	6
A. CARACTERISTICAS ESTRUCTURALES DE LAS PLAQUETAS	6
1. MEMBRANA EXTERNA	6
B. ENDOTELIO.....	7
C. SINDROME ANTIFOSFOLIPIDICO.....	8
D. MECANISMO PATOLOGICO EN EL SÍNDROME ANTIFOSFOLIPIDICO	10
1. CASCADA DE LA COAGULACIÓN	10
2. FOSFOLIPIDOS.....	12
3. ANTICUERPOS ANTIFOSFOLIPÍDICOS.....	13
4.- ANTICOAGULANTE LUPICO.....	13
F. INHIBIDORES ADQUIRIDOS. -.....	15
1. INHIBIDOR ESPECIFICO	15
2. INHIBIDOR DE INTERFERENCIA.....	16
G. CRITERIOS DE DIAGNOSTICO DEL SINDROME ANTIFOSFOLIPÍDICO	16
H. PRUEBAS DE LABORATORIO PARA DIAGNOSTICO DE SAF.....	18
I.- PRUEBAS PARA DIAGNOSTICO DEL ANTICOAGULANTE LÚPICO.....	20
J. VALIDACIÓN DE PRUEBAS	22
3. EXACTITUD DIAGNOSTICA: SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD	22
4. VALORES PREDICTIVOS.....	23
5. ESTUDIO DE CONCORDANCIA.....	24
6. INTERVALO DE REFERENCIA Y PUNTO DE CORTE.....	25
V. OBJETIVOS.....	27
A. OBJETIVO GENERAL.....	27
B. OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	27
VI. DISEÑO METODOLOGICO	28
A. TIPO DE ESTUDIO	28
B. POBLACIÓN.....	28
C. CRITERIOS DE INCLUSION	29
D.- CRITERIOS DE EXCLUSION	29
F. TAMAÑO MUESTRAL.....	30
G. TECNICAS Y PROCEDIMIENTOS	30
K.- ANALISIS ESTADÍSTICO	37
VI.- RESULTADOS.....	38

VII. DISCUSIONES.....	49
VII1. CONCLUSIONES	53
IX. RECOMENDACIONES	54
X. BILIOGRAFIA.....	55
XI .- ANEXO.....	59

INDICE DE FIGURAS

FIGURA N°1	11
<i>Cascada de la coagulación: Modelo celular propuesto de Hoffman M y Monroe D, 2001.</i>	11
FIGURA N° 2	14
<i>Esquema del anticoagulante lúpico por la competencia de fosfolípidos aniónicos.....</i>	14
FIGURA N° 3	19
<i>Esquema simplificado del diagnóstico de SAF.....</i>	19
FIGURA N°4	21
<i>Algoritmo para la detección de anticoagulante lúpico</i>	21
FIGURA N°5	32
<i>Protocolo de obtención de concentrado plaquetario</i>	32
Figura N°6.....	34
<i>Obtención del lisado plaquetario por Sonicación y choque térmico</i>	34

INDICE DE TABLAS

TABLA N° 1.....	17
<i>Criterios de Diagnostico en el Síndrome Antifosfolípido.....</i>	<i>17</i>
TABLA N° 2.....	25
<i>Escala de valoración del indice kappa.....</i>	<i>25</i>
TABLA N° 3.....	38
<i>Resultados de la prueba de detección APTT y Prueba de Confirmación PNP con concentrado de fosfolípidos obtenidos por Sonicación.....</i>	<i>38</i>
TABLA N° 4.....	40
<i>Resultados de detección APTT y Prueba de confirmación PNP con concentrado de fosfolípidos obtenidos por Choque Térmico</i>	<i>40</i>
<i>Nota. La correlación es alta entre los resultados de ambas pruebas y el coeficiente de variación de la prueba de confirmación PNP es menor al 30%</i>	<i>42</i>
TABLA N° 5.....	43
<i>Tabla de 2x2 para determinar la Sensibilidad y Especificidad además de VPP y VPN para las pruebas de detección APTT y de Confirmación PNP de Anticoagulante Lúpico</i>	<i>43</i>
TABLA N°6.....	44
<i>Tabla de comparación del Intervalo de confianza de 95%del fabricante con intervalo de confianza del 95% del estudio del APTT.....</i>	<i>44</i>
TABLA N° 7.....	45
<i>Índice de Concordancia Kappa (k) entre la Prueba de Detección APTT y Confirmación PNP de Anticoagulante Lúpico.....</i>	<i>45</i>

TABLA N° 8.....	46
<i>Intervalo de Referencia y Punto de corte de la Prueba de Detección APTT para AL.....</i>	<i>46</i>
<i>Nota</i> Parámetros que nos dan un rango de referencia procedente de la población aparentemente y el umbral que permitirá discriminar los pacientes sanos de los enfermos.....	46
TABLA N° 9.....	47
<i>Intervalo de referencia y Punto de Corte de la Prueba de confirmación PNP para AL.....</i>	<i>47</i>
TABLA N° 10.....	48
<i>Relación entre Resultados de Laboratorio y Diagnóstico Base o Antecedentes Patológicos en Pacientes con Riesgo Trombótico</i>	<i>48</i>

INDICE DE ANEXOS

Anexo N°1	59
REACTIVO PARA LA PRUEBA DE PNP	59
Anexo N°2	60
CALCULO DE VALIDES Y DE CONCORDANCIA DE LA PRUEBA DE APTT Y PNP	60
Anexo N°3	61
GRAFICA DE DISTRIBUCION DE DATOS, CALCULO DE IRINTERVALO DE REFERENCIA Y PUNTO DE CORTE DE LA PRUEBA DE APTT	61
Anexo N°4	62
GRAFICA DE DISTRIBUCION DE DATOS, CALCULO DE INTERVALO DE REFERENCIA Y PUNTO DE CORTE DE LA PRUEBA DE PNP.....	62
Anexo N°5	63
FORMATO DE COSENTIMIENTO INFORMADO.....	63

RESUMEN

Las reacciones en cascada de la coagulación permanecen en un delicado equilibrio, cuando éste se rompe se llega a la formación de trombos, lo cual puede deberse a la presencia de anticuerpos antifosfolípidos tales como el anticoagulante lúpico (AL), que puede transformarse en patología como el síndrome antifosfolípido (SAF).

El síndrome antifosfolípido (SAF) es una patología de origen autoinmune es reconocida como una causa de trombofilia adquirida, se define por criterios clínicos y de laboratorio para poder ser identificado.

La búsqueda del AL en el laboratorio clínico se ha incrementado debido a su asociación con trombosis venosa o arterial, muertes fetales y abortos espontáneos.

Actualmente la validación de las pruebas de diagnóstico del SAF han sido regularizadas por un comité de expertos de la ISHT (Sociedad Internacional de Trombosis) el BCSH (Comité de Estándares Clínicos en Hematología) y la CLSI (Instituto de estándares Clínicos y de Laboratorio) publicaron guías para implementar las pruebas de tamizaje y confirmatorias.

La prueba de detección, es tiempo parcial de tromboplastina activada (APTT) y de neutralización con plaquetas (PNP) para la confirmación de AL y su relación en pacientes con riesgo de trombosis. Se validaron las pruebas y demostraron buena precisión, sensibilidad del 71% y especificidad de 100%, que es mayor al de otras pruebas de tamizaje, el índice de correlación entre estas pruebas es de $k=0,81$ dando un grado de concordancia “buena” entre las pruebas El intervalo de referencia para la prueba de detección APTT fue de 22,7 a 34,3 seg con un punto de corte de 34,1 seg y para la prueba de confirmación PNP de 2,6 a 7,1 seg con un punto de corte de 6,7. Los resultados obtenidos en los pacientes correlacionaron con las historias clínicas, se destacó un paciente, con alto riesgo de trombosis, presentando resultados prolongado de APTT y confirmado por la prueba de PNP, que derivó aun accidente cerebrovascular con fallecimiento.

Palabras clave: Síndrome fosfolípido, diagnostico de anticoagulante lúpico, anticuerpos anti fosfolípidos

SUMMARY

The coagulation cascade reactions remain in a delicate balance; when this is broken, thrombus formation occurs, which may be due to the presence of antiphospholipid antibodies such as lupus anticoagulant (LA), which can transform into pathology such as antiphospholipid syndrome (APS).

Antiphospholipid syndrome (APS) is a pathology of autoimmune origin, recognized as a cause of acquired thrombophilia, and is defined by clinical and laboratory criteria to be identified.

The search for AL in the clinical laboratory has increased due to its association with venous or arterial thrombosis, fetal deaths and spontaneous abortions.

Currently the validation of APS diagnostic tests has been regularized by a committee of experts from the ISHT (International Society of Thrombosis), the BCSH (Committee for Clinical Standards in Hematology) and the CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) published guides for implementing screening and confirmatory tests.

The screening test is activated partial thromboplastin time (APTT) and platelet neutralization time (PNP) for confirmation of AL and its relationship in patients at risk of thrombosis. The tests were validated and demonstrated good precision, sensitivity of 71% and specificity of 100%, which is higher than other screening tests. The correlation index between these tests is $k=0.81$, giving a degree of agreement of “good.” between tests. The reference interval for the APTT screening test was 22.7 to 34.3 sec with a cut-off point of 34.1 sec and for the PNP confirmatory test was 2.6 to 7.1 sec with a cut-off point of 6.7. The results obtained in the patients correlated with the clinical histories, one patient stood out, with a high risk of thrombosis, presenting prolonged APTT results and confirmed by the PNP test, which led to a stroke with death.

Key words : Phospholipid syndrome, diagnosis of lupus anticoagulant, antiphospholipid antibodies

I. INTRODUCCION

Las reacciones en cascada de la coagulación permanecen en un delicado equilibrio, cuando éste se rompe se llega a la formación de trombos, esto podría deberse a la presencia persistente de anticuerpos antifosfolípidicos en la sangre, tales como el anticoagulante lúpico (AL) y otros, que pueden desarrollar una patología, como el síndrome antifosfolípido (SAF) (Scazziota, Adamczuk, Annetta, 2018, p.327).

El SAF es una enfermedad de origen autoinmune que es reconocida como una trombofilia adquirida, se define por criterios clínicos y de laboratorio para poder ser identificado. Se presenta en ausencia o presencia de otras enfermedades autoinmunes como el lupus eritematoso sistémico (LES) se denomina respectivamente SAF primario, y SAF secundario (Scazziota, Adamczuk, Annetta, 2018, p.327).

El anticoagulante lúpico es categorizado como un inhibidor de interferencia. Son generalmente anticuerpos específicos contra fosfolípidos como protrombina humana o beta 2 glicoproteína I (β_2 GPI) que prolongan las pruebas de coagulación dependientes de fosfolípidos (FL) “*in vitro*” ((Blanco, Kordich, Bermejo,2013, p.561).

Desde la década del 90 la búsqueda del AL en el laboratorio clínico se ha incrementado debido a su asociación con trombosis venosa o arterial, muertes fetales y abortos espontáneos.

