

Nuevos métodos de diagnóstico en hemostasia y trombosis

COORDINADORES: M.^ªF. LÓPEZ FERNÁNDEZ. *A Coruña*
P. LLAMAS. *Madrid*

Resumen del simposio

Desde que se conoce la complejidad del sistema hemostático y las múltiples alteraciones del mismo, ha constituido una verdadera quimera el lograr una prueba de hemostasia global que permitiera el diagnóstico de cada patología, así como la monitorización de su tratamiento y de las complicaciones posibles. Hoy día parece evidente que estamos lejos de alcanzar tan atractivo objetivo. En la mayoría de los casos nos vemos obligados a emplear un conjunto de pruebas de laboratorio, complementarias entre sí, cuyo mejor conocimiento en la práctica asistencial nos permite llevar a cabo con rigor el diagnóstico correcto y, hasta cierto punto, poder aplicar unos rangos de niveles a la hora de establecer el tratamiento más adecuado. Somos conscientes de que se nos escapan aspectos muy importantes, como por ejemplo el riesgo trombótico al que sometemos a un paciente dado cuando con el tratamiento sustitutivo corregimos una deficiencia de un factor concreto. Pero también existen situaciones en las que para corregir un problema hemostático necesitamos emplear productos que no siguen un objetivo de restauración del defecto puntual sino de corregir por vías, no siempre bien conocidas, productos alternativos. Este último caso es el del tratamiento de la hemofilia con inhibidor empleando agentes baipasantes. Como ejemplos de la problemática mencionada, los tres primeros ponentes de este simposio abordan temas de interés en el campo del diagnóstico y tratamiento de alteraciones de la hemostasia.

Precisamente el doctor Víctor Jiménez Yuste, del Hospital Universitario La Paz de Madrid, expone en su ponencia el posible valor de las nuevas pruebas globales de hemostasia, con especial atención al test de generación de trombina (TGT). Esta prueba se está intentando introducir en la práctica clínica, con el objeto de proporcionar información sobre el grado de éxito que logramos con el tratamiento de la difícil situación que supone un inhibidor en hemofilia, así como del posible riesgo de desencadenar complicaciones trombóticas. No obstante, todavía presenta una serie de circunstancias y aspectos poco conocidos que se deben tener muy en cuenta a la hora de la interpretación de sus resultados.

El doctor Javier García Frade, del Hospital Universitario Río Hortega de Valladolid, expone las controversias en el diagnóstico del síndrome antifosfolípido (SAF), dado que en esta entidad tampoco existe una prueba de hemostasia global que permita su diagnóstico. El diagnóstico de SAF depende de la detección de los anticuerpos antifosfolípido (aFL), que se estudian mediante pruebas inmunológicas y coagulométricas, aunque, en ambos casos, faltan métodos reproducibles y estandarizados para determinarlos. La determinación de estos autoanticuerpos, que incluyen anticardiolipina (aCL), anti- β 2-GP-I, antiprotrombina y otros aFL, se realiza mediante procedimientos inmunológicos en fase sólida (ELISA), en muchos casos en laboratorios de Inmunología, y mediante procedimientos de coagulación en laboratorios de Hematología. Esta división condiciona que el estudio con frecuencia sea incompleto. Por último, el doctor García Frade comenta los criterios diagnóstico clínicos y de laboratorio del síndrome antifosfolípido y hace referencia a los aspectos controvertidos. Concluye que quedan temas pendientes, como investigar nuevas pruebas que diferencien subpoblaciones específicas de aFL y establecer estudios cooperativos para diagnosticar el SAF.

En el campo de la enfermedad de von Willebrand (EVW) tampoco existe una prueba global específica de esta entidad y por ello se necesitan diversas pruebas complementarias para permitir un diagnóstico más preciso. El doctor Javier Batlle del Complejo Hospitalario Universitario Juan Canalejo, en A Coruña, nos expone en su presentación los aspectos más relevantes del diagnóstico de esta enfermedad, en ocasiones motivo de clara controversia. Algunas de estas pruebas son engorrosas y/o poco sensibles y se viene intentando su sustitución por otras más sensibles y reproducibles. Sin embargo, en muchos casos las nuevas pruebas no han dado resultados consistentes a nivel internacional y todavía no se aconseja su uso generalizado. Al mis-

mo tiempo están surgiendo nuevas metodologías, muy prometedoras, que aportan nueva información práctica que puede explicar fenómenos observados en pacientes que hasta ahora no se entendían bien. Es el caso de la determinación del propéptido del VWF (VWFpp), en forma de razón VWFpp/antígeno del VWF (VWF:Ag), que suministra información sobre la vida media del factor von Willebrand liberado a partir de los depósitos tisulares. Su investigación viene demostrando la breve o escasa respuesta al acetato de desmopresina en pacientes con EVW en las que el VWF mutado presenta una razón VWFpp/VWF:Ag alterada. De ahí su posible empleo para conocer mejor la fisiopatología de las diferentes mutaciones del VWF y su valor a la hora de predecir la respuesta o utilidad del DDAVP en cada paciente. No obstante, la prudencia parece recomendar que se estudien más ampliamente este tipo de nuevas metodologías antes de su generalización rutinaria. De otro lado, el papel de la medicina molecular en la EVW viene demostrando su utilidad a la hora de confirmar una determinada anomalía, si bien esta metodología no se encuentra todavía al alcance de todos los laboratorios. Ante la complejidad que ha adquirido el diagnóstico de la EVW, resulta de interés recordar el panel de pruebas recomendable a emplear y la estrategia a seguir en esta dirección.

Por último, este simposio finaliza con la presentación de la doctora Raquel Mata, de la Fundación Jiménez Díaz de Madrid, que nos habla del "Día a día en el laboratorio de hemostasia: automatización y modelos de gestión informatizada". En los últimos años, los laboratorios se han convertido en centros generadores de un gasto importante, por lo que el control de dicho gasto se ha convertido en uno de los objetivos prioritarios de los gestores sanitarios. Ello ha sido debido al aumento continuo de la demanda asistencial producida por el incremento en el número de pruebas a realizar, el envejecimiento de la población o el desarrollo de actividades de investigación. Los sistemas de automatización en el laboratorio se han desarrollado de forma importante en las últimas décadas, lo que ha permitido una mejoría en la calidad y seguridad del proceso, junto con una disminución significativa en los costes y en los tiempos de ejecución. Sin embargo, en la actualidad, aún no se ha generalizado su uso en los laboratorios de hemostasia, aunque probablemente en los próximos años vayan implantándose de forma gradual. Asimismo, es de gran importancia el desarrollo de los sistemas informáticos, que han permitido añadir funcionalidad a los sistemas de información del laboratorio y facilitar la realización de múltiples tareas garantizando una integración de la información dentro del laboratorio, y de éste con el hospital y las áreas de atención extrahospitalaria (atención primaria y especializada).

UTILIDAD DE LOS TEST DE GENERACIÓN DE TROMBINA EN LA HEMOFILIA

V. JIMÉNEZ YUSTE, I. FERNÁNDEZ, M.T. ÁLVAREZ, M. MARTÍN-SALCES, I. RIVAS, N. BUTTA, A. RODRÍGUEZ DE LA RÚA

Unidad de Trombosis y Hemostasia.

Servicio de Hematología y Hemoterapia.

Hospital Universitario La Paz. Madrid

Introducción

Los diferentes métodos de laboratorio utilizados de forma habitual juegan un papel importante en el manejo clínico de los pacientes con hemofilia. Como se ha preconizado en los últimos años, el conocimiento de los niveles precisos de factor VIII (FVIII) y del factor IX (FIX) tiene importantes implicaciones en el diagnóstico de la hemofilia, en la determinación de la gravedad de la enfermedad, en la valoración del riesgo de desarrollo de inhibidores, así como en el manejo del tratamiento, tanto en esquemas de profilaxis o si éste se realiza a la demanda¹. Además, como se ha observado, existe una discrepancia muy variable entre los niveles de FVIII/FIX (condicionados por la alteración molecular –genotipo–) y la clínica de los pacientes –fenotipo–, que acentúa aún más, si cabe, la necesidad de conocer un método más preciso que determine de forma real cuál es el nivel efectivo de FVIII/FIX de los pacientes con hemofilia².

Pero es sin duda en el campo del manejo de los pacientes con hemofilia e inhibidor donde la existencia de métodos adecuados para la monitorización se hace más relevante³. Hasta la actualidad los agentes que sortean el efecto del inhibidor (agentes *bypass*) han sido utilizados siguiendo pautas de dosificación empíricas, sin un apoyo definitivo para su monitorización de laboratorio. Sin embargo, estos agentes son potencialmente trombóticos y su respuesta no es igual de predecible que la existente tras la administración del factor deficitario.

A partir del conocimiento del funcionamiento del sistema hemostático a partir de los años cincuenta, se desarrollaron métodos de laboratorio que permitían conocer las diferentes deficiencias de los factores de la coagulación, abandonándose técnicas menos específicas que evaluaban la coagulación desde un punto global⁴. Se reconocieron trece factores de la coagulación, la mayoría de ellos mediante ingeniosas combinaciones de medición de la formación del coágulo. En esta época, quien mejor definió la percepción de los investigadores dedicados al descubrimiento de los diferentes factores fue Rosemary Biggs, cuando dijo que

realmente los experimentos “se parecían a algo similar a cocinar, enriqueciendo el campo de la investigación con un hallazgo tras otro”⁵.

En los últimos años se han reintroducido métodos que evalúan de forma global la función hemostática, pudiendo analizar ambos extremos del equilibrio hemostático, los estados de hipercoagulabilidad y los trastornos con tendencia hemorrágica⁶. De manera particular, el test de generación de trombina (TGT), la tromboelastometría rotacional (roTEG), la fuerza contráctil de las plaquetas, y el denominado Clot Signature Analyzer[®]. La mayor limitación que ofrecen estos métodos es que no existe un punto final que demuestre de forma clara su correlación con el objetivo clínico y que la mayoría de ellos aún no han sido validados. De todos ellos se analizará in extenso el que parece que en la actualidad puede ofrecer una mayor utilidad en el campo de la hemofilia el TGT, no sólo en los pacientes con inhibidor sino también en el análisis y monitorización de los niveles de FVIII/FIX en los pacientes con hemofilia sin inhibidor.

Principio del test de generación de trombina

Los TGT fueron desarrollados por Hemker con el objeto de medir la cinética global de formación de trombina incluso después de que la formación del coágulo comenzara y, por tanto, medir todos los sistemas de activación e inactivación de la coagulación⁷. Este método determina, de forma general, la situación de la coagulación en plasma y, de forma específica, el proceso dinámico de generación y degradación de la trombina. La curva de generación de trombina (Figura 1) nos aporta información acerca de la fase de latencia, también denominada *lag-time* (LT), que equivale al tiempo de formación del coágulo. Otro parámetro interesante es la pendiente de la curva que corresponde a la tasa de formación de trombina por unidad de tiempo. En esta misma curva podemos analizar dos variables más: el pico máximo de trombina (PH) y el tiempo hasta la obtención de este pico (TTP). De estos parámetros se puede deducir la velocidad de formación de trombina expresada en nM/s (índice de velocidad = pico de trombina / TTP-LT). Asimismo, se puede determinar el área bajo la curva o el potencial endógeno de trombina (ETP), que mide la cantidad de acción que potencialmente puede ser realizada por la trombina, es decir, cuánto de trombina existe y cuánto tiempo está activa.

La generación de trombina es esencial en el proceso hemostático. Los actuales métodos, como el tiempo de protrombina (TP) y el tiempo de cefalina (TC), sólo ofrecen una imagen fija y estática del estado de la coagulación, dado que miden el tiempo en el cual suficiente cantidad de trombina (aproximadamente 10 nM o

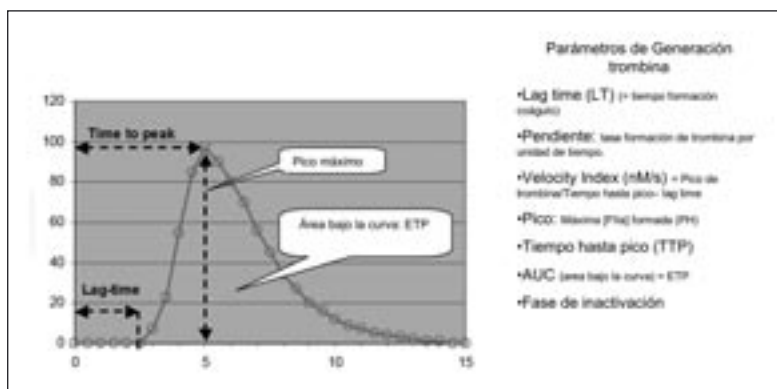


Figura 1. Representación gráfica de la curva de generación de trombina.

el 1% de su potencial real) es suficiente para la formación del coágulo en plasma, sin tener en cuenta el dinamismo de las diferentes vías de formación del mismo (Figura 2).

Además, la determinación de los niveles de los diferentes factores de la coagulación de forma individual no siempre explica de forma precisa la tendencia trombotica o hemorrágica y los síntomas de algunos de estos trastornos. Con la intención de ganar más información detallada del proceso hemostático, especialmente en relación con la dinámica, se desarrollaron los TGT.

Existen diferentes técnicas para la determinación de la generación de trombina. De forma general se pueden dividir en dos grandes grupos: determinación en muestras subdivididas o en muestras de monitorización continua. Las técnicas de muestras subdivididas se dividen a su vez en aquellas que utilizan tecnologías basadas en la formación de coágulo o en métodos amiloidóticos, mientras que la tecnología de evaluación continua utiliza sustratos cromogénicos⁸ o métodos fluorogénicos⁷.

Para cada uno de estos métodos, la tasa y el proceso de generación de trombina pueden ser manipulados a través del proceso de inicio de la coagulación (por vía de activación de la fase de contacto o a través de la vía del factor tisular), la concentración y tipo de fosfolípidos, lo que produce que el test sea más o menos sensible a las deficiencias o aumentos de los niveles de los diferentes factores de la coagulación que se hallan en las diferentes vías de la coagulación, la utilización de factor IX activado para potenciar la reacción, la utilización de agentes que potencien la acción de la proteína C y la utilización de inhi-

bidores de la activación de la fase de contacto⁹. Por esto es muy importante, a la hora de interpretar los resultados de TGT, conocer en detalle el tipo y concentración de los reactivos utilizados.

En la actualidad los TGT han sido utilizados de forma más importante en la valoración de los estados de hipercoagulabilidad, como la predicción del riesgo trombotico en mujeres con anticonceptivos orales¹⁰, para valorar el efecto de diferentes anticoagulantes orales¹¹ y en la detección de estados de hipercoagulabilidad¹². En el campo de la hemofilia es más reciente su implantación, especialmente

en dos campos: en el de los pacientes con hemofilia sin inhibidor y en el del control de los agentes *bypass* en pacientes con hemofilia e inhibidor.

TGT en los pacientes con hemofilia e inhibidor

Existen dos objetivos diferentes a la hora de monitorizar los agentes *bypass* utilizados en el tratamiento de los pacientes con hemofilia e inhibidor¹³. El primero es la capacidad de poder predecir qué pacientes responden y cuáles no a las dosis recomendadas de los fármacos utilizados. El segundo objetivo es tratar de identificar una variable cuantificable y continua que de forma ideal se correlacionase tanto con la eficacia clínica desde el punto de vista hemostático como con el riesgo de trombosis. Actualmente no existe un método único que reúna estas condiciones y sea capaz de un modo fiable y preciso reflejar los efectos procoagulantes o anticoagulantes de los agentes *bypass*¹⁴.

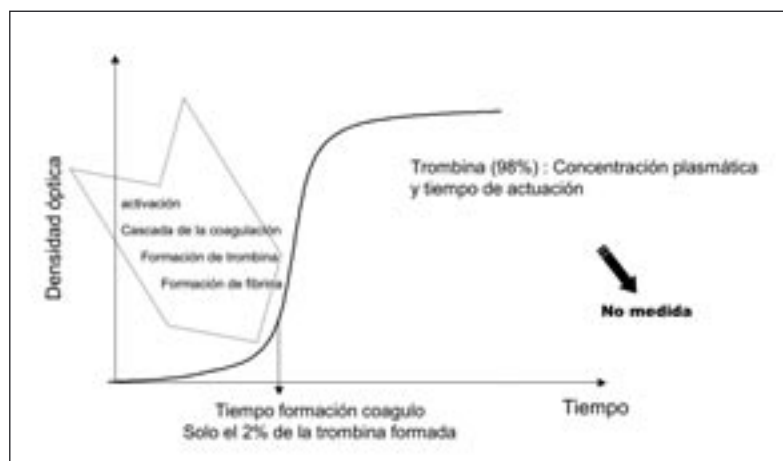


Figura 2. Gráfica de la cantidad de trombina medida por métodos clásicos.