Actualmente la estandarización o validación de las pruebas de diagnóstico del SAF han sido regularizadas por un comité de expertos o sociedades científicas de la ISHT (Sociedad Internacional de Trombosis) que junto al BCSH (Comité de Estándares Clínicos en Hematología) y la CLSI (Instituto de estándares Clínicos y de Laboratorio) publicaron guías para implementar las pruebas de tamizaje y pruebas confirmatorias que investigan la presencia del AL en el laboratorio (Scazziota, Adamczuk, Annetta, 2018, p.327-329).

II. JUSTIFICACIÓN

El SAF es una patología de origen autoinmune, que se caracteriza por la producción de autoanticuerpos antifosfolípidos que alteran la función de los fosfolípidos y crean un estado procoagulante y proinflamatorio, aumentando el riesgo de trombosis recurrente arterial, venosa, microvascular y/o morbilidad obstétrica. Generalmente es diagnosticado en pacientes menores de 50 años, afectando más a mujeres que a hombres.

Debido a esto representa un problema de salud pública con una incidencia a nivel mundial, de aproximadamente cinco casos nuevos por cada 100,000 personas al año y una prevalencia de 40-50 casos por cada 100,000 habitantes. Los anticuerpos antifosfolípidos son positivos en aproximadamente 13% de los pacientes con accidente cerebrovascular, 11% con infarto agudo de miocardio (IAM), 9.5% de los pacientes con trombosis venosa profunda y 6% de los pacientes con morbilidad del embarazo. El SAF primario o catastrófico es una forma

acelerada y de mayor gravedad de la enfermedad, que se asocia con una mortalidad cercana al 50% (Scazziota, Adamczuk y Annetta, 2018).

Por esto el correcto diagnóstico del SAF es importante, contemplan un criterio clínico y uno de laboratorio con la presencia persistente (más de 12 semanas) de uno o más de los anticuerpos antifosfolípidos. A pesar de que hay distintos anticuerpos antifosfolipídicos, los criterios de clasificación para SAF reconocen tres: anticoagulante lúpico, anticardiolipina y anti- β 2-glicoproteína I.

Para investigar la presencia del anticoagulante lúpico en el laboratorio debe realizar dos pruebas de tamizaje sensibles, con diferentes principios analíticos, debido a la evidencia de que no hay ninguna prueba 100% sensible. Además de un ensayo confirmatorio.

Las pruebas que se realizan en el Instituto SELADIS actualmente para el diagnóstico de SAF son: el Rapid Plasma Reagin (RPR) como única prueba de detección del AL (pero puede presentar falsos negativos en el ensayo) y para anticuerpos anticardiolipina (aCL) y anti- β 2 glicoproteína I (α β 2GPI) se utiliza, el ensayo en fase sólida ELISA.

Tomando en cuenta las recomendaciones internacionales, observamos la necesidad de implantar como segunda prueba detección, al APTT con ácido elágico, que minimizara los falsos positivos siendo una prueba recomendada en primera línea y como ensayo confirmatorio a la prueba de neutralización con plaquetas (PNP) que corroborara la

naturaleza de dependencia del AL, por los fosfolípidos y descartar la presencia de inhibidores específicos. Completando de esta manera los criterios de diagnóstico.

Las pruebas que se proponen en este trabajo, son de bajo costo y fácil accesibilidad para el paciente y permitirán ayudar en el diagnóstico del síndrome antifosfolipídico SAF el cual tiene consecuencias importantes, por sus complicaciones trombóticas o en caso de algunas mujeres, abortos repetitivos etc.

III. ANTECEDENTES.

Triplett y col. presentaron la prueba de neutralización con plaquetas (PNP) en 1983. Ellos tomaron 13 pacientes 2 con AL y 11 con inhibidores específicos contra factores VIII (cuatro con hemofilia A) y IX inhibidor (que fue un paciente con hemofilia tipo B) y otro con inhibidor adquirido del factor V. Utilizaron el Tiempo de tromboplastina parcial activada para la detección inicial del anticoagulante lúpico en los pacientes y evidenciaron que la prueba de neutralización con plaquetas combinada con el reactivo de APTT, pudo diferenciar de manera más efectiva el anticoagulante lúpico de los inhibidores específicos, VIII, V y IX, mejor que la prueba de inhibición de tromboplastina tisular (TTI) (Triplett, Brandt, & Schaeffer, 1983, p.681).

Lizbeth Salazar S., Fernando Atmetlla M (1995); realizaron la detección del anticoagulante lúpico en 100 pacientes con trastornos trombóticos y alguna enfermedad de fondo, se detectó

12 pacientes con la presencia de anticoagulante lúpico, utilizaron como prueba de detección el Veneral Disease Research Laboratory (VDRL) además del tiempo de tromboplastina activada APTT y como prueba de confirmación, la prueba recomendada por Triplet internacionalmente, la prueba de neutralización con plaquetas (PNP). Pudieron evidenciar que VDRL presentó resultados falsos positivos, como ya se reportó en otras investigaciones, por esto recomendaron el uso de APTT para corroborar los resultados y observaron que la prueba de confirmación PNP ratificó los 12 casos de pacientes con AL. Los investigadores recomendaron la prueba de APTT y la de confirmación para la detección de anticoagulante lúpico, por su difícil diagnóstico mediante evaluación clínica del paciente (Salazar, & Atmetlla, 1995, p.16).

Avigliano, A y Grand, B (2015). Evaluaron la sensibilidad y especificidad del tiempo de veneno de víbora de rusal diluido (TVVRd) y del APTT para la detección de anticoagulante lúpico en 287 mujeres con antecedentes de abortos recurrentes y complicaciones vasculoplacentarias. El 59.9% (172/287) de las muestras fueron negativas mientras que el 40.1% (115/287) fueron positivas para AL. Donde en las muestras positivas 44/115 fueron positivas para ambas pruebas (APTT y TVVRd), de los 71 restantes 60 fueron positivas para TVVRd y 11 solamente para APTT, en las pruebas confirmatorias de 62 embarazadas 9(57%) se confirmaron PNP- APTT y 7(11.3%) por PNP-TVVRD. Se determinó que APTT tiene una sensibilidad de 58.3% y especificidad del 91.9% mientras que TVVRd tiene una sensibilidad de 87% especificidad del 100% y que sería muy útil utilizar APTT combinado

con un reactivo que lo haga más sensible a AL para mejorar la capacidad de detección (Avigliano, & Grand, B, 2015, p.114).

IV. MARCO TEORICO.

A. CARACTERISTICAS ESTRUCTURALES DE LAS PLAQUETAS

Aunque se ha aceptado universalmente que las plaquetas derivan de los megacariocitos, los mecanismos por los cuales se forman y se liberan siguiendo controvertidos. En la fase final de la megacariocitopoyesis una vez alcanzada la ploidía definitiva, se produce la maduración del citoplasma megacariocítico que da lugar, mediante el proceso de la trombopoyesis a la formación y liberación de plaquetas. La ultra estructura plaquetaria subdividida en tres partes topográficas relacionadas con su función: a) Membrana plaquetaria (intra y extra celular) b) Gránulos y organelas intra citoplasmáticas (secreción plaquetaria) y c) Citoesqueleto (proteínas motoras) (Bermejo, 2017, p.10).

1. MEMBRANA EXTERNA

La superficie plaquetaria juega un rol crucial de contacto, primero asegurando la adhesión a los componentes del subendotelio expuesto y luego favoreciendo la agregación y formación del trombo plaquetario. Al igual que otras membranas biológicas, está compuesta por proteínas y principalmente por fosfolípidos y colesterol. La bicapa lipoproteica tiene glicoproteínas que funcionan como

receptores de los agonistas fisiológicos de las plaquetas adenosindifosfato (ADP), troboxano A2 (TxA2), trombina), proteínas adhesivas (fibrinógeno, fibronectina, laminina, trombospondina, vitronectina, factor de Von Willebrand) y ligandos fibrosos como el colágeno, además, posee enzimas importantes para el funcionamiento celular y fosfolípidos. Es responsable de la interacción de la célula con el medio circundante a través de receptores entre las que figuran las integrinas las cuales se caracterizan por enlazarse a proteínas (Bermejo, 2017, p.11-12).

B. ENDOTELIO

Actualmente se considera al endotelio como un órgano dinámico, heterogéneo y diseminado que tiene funciones secretoras, sintéticas, metabólicas e inmunológicas, y cuya alteración es determinante en el curso de algunas enfermedades. Diversos estudios demuestran que el endotelio participa en una multitud de procesos fisiológicos que incluyen: el control del tráfico celular, la regulación del tono vasomotor, el mantenimiento de la fluidez de la sangre y el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos (vasculogénesis y angiogénesis). Todas estas funciones son llevadas a cabo por receptores para diversas moléculas presentes en la sangre y también receptores que median la interacción célula/célula y célula/matriz que están presentes en la superficie de cada célula endotelial (Dubloscq, 2017, p.19).

C. SINDROME ANTIFOSFOLIPIDICO

El síndrome antifosfolípido, se define como una enfermedad autoinmune que debe cumplir con criterios clínicos y de laboratorio para poder ser diagnosticado. La presencia de manifestaciones trombóticas y/o morbilidad obstétrica en pacientes que expresan de manera persistente anticuerpos antifosfolípidos en sangre, ya sea anticardiolipinas, anti- β 2 glicoproteína I y/o anticoagulante lúpico, es diagnóstico de SAF (Blanco, Scazziota, 2019, p.15).

En la década de los 50, el SAF se definió como una entidad clínica, con el reconocimiento de 2 fenómenos inusuales: la prueba serológica para la sífilis, (VDRL por sus siglas en inglés) con resultado falso-positivo y el descubrimiento de un inhibidor de la coagulación no específico. Por su parte, los anticuerpos antifosfolipídicos (aAFL) fueron detectados tempranamente (siglo XX), mediante ensayos inmunológicos usados en el diagnóstico de la sífilis. Posteriormente, en 1907, un grupo de investigadores desarrollaron un ensayo de fijación del complemento para la sífilis (denominado reagina) y usaron como antígeno el fosfolípido (FL), derivado de extracto de hígado de fetos con sífilis congénita. Más tarde, en 1941, Pangorn demostró que las reaginas eran un FL aniónicos y fueron renombradas cardiolipinas, pues comenzaron a ser aisladas del músculo cardíaco bovino y a utilizarse en conjunto con la lecitina y el colesterol como el antígeno en la

prueba de floculación serodiagnóstica para la sífilis (Pouymiró Pubillones, Pouymiró Brooks, 2012, p. 429).

El anticoagulante lúpico, que es el más frecuente de los inhibidores adquiridos de la coagulación, fue descrito por primera vez en 1952 por *Conley* y *Hartman* de un trastorno de la coagulación en 2 pacientes con lupus eritematoso sistémico (LES), cuyos plasmas mostraban una actividad anticoagulante en los ensayos de coagulación *in vitro*. Ambos pacientes presentaban una serología de lúes falso negativa (Blanco, Kordich, Bermejo.2013, p 561).

En 1972, *Feinstein* y *Rapaport*, introdujeron el término "anticoagulante del lupus" (AL), describiéndolo como un fosfolípido inhibidor directo de la cascada de la coagulación y aunque reiteradamente se ha señalado como incorrecto el termino, dado que la mayoría de los pacientes con anticoagulante del lupus no padecían LES, por razones históricas, ha perdurado hasta hoy día. El efecto anticoagulante es un fenómeno estrictamente *in vitro*, aunque algunos anticuerpos han sido identificados con efecto anticoagulante manifiesto *in vitro* y simultáneamente acción protrombótica *in vivo*, no da lugar a manifestaciones hemorrágicas a menos que esté asociado con trombocitopenia, trombocitopatía o déficit de algún factor de la coagulación (Pouymiró Pubillones, Pouymiró Brooks. 2012.p 429).