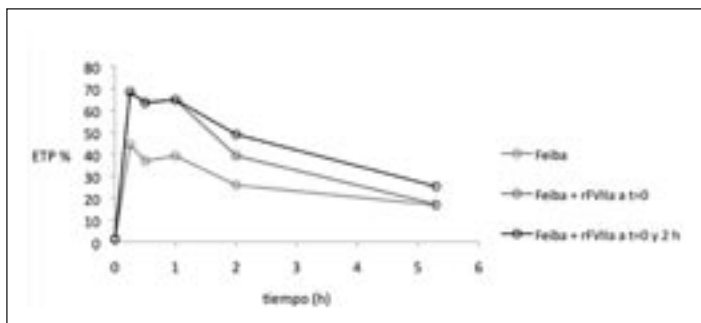


Figura 3. Representación gráfica con FEIBA a 50 unid/kg más una dosis de rFVIIa (90 µg/kg) a los 15 minutos y a las 2 horas de FEIBA.

Las primeras experiencias de Varadi¹⁵ evaluaban la cinética de la generación de trombina en plasma de pacientes con inhibidor tras la administración in vitro de los concentrados del complejo protrombínico activado, FEIBA® (CPPA), o tras la administración de CCPA. A pesar de que no existía generación de trombina en plasma de pacientes con hemofilia e inhibidor, la tasa y el pico de generación de trombina aumentaba de modo dependiente de la dosis tras la administración de CCPA. En pacientes tratados con una sola dosis de CCPA, se observaba un incremento en la generación de trombina a la hora del tratamiento; posteriormente la tasa y el pico de generación de trombina retornaban gradualmente a niveles basales previos con una vida media de 4-7 h¹⁵. El efecto de CCPA en la generación de trombina varía de forma interindividual en cada paciente. Igualmente, la capacidad de los pacientes con hemofilia e inhibidor de aumentar la generación de trombina tras la administración in vitro de factor VII activado recombinante NovoSeven® (rFVIIa) es dependiente de la dosis¹⁶. Resultados similares se consiguieron en plasmas ex vivo tras la administración de rFVIIa. Tanto in vitro como ex vivo de las determinaciones en plasma, la tasa de generación de trombina varía en relación con cada paciente estudiado. Cuando se comparan los resultados in vitro y ex vivo, éstos sugieren que los resultados in vitro pueden ser útiles para predecir la dosis mínima efectiva de rFVIIa en cada paciente. En concordancia con el papel jugado por las plaquetas en el mecanismo de acción del rFVIIa, el uso de plasma pobre en plaquetas infraestima en un 30% el efecto del rFVIIa en comparación con el plasma rico en plaquetas¹⁷. Los TGT han demostrado ser una herramienta útil a la hora de tomar decisiones terapéuticas en pacientes con hemofilia tratados con agentes *bypass*¹⁸, pero la variabilidad en los resultados obtenidos enfatiza la necesidad de una optimización del método y mayores investigaciones en su relación con su utilidad clínica. A este respecto, en nuestro centro hemos tratado

de evaluar la posibilidad de utilización de TGT en dos pacientes, como modelo para poder predecir la utilización conjunta de forma secuencial de ambos agentes *bypass*, pudiendo establecer así una herramienta de laboratorio, en caso de necesidad, por la gravedad extrema, de utilizar ambos agentes (Figura 3). Nuestros resultados parecen confirmar la utilidad de los TGT en este campo (datos aún sin publicar).

TGT en los pacientes con hemofilia sin inhibidor

Como se ha indicado, la determinación precisa de los niveles de FVIII y FIX es muy importante en el manejo integral del paciente con hemofilia. Diferentes estudios han observado que entre el 3-10% de los pacientes con hemofilia grave no padecen hemartros o tienen una mínima artropatía². Por otro lado, es interesante destacar que algunos pacientes con hemofilia moderada presentan sangrados similares a los de los pacientes con fenotipo grave. Parece claro, por tanto, que los niveles de FVIII no son el único determinante a la hora de valorar el fenotipo de los pacientes con hemofilia A, y que otros factores diferentes de las concentraciones del factor deficitario influyen en la situación clínica, como es la tendencia hemorrágica y el estado articular.

Diferentes estudios han evaluado el papel de los TGT en la hemofilia. Salvagno *et al.* estudiaron la influencia de los niveles de FVIII:C en TGT tanto in vivo como ex vivo tras la infusión de diferentes concentrados de FVIII¹⁹. Según los autores los parámetros de TGT podrían ser una herramienta útil para tratar de forma individualizada a los pacientes en función de su patrón hemostático.

Varios trabajos han observado la correlación entre el FVIII:C / FIX:C, determinados de forma basal y ETP, y el pico de trombina²⁰⁻²². En otros trabajos parece observarse una discriminación entre el ETP y el pico de trombina entre sujetos normales y pacientes con diferentes niveles de gravedad de hemofilia^{23,24}. Estos estudios también demuestran el importante grado de variabilidad en la generación de trombina entre pacientes con niveles similares de FVIII:C / FIX:C. Del mismo modo, se observa el efecto del tratamiento sustitutivo y en muestras in vitro a las que se les añade el factor en la generación de trombina²¹⁻²³. Estos estudios demuestran un efecto del factor adicionado, pero con diferentes respuestas en pacientes con similares niveles de FVIII:C. Algunos estudios en los que se añade el FVIII exógenamente a las muestras de plasma, sugieren que el ETP y el pico de trombina alcanza un máximo a niveles de FVIII:

C de 0,5-1 UI/mL^{21,25} y que el FVIII:C no es ya una limitación en la tasa de trombina por encima de estos niveles. De forma general se puede observar que existe un patrón heterogéneo importante en la generación de trombina a niveles similares de FVIII:C, por lo cual algunos pacientes con hemofilia grave pueden tener niveles de ETP normales de forma basal, mientras que otros presentan valores anormales aun cuando han sido tratados para obtener niveles normales en plasma de FVIII:C. Sin embargo, cada paciente parece tener un patrón típico y una respuesta predecible. Similares observaciones han sido apreciadas por nuestro grupo en pacientes con hemofilia tras ser tratados con FVIII y en estudios de farmacocinética (resultados sin publicar).

Consideraciones finales

Los TGT y su aplicación al campo de la hemofilia, tanto en pacientes con inhibidor como sin él, ofrecen una herramienta de laboratorio con posibilidades prometedoras. Sin embargo, existen varias consideraciones a tener en cuenta: unas, derivadas de la técnica utilizada y los reactivos aplicados, que pueden hacer que la interpretación de los mismos sea errónea; y otras, relativas a la necesidad de individualización que ha de observarse en la interpretación de los resultados, dado que cada paciente presenta, en las diversas condiciones, un patrón de respuesta diferente a los test de TGT.

Bibliografía

1. Jiménez Yuste V, Villar A, Quintana M, Hernández Navarro F. Monitorización del factor VIII:C: técnicas coagulativas frente a cromogénicas. *Rev Iberoamer Tromb Hemostasia*. 2001; 14: 3-11.
2. van den Berg HM, De Groot PH, Fischer K. Phenotypic heterogeneity in severe hemophilia. *J Thromb Haemost*. 2007; 5 (Suppl. 1): 151-6.
3. Jiménez-Yuste V, Rodríguez-Merchán EC, Álvarez MT, Quintana M, Fernández I, Hernández-Navarro F. Controversies and challenges in elective orthopedic surgery in patients with hemophilia and inhibitors. *Semin Hematol*. 2008; 45 (2 Suppl. 1): S64-7.
4. Barrowcliffe TW, Cattaneo M, Podda GM, Bucciarelli P, Lusana F, Lecchi A, et al. New approaches for measuring coagulation. *Haemophilia*. 2006; 12 (Suppl. 3): 76-81.
5. Hemker HC. Recollections on thrombin generation. *J Thromb Haemost*. 2008; 6 (2): 219-26.
6. Shima M, Matsumoto T, Ogiwara K. New assays for monitoring haemophilia treatment. *Haemophilia*. 2008; 14 (Suppl. 3): 83-92.
7. Hemker HC, Giesen P, Al Dieri R, Regnault V, de Smedt E, Wagenvoort R, et al. Calibrated automated thrombin generation measurement in clotting plasma. *Pathophysiol Haemost Thromb*. 2003; 33 (1): 4-15.
8. Hemker HC, Beguin S. Thrombin generation in plasma: its assessment via the endogenous thrombin potential. *Thromb Haemost*. 1995; 74 (1): 134-8.
9. van Veen JJ, Gatt A, Makris M. Thrombin generation testing in routine clinical practice: are we there yet? *Br J Haematol*. 2008; 142 (6): 889-903.
10. Tans G, Curvers J, Middeldorp S, Thomassen MC, Meijers JC, Prins MH, et al. A randomized cross-over study on the effects of levonorgestrel- and desogestrel-containing oral contraceptives on the anticoagulant pathways. *Thromb Haemost*. 2000; 84 (1): 15-21.
11. Lawrie AS, Gray E, Leeming D, Davidson SJ, Purdy G, Iampietro R, et al. A multicentre assessment of the endogenous thrombin potential using a continuous monitoring amidolytic technique. *Br J Haematol*. 2003; 123 (2): 335-41.
12. Faber CG, Lodder J, Kessels F, Troost J. Thrombin generation in platelet-rich plasma as a tool for the detection of hypercoagulability in young stroke patients. *Pathophysiol Haemost Thromb*. 2003; 33 (1): 52-8.
13. Key NS, Nelsestuen GL. Views on methods for monitoring recombinant factor VIIa in inhibitor patients. *Semin Hematol*. 2004; 41 (1 Suppl. 1): 51-4.
14. Sorensen B, Ingerslev J. Tailoring haemostatic treatment to patient requirements: an update on monitoring haemostatic response using thrombelastography. *Haemophilia*. 2005; 11 (Suppl. 1): 1-6.
15. Varadi K, Negrier C, Berntorp E, Astermark J, Bordet JC, Morfini M, et al. Monitoring the bioavailability of FEIBA with a thrombin generation assay. *J Thromb Haemost*. 2003; 1 (11): 2374-80.
16. Dargaud Y, Lienhart A, Negrier C. Monitoring of rFVIIa by thrombin generation test. *J Thromb Haemost*. 2007; 5 (Suppl. 2): abstract P-M-176.
17. Dargaud Y, Lambert T, Trossaert M. New advances in the therapeutic and laboratory management of patients with haemophilia and inhibitors. *Haemophilia*. 2008; 14 (Suppl. 4): 20-7.
18. Dargaud Y, Lienhart A, Meunier S, Hequet O, Chavanne H, Chamourard V, et al. Major surgery in a severe haemophilia A patient with high titre inhibitor: use of the thrombin generation test in the therapeutic decision. *Haemophilia*. 2005; 11(5): 552-8.
19. Salvagno GL, Astermark J, Lippi G, Ekman M, Franchini M, Guidi GC, et al. Thrombin generation assay: a useful routine check-up tool in the management of patients with haemophilia? *Haemophilia*. 2009; 15 (1): 290-6.
20. Chantarangkul V, Clerici M, Bressi C, Giesen PL, Tripodi A. Thrombin generation assessed as endogenous thrombin potential in patients with hyper- or hypo-coagulability. *Haematologica*. 2003; 88 (5): 547-54.
21. Beltrán-Miranda CP, Khan A, Jaloma-Cruz AR, Laffan MA. Thrombin generation and phenotypic correlation in haemophilia A. *Haemophilia*. 2005; 11 (4): 326-34.
22. Dargaud Y, Beguin S, Lienhart A, Al Dieri R, Trzeciak C, Bordet JC, et al. Evaluation of thrombin generating capacity in plasma from patients with haemophilia A and B. *Thromb Haemost*. 2005; 93 (3): 475-80.
23. Siegemund T, Petros S, Siegemund A, Scholz U, Engelmann L. Thrombin generation in severe haemophilia A and B: the endogenous thrombin potential in platelet-rich plasma. *Thromb Haemost*. 2003; 90 (5): 781-6.
24. Luddington R, Baglin T. Clinical measurement of thrombin generation by calibrated automated thrombography requires contact factor inhibition. *J Thromb Haemost*. 2004; 2 (11): 1954-9.
25. McIntosh JH, Owens D, Lee CA, Raut S, Barrowcliffe TW. A modified thrombin generation test for the measurement of factor VIII concentrates. *J Thromb Haemost*. 2003; 1 (5): 1005-11.

CONTROVERSIAS EN EL DIAGNÓSTICO DEL SÍNDROME ANTIFOSFOLÍPIDO

L.J. GARCÍA FRADE, J.M. MARTÍN ANTORÁN, E. FERNÁNDEZ FONTECHA

Servicio de Hematología. Hospital Universitario Río Hortega. Valladolid

Introducción

En 1985, Graham Hughes introdujo el término *síndrome antifosfolípido* (SAF) para caracterizar a un grupo de pacientes con trombosis y/o complicaciones recurrentes del embarazo que tenían anticuerpos antifosfolípido (aFL) en plasma¹. Desde entonces, la detección de aFL se ha considerado un factor de alto riesgo para el desarrollo de tromboembolismo, que puede condicionar una modificación del tratamiento de este proceso².

Las manifestaciones clínicas del síndrome, trombosis y morbilidad en el embarazo, son relativamente frecuentes y en la mayoría de los casos no tienen relación con aFL. El diagnóstico de SAF depende de la detección de aFL. Éstos se estudian mediante pruebas inmunológicas y coagulométricas; en ambos casos faltan métodos reproducibles y estandarizados para determinarlos³.

El nombre *síndrome antifosfolípido* es un motivo de confusión, pues los autoanticuerpos generalmente no están dirigidos contra fosfolípidos sino contra proteínas plasmáticas (β 2-GP-I, protrombina) unidas a fosfolípidos aniónicos. La determinación de estos autoanticuerpos, que incluyen anticardiolipina (aCL), anti- β 2-GP-I, antiprotrombina y otros aFL (Tabla 1), se realiza mediante procedimientos inmunológicos en fase sólida (ELISA), en muchos casos en laboratorios de inmunología, y mediante procedimientos de coagulación en laboratorios de hematología; esta división condiciona que el estudio con frecuencia sea incom-

pleto. El hecho de que un paciente presente autoanticuerpos con diferentes especificidades (β 2-GP-I, dominio I, fosfolípidos, protrombina, anexina V, etc.) determina que se precisen múltiples ensayos para su detección.

Criterios diagnósticos

El diagnóstico de SAF se basa en criterios clínicos y de laboratorio. Hasta 1999 se utilizaron los criterios propuestos por Harris⁴, que incluían anticuerpos aCL, IgG e IgM, en títulos moderados/altos y la detección de anticoagulante lúpico (AL), confirmados tras un intervalo de al menos 6 semanas.

En la conferencia de consenso internacional desarrollada en Sapporo en 1999 se establecieron nuevos criterios clínicos y de laboratorio para definir una población de pacientes homogénea con fines de investigación⁵. Sin embargo, no se considera preciso cumplir todos los criterios para el diagnóstico clínico. La propuesta de Sapporo fue sometida a validación en 243 pacientes⁶, demostrando una sensibilidad de 0,71, especificidad de 0,98, valor predictivo positivo de 0,95 y negativo de 0,88, confirmándose su utilidad para ensayos clínicos.

Los criterios de Sydney en 2006⁷ constituyen una puesta al día de Sapporo, con incorporación de la determinación de β 2-GP-I, IgG e IgM, mejor definición del título y extensión del tiempo mínimo entre dosificaciones a 12 semanas (Tabla 2). Se ha eliminado la condición de que aCL deba realizarse con un test dependiente de β 2-GP-I. En los criterios de Sydney se recomienda estratificar a los pacientes en *tipo I* si presentan más de un criterio de laboratorio; en *Ila* si tienen AL; en *Ilb* si aCL; y en *Ilc* si anti- β 2-GP-I.

Como señala Galli⁸, la decisión de incluir estas tres determinaciones presenta el riesgo de diagnosticar como SAF a pacientes que no tienen el síndrome y someterlos así a un tratamiento innecesario.

Tabla 1. Clasificación de anticuerpos antifosfolípidos

aFL	Término general para anticuerpos antifosfolípidos (aCL, anti- β 2-GP-I, aPT, AL, etc.)
aCL	Anticuerpos contra cardiolipina detectados por ELISA
Anti- β 2-GP-I	Anticuerpos contra β 2-GP-I detectados por ELISA
aPT	Anticuerpos contra protrombina detectados por ELISA
aFS/PT	Anticuerpos contra complejo fosfatidilserina-protrombina detectados por ELISA
AL	Anticuerpos anticoagulante lúpico, detectados por pruebas de coagulación, con especificidad para β 2-GP-I o protrombina
aFE, aFS	Anticuerpos contra fosfolípidos diferentes de cardiolipina (fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina) detectados por ELISA
aAnA5	Anticuerpos contra anexina A5 detectados por ELISA

Tabla 2. Criterios de clasificación del SAF*

Criterios clínicos	1. Trombosis vascular	Uno o más episodios de trombosis arterial o venosa en cualquier tejido u órgano. Cualquier evento trombotico debe ser confirmado con métodos objetivos y validados
	2. Morbilidad del embarazo	Una o más muertes fetales inexplicables (fetos morfológicamente normales) con más de 10 semanas de gestación o uno o más partos prematuros de recién nacidos normales antes de las 34 semanas de gestación por eclampsia, preeclampsia severa o insuficiencia placentaria o tres o más abortos consecutivos antes de las 10 semanas de gestación sin anomalías anatómicas u hormonales maternas ni anomalías cromosómicas de ambos progenitores
Criterios de laboratorio	1. Anticoagulante lúpico	Presente en más de dos ocasiones (con un intervalo de 12 semanas), detectado con las guías de la ISTH
	2. Anticuerpos anticardiolipina, IgG o IgM en títulos medios o altos (> 40 GPL o MPL)	Presentes en dos o más ocasiones con un intervalo de 12 semanas, determinado con ELISA estandarizado
	3. Anticuerpos anti- β 2-GP-I, IgG o IgM en títulos > percentil 99%	Presentes en dos o más ocasiones con un intervalo de 12 semanas, determinado con ELISA estandarizado

*Se obtiene el diagnóstico de SAF si al menos se dan un criterio clínico y uno de laboratorio. FUENTE: International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost.* 2006; 4: 295-306.

Determinación de anticardiolipina, anti- β 2-GP-I y nuevos aFL

Es posible diferenciar anticuerpos dirigidos contra cardiolipina y otros fosfolípidos, anticuerpos anticardiolipina que precisan β 2-GP-I y anti- β 2-GP-I independientes de fosfolípido.

La determinación de aCL constituye un método sensible para el diagnóstico pero falto de especificidad. Los anticuerpos aCL de isotipo IgG o IgM se expresan en unidades GPL y MPL, respectivamente. Existe una gran variabilidad de resultados para aCL entre diferentes laboratorios. La concordancia mejora añadiendo medidas semicuantitativas a los resultados en unidades (positivo alto ≥ 80 U, medio 20-80 U); por encima de 80 U y por debajo de 20 U los resultados no son fiables. Existe discusión sobre la utilización de anticuerpos policlonales o monoclonales en la calibración de aCL. Los policlonales derivan de pacientes y son poliespecíficos, fueron preparados con una mezcla de sueros de pacientes con diferentes concentraciones y especificidades de autoanticuerpos y se establecieron como calibradores primarios. Los monoclonales permiten utilizar un componente de forma indefinida pero tienen afinidad única. Se precisa establecer el rango de normalidad y los valores de corte en cada laboratorio con una muestra de plasmas normales superior a 50. La aplicación de tecnologías cada vez más automatizadas puede incrementar los problemas de estandarización.

Se ha descrito hasta un 10% de donantes sanos con aCL positivos, habitualmente en título bajo; tan sólo un 1,5% se mantienen positivos en un segundo estudio⁹. Aumentos transitorios de aCL se pueden observar en infecciones, generalmente víricas y en trata-

miento con fenotiacinas, hidralacina, procainamida y fenitoína.

La determinación de aCL es útil, pero debe realizarse conjuntamente con AL en aquellos pacientes con sospecha de SAF. Su determinación debe completarse con la determinación de anticuerpos anti- β 2-GP-I.

La unión de aFL a fosfolípidos se realiza por medio de proteínas plasmáticas, siendo β 2-GP-I el antígeno principal. β 2-GP-I es un antígeno relativamente específico para autoanticuerpos presentes en el plasma de pacientes con SAF, carece de calibrador establecido aunque la adopción de calibradores monoclonales por su estabilidad y disponibilidad puede paliar este problema. Respecto a la estandarización de su determinación, pueden influir factores como tipo de placa utilizada, fuente y pureza de β 2-GP-I y concentración que se utiliza al cubrir la placa¹⁰.

Los numerosos ensayos comerciales para aCL y β 2-GP-I no identifican el mismo tipo de muestras como positivas. La reproducibilidad entre diferentes laboratorios es pobre. Algunos pacientes con clínica de SAF presentan determinaciones negativas de aCL, anti- β 2-GP-I y AL; en tales casos se deben determinar otros anticuerpos aFL, una vez que se haya descartado la deficiencia de factores de coagulación o la presencia de inhibidores específicos.

En el SAF se han demostrado anticuerpos de las tres principales clases de inmunoglobulinas, IgA, IgG e IgM, capaces de reaccionar con proteínas unidas a fosfolípidos. Existe evidencia de IgA aCL y anti- β 2-GP-I, siendo la utilidad de IgA aCL similar a IgG en cuanto a trombogenicidad. Debido a su baja prevalencia de forma aislada, sólo se recomienda su determinación cuando son negativos IgG e IgM aCL y existe un alto grado de sospecha de SAF.

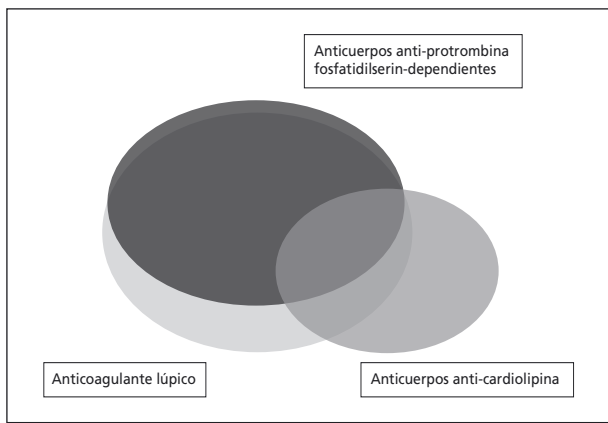


Figura 1. Distribución de aFL (aCL, aPS/PT, AL) en pacientes con síndrome antifosfolípido. FUENTE: Atsumi. *Arthritis Rheum.* 2000; 43: 1982.

Los nuevos test para anticuerpos específicos contra el dominio I de $\beta 2$ -GP-I, protrombina, complejo fosfatidilserina-protrombina (PS/PT), fosfolípidos con carga negativa, anexina A5, no son tan sensibles como aCL y su significación clínica no está establecida. Los anticuerpos contra el dominio I de $\beta 2$ -GP-I parecen correlacionarse con la aparición de trombosis, y aún no está claro que sean los únicos anticuerpos patogénicos¹¹.

Los anticuerpos antiprotrombina constituyen una población heterogénea que comprende anticuerpos dirigidos sólo contra protrombina y anticuerpos contra PS/PT. Estos últimos se correlacionan con la presencia de AL y se ha sugerido que podrían utilizarse como prueba confirmatoria (Figura 1). Su determinación en 441 pacientes con enfermedades autoinmunes, incluyendo 152 pacientes con SAF (84 primario y 68 secundario a LES), demuestra su alta prevalencia en este síndrome en relación con otras enfermedades autoinmunes, y su determinación se ha propuesto como candidata a criterio de laboratorio para la clasificación de SAF¹².

Se hace evidente la necesidad de realizar estudios prospectivos que permitan determinar el valor predictivo de los diferentes ensayos disponibles.

Determinación de anticoagulante lúpico

La detección del anticoagulante lúpico se remonta a 1952, cuando Conley y Hartmann¹³ demostraron en el plasma de pacientes con LES la existencia de una actividad anticoagulante in vitro que posteriormente se comprobó asociada a tendencia trombótica. El diagnóstico de AL comienza cuando se detecta alargado un tiempo de coagulación dependiente de fosfolípidos. Debido a la heterogeneidad de los aFL, no existe actualmente ninguna prueba que tenga sensibilidad o especificidad del 100%. Se recomienda el uso de dos

metodologías con distintos principios analíticos y cada una con distintas concentraciones de fosfolípidos. Los métodos más utilizados han sido: tiempo de trombo-plastina parcial activada (TTPa), tiempo de trombo-plastina parcial activada sensibilizada (TTPad), tiempo de protrombina diluida (TPd), tiempo de veneno de víbora de Russell diluido (TVVRd), tiempo de coagulación de kaolín (TCK), tiempo de coagulación de sílica (TCS) y tiempo de textarina.

La aplicación de pruebas de coagulación para diagnosticar AL se basa aún en los criterios establecidos en 1995 por el ISTH-SCC¹⁴: utilización de plasma con un recuento residual de plaquetas $< 10 \times 10^9/L$, prolongación de al menos un test de coagulación dependiente de fosfolípidos, falta de corrección tras mezcla con plasma normal, corrección del test prolongado tras la adición de fosfolípidos y exclusión de otra posible coagulopatía. No hay acuerdo sobre cómo expresar los resultados ni sobre el grado de corrección a alcanzar con la adición de fosfolípidos. También falta por establecer el tipo y combinación de test que proporcionen suficiente sensibilidad y especificidad para el diagnóstico y la forma de estudio en pacientes tratados con anticoagulantes⁸.

Las pruebas de laboratorio para demostrar AL no están estandarizadas, se pueden utilizar diferentes combinaciones de pruebas de escrutinio y pruebas confirmatorias (Figura 2). Los test más utilizados, TTPa y TVVR diluido, no son suficientemente sensibles, y por ello es preciso realizar al menos dos pruebas diferentes antes de descartar un AL, ningún test aislado es positivo para todos los AL. El TTPa puede ser negativo en aproximadamente la mitad de las muestras. Por otra parte, encontrar un TTPa prolongado y demostrar un efecto inhibitorio en una prueba de mezclas no es suficiente para el diagnóstico de AL, la presencia de heparina o de inhibidores específicos contra un factor pueden producir el mismo efecto.

En la prueba de mezclas la proporción de plasma de paciente y plasma normal varía: la más común es 1:1. La sensibilidad de la prueba depende en gran medida de la valoración de los resultados. Se puede aplicar a la prueba de mezclas un porcentaje de corrección del 70% o el índice de Rosner; cuanto mayor sea (>15), más probabilidad de AL. Este índice tiene sensibilidad del 93% y especificidad del 82%. Ambos pueden ser útiles para estandarizar los resultados y evitar diagnósticos incorrectos¹⁵. La normalización de las pruebas de escrutinio al añadir fosfolípidos en exceso al plasma es la base para demostrar la dependencia de fosfolípidos. La neutralización se puede realizar a partir de plaquetas humanas, con fosfolípidos en fase hexagonal o con reactivos con alto contenido en fosfolípidos. No se dispone de plasma de calibración homologado; como control de calidad se puede utilizar plasma al que se ha incorporado un anticuerpo monoclonal con actividad AL, y es muy aconsejable utilizar cocientes normali-

zados en las pruebas de escrutinio y confirmatorio.

Cuando nos encontramos ante un paciente en tratamiento anticoagulante, hay que recordar que no se debe realizar la determinación en pacientes tratados con dicumarínicos y suspender el tratamiento una o dos semanas antes del estudio. No obstante, en pacientes con riesgo elevado de recurrencia podría hacerse con INR inferior a 3,5⁷; en este caso el plasma del paciente se diluye 1:2 con plasma normal. Probablemente es preferible utilizar HBPM, con la que es posible la medición siempre que la actividad anti-Xa esté en rango terapéutico¹⁶. En pacientes con heparina no fraccionada no se puede detectar AL. El efecto de inhibidores de Xa como fondaparinux y rivaroxabán y de los inhibidores directos de trombina necesitará ser estudiado en muestras de pacientes.

Es preciso definir la menor combinación de pruebas que alcance suficiente sensibilidad y especificidad para el diagnóstico. Todos los autores están de acuerdo en la necesidad de actualizar los criterios de la ISTH de 1995. Temas pendientes son el procesamiento de las muestras, elección de pruebas y procedimientos (mezcla, test confirmatorio), expresión de los resultados, interpretación de la prueba de mezclas y del grado de corrección que inducen los fosfolípidos en exceso.

Práctica actual

El estudio realizado por Moffat *et al.*¹⁷ sobre las prácticas actuales en 113 laboratorios de Norteamérica (NASCOLA) y 96 europeos (ECAT) demuestra que para la determinación de AL los test más utilizados son TTPa sensibilizado y TVVR diluido, con corrección por fosfolípidos hexagonales. La mayoría utiliza un mínimo de dos pruebas, siendo una de ellas con concentración baja de fosfolípidos. El índice de Rosner para la prueba de mezclas se aplicó en el 53% de los laboratorios europeos pero sólo por un 17% de los norteamericanos. La presentación de los resultados de TVVRd escrutinio/confirmatorio en forma nor-

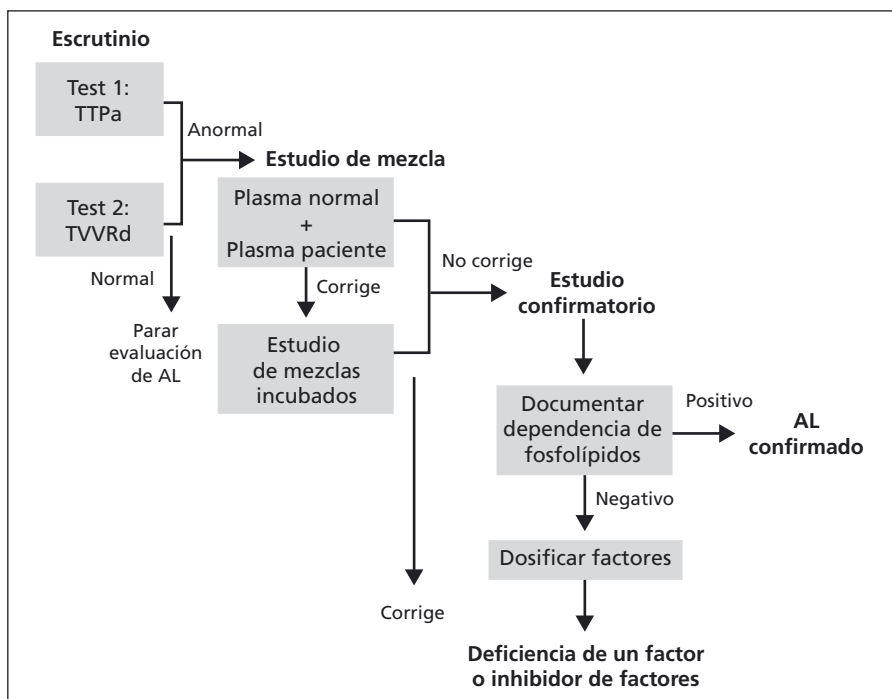


Figura 2. Algoritmo diagnóstico de anticoagulante lúpico. Se deben realizar dos pruebas de escrutinio basadas en diferentes propiedades para descartar la presencia de AL. Si cualquiera de ellas es anormal, realizar prueba de mezclas y, si no corrige, test confirmatorio. Se han de dosificar factores si la prueba de mezclas corrige, el confirmatorio es negativo o hay sospecha de inhibidor específico. Fuente: Brandt: *Thromb Haemost.* 1995; 74: 1185.

malizada fue más frecuente en laboratorios europeos (39%) que norteamericanos (17%). Tan sólo una minoría (35%) siguió la recomendación de excluir deficiencia de factor o un inhibidor específico. La mayoría (78%) determinaron aCL, mientras que un número menor (46%) valoró anti-β2-GP-I.

Significado clínico

Es esencial establecer el perfil de riesgo de cada paciente para guiar la terapia antitrombótica. El valor clínico de los diversos anticuerpos no está bien definido. Diferentes estudios han señalado que la actividad AL presenta mayor riesgo de trombosis que aCL. Otros estudios responsabilizan a anti-β2-GP-I de la patogenicidad de aFL (Figura 3). El riesgo de tromboembolismo puede aumentar con el título de aFL y con el número de diferentes especificidades presentes. En un estudio de casos y controles con 208 pacientes con sospecha de SAF¹⁸, el aumento del título de IgG aCL se asoció con un aumento en el riesgo de tromboembolismo, incluso tras el ajuste de los factores de riesgo cardiovascular. Además, cada especificidad adicional de aFL (aCL+ vs. aCL+AL+ vs. aCL+AL+anti-β2-GP-I+) aumentó la probabilidad de tromboembolismo entre el 50-70%.