El síndrome antifosfolípido (SAF), descrito en 1983, se definió como una tríada compuesta por trombosis venosas/arteriales, de pequeño vaso, morbilidad en los embarazos (fundamentalmente, abortos, pérdidas fetales recurrentes y prematuridad) y alteraciones hematológicas (trombocitopenia y anemia hemolítica), asociadas por un título elevado de anticuerpos antifosfolípido (aAFL), anticoagulante tipo lupus (AL) y/o anticuerpos anticardiolipina (aCL). Puede asociarse a otras enfermedades autoinmunes SAF secundario o no SAF primario además del SAF catastrófico (Pouymiró Pubillones, Pouymiró Brooks. 2012.p 429).

El síndrome antifosfolípido catastrófico (SAFC) es la expresión del síndrome con mayor gravedad y compromiso de vida, ya que se asocia con una mortalidad cercana al 50%. El término catastrófico define una forma acelerada de SAF, que resulta en una falla orgánica múltiple, que ocurre en menos del 1% de todos los pacientes con SAF (Blanco, Scazziota, 2019, p.19).

D. MECANISMO PATOLOGICO EN EL SÍNDROME ANTIFOSFOLIPIDICO

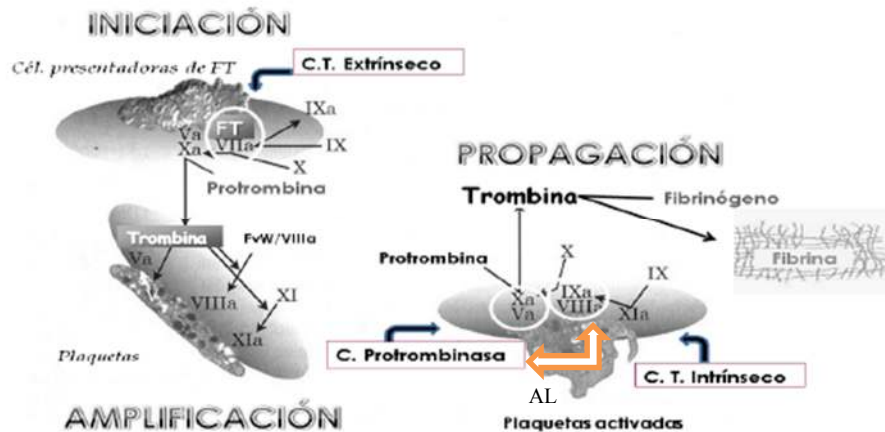
1. CASCADA DE LA COAGULACIÓN

En el 2001, Hoffman M y Monroe D, proponen un modelo en el cual la coagulación está regulada por las propiedades de las superficies celulares, ambiente natural donde se desarrollan las reacciones de coagulación. Donde se observan 3 etapas:

Fase inicial: El complejo factor tisular-factor VII, de forma directa e indirectamente a través del factor IX, activa el factor X transformando pequeñas cantidades de protrombina en trombina. **Fase de amplificación:** La trombina así formada, junto con el calcio de la sangre y los fosfolípidos ácidos, que provienen de la plaqueta, participa activamente en un proceso de retroalimentación para activar los factores XI, IX, VIII y V de forma especial, para acelerar la activación de la plaqueta. **Fase de propagación:** La amplificación del proceso por mecanismos de retroalimentación entre trombina, plaqueta y la activación de todos estos factores permiten activar grandes cantidades del factor X y formar el complejo protrombinasa para convertir la protrombina en trombina y a expensas de ésta, el fibrinógeno en fibrina. (Pérez, Gómez. Bover.2007, p1217).

FIGURA N°1

Cascada de la coagulación: Modelo celular propuesto de Hoffman M y Monroe D, 2001.



Nota. - Consiste en 3 etapas o fases: *Iniciación:* La exposición del factor tisular(FT) presente en la célula y formación del complejo tenasa extrínseco. *Ampliación:* La trombina activa las plaquetas y otros factores como el FV, FVII y FIX. *Propagación:* la formación del complejo “tenasa intrínseco” y “Protrombinasa” aseguran formación de trombina y esta fase culmina con la formación de fibrina entrecruzada, resultado en un coagulo estable.

2. FOSFOLIPIDOS

Los fosfolípidos son lípidos polares componentes de la membrana celular. La cardiolipina, la fosfatidilserina y el ácido fosfatidico son fosfolípidos negativamente cargados (aniónicos) mientras que la fosfatidilcolina es neutro y la fosfatidiletanolamina es Zwitteriónico. Su función se basa en el mantenimiento de la membrana celular modificando la función de las proteínas presentes en la

superficie celular. Intervienen en puntos críticos de la cascada de la coagulación (Blanco, Kordich, Bermejo.2013, p 561).

3. ANTICUERPOS ANTIFOSFOLIPÍDICOS

Estos aAFL constituyen un grupo de anticuerpos heterogéneos dirigidos contra una amplia variedad de proteínas con afinidad por fosfolípidos aniónicos. En el SAF se reconoce a tres anticuerpos. Son una familia de anticuerpos, que pueden o no estar presentes a lo largo del tiempo, desde días hasta años. Aquellos anticuerpos que desaparecían en pocos días, se los asoció con infecciones, mientras que los que perduraban en el tiempo se los relacionó con enfermedades autoinmunes, o enfermedades trombóticas y/o morbilidad obstétrica (Larrañaga, 2020.p 29).

Dos de ellos se nombran por el antígeno contra el que están dirigidos: la proteína β_2 glicoproteína I y la combinación del fosfolípido aCL y la proteína β_2 glicoproteína I. En cambio, el tercer grupo de anticuerpos se denomina AL, en base a su actividad funcional, ya que prolonga los tiempos de las pruebas de coagulación *in vitro* (Blanco, Scazziota. 2019.p16).

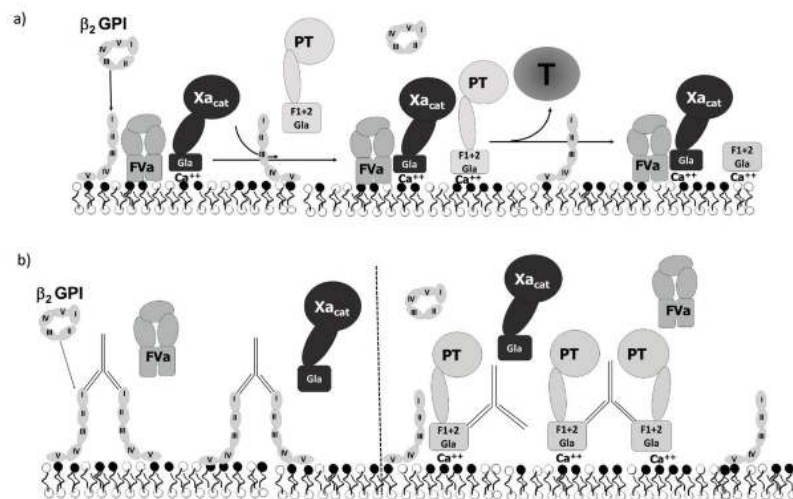
4.- ANTICOAGULANTE LUPICO

El anticoagulante lúpico, pertenece a una familia heterogénea de autoanticuerpos que pueden ser IgG o IgM. Esta categorizado como inhibidor de interferencia. Son autoanticuerpos con especificidad contra, protrombina y β_2 -GPI, que prolongan

las pruebas de coagulación dependientes de FL. 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 FL. Esto, como consecuencia, disminuye por competición la disponibilidad de FL para las pruebas de coagulación. Al presentar este efecto “*in vitro*”, “*in vivo*” representa un factor de riesgo importante de complicaciones, predominantemente trombóticas en el SAF (Scazziota, Adamczuk, Annetta, 2018, p.327).

FIGURA N° 2

Esquema del anticoagulante lúpico por la competencia de fosfolípidos aniónicos



Nota. Esquema adaptado de Molhoek JE y col. Fenómeno que determina la actividad del AL debido a la competencia por los fosfolípidos aniónicos entre los factores de coagulación (en la figura se detalla el complejo protrombinasa) y la β 2GPI o la protrombina cuando son dimerizadas por los autoanticuerpos. Se esquematiza la situación en ausencia (a) o presencia (b) de anticuerpos anti β 2GPI o anti protrombina. Fuente: Blanco, Scazziota (2019).

F. INHIBIDORES ADQUIRIDOS. -

Se denominan inhibidores adquiridos a aquellas sustancias que afectan una o varias etapas del mecanismo de coagulación, prolongando las pruebas correspondientes, por ejemplo, tiempo de tromboplastina activada, tiempo de trombina (TT), etc., al inhibir específicamente algún factor de la coagulación o al interferir en su reacción (Blanco, Kordich, Bermejo, 2013, p.517)

1. INHIBIDOR ESPECIFICO

Los inhibidores específicos son inmunoglobulinas. Actúan de modo específico sobre la actividad coagulante de un factor, al bloquear sus sitios funcionales del mismo y se manifiesta alterando las pruebas de coagulación correspondientes. También pueden presentarse anticuerpos específicos dirigidos contra epitope no funcionales denominados anticuerpos no neutralizantes, en cuyo caso no se detecta un efecto de inhibición de la coagulación La formación del complejo antígeno-anticuerpo puede modificar la depuración del factor, disminuyendo su vida media y

provocando un déficit del mismo mediado por anticuerpos. La expresión clínica de estos anticuerpos es variable, en algunos individuos no se observa alteraciones de la coagulación, a pesar de que el anticuerpo pueda modificar la vida media del factor. por otra parte, existen pacientes que cursan con disminución de la actividad del factor, debido al descenso de la concentración de la proteína por aumento de la depuración de los complejos antígeno-anticuerpo; en ellos puede observarse manifestaciones hemorrágicas (Blanco, Kordich, Bermejo,2013, p.525).

2. INHIBIDOR DE INTERFERENCIA

Los inhibidores de interferencia son inmunoglobulinas u otras sustancias que por diversos mecanismos “interfieren” en el proceso de la coagulación in vitro, pudiendo afectar la determinación de la actividad coagulante de los factores involucrados en la vía alterada. El más destacado de estos inhibidores, dada su frecuencia y relevancia clínica es el inhibidor lúpico, también denominado anticoagulante lúpico (Blanco, Kordich, Bermejo,2013, p.561).

G. CRITERIOS DE DIAGNOSTICO DEL SINDROME ANTIFOSFOLIPÍDICO

El SAF es una enfermedad autoinmune, multisistémica, con etiología multifactorial genética y ambiental, que se caracteriza por la presencia de AAF, trombosis (arterial o venosa) y/o pérdidas fetales de repetición. Generalmente es diagnosticado en

pacientes menores de 50 años, afectando más a mujeres que a hombres. Para establecer un diagnóstico definitivo se definieron unos criterios en el Octavo Congreso Internacional sobre anticuerpos antifosfolípido de Sapporo 1998, que fueron revisados en la reunión de Sydney 2015 (TABLA N°2) (Forastiero,2020, p.18).