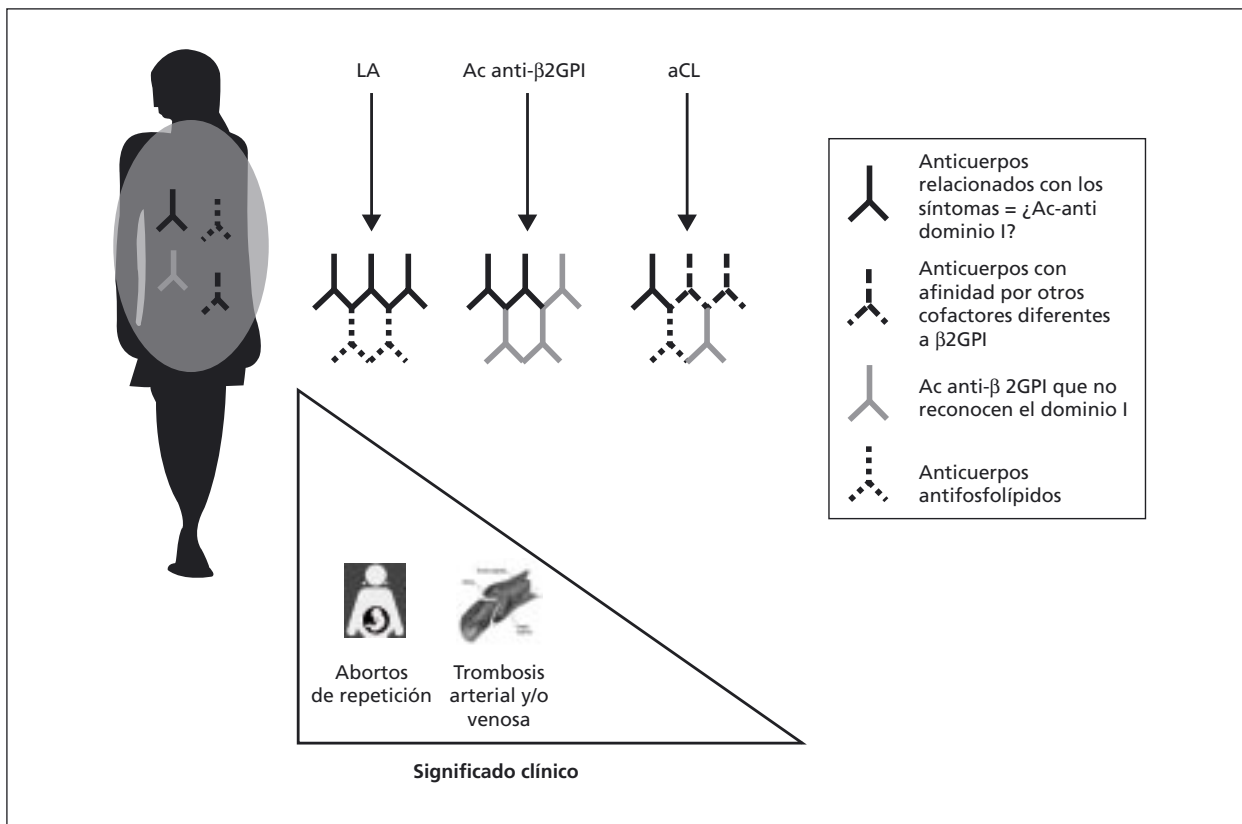


Figura 3. Significación clínica de las pruebas para detectar aFL. FUENTE: Oku. *Semin Thromb Hemost.* 2008; 34 (4): 335.

En el mismo sentido, el estudio retrospectivo realizado por Pengo *et al.*¹⁹ sobre 100 pacientes con aFL demostró que la triple positividad para AL, aCL y anti-β2-GP-I se asoció con el mayor riesgo de trombosis con una OR superior a 33. Cuando se analizaron de forma individualizada, sólo AL y anti-β2-GP-I se asociaron con trombosis (OR: 4,4 y 2,9). El estudio prospectivo de Forastiero *et al.*²⁰, con 194 pacientes, demostró que la triple positividad para AL, IgG anti β2-GP-I e IgG aPT presentó la mayor incidencia anual de trombosis (8,4%) (OR: 2,6). La positividad combinada de AL e IgG anti-β2-GP-I fue marginalmente significativa (OR 1,62; IC 95%: 1,00-2,39; p = 0,008); este estudio no demostró ninguna asociación significativa para los anticuerpos de isotipo IgM.

La evidencia señala que los pacientes que registran más de un test positivo tienen mayor riesgo y, por ello, es necesario realizar un panel de aFL. Queda por resolver el significado de los pacientes con una sola prueba positiva.

Conclusiones

- Los criterios de valoración de anticoagulante lúpico se remontan al año 1995 y están pendientes de ac-

tualizarse. Los criterios clínicos y de laboratorio del síndrome antifosfolípido fueron revisados en el año 2006.

- En la práctica diaria el estudio de estos pacientes en muchas ocasiones no se adapta a las guías internacionales. El hecho de que las pruebas biológicas sean solicitadas de forma independiente a laboratorios de hematología e inmunología condiciona que el estudio sea heterogéneo.

- La diversidad de antígenos y anticuerpos involucrados en el síndrome antifosfolípido es la causa de que existan múltiples dificultades aún por resolver en la estandarización de las pruebas biológicas, procesamiento de las muestras, tipo y combinación de pruebas a realizar, aplicación de estándares de referencia y expresión de resultados.

- En el momento presente, se hace necesario unificar criterios, controlar las solicitudes incompletas, seguir las guías internacionales y realizar tanto inmunoensayos (aCL, anti-β2-GP-I) como pruebas de coagulación (TTPa, TVVRd), establecer valores de corte del laboratorio y poner en común la expresión de los resultados. Queda pendiente investigar nuevas pruebas que diferencien subpoblaciones específicas de aFL y establecer estudios cooperativos para diagnosticar SAF.

Bibliografía

- Hughes GR. The anticardiolipin syndrome. *Clin Exp Rheumatol* 1985; 3: 285-286.
- Levine JS, Branch DW, Rauch J. The antiphospholipid syndrome. *N Engl J Med* 2002; 346: 752-763.
- De Groot PG, Derksen RHW, De Laat B. Twenty-two years of failure to set up undisputed assays to detect patients with the antiphospholipid syndrome. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* 2008; 34 (4): 347-355.
- Harris EN. Antiphospholipid antibodies. *Br J Haematol*. 1990; 74: 1-9.
- Wilson WA, Gharavi AE, Koike T, Lockshin MD, Branch DW, Piette JC et al. International consensus statement on preliminary classification criteria for definite antiphospholipid syndrome: report of an international workshop. *Arthritis Rheum* 1999; 42: 1309-1311.
- Lockshin MD, Samartano LR, Schwartzman S. Validation of the Sapporo criteria for antiphospholipid syndrome. *Arthritis Rheum* 2000; 43: 440-443.
- Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, Branch DW, Brey RL, Cervera R et al. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost* 2006; 4: 295-306.
- Galli M, Reber G, De Moerloose P, De Groot G Invitation to a debate on the serological criteria that define the antiphospholipid syndrome. *J Thromb Haemost* 2008; 6: 399-401.
- Vila P, Hernández MC, Lopez-Fernández MF, Battle J. Prevalence, follow-up and clinical significance of the anticardiolipin antibodies in normal subjects. *Thromb Haemost* 1994; 72: 20; 209-213.
- Reber G, Boehlen F, De Moerloose P. Technical aspects in laboratory testing for antiphospholipid antibodies: is standardization an impossible dream? *Sem Thromb Hemost* 2008; 34(4): 340-346.
- De Laat B, Derksen RHW, Urbanus RT, De Groot PG. IgG antibodies that recognize epitope Gly40-Arg43 in domain I of β 2-Glycoprotein causes LAC and their presence correlate strongly with thrombosis. *Blood* 2005; 105: 1540-1545.
- Atsumi T, Ieko M, Bertolaccini ML, Ichikawa K, Tsutsumi A, Matsuura A et al. Association of autoantibodies against the phosphatidylserine-prothrombin complex with manifestations of the antiphospholipid syndrome and with the presence of lupus anticoagulant. *Arthritis Rheum* 2000; 43: 1982-1993.
- Conley CL, Hartmann RC. A hemorrhagic disorder caused by circulating anticoagulant in patients with disseminated lupus erythematosus. *J Clin Invest* 1952; 31: 621-622.
- Brandt JT, Triplett DA, Alving B, Scharrer I. Criteria for the diagnosis of lupus anticoagulants: an update. *Thromb Haemost* 1995; 74: 1185-1190.
- Devreese KMJ. Interpretation of normal plasma mixing studies in the laboratory diagnosis of lupus anticoagulant. *Thromb Res* 2007; 119: 369-376.
- Liestol S, Wisloff F. Effect of subcutaneous administration of dalteparin on lupus anticoagulant assays. *Thromb Res* 2005; 115: 509-517.
- Moffat KA, Ledford-Kraemer MR, Plumhoff E, McKay H, Nichols WL, Meijer P et al. Are laboratories following published recommendations for lupus anticoagulant testing? An international evaluation of practices. *Thromb Haemost* 2009; 101: 178-184.
- Neville C, Rauch J, Kassis J, Chang ER, Joseph L, Le Comte M et al. Thromboembolic risk in patients with high titre anticardiolipin and multiple antiphospholipid antibodies. *Thromb Haemost* 2003; 90: 108-115.
- Pengo V, Biasiolo A, Pegoraro C, Cucchini U, Noventa F. Antibody profiles for the diagnosis of antiphospholipid syndrome. *Thromb Haemost* 2005; 93: 1147-1152.
- Forastiero R, Martinuzzo M, Pombo G, Puente D, Rossi A, Celebrin L et al. A prospective study of antibodies to B2-GPI and prothrombin and risk of thrombosis. *J Thromb Haemost* 2005; 3: 1231-1238.

MÉTODOS DIAGNÓSTICOS EN LA ENFERMEDAD DE VON WILLEBRAND

J. BATLLE, A. PÉREZ-RODRÍGUEZ, E. LOURÉS FRAGA, Á. RODRÍGUEZ TRILLO, M.F. LÓPEZ-FERNÁNDEZ

Servicio de Hematología y Hemoterapia e INIBIC. Complejo Hospitalario Universitario. A Coruña. Departamento de Medicina. Universidad de Santiago de Compostela (A Coruña)

Introducción

La enfermedad de von Willebrand (EVW) es un trastorno hemorrágico de herencia autosómica, debido a una alteración cualitativa o cuantitativa de la proteína del factor de von Willebrand (FVW). A pesar de ser el trastorno hemorrágico hereditario más frecuente, su identificación y diagnóstico es difícil debido a la variabilidad en su expresión clínica así como por las limitaciones de los métodos de laboratorio disponibles¹⁻⁴. Por ello, con frecuencia no es fácil la clasificación de un paciente determinado en una de las categorías concretas aceptadas.

Se han descrito tipos y subtipos diferentes basados en las características fenotípicas de la proteína y del genotipo del FVW. En la Tabla 1 se especifica la nomenclatura recomendada internacionalmente de cada una de las propiedades del FVW⁵. La clasificación actualizada recientemente por el Subcomité del FVW de la Sociedad Internacional de Trombosis y Hemostasia (ISTH-SCC VWF) es la más admitida⁶. En ella se considera que la EVW no se limita a mutaciones exclusivamente localizadas en el locus genético del FVW, y establece tres niveles jerárquicos: en el primero distingue los trastornos cuantitativos parciales (tipo 1) o totales (tipo 3), de las formas moleculares

Tabla 1. FVW y sus propiedades. Nomenclatura recomendada

Atributo	Nomenclatura
Proteína madura	FVW
Antígeno	FVW: Ag
Actividad como cofactor de la ristocetina	FVW:RCo
Capacidad de unión al colágeno	FVW:CB
Capacidad de unión al FVIII	FVW:FVIII B
Propéptido	FVWpp

Tabla 2. Clasificación revisada y actualizada de la EVW

Tipo	Descripción
1	Deficiencia cuantitativa parcial del FVW
3	Deficiencia completa del FVW
2	Deficiencia cualitativa del FVW
2A	Disminución de la adhesión plaquetaria dependiente del FVW con deficiencia selectiva de los MAPM
2B	Aumento de la afinidad del FVW por la glicoproteína Ib.
2M	Disminución de la adhesión plaquetaria dependiente del FVW sin deficiencia selectiva de los MAPM
2N	Marcada disminución de la afinidad del FVW por el FVIII.

MAPM: multímeros de alto peso molecular del FVW. FUENTE: Sadler. *J Thromb Haemost* 2006.

res anormales (tipo 2). En el segundo nivel se diferencian cuatro tipos diferentes: A, B, M y N. En el tercer nivel se tienen en cuenta aspectos fenotípicos particulares que no se reflejan en los niveles anteriores, como es el subtipo Vicenza, u otras formas con ca-

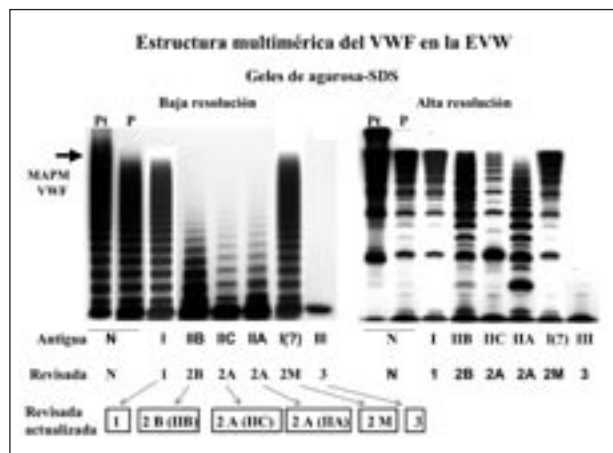


Figura 1. Análisis multimérico del FVW en la EVW mediante electroforesis en gels de agarosa SDS. Lisado plaquetario (Pt) y plasmas de sujeto normal (N) y plasmas de pacientes con EVW tipos 1, 2A (IIA), 2A (IIC), 2B (IIB), 2M y 3. Puede verse la equivalencia entre las nomenclaturas previas, antigua y la revisada, así como la revisada actualizada empleada en la actualidad. Empleando gels de baja resolución el plasma normal (N) presenta una serie lineal de multímeros del FVW de distinto tamaño molecular. En el lisado plaquetario (Pt) normal existen multímeros supranormales (flecha gruesa) en comparación con el plasma correspondiente. En el tipo 1 se aprecia una disminución global de todos los multímeros, El tipo 2A se caracteriza por una ausencia de los multímeros de alto peso molecular (MAPM), lo que también ocurre en algunas formas 2B [2B(IIB)]. El tipo 3 muestra una carencia prácticamente total del FVW. En gels de alta resolución, cada multímero presenta un complejo patrón de bandas satélites, cuya proporción relativa varía de acuerdo con el tipo de EVW. Por ejemplo, en el tipo 2A (IIA) la proporción relativa de las bandas satélites se encuentra muy aumentada comparativamente con la del sujeto normal; por el contrario, en la forma 2A (IIC) se aprecia un patrón aberrante de bandas.

racterísticas peculiares tales como los antiguos subtipos IIA, IIB, IIC, y muchos otros. En la Tabla 2 se indican las características de los tipos y subtipos dentro de los dos primeros niveles jerárquicos. En la Figura 1 se presenta una comparación entre la clasificación actual (revisada y actualizada) y las previas (antigua y la revisada).

El interés de un correcto diagnóstico y clasificación de la EVW no es puramente académico o científico, sino que conlleva importantes implicaciones terapéuticas y sociolaborales que son clave para efectuar un adecuado consejo genético.

Diagnóstico de la EVW

Requiere tanto de la evaluación clínica como de laboratorio. La primera es crítica ya que constituye el primer paso en la identificación de aquellas personas que puedan beneficiarse o no de una evaluación analítica posterior. La evaluación clínica incluye una historia personal y familiar de diátesis hemorrágica detallada^{1,2}. El estudio de laboratorio es crítico también, pero en numerosas ocasiones se realiza pobremente o no se interpreta de manera adecuada³.

Diversos estudios han puesto en evidencia inconsistencias en el diagnóstico de la EVW entre laboratorios considerados como “expertos”, como es el caso de la caracterización inicial como tipo 1 de pacientes que, tras un nuevo análisis, deben encuadrarse en el tipo 2^{3,7-10}.

Evaluación clínica

Debe enfocarse a la historia personal de tendencia hemorrágica patológica, sopesando su intensidad o gravedad y duración del episodio, así como de las actuaciones médicas acontecidas con anterioridad para controlar las hemorragias. Cualquier dato relevante de diátesis hemorrágica en la historia familiar debe ser también considerado. Además, deben tenerse en cuenta medicaciones recientes recibidas por el paciente. Es muy aconsejable realizar una anamnesis sistemática, empleando un cuestionario que incluya la sintomatología hemorrágica más frecuente en la EVW, con el fin de obtener la información más objetiva posible. En esta dirección se han propuesto diferentes sistemas estandarizados de puntuación de síntomas en base a un baremo hemorrágico, uno de los cuales queda reflejado en la Tabla 3^{11,12}.

Esta estrategia ha sido evaluada dentro del Proyecto de la Unión Europea MCMMDM-1VWD en pacientes con EVW tipo 1; no obstante, puede ser de utilidad en otros tipos y subtipos¹¹. Se han propuesto otros baremos con algunos enfoques especiales, tal

Tabla 3. Baremo y puntuación hemorrágica en EVW

Puntuación hemorrágica						
Síntoma	-1	0	1	2	3	4
Epistaxis	–	No o trivial (menos de 5)	> 5 o más de 10 min	Solamente consulta	Presión local o cauterización o antifibrinolítico	Transfusión sanguínea o terapia sustitutiva o desmopresina
Cutáneo	–	No o trivial (< 1 cm)	> 1 cm y no trauma	Solamente consulta	–	–
Sangrado de heridas menores	–	No o trivial (menos de 5)	> 5 o más de 5 min	Solamente consulta	Hemostasia quirúrgica	Transf. sang. o terapia sustitut., desmopresina
Cavidad oral	–	No	Referido al menos 1	Solamente consulta	Hemostasis quirúrgica o antifibrinolítica	Transf. sang. o terapia sustitut., desmopresina
Sangrado gastrointestinal	–	No	Asociada con úlcera, hipertensión portal, hemorroides, angiodisplasia	Espontáneo	Hemostasis quirúrgica, transf. sang., terapia sustitut., desmopresina antifibrinolítico	–
Extracción de dientes	No sangrado en al menos dos extracciones	Ningún hecho o ningún sangrado en 1 extrac.	Referido en < 25% de todos los procesos	Referido en > 25% de todos los procesos, no intervención	Resutura o presión local	Transfusión sanguínea o terapia sustitutiva o desmopresina
Cirugía	No sangrado en al menos dos cirugías	Ningún hecho o sangrado en una cirugía	Referido en < 25% de todas las cirugías	Referido en > 25% de todos los procesos, no intervención	Hemostasia quirúrgica o antifibrinolítico	Transfusión sanguínea o terapia sustitutiva o desmopresina
Menorragia	–	No	Solamente consulta	Antifibrinolítico, uso de píldora	Legrado, terapia férrica	Transf. sang. o terapia sustitut., desmopresina o histerectomía
Hemorragia posparto	No sangrado en al menos dos partos	No partos o no sangrado en un parto	Solamente consulta	Legrado, terapia férrica o antifibrinolíticos	Transfusión sanguínea o terapia sustitutiva o desmopresina	Histerectomía
Hematomas musculares	–	Nunca	No terapia postrauma	Espontáneo, no terapia	Espontáneo o traumático, requiere desmopresina o terapia sustitutiva	Espontáneo o traumático, requiere intervención quirúrgica o transfusión sang.
Hemartrosis	–	Nunca	No terapia postrauma	Espontáneo, no terapia	Espontáneo o traumático, requiere desmopresina o terapia sustitutiva	Espontáneo o traumático, requiere intervención quirúrgica o transfusión sang.
Sangrado SNC	–	Nunca	–	–	Subdural, ninguna intervención	Intracerebral, ninguna intervención

FUENTE: Tosseto. *J Thromb Haemost* 2007.

como es la puntuación en pacientes pediátricos. En la actualidad se trabaja con la intención de unificar estos diferentes baremos hemorrágicos. Es justo reconocer la dificultad de esta evaluación desde el momento en que algunos sujetos normales pueden referir también cierta sintomatología hemorrágica. Finalmente debe realizarse un examen físico dirigido tanto a confirmar la evidencia de diátesis hemorrágica como para descartar la existencia de problemas hemorrágicos adquiridos, como enfermedad hepática, entre otros.

Evaluación de laboratorio

Sería ideal disponer de un único método de laboratorio capaz de detectar la presencia de la EVW. Ello requeriría una prueba sensible a la mayoría de los tipos existentes, y que además tuviera un bajo nivel de falsos positivos. Desafortunadamente no existe una prueba de tales características, lo que obliga al empleo de un panel de determinaciones que puedan identificar todas las formas diferentes de EVW. Hay

que resaltar que tampoco existe un único panel empleado uniformemente a nivel internacional¹⁻³. Precisamente este hecho propició un estudio multicéntrico internacional del ISTH-SCC VWF cuyo objetivo era averiguar cuál es el panel de pruebas diagnósticas más recomendable (<http://www.vwfassays-in-vwd.com/>). En él se remitieron de forma ciega a los centros participantes muestras de plasmas liofilizados de pacientes con diferentes tipos de EVW perfectamente caracterizados. Los resultados preliminares demostraron que algunos de los subtipos incluidos no fueron identificados correctamente por un número significativo de laboratorios participantes. Aunque no se conocen los resultados finales de este proyecto, el estudio demuestra la enorme dificultad a la hora de averiguar no sólo el tipo de pruebas a emplear sino también su adecuada estandarización.

Además, otros estudios ponen en evidencia la necesidad de incorporar nuevos métodos de estudio del FVW para mejorar el diagnóstico y el conocimiento de cada uno de los tipos y subtipos de la EVW^{2,3}.

En la Tabla 4 se señalan las pruebas de diagnóstico de laboratorio disponibles cuya combinación y tipo de metodología a emplear vienen condicionados en bastantes casos por las preferencias locales, lo que explica la gran variabilidad del panel empleado por cada laboratorio individual¹⁻³. En general, cuanto más extenso es el panel de pruebas empleado, y más cuidadosa la investigación en cada caso, mayor es la proporción de identificación correcta de la EVW y su subtipo. Las diferentes pruebas deben irse empleando en etapas secuenciales en base a los resultados obtenidos. En la práctica, en bastantes ocasiones, y sobre todo cuando existe una fuerte sospecha de EVW, se realizan simultáneamente.

Pruebas de evaluación inicial

Recuento globular en sangre

Este recuento, que incluirá cifras de plaquetas y frotis de sangre periférica, se precisa para descartar otras causas de diátesis hemorrágica. No debe olvidarse que una trombopenia/pseudotrombopenia puede observarse en el tipo 2B de EVW.

Tiempo de hemorragia de Ivy (TH)

Tradicionalmente fue una prueba elemental en el diagnóstico de la EVW, siendo la única realizada in vivo. Sin embargo, en la actualidad se utiliza con mucha menor frecuencia por su problema de estandarización en la labor de rutina, además de su escaso valor predictivo con respecto al evento hemorrágico. Por otra

Tabla 4. Métodos diagnósticos de la EVW y sus niveles

1. Marcadores clínicos

Baremo y puntuación hemorrágica
Historia familiar de hemorragia o de EW

2. Marcadores de laboratorio

PRIMER NIVEL

FVW:RCo
FVW:Ag
FVIII
FVW:CB (¿?)
Cocientes FVW:RCo/FVW:Ag y FVIII/FVW:Ag
Aglutinación plaquetaria inducida por ristocetina

SEGUNDO NIVEL

Análisis multimérico del FVW (baja y alta resolución)
Prueba respuesta a la desmopresina (DDAVP)
FVW: FVIIIb
Propéptido del FVW (FVWpp)
→ FVWpp/FVW:Ag

3. Marcadores moleculares para confirmación diagnóstica

Investigación de mutaciones

parte, no es específico de la EVW. Además, en algunos pacientes la incisión evoluciona hacia un queloide, o cicatriz persistente².

Análisis de función plaquetaria global en sangre total (PFA100®)

Su objetivo ha sido el de sustituir al TH, y en la práctica se utiliza ampliamente^{1,3}. A diferencia de este último, no detecta anomalías de la pared vascular. Emplea dos tipos de cartuchos: colágeno/ADP y colágeno/epinefrina. El tiempo de obturación (TO) es el parámetro que se mide en esta prueba, y diversos estudios han demostrado una buena correlación entre el TO y el nivel de FVW en el tipo 1 de EVW, siendo útil en la monitorización de la respuesta al acetato de desmopresina (DDAVP: 1-deamino-8-D-arginina vasopresina) en este tipo de EVW. Se encuentra muy prolongado en las formas 2A, 2B y 2M, siendo normal en el tipo 2N. No es útil en la monitorización del tratamiento sustitutivo de la EVW empleando concentrados de FVIII/FVW, muy probablemente por las condiciones reológicas particularmente intensas que emplea, que por otra parte no se pueden modificar. Por este hecho, se considera que es más sensible al FVW del compartimento plaquetario que al del propio plasma.

Existen nuevos instrumentos de este tipo, como el Multiplate®, muy prometedores, pero pendientes de estudios amplios que avalen su uso generalizado.

Tiempo de tromboplastina activado (TTPA)

Su valor radica en la detección de la deficiencia de FVIII:C.

Pruebas diagnósticas iniciales

Factor VIII procoagulante (FVIII:C)

Mide la actividad procoagulante del factor VIII. En el contexto de la EVW tiene interés para valorar la deficiencia secundaria de esta proteína, bien debida a la disminución del FVW, su proteína transportadora y protectora, o por anomalía molecular de esta última que le impide unirse adecuadamente a la primera, como sucede en el tipo 2N. Por ello, realmente desde un punto de vista teórico debería realizarse si el TTPA se encuentra prolongado.

Antígeno del FVW (FVW:Ag)

Mide la concentración de la proteína del FVW independientemente de su actividad funcional. Existen diversos métodos disponibles, siendo los más frecuentes en la actualidad los ELISA y los basados en turbidimetría automatizados, empleando partículas de látex (LIA). La técnica de Laurell, empleada hace unos años, se encuentra en desuso en la actualidad. El empleo de un plasma estándar calibrado frente al estándar internacional de la OMS es crucial en esta técnica.

Actividad del FVW como cofactor de la ristocetina (FVW:RCO)

Representa la actividad funcional del FVW midiendo su capacidad de interacción con el receptor Ib de plaquetas normales inducida por el antibiótico ristocetina. En realidad in vivo el papel de la ristocetina lo ejerce el estrés circulatorio en la microcirculación, que es el que causa los cambios conformacionales del FVW que conducen a su interacción con la plaqueta. Se dispone de diversos métodos de medición de este parámetro^{2,3}:

1. Tiempo de aglutinación visible, o bien pendiente de la curva de agregación de plaquetas normales (frescas o formalinizadas) lavadas y diluciones del plasma en presencia de ristocetina. Posee una menor sensibilidad detectando niveles entre 6-12 UI/dL. La variabilidad intra e interlaboratorios es muy notable y no representa la función fisiológica real. El coeficiente de variación es alto, alcanzando un 30%, e incluso mayor, ante niveles inferiores a 12-15 UI/dL.

2. Ensayos ELISA, que valoran la capacidad de unión del FVW plasmático a la glicoproteína Ib (GPIb) plaquetaria, también en presencia de ristocetina. Se han descrito varias modificaciones en las que se emplean fragmentos de GPIb, que incrementan su sensibilidad (detectando niveles < 1 UI/dL); sin embargo, no se encuentran disponibles comercialmente, limitándose su uso al campo de la investigación.

3. Cuantificación de unión de un anticuerpo específico de epítipo conformacional del FVW (en su dominio A1), ya sea por técnica de ELISA o de turbidimetría empleando partículas de látex. Se han empleado diversos anticuerpos monoclonales diferentes. Estos procedimientos no dependen de la presencia de ristocetina. La propiedad valorada mediante estas técnicas se ha denominado también FVW:Actividad (FVW:ACT), y, a pesar de su mayor sensibilidad y comodidad, por el momento no debe reemplazar al FVW:RCO obtenido por técnicas convencionales, aunque pueden ser útiles como método de cribado, debiendo confirmarse un descenso obtenido mediante una técnica convencional.

A pesar de las diversas limitaciones del método del FVW:RCO, éste sigue siendo el método más universalmente aceptado a la hora de valorar la actividad del FVW. Su resultado se expresa en UI/dL. Es muy importante que se emplee el mismo estándar plasmático internacional en la medición tanto del FVW:RCO como del FVW:Ag, además de que cada laboratorio local establezca su propio rango de normalidad.

Determinación del grupo sanguíneo ABO

Los pacientes del grupo sanguíneo O presentan una concentración plasmática de FVW incluso un 25% menor que los de los otros grupos ABO. Si bien se ha recomendado establecer rangos de normalidad del FVW:RCO y del FVW:Ag tanto para el grupo O como para el no O, la experiencia parece señalar que, independientemente de la relación entre el grupo sanguíneo ABO y el rango del FVW, el mayor determinante de síntomas hemorrágicos lo constituye un FVW bajo en el plasma. De ahí que el empleo de rango poblacional normal puede ser más útil clínicamente².

Capacidad de unión del FVW al colágeno (FVW:CB)

Para su determinación, se utiliza la técnica de ELISA. Aunque se esperaba que este método, por su mayor reproducibilidad y sensibilidad, sustituyera a la técnica del FVW:RCO, diversos estudios han demostrado que no son equiparables y no debe sustituir a esta última propiedad, desde el momento en que es sensible a

la presencia de multímeros de gran tamaño, aun cuando no sean funcionales, como sucede en la EVW de tipo 2M. Por ello se recomienda que, de emplearse, se haga como prueba complementaria a la del FVW:RCo. El mayor problema del FVW:CB es la falta de estandarización del tipo de colágeno a emplear (de tipo 1 o 3, mezcla, o incluso otros tipos). Su valor especial iría dirigido a los trastornos selectivos del dominio del FVW para su unión al colágeno, en los que el FVW:RCo y la estructura multimérica pueden ser normales. Sin embargo, se han identificado muy pocos pacientes con este tipo de problema, e incluso algunos se detectaron por casualidad (incluso sin historia hemorrágica). Por todo ello, su lugar en el diagnóstico de la EVW no está claro todavía^{2,3}.

Cocientes FVW:RCo/FVW:Ag; FVW:CB/FVW:Ag; FVIII:C/FVW:Ag

Si los resultados aislados de cada uno de estos parámetros son importantes, los valores de estos cocientes pueden ser de ayuda a la hora de orientar una forma variante^{1,3,8}. Por ejemplo, ante un FVW:RCo/FVW:Ag < 0,5-0,7 orienta a la existencia de una forma variante 2A, 2B o 2M; y ante un FVIII:C/FVW:Ag descendido puede orientar a una forma 2N, precisando la comprobación con otras pruebas adicionales, incluso el estudio genético. Sin embargo, los puntos de corte de estos cocientes todavía están siendo motivo de estudio.

Pruebas diagnósticas de confirmación

Agglutinación plaquetaria de plasma rico en plaquetas en presencia de ristocetina (RIPA)

Analiza la interacción FVW plasmático y las propias plaquetas del paciente en presencia de concentraciones diferentes de ristocetina. Es poco sensible pero de gran utilidad a la hora de detectar la EVW de tipo 2B cuando se evidencia aglutinación con ristocetina en concentraciones bajas (0,3-0,5 mg/mL), la cual es negativa en condiciones normales.

Una modificación de esta técnica, útil en casos con RIPA presente en concentraciones bajas de ristocetina, consiste en el empleo de plaquetas lavadas ya sean normales o del paciente y plasma pobre en plaquetas (PPP) del paciente o normal, y también concentraciones bajas de ristocetina. En base a la mezcla que muestre aglutinación permitirá diferenciar el problema de una EVW 2B (plaquetas normales y PPP del paciente) o, por el contrario, a un defecto plaquetario de tipo pseudoenfermedad de von Willebrand, también llamada EVW de tipo plaquetario (en el caso de plaquetas del paciente y PPP normal).

Análisis multimérico del FVW

Consiste en el análisis electroforético cualitativo del FVW en geles con el detergente dodecilsulfato sódico (SDS), que permiten la separación de esta proteína en forma de una serie lineal de multímeros en base a su diferente tamaño molecular cuando se emplean geles de tamaño de poro grande (baja resolución) (Figura 1)¹⁻⁴. Los multímeros de mayor tamaño son los más eficientes desde un punto de vista hemostático, y se encuentran ausentes en las formas 2A y en algunas 2B. Empleando geles de tamaño de poro menor (alta resolución) se visualizan diferentes bandas integrantes de cada multímero (tripletes o quintupletes, dependiendo del tamaño del poro), las cuales varían ostensiblemente en función del tipo o subtipo de EVW. Esta metodología es sumamente laboriosa, y requiere mucho tiempo en su elaboración. Además, parece evidente que exige notable destreza y experiencia, limitándose su uso a centros con gran actividad de estudio de la EVW o dedicados a la investigación en este tema. Es por esta razón por lo que resulta muy difícil incorporarla rutinariamente de una forma generalizada, entre otros motivos por la política de reducción de costes. Existen al menos dos tipos de opinión en relación con su empleo:

- a) No es necesaria, ya que pueden descartarse las formas variantes mediante el uso de cocientes FVW:RCo/FVW:Ag y FVW:CB/FVW:Ag antes comentadas³; o
- b) Parece claro que este método descubre alteraciones relevantes, y de ahí su utilidad, siendo aconsejable referir muestras a un laboratorio experimentado en esta metodología^{1,2}.