TABLA N° 1

Criterios de Diagnostico en el Síndrome Antifosfolípido

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 ECLAMPسيا, PREECLAMPسيا 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 β2GPI
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 (enzimoimmunoensayo), Ig (inmunoglobulina), β2GPI (beta 2 glicoproteína I)

Nota. Los criterios vigentes para la clasificación de APS definido. Fuente: Scazziota, Adamczuk, Annetta (2018).

A pesar de que varios antígenos dan origen a distintos aAF, los criterios de clasificación para SAF sólo reconocen los tres anticuerpos mencionados. Dos de ellos se nombran por el antígeno contra el que están dirigidos: la proteína β 2 glicoproteína I y la combinación de cardiolipina y la proteína β 2 glicoproteína I. En cambio, el tercer grupo de anticuerpos se denomina AL, en base a su actividad funcional, ya que prolonga los tiempos de las pruebas de coagulación *in vitro* (Blanco, Scazziota, 2019, p.16).

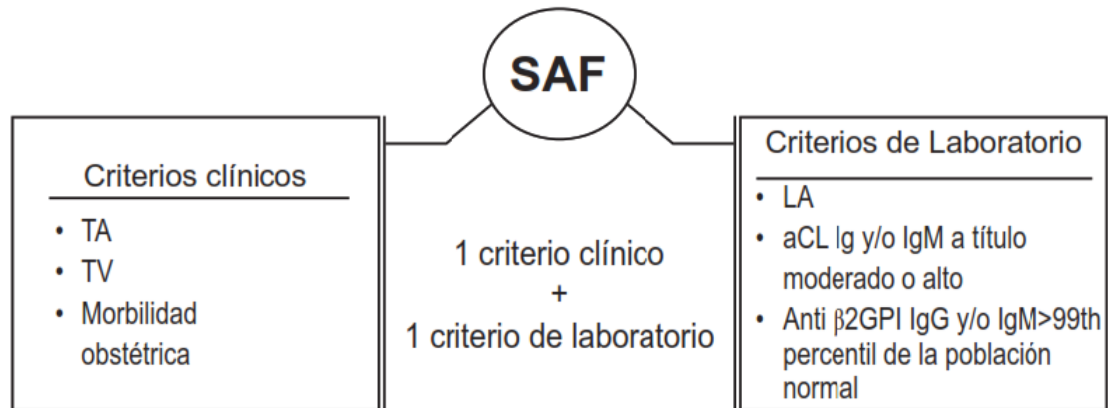
Los cambios más drásticos fueron introducidos en los criterios del laboratorio donde la persistencia de la positividad de los aAF se cambió a más de 12 semanas en vez de 6 semanas (Forastiero,2020, p.19).

H. PRUEBAS DE LABORATORIO PARA DIAGNOSTICO DE SAF

El síndrome antifosfolípido al igual que otras patologías de origen autoinmune, se define por criterios clínicos y de laboratorio (FIGURAN°3), para poder identificar anticuerpos antifosfolípidos en los pacientes con sospecha de SAF se utiliza hasta tres diferentes métodos análisis, como una determinación para AL, anticardiolipinas y anticuerpos anti-beta2-glicoproteína (Scazziota, Adamczuk, Annetta, 2018, p.327).

FIGURA N° 3

Esquema simplificado del diagnóstico de SAF



Nota. Los criterios vigentes para la clasificación de SAF Fuente: Scazziota, Adamczuk, Annetta (2018).

Las pruebas de laboratorio que demuestran la presencia de un anticuerpo antifosfolípidos pueden dividirse en dos categorías: a) inmunológicas en fase sólida (ELISA): que detectan autoanticuerpos dirigidos principalmente contra las cardiolipinas y beta 2 -glicoproteínas I b) ensayos de coagulación: que demuestran la presencia del anticoagulante lúpico que son inmunoglobulinas que inhiben la coagulación *in vitro*, pero están asociados a trombosis (Valor, Hernández, Martínez, López Longo, 2018, p.120).

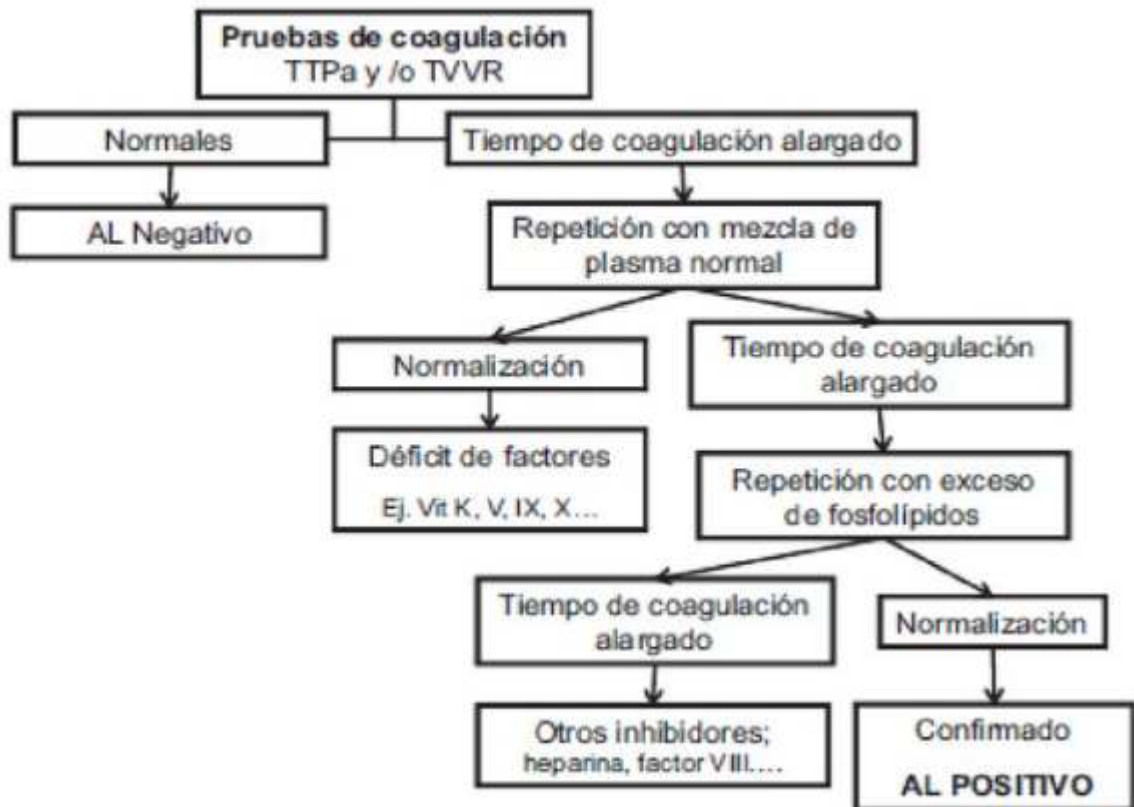
I.- PRUEBAS PARA DIAGNOSTICO DEL ANTICOAGULANTE LÚPICO

Los criterios para el diagnóstico de inhibidor lúpico propuestos por tres guías: (ISHT, BCSH y CLSI) coinciden que se deben realizar dos pruebas de tamizaje sensibles con diferentes principios analítico debido a que no hay pruebas 100% sensibles. Además, la prueba de tamizaje que dio alterada deberá ser confirmada y que la prueba de confirmación debe ser de la misma marca comercial, para que sea un sistema integrado. El ensayo de mezcla debe ser realizado para descartar deficiencias.

- 1.Prolongación de los ensayos de coagulación dependientes de fosfolípidos (prueba de detección: tiempo de tromboplastina parcial activada (APTT).
- 2.Demostrar la presencia del inhibidor a través de mezcla con plasma normal.
- 3.Evidenciar la dependencia de fosfolípidos que tiene el inhibidor través de una prueba confirmatoria Prueba de neutralización con plaqueta o prueba de neutralización (PNP) (FIGURA N°4) (Scazziota, Adamczuk, Annetta, 2018, p.330).

FIGURA N°4

Algoritmo para la detección de anticoagulante lúpico



Nota. Esquema para detección de anticoagulante lúpico, con prueba básica de coagulación APTT, en paciente con sospecha clínica de SAF Fuente: Blanco, Kordich, Bermejo (2013).

J. VALIDACIÓN DE PRUEBAS

Las buenas prácticas de laboratorio indican que todas las pruebas de análisis clínico deben ser validadas y/o verificadas previo a ser utilizadas antes de procesar muestras de pacientes

Se evaluarán las nuevas pruebas diagnóstica para una buena aplicación.

3. EXACTITUD DIAGNOSTICA: SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD

La sensibilidad corresponde a la proporción de individuos correctamente diagnosticados con la condición o enfermedad por la prueba diagnóstica. En otras palabras, la proporción de verdaderos positivos correctamente identificados por el test del total de individuos enfermos según el estándar de referencia.

La especificidad corresponde a la proporción de individuos correctamente diagnosticados con ausencia de la condición o enfermedad por la prueba diagnóstica en estudio. Vale decir, es la proporción de verdaderos negativos que fueron correctamente identificados por el test, del total de individuos sanos según el estándar de referencia (Salazar.2017, p.366).

4. VALORES PREDICTIVOS

Los valores predictivos positivos (VPP) y negativos (VPN) proporcionan estimaciones de la probabilidad de la enfermedad. Vale decir, es la probabilidad de que la prueba diagnóstica entregue el diagnóstico correcto, si esta resulta positiva o negativa. **a. Valor Predictivo Positivo** Corresponde a la probabilidad condicional de que el paciente tenga la enfermedad, dado que el test resultó positivo. Expresado de otra manera, es la proporción de pacientes con la prueba diagnóstica positiva que efectivamente tienen la condición. **b. El Valor Predictivo Negativo** Corresponde a la probabilidad condicional de que el paciente no tenga la enfermedad, dado que la prueba diagnóstica resultó negativa. En otras palabras, es la probabilidad de que el individuo no tenga la condición en estudio luego de que el test es negativo Salazar.2017, p.367).

De acuerdo con esto se puede inferir que la sensibilidad y la especificidad representan la validez de una prueba diagnóstica, y que el valor predictivo positivo y valor predictivo negativo representan la seguridad de una prueba diagnóstica En este sentido, podemos calificar una prueba diagnóstica en los parámetros mencionados como excelente (mayor o igual al 95%), buena (entre 80% y 94%), regular (entre 50% y 79%) y mala (menor del 50%) Salazar.2017, p.368).

5. ESTUDIO DE CONCORDANCIA

Se define el índice de concordancia kappa de la siguiente manera:

$$\kappa = \frac{P_o - P_e}{1 - P_e}$$

Donde P_o es la *proporción de concordancia observada* (en tanto por 1) y P_e es la *proporción de concordancia esperada por puro azar*. En caso de acuerdo perfecto la proporción de concordancia será 1, por lo que $1 - P_e$ representa el margen de acuerdo posible no atribuible al azar. De ese margen nosotros observamos probablemente sólo una parte $P_o - P_e$, salvo que haya acuerdo perfecto $P_o = 1$. Así pues, en caso de concordancia perfecta el valor de kappa es 1; si la concordancia observada es igual a la esperada kappa vale 0; y en el caso de que el acuerdo observado sea inferior al esperado la índice kappa es menor que cero (Salazar, 2017, p. 383).