Capacidad de unión del FVW al FVIII (FVW:FVIII:B)

Mide la normalidad del FVW en su dominio a través del cual se une al FVIII normal. Su objetivo es confirmar el tipo 2N de EVW, que es recesiva. Se realiza mediante método ELISA inmovilizando el FVW de la muestra problema o normal y ofreciendo una fuente de FVIII exógeno normal purificado. El FVIII unido se detecta mediante un anticuerpo específico del FVIII conjugado con una enzima. Esta estrategia ha ido desbancando a otra realizada previamente en la que se detectaba el FVIII por método cromogénico en vez de por ELISA. Algunos laboratorios emplean esta misma técnica pero utilizando un anticuerpo marcado isotópicamente. Empleando diluciones seriadas de la muestra de control y de la muestra problema se obtienen curvas integrando la relación FVW inmovilizado y FVIII unido, cuya pendiente indica el grado de normalidad de esta propiedad. No todos los tipos 2N presentan el mismo grado de defecto, y los pacientes 2N heterocigóticos

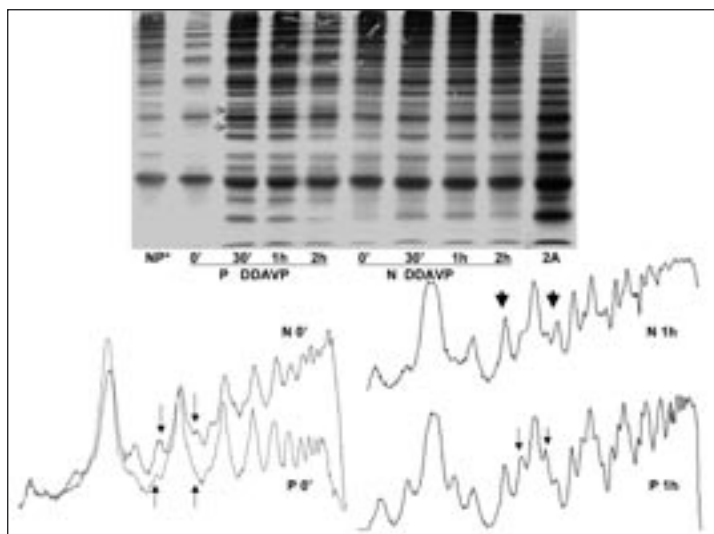


Figura 2. Respuesta al DDAVP en paciente con EVW 2A (IIE) por la mutación C1149R y en un sujeto normal. Panel superior: Patrón multimérico del FVW en gel de alta resolución (agarosa 2%-SDS) en plasmas de un individuo normal (N) y de un paciente (P) antes (0') y a los 30 minutos, una, dos y cuatro horas (30', 1h, 2h) después de la administración de DDAVP). Panel inferior: Análisis densitométrico de los perfiles electroforéticos del panel superior. Antes del DDAVP se observa en el paciente (a la izquierda) una clara disminución de la proporción relativa de las bandas satélite de cada multimero en comparación con el sujeto normal. Tras el DDAVP se aprecia un claro incremento de la proporción relativa de las bandas satélite internas (indicado por flechas finas) en claro contraste con el incremento de las bandas satélite externas observado en el sujeto normal. Este hecho parece indicar una proteólisis anormal del FVW mutante. FUENTE: Reproducido con autorización de *Haematologica* 2009⁽¹⁴⁾.

son más difícilmente detectados, y ello ocurre más frecuentemente al realizar un estudio familiar. En nuestra experiencia todos los pacientes con deficiencia de FVIII < 1-4 UI/dL son hemofílicos (comprobados al demostrar su mutación en el gen del FVIII). Por el contrario, en todos los pacientes que hemos estudiado en los que se ha detectado un FVW:FVIII B alterado el estudio molecular ha confirmado la existencia de una mutación en el gen del FVW.

Es preferible realizar este ensayo en laboratorios con experiencia, no ya por la dificultad técnica sino porque su interpretación no es siempre fácil³.

Respuesta basal al acetato de desmopresina (DDAVP)

El interés principal de su administración es el terapéutico, al inducir una liberación del FVW tisular al plasma elevando su nivel 3-5 veces el valor basal dentro de los 30-60 minutos después de su administración, y en general su efecto se mantiene por lo menos de 6-8 horas. Se emplea en dosis de 0,3 µg/kg diluida en 50 mL de suero salino a infundir por vía intravenosa en unos 30 minutos. Dado que la respuesta a este agente es bastante estable en cada individuo, se recomienda realizar una prueba basal (sin hemorragia activa) en el paciente con el objeto de valorar la intensidad y patrón de su respuesta individual y, de ahí, su posible utilidad futura ante eventos hemorrágicos².

Además, su estudio es de utilidad a la hora de caracterizar mejor el tipo de EVW, por lo que se debe incluir en la exploración diagnóstica de la enfermedad. Por ejemplo, puede indicar una vida media acortada del FVW liberado, o inducir un patrón multimérico anormal no observado en condiciones basales^{1-3,13,14} (Figura 2).

Detección de anticuerpos anti FVW

Su utilidad es de interés en los pacientes con EVW que han desarrollado aloanticuerpos anti-FVW después de recibir tratamiento sustitutivo mediante concentrados de FVW. Estos anticuerpos, además de neutralizar el efecto del FVW exógeno administrado, pueden desencadenar reacciones anafilactoides graves con este tratamiento. También puede permitir el detectar autoanticuerpos en el seno del síndrome de von Willebrand (también denominado EVW adquirida)^{2,3}. No existe un método bien estandarizado, ya que existe mucha interferencia con anticuerpos naturales dirigidos frente a determinantes de grupos sanguíneos y que reaccionan con los carbohidratos del FVW (ya que es una glicoproteína). Se intuye que la producción de un FVW recombinante sin la presencia de estos últimos puede permitir en el futuro elaborar una prueba fiable. En nuestra experiencia este tipo de anticuerpos se detectan en plasma por ELISA cuando se encuentran presentes en título muy alto. Por el momento, el método de neutralización del FVW:RCo del plasma normal mezclado con el plasma del paciente descubre también este tipo de complicación, si bien no es excesivamente sensible.

Estudio molecular del gen del FVW

Indicado en pacientes seleccionados, las primeras mutaciones descritas se localizaban en los dominios A1, A2 y A3 del FVW en pacientes con EVW de los tipos 2A y 2B. En la actualidad se conocen las mutaciones de todos los tipos y subtipos de EVW^{1-3,5,9}. En la Figura 3 se señala la localización de estas mutaciones de acuerdo con el tipo de EVW. Mientras que las mutaciones del tipo 2B se agrupan en la zona concre-

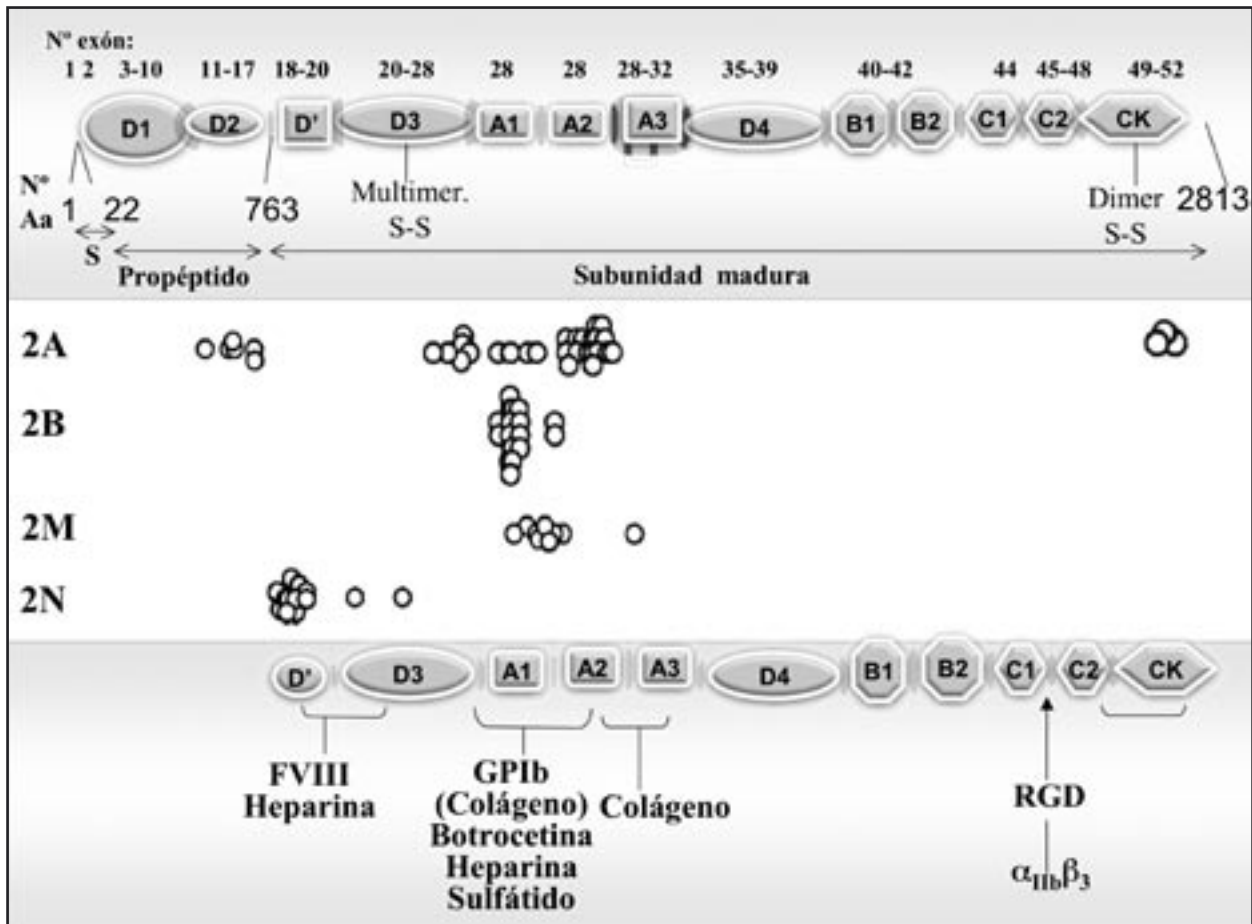


Figura 3. Estructura de la molécula precursora del FVW y localización de las mutaciones en la EVW. La molécula precursora consta de un péptido señal (S), propéptido y subunidad madura. Se indican los dominios estructurales A, B, C, CK y los sitios de unión al factor VIII, glicoproteína Ib, colágeno e integrina plaquetaria α IIb β 3. Se muestra la localización de las mutaciones en los tipos 2 de EVW. En los tipos 1 y 3 las mutaciones se localizan a lo largo de toda la molécula del FVW.

ta del dominio A1, las de los tipos 1 y 3 se encuentran dispersas a lo largo de toda la proteína. Los defectos genéticos de algunos tipos, especialmente los del tipo 1 leve (con niveles superiores a 30 U/dL), permanecen todavía ocultos^{2,3,9}.

Es muy posible que defectos en otros genes que podrían modular la regulación funcional del gen del FVW (genes moduladores) puedan ser responsables de descendos del FVW en sangre. Así, en algunas familias compatibles con EVW de tipo 1 se ha visto la ausencia de ligamiento entre el defecto del FVW y el estudio haplotípico realizado mediante marcadores genéticos de su gen¹⁵. Por ello, en la actualización de la clasificación revisada de la EVW el diagnóstico no se restringe a anomalías del locus genético del FVW. La prevalencia de estas mutaciones varía mucho con el país y el área geográfica. En el norte de Italia es relativamente frecuente la mutación Vicenza (R1205H)¹⁻³; por el contrario, en Galicia la mutación R1374C causante de EVW tipo 2A/2M es muy frecuente¹⁰. En relación con la forma 2N, en España, y según nuestro conoci-

miento, las dos únicas mutaciones detectadas son: 1) la R816W (en el exón 19), que en su estado homocigótico es la más severa; y 2) la R854Q, en el exón 20, cuyo defecto es moderado.

En el tipo 3 inicialmente se describieron deleciones grandes o pequeñas del gen, las cuales en estado de homocigosis se asocian a un alto riesgo de desarrollo de aloanticuerpos tras el tratamiento sustitutivo¹⁻³.

Otras pruebas diagnósticas

FVW en lisado plaquetario

Se basa en la cuantificación o cualificación del FVW existente en las plaquetas. Ha permitido comprobar la existencia de algunos tipos particulares de EVW como es el caso de la EVW plaquetaria baja (con normalidad en el plasma). A su vez permite la observación de defectos no visibles en el plasma complementando la información obtenida en este último^{2,14}. Es también una

técnica engorrosa, lo que explica que su uso no se haya generalizado.

Propéptido del FVW (FVWpp)

Es el fragmento de la molécula precursora que se escinde para generar la subunidad madura del FVW, hecho necesario para que se logre la debida multimerización del FVW. El FVWpp y la proteína del FVW permanecen unidas no covalentemente en los gránulos alfa de los megacariocitos y plaquetas y en los corpúsculos de Weibel-Palade de la célula endotelial hasta su liberación al plasma. Aquí se disocian y circulan independientemente con vidas medias diferentes (de 2 a 3 h el FVWpp, y de 8 a 12 h el FVW)^{1-4,14,16}.

El nivel plasmático de este fragmento es normalmente proporcional al del FVW: Ag, y la medición del cociente FVWpp/FVW:Ag puede orientar a la existencia de un aclaramiento anormal del FVW del paciente. Así, se ha observado la existencia de correlación entre este cociente y la vida media del FVW tanto en pacientes como en sujetos normales. Al comparar este coeficiente en sujetos normales del grupo O con respecto a los no O, se ha podido deducir una vida media del FVW algo más corta en los primeros, lo que puede a su vez explicar su menor nivel plasmático. En este sentido, puede predecir una respuesta reducida a la administración del DDAVP, o la existencia de aloanticuerpos anti-FVW, entre otros aspectos. Aunque todavía precisará estudios más extensos, es muy probable que en un futuro próximo se incorpore al panel diagnóstico de rutina de la EVW.

Establecimiento del diagnóstico de la EVW y su tipo

En la Figura 4 se resume el diagrama del proceso diagnóstico de la EVW en función de los resultados obtenidos en las pruebas de laboratorio anteriormente comentadas. El diagnóstico de los tipos 2A, 2B, 2M, 2N (en su forma homocigótica o doble heterocigótica) así como el tipo 3 no suelen presentar problema a la hora del diagnóstico; sin embargo, no es así en el tipo 1, tal y como se ha confirmado en estudios internacionales

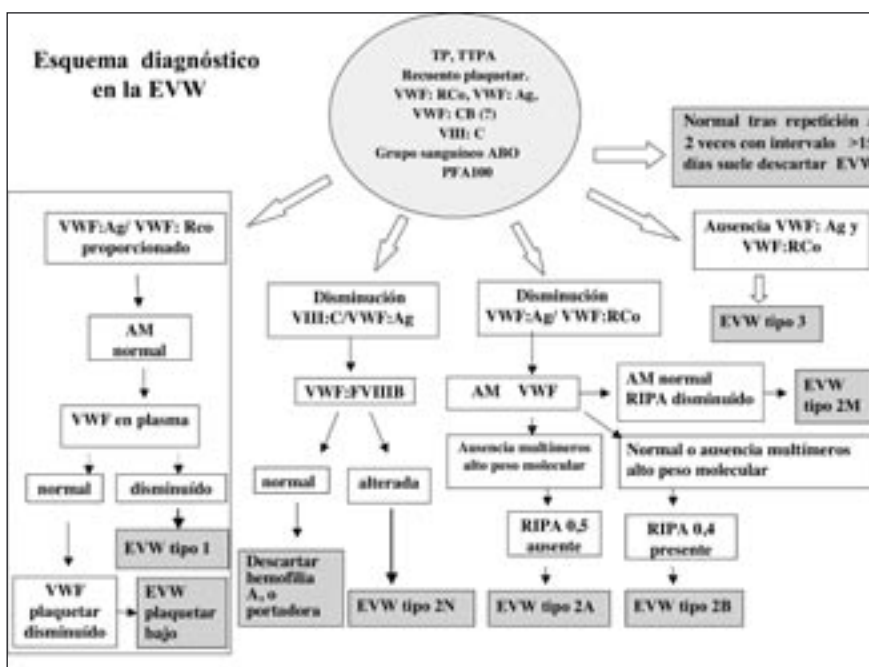


Figura 4. Esquema diagnóstico de laboratorio de la EVW en base a los resultados de las diferentes pruebas de laboratorio. AM: análisis multimérico; EFW: enfermedad de Von Willebrand; VWF: factor de Von Willebrand.

como el MCMDM-1VWD, el estudio Canadiense o el del Reino Unido¹⁷.

Consideraciones adicionales

1. Es imprescindible repetir las pruebas diagnósticas al menos en dos ocasiones para confirmar o descartar la EVW. El estudio familiar puede ser de utilidad en este sentido.
2. El empleo de un adecuado estándar internacional en el estudio de laboratorio es crítico. El estándar local debe ser calibrado frente a este estándar internacional, que es el recomendado por la OMS.
3. Debe tenerse en cuenta que la clasificación de la EVW es un proceso evolutivo y complejo en el que la incorporación de nuevas pruebas diagnósticas, o bien la obtención de mayor información sobre las actuales, obligará en un futuro a ir modificando el planteamiento actual^{4,5}. De hecho, la distinción entre los tipos 2A y 2M parece un tanto artificial y redundante, de ahí que nuestro equipo haya propuesto al ISTH-SCC VWF (Reunión de Viena 2008) fundir ambas en un único tipo, en un nivel jerárquico de segundo nivel^{10,18}.
4. Heterocigosis y fenotipos combinados: el fenotipo de los pacientes heterocigóticos puede depender de la interacción entre subunidades codificadas por ambos alelos. Cuando ello ocurre, la clasificación del paciente dado incluye la designación de ambos

(1/2N, por ejemplo). Una combinación de un alelo nulo y otro afectado por una forma recesiva de EVW (tal como el 2N) conduce a una forma grave a pesar de no ser homocigótica para este último defecto. Estos hechos tienen importancia, por ejemplo, a la hora del consejo genético^{4,5}.