Landis y Koch propusieron unos márgenes para valorar el grado de acuerdo en función del índice kappa:

TABLA N° 2*Escala de valoración del índice kappa*

kappa	grado de acuerdo
< 0	sin acuerdo
0,1 - 0,2	insignificante
0,21 - 0,4	bajo
0,41 - 0,6	moderado
0,61 - 0,8	bueno
0,81 - 1	muy bueno

Nota. Landis y Koch propusieron unos límites para el grado de acuerdo estimado con el resultado del cálculo de Kappa. Fuente: Landis, Koch (1977).

6. INTERVALO DE REFERENCIA Y PUNTO DE CORTE

El intervalo de referencia es conjunto de valores que el médico utiliza para interpretar los resultados de las pruebas en un paciente. El intervalo de referencia para una prueba determinada se basa en los resultados de la prueba en el 95% de la población sana. Para el cálculo del intervalo de referencia IR y punto de corte, existen diferentes guías, pero todas coinciden en que los puntos de corte y los IR deben ser calculados por cada

laboratorio tanto de la prueba de detección como la de confirmación. Proponen el uso de 20-60 donantes normales. Si la distribución de las muestras es normal (gaussiana, para el cálculo de IR se utilizará la media más menos 2 desviaciones estándar, donde el punto de corte es $X+2DS$. Se determinará el IR, calculando el Percentil 2,5 y 97.5 (Scazziota, Adamczuk, Annetta, 2018, p.336).

El Punto de corte es el umbral que por encima del cual el resultado se informa como positivo y por debajo se reporta como negativo. Para punto de corte se calcula el percentil 99. Para determinación de punto de corte de patológicos en la prueba de detección y confirmación se puede realizar con un mínimo de 10 pacientes (Scazziota, Adamczuk, Annetta, 2018, p.336).

V. OBJETIVOS

A. OBJETIVO GENERAL

- Optimizar la prueba de tiempo de tromboplastina parcial activada (APTT) y de neutralización con plaquetas (PNP) para la detección y confirmación del anticoagulante lúpico y su relación en pacientes con riesgo de trombosis.

B. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Establecer la técnica más efectiva para la obtención de fosfolípidos a partir de plasma rico en plaquetas (PRP).
- Determinar la Especificidad y Sensibilidad diagnóstica de la prueba de APTT y PNP para anticoagulante lúpico.
- Determinar el Valor Predictivo Positivo y Valor Predictivo Negativo de la prueba de APTT y PNP para anticoagulante lúpico.
- Determinar el Índice Kappa y el Grado de Concordancia del método de detección APTT y la prueba de confirmación PNP para anticoagulante lúpico.
- Determinar el rango de referencia y punto de corte en la prueba de detección APTT para el anticoagulante lúpico en nuestro medio.

VI. DISEÑO METODOLOGICO

A. TIPO DE ESTUDIO

Se trata de un estudio tipo descriptivo transversal.

B. POBLACIÓN

El presente estudio se realizó con dos poblaciones de pacientes, que acudieron al Instituto SELADIS.

1° GRUPO DE CONTROL

Conformada por 32 individuos entre 20-40 años aparentemente sanos seleccionados como grupo control, para la obtención de rangos de referencia y punto de corte de las pruebas de detección APTT y confirmación PNP de anticoagulante lúpico.

2° GRUPO DE ESTUDIO

La segunda población conformada por 10 pacientes de ambos sexos entre 20 a 40 años de edad. Agrupados en 3 categorías: baja, moderada y alta probabilidad de tener SAF, atendidos en centros hospitalarios como COSSMIL y el Hospital de Clínicas de la ciudad de La Paz que acudieron al instituto SELADIS.

C. CRITERIOS DE INCLUSION

1. GRUPO DE CONTROL

Las muestras del grupo control fueron obtenidas de pacientes aparentemente sanos entre las edades de 20 a 40 años de edad, sin antecedentes de enfermedad

2. GRUPO DE ESTUDIO

Pacientes e ambos sexos entre 20 a 40 años de edad, con problemas de: aborto recurrente o morbilidad obstétrica, trombosis venosa o arterial profunda, trombocitopenia, anomalías cardíacas y con enfermedad autoinmune de ambos sexos entre 20 a 40 años.

D.- CRITERIOS DE EXCLUSION

1. GRUPO DE CONTROL

Se excluyeron la muestra de pacientes mayores de 50 años deficiencias de factores o coagulopatías.

2. GRUPO DE ESTUDIO

Se excluyeron a pacientes mayores a 50 años o con deficiencia de otros factores de coagulación o la presencia de inhibidores específico.

F. TAMAÑO MUESTRAL

Al tener un porcentaje bajo de casos positivos de AL y no contar con datos de incidencia y prevalencia en nuestro medio, nos obliga a que sigamos las recomendaciones internacionales para determinar el número pacientes que debemos trabajar.

La ISTH 2009 y BCSH 2012, proponen contar con 40 individuos sanos, menores de 50 años para determinar el intervalo de referencia y el punto de corte. Además de una población patológica de 10 pacientes según la CLSI 2014.

En total nuestra población en estudio fue de 52 pacientes siendo este el mínimo requerido para que tener significancia estadística.

G. TECNICAS Y PROCEDIMIENTOS

OBTENCION DE CONCENTRADO PLAQUETARIOS

Se obtuvo una bolsa de concentrado plaquetario con tiempo de utilidad cumplido descartado por bancos de sangre.

EQUIPOS Y REACTIVOS

EQUIPOS

Coagulómetro semiautomático (Clot SP)

Sonicador (SONICS MATERIALS INC Vibra Cel)

Centrifugadora (Centrifuge AIC)

Vortex (Vortex AB 2000)

Microscopio (Olympus CH-2)

Cámara de Neubauer

Tanque de nitrógeno líquido (YDS-30 litros)

REACTIVOS

BUFFER TRIS-SALINO pH 7.4

Citrato de sodio líquido al 32% (0.109 ó 0.105 M)

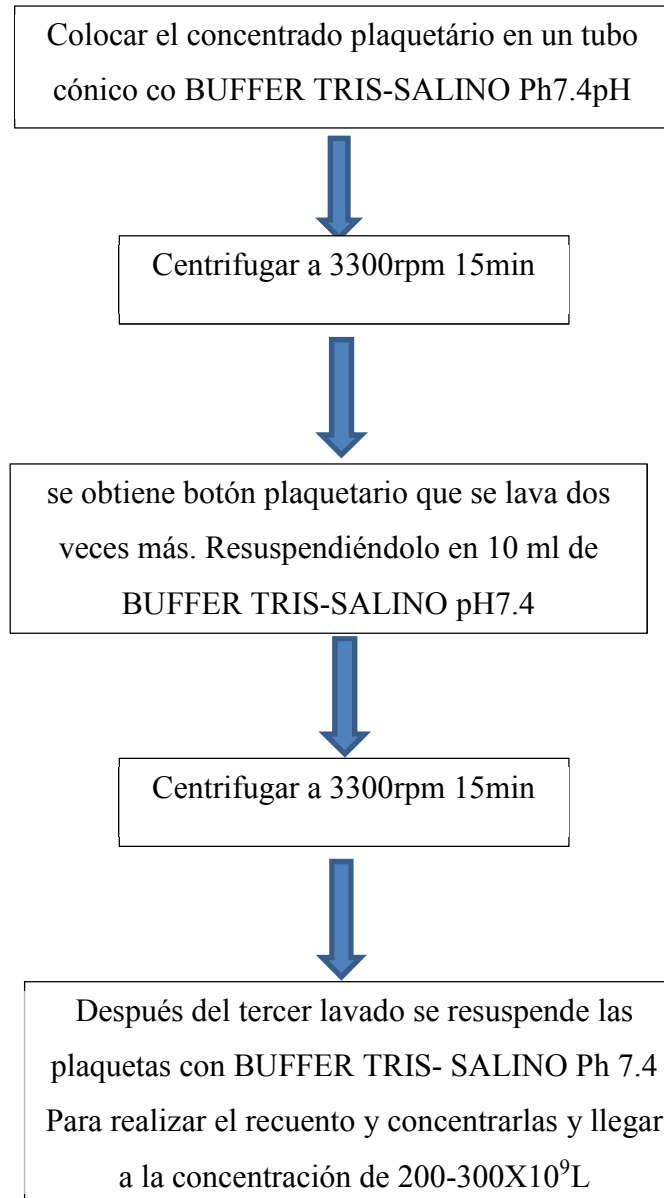
Reactivo de Cefaloplastina Activada (Dade Actin-Siemens)

PROCEDIMIENTO

Se transfirió una parte de concentrado de plaquetas en un tubo de plástico de forma cónica, y se resuspendió con un volumen igual de BUFFER TRIS-SALINO, se homogenizó y se centrifugo a 3300 rpm por 15 minutos, se elimina el sobrenadante y se obtiene un botón plaquetario, este se lava dos veces más resuspendiéndolo en 10 ml de BUFFER TRIS-SALINO, para luego centrifugar a 3000 rpm por 15 minutos (FIGURA N°5). Después del tercer lavado se resuspende las plaquetas con BUFFER TRIS-SALINO y se realiza el recuento de plaquetas para llegar a la concentración de $200-300 \times 10^9/L$.

FIGURA N°5

Protocolo de obtención de concentrado plaquetario



Nota. Diagrama del protocolo de obtencion del concentrado plaquetario.

TECNICAS DE OBTENCION DE FOSFOLIPIDO MEDIANTE LISADO PLAQUETARIO

Para la obtención de fosfolípidos a partir de plaquetas lisadas, se ejecutaron dos técnicas: lisado por sonicación y por choque térmico.

LISADO PLAQUETARIO POR SONICACIÓN

Una vez obtenido el botón plaquetario se resuspensión en el buffer Tris- salino y se llevó a un recuento plaquetario de 200 a 300 x10⁹ L.

Se inserta una sonda ultrasónica en la muestra y se aplican ondas sonoras de alta frecuencia en pulsaciones de aproximadamente 20 kHz por minuto. Se realizó la sonicación en dos tubos en tiempos diferentes para ver el tiempo necesario para conseguir la lisis plaquetaria.

El primer tubo fue sometido a 1 minutos de sonicación manteniéndolo en hielo. Se observó en el microscopio que el lisado plaquetario no era total.

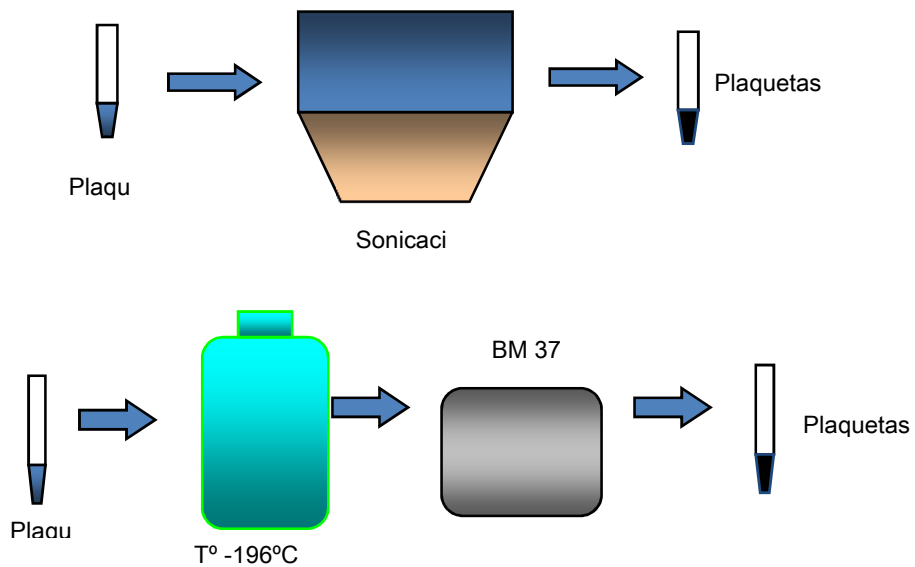
El segundo tubo fue sometido a 2 minutos de sonicación y manteniéndolo en hielo. Se observó en el microscopio que este tubo se obtuvo un lisado completo de las plaquetas (FIGURANº6).

LISADO PLAQUETARIO POR CHOQUE TÉRMICO

Una vez obtenido el plasma rico en plaquetas se realizó una resuspensión en el buffer Tris- salino y se llevó a un recuento plaquetario de 200 a 300 x10⁹ L para luego realizar el lisado plaquetario. Los lisados plaquetarios se obtuvieron tras 5 ciclos consecutivos de congelación/descongelación del concentrado de plaquetas a -80 °C, eliminando los restos celulares por centrifugación, se confirmó el lisado de las plaquetas, mediante la observación en el microscopio y luego se almacenando el sobrenadante en tubos de crio preservación a -196°C hasta su posterior empleo (Figura N°6).

Figura N°6

Obtención del lisado plaquetario por Sonicación y choque térmico



Nota. Esquema de los 2 protocolo que se realizados para determinar la mejor foma de obtencion de fosfolipidos mediante el lisado de plaquetas.

PRUEBA DE DETECCION DE ANTICOAGULANTE LÚPICO

Se determinó la presencia de anticoagulante lúpico (AL) mediante la determinación del tiempo de tromboplastina parcial activada (APTT) con ácido eláxico fue utilizada como una prueba estándar en el diagnóstico de inhibidor lúpico pues es muy sensible a la presencia de los fosfolípidos, ya que el reactivo utiliza cerebro de animal como fuente de fosfolípidos y ácido eláxico como activador. La activación “*in vitro*” producida a través de la fase de contacto, conduce a la generación de trombina con una cinética más lenta y por tanto adecuada, para evidenciar la interferencia que ejercen esto anticuerpos en los complejos Xasa y Protrombinasa.

PROCEDIMIENTO

Obtención de muestra de sangre en un tubo con citrato de sodio 3,2% en proporción 1:9 anticoagulante: sangre.

Obtener plasma citratado pobre en plaquetas centrifugando la muestra de sangre a 3500 rpm por 10 minutos

Realizar la prueba en un coagulómetro semiautomatizado

Incubar el plasma en el coagulómetro por 3 minutos a 37°C

Añadir la cefalina a la muestra y dejar que incubar 3 minutos a 37°C

Colocar la mezcla en la celdilla de reacción y añadir cloruro de calcio 0,025 M previamente preincubado a 37°C

Iniciar el cronometro y una vez producida la formación de fibrina anotar el tiempo de reacción en segundos. Los resultados de tiempo prolongado determinan la posible presencia de AL.

PRUEBA DE CONFIRMACIÓN DE ANTICOAGULANTE LÚPICO

La prueba confirmatoria se realizó utilizando dos tubos, en uno se colocó el plasma del paciente, el reactivo de APTT y la mezcla de un buffer, el segundo tubo contenía el lisado plaquetario (por sonicación o choque térmico) más el reactivo de APTT añadido al plasma del paciente.

APTT - Buffer

50 ul plasma

50 ul reactivo de APTT

APTT – Plaquetas

50 ul plasma

50 ul reactivo de APTT

50 ul de buffer tris –salino

50 ul de lisado plaquetario

PROCEDIMIENTO

- Se incubó 3 minutos a 37°C
- Se añadió 50 ul de cloruro de calcio 0,025 M precalentado a 37°C
- Se calculó la diferencia en segundos entre el APTT-buffer y el APTT-plaquetas.
- Considerando un resultado normal, cuando la diferencia es menor a 7 segundos y un resultado positivo para inhibidor lúpico si es mayor 7 segundos.

K.- ANALISIS ESTADISTICO

Se realizó estadística descriptiva e inferencial para la validación, del ensayo determinando la sensibilidad y especificidad diagnóstica, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo, el grado de concordancia, el intervalo de referencia además del punto de corte para el laboratorio. Se utilizó el programa Microsoft Excel 2016 para los cálculos de todos estos parámetros.

VI.- RESULTADOS

OPTIMIZACION DE LA OBTENCION DEL LISADO PLAQUETARIO

Una vez adquirido el plasma rico en plaquetas, se realizó la obtención de fosfolípidos mediante el lisado plaquetario por dos métodos: sonicado y choque térmico y se los comprobó respectivamente en la prueba de confirmación PNP.

a) Lisado plaquetario por Sonicación: Se realizó la prueba de confirmación PNP para AL, con el lisado plaquetario por sonicación y se correlaciono con la prueba de APTT, en pacientes del grupo control (Tabla N° 3)

TABLA N° 3

Resultados de la prueba de detección APTT y Prueba de Confirmación PNP con concentrado de fosfolípidos obtenidos por Sonicación

N° GRUPO CONTROL	PRUEBA DE APTT	PRUEBA DE PNP
1	25,4 seg.	9,1 seg.
2	26,6 seg.	26,7seg.
3	28 seg.	8,0 seg.
4	33,0 seg.	0,1 seg.
5	26,8 seg.	2,4 seg.
6	32,2 seg.	0,0 seg.
7	24,8 seg.	1,0 seg.
8	28,5 seg.	2,1 seg.
9	30,1 seg.	0,2 seg.

10	25,4 seg.	0,2 seg.
11	29,1 seg.	0,0 seg.
12	25,2 seg.	0,0 seg.
13	28,0 seg.	0,0 seg.
14	28,0 seg.	0,1 seg.
15	30,2 seg.	0,1 seg.
16	25,0 seg.	0,1 seg.
17	31,2 seg.	17,5 seg.
18	31,2 seg.	0,7 seg.
19	27,6 seg.	0,0 seg.
20	24,6 seg.	0,0 seg.
21	27,9 seg.	0,2 seg.
22	32,2 seg.	2,1 seg.
23	27,2 seg.	0,1 seg.
24	23,1 seg.	6,6 seg.
25	29,8 seg.	0,6 seg.
26	32,4 seg.	5,1 seg.
27	34,1 seg.	4,6 seg.
28	34,0 seg.	0,3 seg.
29	27,3 seg.	2,0 seg.
30	25,3 seg.	2,0 seg.
PROMEDIO	28,5	3,1
DS	3,0	5,9
CV	10,7%	191,7%

Nota. Como se observa los resultados de ambas pruebas, no correlacionan y la prueba de PNP presenta un coeficiente de variación muy alto

La desviación estándar (DS) es de 5,9 y su coeficiente de variación(CV) es de 191,7 % cómo se puede observar el coeficiente es muy alto por tanto datos son muy dispersos y poco precisos, los datos no son homogéneos y tiene alta variabilidad.

b) Lisado plaquetario por choque térmico: Se realizó la prueba de confirmación PNP para AL, con el lisado plaquetario por choque térmico y se correlaciono con la prueba de APTT, en pacientes del grupo control. Sus resultados presentaron una mayor correlación con la prueba de APTT por tanto es la mejor forma de obtención de fosfolípidos para la prueba de confirmación (TABLA N° 4).

TABLA N° 4

Resultados de detección APTT y Prueba de confirmación PNP con concentrado de fosfolípidos obtenidos por Choque Térmico

N° GRUPO CONTROL	PRUEBA DE APTT	PRUEBA DE PNP
1	25,4 seg.	6,7seg.
2	26,6 seg.	4,4 seg.
3	28 seg.	4,0 seg.
4	33,0 seg.	5,2 seg.
5	26,8 seg.	6,6 seg.
6	32,2 seg.	3,2 seg.
7	24,8 seg.	3,0 seg.
8	28,5 seg.	5,5 seg.
9	30,1 seg.	5,6 seg.
10	25,4 seg.	6,0 seg.

11	29,1 seg.	6,0 seg.
12	25,2 seg.	5,2 seg.
13	28,0 seg.	4,5 seg.
14	28,0 seg.	6,1 seg.
15	30,2 seg.	3,3 seg.
16	25,0 seg.	5,2 seg.
17	31,2 seg.	6,2 seg.
18	31,2 seg.	5,3 seg.
19	27,6 seg.	3,3 seg.
20	24,6 seg.	4,8 seg.
21	27,9 seg.	5,1 seg.
22	32,2 seg.	4,9 seg.
23	27,2 seg.	5,2 seg.
24	23,1 seg.	4,5 seg.
25	29,8 seg.	6,1 seg.
26	32,4 seg.	3,6 seg.
27	34,1 seg.	4,4 seg.
28	34,0 seg.	6,4 seg.
29	27,3 seg.	3,3 seg.
30	25,3 seg.	5,1 seg.
31	27,2 seg.	3,5 seg.
32	30,0 seg.	3,0 seg.
PROMEDIO	28,5	4,9
DS	3,0	1,1
CV	10%	23%

Nota. La correlación es alta entre los resultados de ambas pruebas y el coeficiente de variación de la prueba de confirmación PNP es menor al 30%.

Se puede observar en la tabla anterior que se obtuvo una DS de APTT igual 3,0 y un CV de 10%. y para la prueba de confirmación de PNP una DS de 28,5 un CV de 23 % los datos son homogéneos es decir tienen poca variación y una precisión buena en ambos casos.

EXACTITUD DIAGNOSTICA: SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD

TABLA N° 5

Tabla de 2x2 para determinar la Sensibilidad y Especificidad además de VPP y VPN para las pruebas de detección APTT y de Confirmación PNP de Anticoagulante Lúpico

Resultado de la prueba	Enfermedad	Enfermedad	Total
	Presente	Ausente	
PRUEBA POSITIVA	5	0	5
PRUEBA NEGATIVA	2	35	37
	7	35	42

VALORES ESTIMADOS

SENSIBILIDAD	71 %
ESPECIFICIDAD	100 %
VP (+)	100 %
VP(-)	95 %

Nota . Los resultados de sensibilidad y especificidad además del valor predictivo positivo y negativo son de ambas pruebas puesto que sus resultados fueron similares.

Como puede apreciarse en la prueba de APTT y PNP tienen una Sensibilidad del 71% de capacidad para identificar correctamente aquellos que tienen AL. y una mayor especificidad del 100% de capacidad para identificar aquellos que no tienen AL.

A si también el valor predictivo positivo VP (+) muestra que se tiene un 100% de probabilidad de que el paciente sea positivo y este realmente afectado por el AL.