5. Mutaciones puntuales pueden motivar fenotipos causados por diversos mecanismos (síntesis, liberación, proteolización y aclaramiento). Es, por ejemplo, el caso de la mutación C1149R (Figura 4)¹⁴.

6. **Controversia** entre EVW tipo 1 leve o factor de riesgo hemorrágico. El diagnóstico de la EVW tipo 1 puede ser difícil de establecer con confianza, ya que el criterio mayor diagnóstico es un descenso del FVW en plasma, pero el nivel de esta proteína varía ampliamente en un mismo sujeto. Asimismo, el riesgo hemorrágico varía también en función del nivel del FVW sin que haya un claro umbral que distinga ambas situaciones^{4,5,19}. Como consecuencia, muchos pacientes diagnosticados de EVW de tipo 1 no presentan clínica hemorrágica relevante, lo cual limita la utilidad de este diagnóstico.

Parece sumamente acertada la recomendación de Sadler de considerar los descensos leves de FVW como factor de riesgo hemorrágico más que como enfermedad propiamente dicha, siguiendo el ejemplo de la dinámica empleada con otros factores de riesgo como, por ejemplo, los trombofílicos¹⁹. Esta estrategia no impide en absoluto que a un paciente con descenso leve pueda diagnosticarse EVW de tipo 1 cuando por ejemplo tenga una historia familiar en este sentido confirmada. Por el contrario, tampoco impide el uso de agentes terapéuticos, como el DDAVP, en aquellos considerados simplemente como factor de riesgo hemorrágico. A la espera de obtener mayor información se recomienda que el nivel de 30 UI/dL se emplee como punto de corte en esta distinción².

7. Conscientes de la complejidad diagnóstica de esta enfermedad, y de la necesidad de lograr una mayor homogeneidad o armonización, se ha iniciado un Proyecto del Registro de la EVW en España²⁰ con un objetivo múltiple:

- a) Conocer la realidad diagnóstica y terapéutica de la EVW en España en la práctica clínica habitual actual.
- b) Elaboración de una plataforma de pacientes españoles con esta enfermedad lo mejor caracterizados posible.
- c) Creación de un grupo de trabajo en EVW que asuma este objetivo inicial, así como el desarrollo de proyectos propios posteriores, aprovechando la plataforma de pacientes con EVW y estableciendo colaboraciones con proyectos internacionales (European Union VWD Group, Proyecto Norteamericano Zimmerman, entre otros).
- d) Elaboración de guías de consenso en el diagnóstico y tratamiento de la EVW. Siguiendo modelos empleados previamente a nivel internacional la novedad de este proyecto radica en la inclusión de un diagnóstico estandarizado que permita una unificación de determinaciones y criterios.

Creemos que es una iniciativa de gran interés en la que deseamos participen el mayor número posible de centros de España.

Conclusiones

- El diagnóstico de la EVW requiere la adecuada valoración clínica del paciente, su historia familiar y el empleo secuencial de diversas pruebas de laboratorio.
- A nivel clínico se aconseja una anamnesis sistematizada, y su valoración cuantitativa empleando un baremo hemorrágico puede ser de gran ayuda.
- A lo largo de estos años hay que reconocer que este diagnóstico sigue globalmente distante de un nivel óptimo.
- La correcta estandarización de los métodos de laboratorio es crucial y debe incluir un estándar internacional reconocido.
- Diversas pruebas nuevas o que mejoran la sensibilidad y reproducibilidad de las actuales están siendo fruto de intensa valoración en el campo de la EVW. Este hecho mejorará la perspectiva diagnóstica, pero desde un punto de vista rutinario no se recomienda su uso generalizado hasta que se confirme su utilidad.
- Dada la complejidad o dificultad de algunas de las pruebas empleadas en el diagnóstico de la EVW, es aconsejable su realización en centros con experiencia en las mismas.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido realizado merced al Proyecto del Fondo de Investigación Sanitaria, FIS Carlos III, Ministerio de Sanidad, Spain (FIS PI# 07/0229) y de la Consellería de Innovación e Industria, Xunta de Galicia (INCITE08ENA916109ES). Expresamos también nuestra gratitud a Bayer Healthcare, Baxter Biosciences, Wyeth y Novo Nordisk por su patrocinio.

Bibliografía

1. Federici AB, Canciani MT. Clinical and laboratory versus molecular markers for a correct classification of von Willebrand disease. *Haematologica*. 2009; 94: 610-5.
2. Nichols WL, Hultin MB, James AH, Manco-Johnson MJ, Montgomery RR, Ortel TL, Rick ME, Sadler JE, Weinstein M, Yawn BP. von Willebrand disease (VWD): evidence-based diagnosis and management guidelines. The National Heart, Lung, and Blood Institute (NHLBI) Expert Panel Report (USA). *Haemophilia*. 2008; 14 (2): 171-232.
3. Favalaro EJ. Toward a new paradigm for the identification and functional characterization of von Willebrand disease. *Semin Thromb Hemost*. 2009; 35 (1): 60-75.
4. Batlle J, Pérez Rodríguez A, López Fernández MF. Classification of VWD. En: Federici A, Lee C, Berntorp E, Lil-

- licrap D, Montgomery B (eds.). Von Willebrand disease: basic and clinical aspects. Oxford: Blackwell Publishing; 2009 (en prensa).
5. Mazurier C, Rodeghiero F; von Willebrand Factor Subcommittee of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. Recommended abbreviations for von Willebrand factor and its activities. *Thromb Haemost.* 2001; 86 (2): 712.
 6. Sadler JE, Budde U, Eikenboom JC, Favaloro EJ, Hill FG, Holmberg L, et al.; Working Party on von Willebrand Disease Classification. Update on the pathophysiology and classification of von Willebrand disease: a report of the Subcommittee on von Willebrand factor. *J Thromb Haemost.* 2006; 4 (10): 2103-14.
 7. Budde U, Schneppenheim R, Eikenboom J, Goodeve A, Will K, Drewke E, et al. Detailed von Willebrand factor multimer analysis in patients with von Willebrand disease in the European study, molecular and clinical markers for the diagnosis and management of type 1 von Willebrand disease (MCMDM-1VWD). *J Thromb Haemost.* 2008; 6 (5): 762-71.
 8. Tosetto A, Rodeghiero F, Castaman G, Bernardi M, Bertocello K, Goodeve A, et al. Impact of plasma von Willebrand factor levels in the diagnosis of type 1 von Willebrand disease: results from a multicenter European study (MCMDM-1VWD). *J Thromb Haemost.* 2007; 5 (4): 715-21.
 9. Goodeve A, Eikenboom J, Castaman G, Rodeghiero F, Federici AB, Batlle J, et al. Phenotype and genotype of a cohort of families historically diagnosed with type 1 von Willebrand disease in the European study, Molecular and Clinical Markers for the Diagnosis and Management of Type 1 von Willebrand Disease (MCMDM-1VWD). *Blood.* 2007; 109 (1): 112-21.
 10. Penas N, Pérez-Rodríguez A, Torea JH, Lourés E, Noya MS, López-Fernández MF, Batlle J. Von Willebrand disease R1374C: type 2A or 2M? A challenge to the revised classification. High frequency in the northwest of Spain (Galicia). *Am J Hematol.* 2005; 80 (3): 188-96.
 11. Tosetto A, Rodeghiero F, Castaman G, Goodeve A, Federici AB, Batlle J, et al. A quantitative analysis of bleeding symptoms in type 1 von Willebrand disease: results from a multicenter European study (MCMDM-1 VWD). *J Thromb Haemost.* 2006; 4 (4): 766-73.
 12. Rodeghiero F, Castaman G, Tosetto A, Batlle J, Baudo F, Cappelletti A, et al. The discriminant power of bleeding history for the diagnosis of type 1 von Willebrand disease: an international, multicenter study. *J Thromb Haemost.* 2005; 3 (12): 2619-26.
 13. Castaman G, Lethagen S, Federici AB, Tosetto A, Goodeve A, Budde U, et al. Response to desmopressin is influenced by the genotype and phenotype in type 1 von Willebrand disease (VWD): results from the European Study MCMDM-1VWD. *Blood.* 2008; 111 (7): 3531-9.
 14. Pérez-Rodríguez A, García-Rivero A, Lourés E, López-Fernández MF, Rodríguez-Trillo A, Batlle J. Autosomal dominant C1149R von Willebrand disease: phenotypic findings and their implications. *Haematologica.* 2009; 94 (5): 679-86.
 15. Eikenboom J, Van Marion V, Putter H, Goodeve A, Rodeghiero F, Castaman G, et al. Linkage analysis in families diagnosed with type 1 von Willebrand disease in the European study, molecular and clinical markers for the diagnosis and management of type 1 VWD. *J Thromb Haemost.* 2006; 4 (4): 774-82.
 16. Haberichter SL, Castaman G, Budde U, Peake I, Goodeve A, Rodeghiero F, et al. Identification of type 1 von Willebrand disease patients with reduced von Willebrand factor survival by assay of the VWF propeptide in the European study: molecular and clinical markers for the diagnosis and management of type 1 VWD (MCMDM-1VWD). *Blood.* 2008; 111 (10): 4979-85.
 17. Peake I, Goodeve A. Type 1 von Willebrand disease. *J Thromb Haemost.* 2007; 5 Suppl 1: 7-11.
 18. Batlle J, Pérez-Rodríguez A, Franqueira MD, López-Fernández MF. Type 2M von Willebrand disease: a variant of type 2A? *J Thromb Haemost.* 2008; 6 (2): 388-90.
 19. Sadler JE. (2003). Von Willebrand disease type 1: a diagnosis in search of a disease. *Blood;* 101: 2089-93.
 20. Batlle J, Aznar JA. Proyecto de estudio epidemiológico de la enfermedad de von Willebrand en España. *Haematologica* (edición española) 2009; Suplemento (en prensa).

DÍA A DÍA EN EL LABORATORIO DE HEMOSTASIA: AUTOMATIZACIÓN Y MODELOS DE GESTIÓN INFORMATIZADA

R. MATA SERNA, P. LLAMAS SILLERO

*Servicio de Hematología y Hemoterapia.
Fundación Jiménez Díaz. Madrid*

Introducción

El origen de los primeros estudios de coagulación data de hace más de 200 años, cuando se comenzó a medir el tiempo que tardaba en coagular la sangre extraída de personas sanas o aquejadas de determinadas enfermedades. A finales del siglo XIX y principios del XX se publicaron numerosos métodos para medir el tiempo de coagulación, apareciendo posteriormente las primeras técnicas instrumentales. Es ya en la década de los ochenta cuando se produce un gran avance en este sentido, iniciándose la automatización de dichas técnicas debido al aumento en el número de pruebas. Fundamentalmente en Japón, comenzaron a desarrollarse sistemas de transporte de muestras, robots para carga y descarga de los analizadores y aplicaciones informáticas que controlaban todo el proceso. Con este concepto de automatización, se intentaba reducir la carga de trabajo y mejorar la precisión y calidad del mismo.

A mediados de los noventa, algunas compañías empezaron a ofrecer sistemas que incluían estas tecnologías para su instalación en grandes laboratorios, aunque inicialmente su coste era elevado y su funcionalidad limitada. Posteriormente, su implantación en laboratorios de referencia de Japón y Estados Unidos demostró una disminución significativa en los costes y en los tiempos de ejecución, junto con una mayor calidad y seguridad del proceso. Todo ello llevó a un aumento en el desarrollo de estas tecnologías hasta la actualidad, en la que la mayoría de las casas comerciales de este sector poseen opciones de automatización de sus equipos.

Este desarrollo tecnológico ha dado paso a la formación de grandes laboratorios debido al aumento

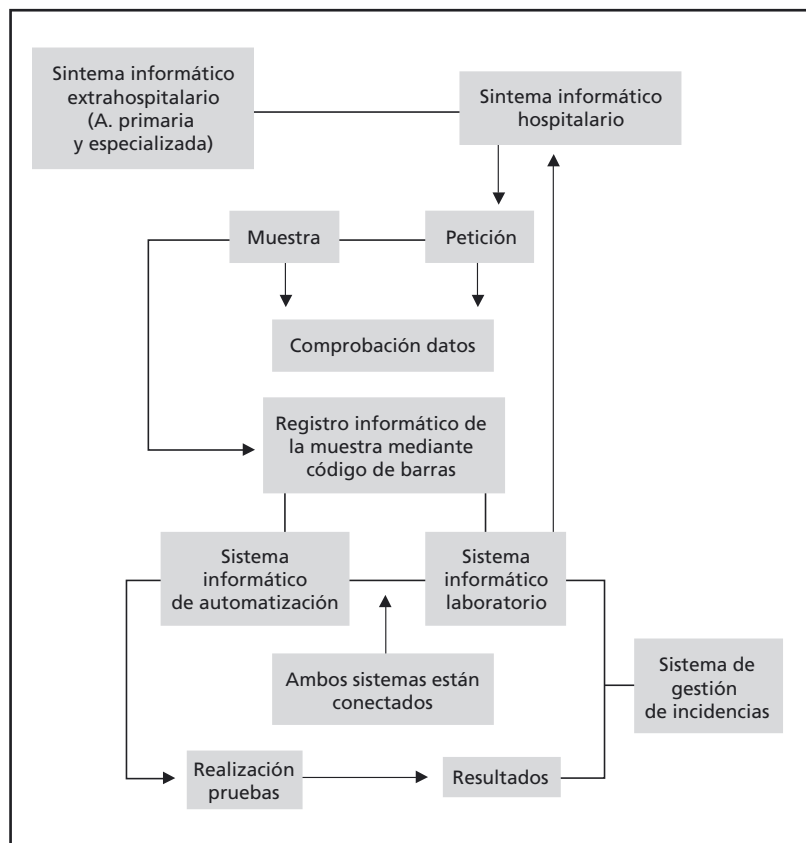


Figura 1. Modelo simplificado de gestión informatizada.

continuo de la demanda asistencial producida por el incremento en el número de pruebas a realizar, el envejecimiento de la población o el desarrollo de actividades de investigación. Además, la tendencia actual se dirige hacia la centralización de todas las pruebas analíticas incluyendo tanto los pacientes hospitalizados como los de atención primaria o especializada extrahospitalaria. Todo ello ha convertido a los laboratorios en centros generadores de un gasto importante cuyo control constituye uno de los objetivos prioritarios de los gestores sanitarios. Además, estos centros intentan seguir un modelo de gestión de la calidad total (TQM) que pretende garantizar con la gestión de procesos el cumplimiento de los requisitos de los clientes (clínicos y pacientes), de los requisitos legales y los propios que la organización establezca, teniendo como estrategia general la mejora continua.

Procesos del laboratorio de hemostasia

La infraestructura personal e instrumental de un laboratorio de hemostasia se debe adecuar al tipo de pacientes que se atienden y al grado de especialización que se quiere abarcar. Así, un laboratorio de hemostasia de alto nivel será muy especializado y com-

plejo, pudiendo abarcar diversos aspectos de un laboratorio clínico y de investigación. Dentro de la organización del laboratorio distinguimos varias fases:

1. Fase preanalítica. Es fundamental, ya que en ella ocurren el 80% del total de los errores del laboratorio. Los objetivos del control de calidad en esta etapa incluyen la correcta identificación de la muestra, la introducción precisa de las peticiones en el sistema informático, y evitar el deterioro de la muestra en los procesos de obtención, manipulación, transporte y conservación, así como asegurar su adecuada centrifugación. Según el laboratorio, el origen de las muestras puede ser heterogéneo, por lo que esta etapa es la más difícil de controlar.

2. Fase analítica. En ella se realizan las diversas pruebas solicitadas por el servicio peticionario. Estas mediciones siempre están sujetas a un mayor o menor grado de variabilidad, la cual puede reducirse con un buen control de calidad de los instrumentos, metodología y reactivos, con una buena formación de

los técnicos y con un programa adecuado de control de calidad (interno y externo). El control interno nos indicará nuestra variabilidad interna (existen controles comerciales normales y patológicos), y el control externo nos permitirá compararnos con otros laboratorios, y entre distintos métodos o instrumentos. Analizando los resultados del control de calidad, se pueden detectar e identificar problemas y proponer soluciones para mejorar los resultados, corrigiendo las desviaciones que puedan surgir por múltiples causas.

3. Fase postanalítica. En esta fase se validan los resultados en el analizador y, posteriormente, el facultativo procede a la validación de los mismos en el sistema informático. Es frecuente la falta de comunicación con los facultativos solicitantes y la escasa información del paciente, lo que dificulta a veces la valoración correcta de los resultados obtenidos. En este sentido, puede ocurrir que se realice un diagnóstico erróneo de un parámetro hemostático, por ejemplo si no existe información de que el paciente está recibiendo tratamiento anticoagulante. Es importante también realizar en esta etapa la valoración global de los resultados, observando si un parámetro tiene tendencia a desviarse en un sentido. Asimismo, valorando de forma individual los resultados, podemos detectar incoherencias que nos hagan reevaluar la fase preanalítica o analítica.