El valor predictivo negativo VP (-) muestra que se tiene un 95% de probabilidad de que el paciente sea negativo a la prueba y no estar realmente afectado por el AL.

TABLA N°6

Tabla de comparación del Intervalo de confianza de 95%del fabricante con intervalo de confianza del 95% del estudio del APTT

	<i>IC95% Fabricante</i>	<i>Resultado del Estudio</i>	<i>IC superior del laboratorio</i>
<i>Sensibilidad</i>	91,8%	71,4%	91,8 %
<i>Especificidad</i>	39,2%	100%	100 %

Nota. El IC95% del fabricante nos permite aceptar la prueba si el IC95% obtenido es igualo mayor al del fabricante además de compararlo con el IC superior obtenido.

GRADO DE CONCORDANCIA: INDICE KAPPA

Se estudió la concordancia o eficacia de las pruebas de APTT Y PNP de confirmación y se obtuvo los siguientes resultados.

TABLA N° 7

Índice de Concordancia Kappa (k) entre la Prueba de Detección APTT y

Confirmación PNP de Anticoagulante Lúpico

	Valor
Índice Kappa (K)	0,81
Grado de Concordancia	BUENA

Nota. Resultados que determinan el grado de concordancia entre las dos pruebas evaluadas.

Comparando el valor obtenido de índice Kappa = 0,81 (TABLA N° 6) con la clasificación de los valores del Índice Kappa podemos observar que muestra una concordancia buena entre la prueba de APTT y PNP de confirmación.

INTERVALO DE REFERENCIA Y PUNTO DE CORTE

A través de los datos obtenidos de pacientes aparentemente sanos en la prueba de APTT y de confirmación PNP se determinó el intervalo de referencia y el punto de corte de ambos.

TABLA N° 8

Intervalo de Referencia y Punto de corte de la Prueba de Detección APTT para AL

VALORES	
<i>Intervalo de referencia</i>	22,7 seg. - 34,3 seg.
<i>Punto de Corte</i>	34,1 seg

Nota Parámetros que nos dan un rango de referencia procedente de la población aparentemente y el umbral que permitirá discriminar los pacientes sanos de los enfermos.

TABLA N° 9

Intervalo de referencia y Punto de Corte de la Prueba de confirmación PNP para AL

	VALORES
<i>Intervalo de referencia</i>	2,6 seg. - 7,1 seg
<i>Punto de Corte</i>	6,7 seg

Nota. Valores que permitirán interpretar el resultado y confirmar la presencia o ausencia del anticoagulante lúpico.

RELACIÓN PRESENCIA DE INHIBIDOR LÚPICO Y PATOLOGÍA DIAGNOSTICADA

Los datos de la prueba de APTT y de confirmación de AL por PNP fueron relacionados con el diagnóstico base de los pacientes estudiados teniendo que todos tenían antecedentes de trombosis venosa, antecedentes familiares de trombofilia y uno con accidente cerebro vascular (TABLA N°10).

TABLA N° 10

*Relación entre Resultados de Laboratorio y Diagnóstico Base o Antecedentes Patológicos en
Pacientes con Riesgo Trombótico*

N° Paciente	Prueba de Detección APTT	Prueba de Confirmación PNP	Diagnóstico/Antecedentes Clínico
1	33,7 seg	2,3 seg	Trombosis venosa profunda
2	34,1 seg	3,3 seg	Trombosis venosa profunda hemiparestesia izquierda
3	44 seg	7,2 seg	LES TROMBOSIS EN MIEMBRO INFERIOR
4	40,2 seg	7,8 seg	LES TROMBOSIS VENOSA PROFUNDA TROMBOSIS VENOSA PROFUNDA
5	42,1 seg	8,1 seg	ERITROSITOSIS
6	32,8 seg	4,8 seg	Riesgo de trombofilia por antecedentes familiares
7	33,2 seg	5,6 seg	Riesgo de trombofilia por antecedentes familiares
8	30,4 seg	6,0 seg	Riesgo de trombofilia por antecedentes familiares
9	39,3 seg	8,8 seg	RIESGO DE TROMBOFILIA POR ANTECEDENTES FAMILIARES
10	42,6 seg	9,1 seg	LES ACCIDENTE CEREBRO-VASCULAR Y MUERTE
IR	22,7 seg. - 34,3 seg.	2,6 seg. - 7,1 seg	
PC	34,1 seg	6,7 seg	

Se puede observar en la tabla que 5 pacientes presentan un tiempo prolongado en la prueba de APTT son confirmados por la prueba de PNP y son de interés pues estos pacientes son positivos para AL. Este se puede evidenciar gracias a los intervalos de confianza de cada prueba y su punto de corte, relacionándolo también con los datos clínicos de los pacientes.

VII. DISCUSIONES

De acuerdo a la investigación realizada por Triplett y col. (estudio base de investigación sobre anticuerpos antifosfolípidos e inhibidor lúpico) se determinó que la prueba de neutralización de plaquetas es específica, para diferenciar entre inhibidores específicos y adquiridos de la coagulación. Además, determina que el tiempo parcial de tromboplastina activada es la prueba de detección más apropiada. Esto se comprobó en nuestro trabajo, ya que se utilizó el reactivo de APTT con ácido elálgico, que le da mayor sensibilidad a anticoagulante lúpico, y se comprobó que la sensibilidad es mayor con el activador. Validando así, ambas pruebas como las mejores opciones para la detección y confirmación del AL.

Los investigadores Lizbeth Salazar y Fernando Atmetlla⁸ realizaron la detección del anticoagulante lúpico en pacientes con trastornos trombóticos y alguna enfermedad de fondo, se detectó la presencia del anticoagulante con la prueba de VDRL además del APTT pero detectaron a dos pacientes con pruebas positivas falsas, es por esto que

recomendaron el uso del APTT para la detección de inhibidor lúpico y como prueba de confirmación la de neutralización de plaquetas PNP, específicamente la de lisado de plaquetas y no de fosfolípidos exógenos o plaquetas intactas, en nuestro trabajo se realizó una variante en la obtención de fosfolípidos que fue la sonicación, pero no se obtuvieron resultados confiables, por esto se determinó que el lisado por choque térmico, a pesar del arduo proceso de su obtención, es la mejor alternativa para esta prueba comprobándose así las recomendaciones de Tripell y col. como de Lizbeth Salazar .et al.

Se corroboró que al utilizar una prueba de mayor sensibilidad para anticoagulante lúpico como el APTT con ácido elágico seguida de una prueba de confirmación como el PNP que son las más utilizadas, se incrementa la efectividad en el laboratorio y el fácil acceso para el paciente en relación al costo y la fiabilidad en la prueba, Es importante indicar que actualmente en nuestro medio, no se cuenta con set comerciales específicas para este diagnóstico y a pesar de la existencia de los mismos en el exterior las características de sensibilidad y especificidad de los mismos es igual o menor a las obtenidas en nuestro estudio.

Avigliano.A y Grand, B (2015) evaluaron la sensibilidad y especificidad del TVVRd y del ATPP para la detección de anticoagulante y utilizaron las pruebas confirmatorias correspondientes de cada uno, se determinó que APTT tiene una sensibilidad de 58.3% y especificidad del 91.9% mientras que TVVRd tiene una sensibilidad de 87%

especificidad del 100% y recomendaron que sería muy útil utilizar APTT combinado con un reactivo que lo haga más sensible a AL para mejorar la capacidad de detección, en nuestro trabajo evidenciamos el utilizar un reactivo de APTT combinado con ácido elárgico que mejora la capacidad de este para la detección de AL, cómo se puede observar en los resultados que obtuvimos es una sensibilidad de 71% y especificidad del 100%.

Al comparar IC del 95% del fabricante de la prueba de APTT, solo podemos decir que el IC del 95% que obtuvimos fue bajo, también se compara con el IC superior que se obtuvo en el laboratorio que es igual en sensibilidad y superior en especificidad al del fabricante y que el problema que se tubo fue debió al bajo número de muestras que manejamos en el trabajo, pero esto no significa que la prueba, no son eficientes para el diagnóstico del anticoagulante lúpico.

La utilización del APPT y del PNP es accesible en términos de ejecución, costo y tiempo ya que otras pruebas de detección como el Tiempo de Veneno de Víbora de Russell y el Tiempo de Kaolin por factores de costo y tiempo de ejecución en nuestro medio no son del todo asequibles a la población.

Al determinar la técnica más efectiva para la obtención del lisado plaquetario comprobamos que la técnica por sonicación destruía completamente la membrana plaquetaria, por tanto, destruía también los fosfolípidos que deseábamos obtener, no se

produjo el mismo resultado en el lisado por choque térmico ya que se podía ver en el microscopio las plaquetas lisadas.

Pudimos obtener intervalos de referencia en nuestro medio y punto de corte , para la prueba de detección APTT y de confirmación de anticoagulante lúpico PNP, que nos permitió corroborar la presencia de AL en 5 pacientes de 10 que presentaron un tiempo alargado de APTT además de confirmarlo, estos 5 pacientes tenían antecedentes de LES y por nuestros resultados podemos pronosticar un riesgo de trombosis, destacando un paciente que mostró resultados de APTT y PNP muy por encima del punto de corte siendo un paciente de alto riesgo de trombosis, que como consecuencia derivó en un accidente cerebrovascular con fallecimiento.

La prueba de detección APTT con ácido elálgico mostro ser específica en la detección de AL, lo que fue corroborado por la prueba de confirmación PNP Demostrando ser una prueba de tamizaje útil en el laboratorio.

La prueba confirmatoria corrobora la naturaleza del efecto inhibitorio de los fosfolípidos, por esto deben ser altamente específica para diagnosticar la presencia de inhibidor lúpico. La adición de un concentrado de plaquetas acorta el tiempo de coagulación del APTT que se alarga en presencia del anticoagulante lúpico. Por lo tanto, el sistema del procedimiento de neutralización plaquetaria es más valioso como una prueba diagnóstica para diferenciar el anticoagulante lúpico de un inhibidor específico de factor (p. ej.,

inhibidor del factor VIII). Como se observó en nuestros resultados, se estableció que nuestra prueba de confirmación es altamente específica, lo cual es necesario para el diagnóstico de anticoagulante lúpico.

Se determinó que las prueba de detección y de confirmación tiene una buena precisión, Además que tiene un valor predictivo del 95.2% que valida la prueba de detección, por tanto también la prueba de confirmación Está claro que a pesar de la sensibilidad y de la especificidad si los resultados no pueden reproducirse su valor y utilidad son mínimos, por eso determinamos en nuestro trabajo la fiabilidad o eficiencia usando una prueba de concordancia como el índice Kappa el cual nos dice que la correlación entre las pruebas de APTT y PNP de confirmación es buena.

VIII. CONCLUSIONES

- Se realizó la optimización de la prueba de neutralización con plaquetas para la detección y confirmación del anticoagulante lúpico, al utilizar un concentrado plaquetario lisado mediante choque térmico, esto permitió la obtención de resultados consistentes en la prueba.
- Se optimizó el proceso de lisado de plaquetas y se determinó que la mejor técnica es la de choque térmico, pues se puede observar que los resultados obtenidos con la prueba de confirmación PNP están en concordancia con los resultados de la prueba de detección de anticoagulante lúpico APTT.

- Se determinó que la prueba de detección y confirmación presentan excelente especificidad (100 %) y una sensibilidad buena (71%) mayor a otras pruebas de tamizaje que generalmente llegan al 60% lo cual es necesario para diagnosticar la presencia del anticoagulante lúpico y confirmar la naturaleza dependiente de fosfolípidos del efecto inhibitor. Además, se determinó un valor predictivo positivo de 71 % y un valor predictivo negativo de 95 % que muestra que la prueba es confiable al tiempo de obtener resultados en pacientes enfermos y sanos, el índice de correlación entre estas pruebas es de $k=0,81$ que determina un grado de concordancia buena entre las pruebas de APTT y PNP.
- Los resultados positivos obtenidos en los pacientes correlacionaron con la historia clínica del paciente puesto que los mismos tenían factores de riesgo para trombosis como antecedentes de Lupus Eritematoso Sistémico. Es importante notar hacer que se obtuvo un resultado positivo en ambas pruebas en un paciente con una enfermedad de base como LES el cual al momento de la toma de muestra presentó un accidente cerebro vascular y posteriormente falleció.

IX. RECOMENDACIONES

Observamos que es necesario seguir el protocolo sugerido por la Sociedad Internacional de Hemostasia y Trombosis (ISHT) para el efectivo diagnóstico de Anticoagulante Lúpico en el laboratorio, además de poner en conocimiento de los médicos los adelantos

en el diagnóstico de síndrome antifosfolipídico específicamente del anticoagulante lúpico.

Al introducirnos en el estudio de problemas trombóticos y hemostáticos, pudimos percatarnos que es nuestro medio no contamos con pruebas, para ese tipo de enfermedades, es por esto que es necesario contar con una unidad de laboratorio especializado en el área enfermedades tromboembólicas y hemostáticas, que permitirá un diagnóstico precoz y preciso de pacientes con estos problemas y hacer el seguimiento de pacientes que estén bajo tratamiento con anticoagulantes.

X. BILIOGRAFIA

Avigliano, A., & Grand, B. (2015). Detección de anticoagulante lúpico en mujeres con complicaciones obstétricas: sensibilidad y especificidad de las pruebas. *Hematología*, 19, 112-117.

Bermejo, E. (2017). Fisiología de la hemostasia normal. *Hematología*, editado por el Grupo CAHT 21, 10-18.

Blanco, A, Scazzioti, A. (2019) *Guía para el estudio de Anticoagulante Lúpico*. editado por el Grupo CAHT.

- Blanco, A., Kordich, L., Bermejo, E., Forastiero, R., Lauricella, A. M., Pieroni, G., ... & Scazziota, A. (2013). Fundamentos para el manejo práctico en el laboratorio de hemostasia. editado por el Grupo CAHT
- Dubloscq, C. (2017). Fisiología de la hemostasia normal. *Hematología*, editado por el Grupo CAHT 21, 19-30.
- Forastiero, R. R. (2020) *Historia de los anticuerpos antifosfolípidos y el síndrome antifosfolípido*. editado por el Grupo CAHT
- Larrañaga, G. F. (2020). *Tipos de anticuerpos antifosfolípidos y epitopes antigénicos*. editado por el Grupo CAHT
- Orozco-López, G., Rubio-Jurado, B., & Nava-Zavala, A. H. (2015). Conceptos de hemostasia, trombofilia y síndrome antifosfolípido. *El Residente*, 10(3), 142-153.
- Peláez-Cruz, E. J., Chigne-Castro, Y. S., Ríos-Pereda, W. B., Castillo, Y. R., Raza, M. D. P. R., Rodríguez-Cárdenas, B. M., & Peña-Quispe, C. (2022). Trombosis portal en síndrome antifosfolipídico: Reporte de Caso. *Revista de la Facultad de Medicina Humana*, 22(4), 882-887.

- Pérez-Gómez, F., & Bover, R. (2007). La nueva cascada de la coagulación y su posible influencia en el difícil equilibrio entre trombosis y hemorragia. *Revista española de cardiología*, 60(12), 1217-1219. (Pérez-Gómez, Bover, 2007, p.)
- Pouymiró Pubillones, Pedro Omar, Pouymiró Brooks, Yalili, & Pouymiró Brooks, Iarmila. (2012). *Síndrome de anticuerpos antifosfolípidos*. MEDISAN, 16(3), 429-444. (Pouymiró Pubillones, Pouymiró Brooks, 2012, p.)
- Salazar, G. J. V. (2017). Importancia del cálculo de la sensibilidad, la especificidad y otros parámetros estadísticos en el uso de las pruebas de diagnóstico clínico y de laboratorio. *Medicina & laboratorio*, 23(7), 365-386.
- Salazar, L., & Atmetlla, F. (1995). Detección del anticoagulante lúpico en pacientes con trastornos tromboticos. *Revista costarricense de Ciencias Médicas*, 20, 15-20
- Scazziota, A., Adamczuk, Y., Annetta, E., Bertolaccini, M. L., Blanco, A. N., Duboscq, C., & Rossi, E. (2018). Aspectos destacados del Taller de Laboratorio de Anticuerpos Antifosfolípidos XIII Congreso Argentino de Hemostasia y Trombosis, organizado por el GRUPO CAHT. *Revista Hematología*, 22(3), 326-347.
- Triplett, D. A., Brandt, J. T., Kaczor, D., & Schaeffer, J. (1983). Laboratory diagnosis of lupus inhibitors: a comparison of the tissue thromboplastin inhibition procedure with a new

platelet neutralization procedure. *American Journal of Clinical Pathology*, 79(6), 678-682. (Triplett, Brandt, & Schaeffer, 1983, p.681)

Valor, L., Hernández-Flórez, D., Martínez-Barrio, J., & López Longo, F. J. (2018). Una reflexión sobre el anticoagulante lúpico: cómo lo definimos, determinamos e interpretamos. *Reumatología Clínica*, 14(2), 120-122.

XI .- ANEXO

ANEXO N°1

REACTIVO PARA LA PRUEBA DE PNP

Preparación de TRIS-SALINO Ph 7,35 (TBS)

TRIS-BASE ($\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$), 121,14 g/mol..... 6,06 g

Cloruro de Sodio NaCl, 58,5 g/mol.....8,5 g

Agua destiladacsp1000ml

ANEXO N°2

CALCULO DE VALIDES Y DE CONCORDANCIA DE LA PRUEBA DE APTT Y PNP

		Método comparativo		
		Positivo	Negativo	
Método en evaluación	Positivo	5	0	5
	Negativo	2	35	37
		7	35	42

% de Acuerdos Positivos	71%
% de Acuerdos Negativos	100,0%
% de Acuerdos globales	95,2%

% de Acuerdos Positivos: $a / (a+c)$

% de Acuerdos Negativos: $d / (b+d)$

% de Acuerdos globales: $(a+d) / n$

Conclusiones:

Concordancia observada 95,2%

Criterio: Aceptación > 80%

Decisión **VALIDES
ACEPTADA**

Nivel de concordancia (Indice Kappa):

Pe 0,75 Proporción esperada por azar

Po 0,95 Proporción total de concordancia observada

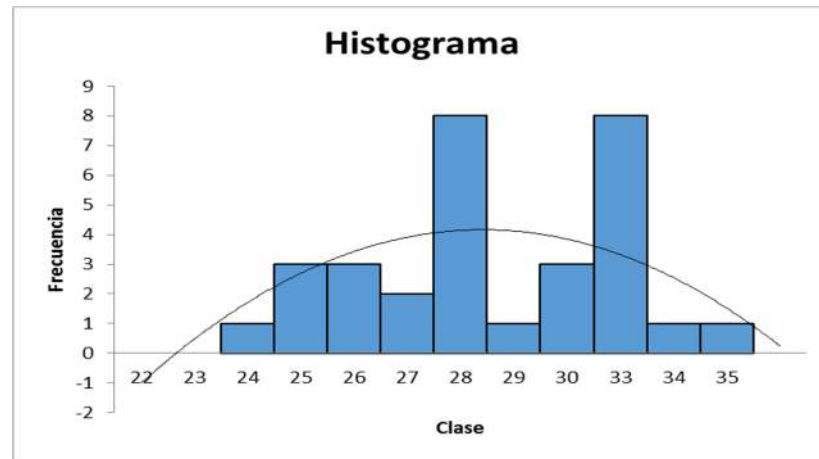
Índice Kappa 0,81

Decisión Aceptable

$$k = (Po - Pe) / (1 - Pe)$$

ANEXO N°3

GRAFICA DE DISTRIBUCION DE DATOS, CALCULO DE IRINTERVALO DE REFERENCIA Y PUNTO DE CORTE DE LA PRUEBA DE APTT

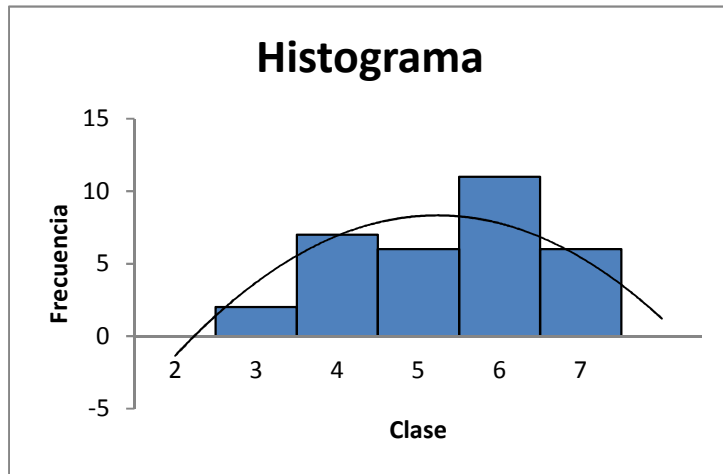


Clase	Frecuencia
22	0
23	0
24	1
25	3
26	3
27	2
28	8
29	1
30	3
33	8
34	1
35	1
	0

Percentil	IR	Limite
P97,5	34,3	LIMITE SUP
P2,5	22,7	LIMITE INF
Punto de corte		34,1

ANEXO N°4

GRAFICA DE DISTRIBUCION DE DATOS, CALCULO DE INTERVALO DE REFERENCIA Y PUNTO DE CORTE DE LA PRUEBA DE PNP



<i>Clase</i>	<i>Frecuencia</i>
2	0
3	2
4	7
5	6
6	11
7	6

Percentil	IR
p2,5	2,6
p97,5	7,1
PUNTO DE CORTE	6,7

ANEXO N°5

FORMATO DE COSENTIMIENTO INFORMADO

CONSENTIMIENTO INFORMADO

**“OPTIMIZACION DE LA PRUEBA DE TIEMPO DE
TROMBOPLASTINA PARCIAL ACTIVADA (APTT) Y
NEUTRALIZACION CON PLAQUETAS(PNP) PARA LA**

Yo _____, acepto participar en el estudio titulado “OPTIMIZACION DE LA PRUEBA DE TIEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ACTIVADA (APTT) Y NEUTRALIZACION CON PLAQUETAS(PNP) PARA LA” de dejando constancia asimismo que fui debidamente informado de las condiciones del estudio. He sido también informado/a de que mis datos personales serán protegidos cuando los resultados del estudio sean publicados.

FIRMA

C.I.