Tabla 1. Componentes de un sistema de automatización en un laboratorio clínico

- Área de entrada de muestras: Se realiza la clasificación de las muestras, separación de pruebas ordinarias/especiales, si requieren centrifugación o retirada de tapón, alícuotas
- Área de lectura de código de barras
- Sistema de transporte: Trasladan las muestras a los destinos apropiados
- Centrifugación automática (refrigerada para muestras de coagulación), tras la cual las muestras regresan al sistema de transporte
- Sistemas que comprueban la integridad de la muestra (volumen, presencia de coágulos, fibrina, hemólisis, lipemia o bilirrubina). Pocos sistemas incorporan este paso porque en muchos casos los propios analizadores tienen esta función
- Retirada de tapones de las muestras
- Preparación de alícuotas si necesario
- Sistema de transporte al analizador que permite la aspiración de la muestra y realización de las pruebas solicitadas
- Re-taponamiento de los tubos
- Módulo de conservación temporal de las muestras: Donde permanecen hasta que se verifican los resultados por si hay que realizar repeticiones o pruebas adicionales
- Zonas de almacenamiento de las muestras ya procesadas donde permanecen el tiempo estipulado por cada laboratorio hasta su eliminación. Pueden estar refrigeradas

Un aspecto a tener en cuenta en esta fase es el control de los plazos de respuesta fijados para cada prueba.

Automatización del laboratorio de hemostasia

La automatización en el laboratorio de hemostasia, al igual que en el resto de los laboratorios clínicos, ha conllevado el uso combinado y conjunto de la informática, de la robótica y de los analizadores para manipular las muestras antes, durante y después de las mediciones. Surge en un intento de mejorar el flujo de trabajo, disminuir los tiempos de ejecución, la tasa de errores en el proceso analítico o de informe de resultados, y por la dificultad de disponer de personal cualificado y por la existencia de un aumento en la demanda asistencial. Todo ello se traduce en una disminución de los costes y una mejora de la calidad.

Cualquier laboratorio que considere implantar un sistema de automatización debe comenzar por establecer cuál es su estado actual, y cuáles son sus necesidades y expectativas. Además, es importante un buen conocimiento de todo el proceso de trabajo, desde la entrada de la muestra, su distribución, análisis y almacenamiento, así como la validación e informe de los resultados.

El grado de automatización puede ser parcial o total, lo que vendrá determinado por el tamaño y complejidad del laboratorio (Tabla 1). En ocasiones, la automa-

tización es parcial incluyendo únicamente algunos de los pasos del proceso de trabajo que son más susceptibles de mejora. La automatización total "ideal" incluye todo el proceso desde la fase preanalítica a la postanalítica, englobando todas las especialidades del laboratorio. Esto ha permitido que en la actualidad los laboratorios clínicos se estén organizando de acuerdo con criterios tecnológicos, consolidando en el mismo espacio mediciones de diversas especialidades y dando lugar a laboratorios pluridisciplinares. Este tipo de organización no excluye que la responsabilidad sobre cada proceso recaiga sobre el especialista correspondiente.

El laboratorio de hemostasia ha estado casi siempre unido al de hematimetría, constituyendo el laboratorio de hematología bajo la responsabilidad de un médico especialista en hematología y hemoterapia. Este hecho es importante, ya que este especialista es el único que durante su formación adquiere una visión global capaz de integrar datos clínicos y analíticos, y, por tanto, con una capacidad mayor de interpretación de los resultados analíticos. No todas las casas comerciales tienen sistemas compatibles con la automatización total del laboratorio de hematología, y son escasos los ejemplos que podemos ver en este sentido (A&T Corporation, Integrated Laboratory Automation Solutions, Roche Diagnostics, Siemens Medical Solutions Diagnostics, Thermo Fisher Scientific, etc.). Además, el laboratorio de hematología y, en concreto, el de hemostasia presentan unas condiciones propias de clasificación y manejo de las muestras diferentes a las del resto. Dado que en la fase preanalítica tienen lugar la mayoría de los errores del laboratorio, es uno de los procesos que más se puede beneficiar de la automatización.

Es interesante, una vez conseguida la automatización del laboratorio realizar una evaluación antes y después del proceso, que incluya parámetros de tiempo, productividad, control de calidad, satisfacción de los clínicos o incluso seguridad de los empleados, al disminuir la manipulación de las muestras y, por tanto, el riesgo de accidentes biológicos.

Recientemente, se han ido implantando modelos de automatización del laboratorio que proponen una descentralización parcial mediante la realización de pruebas en el lugar de asistencia al paciente (pruebas a la cabecera del paciente o POC [*point of care*]). Esto ha sido posible por el desarrollo de analizadores portátiles, de pequeño tamaño, que pueden utilizarse en el lugar de asistencia (ambulancias, centros periféricos o domicilio del paciente). En lo referente a la hemostasia, han ido cobrando importancia los coagulómetros portátiles capaces de determinar el INR en sangre capilar en pacientes en tratamiento con antivitaminas K. Las ventajas asociadas a este tipo de analizadores incluyen la punción capilar (no venosa), el no requerir centrifugación de la muestra, el menor tiempo de espera hasta la obtención del resultado y la realización de la analítica en

el propio domicilio del paciente o en centros periféricos (sin requerir envío de muestras al laboratorio). Los inconvenientes incluirían un posible mayor coste por medición (cuestionable), la variación respecto a los resultados obtenidos en muestra venosa, el desarrollo de un programa de calidad adecuado y la incorrecta formación del personal encargado de hacer las mediciones (aspecto fundamental). Generalmente, el propio fabricante del coagulómetro portátil suministra una aplicación informática que puede conectarse con el sistema de información del laboratorio o historia clínica electrónica para realizar la transferencia de datos y que permite, además, añadir un calendario con la pauta adecuada y validar el resultado de acuerdo con el nivel de anticoagulación definido para el paciente.

Tecnologías de la información y automatización

Los sistemas informáticos son un elemento clave en cualquier proceso de automatización, ya que se necesita que exista una comunicación entre el sistema informático del laboratorio (LIS) y los sistemas integrados automatizados. La comunicación entre todos los sistemas implicados debe permitir un flujo de información rápido y preciso. También permite identificar en qué analizador se ha procesado una determinada muestra, así como poder realizar comparaciones de los controles de calidad para una misma prueba que se realiza en varios equipos.

El sistema informático debería incluir la entrada de datos e información sobre la fase preanalítica (lectura del ID del código de barras de la muestra y volante de petición, información de la procedencia de la misma...), el proceso de la muestra (cuáles son las pruebas que hay que realizar, programar pruebas complementarias, transmisión de resultados...), y el proceso de validación y reporte de resultados, aunque éste es difícil de automatizar dada la importancia del factor humano en la interpretación de los resultados. Aun así, puede incluir un proceso de autoverificación, permitiendo realizar repeticiones, diluciones o posibilidad de validar los resultados según condiciones preestablecidas.

El LIS nos va a permitir, además, asignar las pruebas a los equipos en el momento de su introducción, eliminando la necesidad de listas de trabajo, ya que la asignación de pruebas se realiza de forma continua, enviando la información a los analizadores que realizan una consulta *host-query* en modo local, y respondiendo a los analizadores que efectúan la pregunta directamente al sistema de información del laboratorio. En el caso de técnicas manuales o realizadas en equipos que no están *on-line*, permite imprimir la lista de trabajo en cualquier momento.

Es habitual que existan registros para el control de incidencias relacionadas con la muestra o su procesa-

miento, para que puedan reclamarse lo antes posible si ha habido problemas en la realización del estudio solicitado, y programas de gestión de almacenes que nos permitan llevar a cabo un control preciso sobre las existencias de reactivos y posibles caducidades.

Gestión informatizada en el laboratorio

La mejora en los sistemas de información y la automatización ha permitido avanzar hacia la creación de redes integradas de laboratorios en un área de salud que incluye atención primaria y especializada, y su conexión con la red de sistemas de información de los hospitales. Todo esto requiere una reestructuración de los servicios de diagnóstico con la conexión entre un laboratorio central dotado con la robotización adecuada y que sirve de referencia, que asume las pruebas complejas y que es responsable de la calidad de sus resultados. Al mismo tiempo, dicho laboratorio debe ser responsable de la eficacia de todas sus áreas, laboratorios satélites y de los análisis realizados por POC mediante la conexión de los sistemas de información y el adecuado diseño del flujo de muestras. Un objetivo primordial es la integración de la información de las tres fases del proceso analítico (preanalítica, analítica y postanalítica) en una sola aplicación informática. Así se consigue que exista un único punto de entrada, un solo informe y una sola historia clínica de laboratorio, para que también durante el proceso de validación puedan consultarse todas las analíticas realizadas. Asimismo, existen distintos niveles de acceso en el laboratorio para que un facultativo pueda solo modificar o validar pruebas realizadas en su departamento, o para que el personal técnico no pueda validar resultados que requieran la interpretación de un facultativo (Tabla 2). Todo ello, siguiendo las directrices de la Ley de Protección de Datos.

Es importante que el sistema de peticiones esté conectado al programa de historia clínica electrónica, siendo deseable que la información generada en cada uno de los laboratorios se integre en la historia clínica electrónica y se conozca a tiempo real. Otra de las características que debe tener un sistema de información es la posibilidad de realizar búsquedas específicas y exportar de forma fácil estos datos a Microsoft Excel u otras aplicaciones similares para su tratamiento posterior y realización de estadísticas.

Comunicación clínico-laboratorio

Por otro lado, los sistemas informáticos y la comunicación por vía web son instrumentos muy eficaces ya que facilitan la conexión entre el clínico y el laboratorio.

Los sistemas informáticos permiten a los clínicos consultar los resultados en tiempo real del análisis ac-

Tabla 2. Áreas de acceso a los datos

Entrada de datos. Fase preanalítica	Personal administrativo/enfermería
Proceso de muestras (fase analítica)	Personal técnico/facultativo
Validación de resultados/Informes	Personal facultativo
Área de mantenimiento (ficheros maestros)	Personal encargado de la actualización y mantenimiento de ficheros maestros

tual y de todos los históricos del paciente, sin tener que depender de un informe en papel. El hecho de poder interpretar el resultado de un estudio de coagulación teniendo en cuenta los estudios históricos del paciente aumenta la eficacia, evita errores en la interpretación de los resultados y mejora la calidad del proceso analítico. Además, puede ayudar a disminuir el número de repeticiones y la demanda de nuevas pruebas. Un punto a destacar es la posibilidad de establecer los niveles de acceso de la aplicación, permitiendo que el facultativo pueda acceder sólo a sus pacientes, a los de su servicio o a todos. La búsqueda de datos de paciente se puede realizar desde diferentes ítems: apellido y nombre, número de historia clínica, número de documento, dirección de paciente, etc.

Otra utilidad de la informática aplicada al laboratorio es que permite acceder al catálogo de pruebas del laboratorio para informarse del tipo de muestra que se precisa, condiciones de extracción y conservación, rangos de normalidad, costes, interacciones, o incluso la existencia de avisos que cuestionen las repeticiones basándose en resultados previos, diagnóstico o medicación.

Existen soluciones informáticas que actúan conectando al clínico con el sistema de información del laboratorio, conocidos como los *sistemas expertos*. Permiten guiar a los clínicos en el momento de realizar una petición y combinar la información aportada por el clínico con los resultados obtenidos del laboratorio, para dar una interpretación específica o incluso generar otras magnitudes a realizar sobre la misma muestra. Con estos sistemas se disminuye el número de determinaciones, el número de muestras extraídas, el tiempo de respuesta y los costes. Incluso pueden contener protocolos de petición y algoritmos de decisión con pruebas encadenadas que ayuden a los clínicos a solicitar las peticiones correctas para un determinado paciente, o contener hiperenlaces de interés a bibliografía o guías relevantes existentes en la web.

Elaboración de un cuadro de mando integral en el laboratorio clínico y elaboración de indicadores

El cuadro de mando es un instrumento de control de gestión de calidad total que empezó a definirse en la década de los noventa por Norton y Kaplan. Consiste en

establecer una serie de objetivos desarrollando un sistema de medida basado en indicadores para monitorizar los resultados. Este modelo se fue ampliando hasta lo que se denominó “cuadro de mando integral” o BSC (*balanced scorecard*), estructurado en torno a cuatro perspectivas: la financiación (¿cómo son nuestros resultados financieros?), el proceso interno (¿en qué procesos debemos lograr la excelencia para garantizar el éxito?), el factor humano (¿cómo podemos mejorar nuestros recursos humanos y tecnologías de información?) y el cliente (¿cómo nos ven nuestros clientes?), llegando a convertirse en un sistema de gestión estratégico aplicable también al laboratorio clínico. Se trata de una herramienta valiosa ya que proporciona una estrategia en la que se definen y comunican los objetivos, promoviendo un alineamiento estratégico de toda la organización y un trabajo coordinado en equipo.

Para la elaboración de un BSC en el laboratorio se requiere la selección de una serie de indicadores según los objetivos estratégicos de las distintas perspectivas (mapa estratégico), estableciendo metas definidas para ellos. Así podrán aplicarse acciones de mejora para cumplir con dichas metas retroalimentando el sistema, ya que es fundamental la adaptación ante un entorno permanentemente en cambio. Esta monitorización de los indicadores es una herramienta de evaluación que asegura que los recursos sean utilizados con el máximo de eficiencia para responder a los objetivos fijados. Los indicadores son útiles para procesar y comparar a través del tiempo la eficiencia de una organización, y evaluar el éxito o fracaso de la implementación de cualquier modelo de gestión.

El BCS nos permite la realización de estadísticas preprogramadas de los diferentes sectores que integran el sistema: estadísticas de pacientes, de médicos o de órdenes de prácticas con cálculo de las unidades de laboratorio (UL), etc. Además de las estadísticas programadas es factible realizar las que requiera cada usuario de acuerdo con los datos existentes en las diferentes bases del sistema. Este modelo ya se ha aplicado con éxito en algunas instituciones sanitarias públicas.

Análisis de coste-beneficio

La decisión de automatizar el laboratorio conlleva una inversión económica considerable, siendo importante establecer cuál va a ser el periodo necesario para analizar la inversión realizada. Es conveniente efectuar un estudio exhaustivo del impacto del proyecto en el coste por medición, y ver si ello puede justificar la puesta en marcha del proyecto. A esto hay que añadir que existe muy poca información publicada al respecto, por lo que se generan dudas sobre su viabilidad real. Es importante tener en cuenta numerosos factores que a veces se olvidan o son di-

fíciles de cuantificar (disminución de tasa de errores, aumento de la seguridad, el cambio cualitativo de la labor del personal...).

El área económico-financiera es una de las más difíciles de valorar y comparar, debido a que muchas veces no se encuentran los indicadores idóneos que reflejen la buena marcha financiera del laboratorio. La automatización puede facilitar el análisis de los costes directos del laboratorio de hemostasia y disminuir los costes directos de personal.

'Benchmarking'

La evaluación de los procesos, de la práctica clínica y de los resultados puede llevarse a cabo mediante una herramienta de mejora continua denominada *benchmarking*. Se trata de un proceso sistemático por el que una organización compara sus procesos y resultados frente a otras similares en una materia determinada, en un intento de disminuir la tasa de errores, los costes debidos a las reclamaciones, y producir una mejora en el cumplimiento de la normativa vigente. Es una herramienta de aprendizaje continuo que nos permite tomar medidas de mejora adaptando a la organización los conocimientos aprendidos en busca de la excelencia en su rendimiento. Este método es fundamental aplicado al laboratorio u organizaciones sanitarias, ya que permite que la empresa sobreviva con recursos económicos limitados. Para que los datos entre distintas organizaciones sean comparables, es imprescindible consensuar las formas de medir y de evaluar la actividad estableciendo indicadores apropiados. Los requisitos que debe cumplir un indicador son: que sea relevante, fiable, discriminatorio, objetivo, exento de riesgos, válido y adecuado para medir el objetivo marcado. La misma importancia tiene el establecimiento de buenos indicadores como la selección del objetivo a medir (que sean procesos críticos para el resultado y susceptibles de mejora).

Un ejemplo de *benchmarking* en el laboratorio de hemostasia podría ser el control de calidad externo, que, además de comprobar la calidad de nuestros resultados, nos permite compararnos con otros laboratorios que utilizan los mismos autoanalizadores. También podría existir la posibilidad de *benchmarking* interno si, por ejemplo, establecemos indicadores en la fase preanalítica (muestras rechazadas por problemas en el transporte, extracción, anticoagulante inadecuado...). Así, tras su posterior análisis, podemos implantar me-

das de mejora que nos permitan corregir los errores cometidos en esta fase.

Consideraciones finales

Los sistemas de automatización se han desarrollado de forma importante en las últimas décadas, lo que ha permitido una mejora en la calidad del proceso, ahorro de tiempo de trabajo y una mayor seguridad para el personal implicado, disminuyendo las intervenciones manuales. Sin embargo, en la actualidad, aún no se ha generalizado su uso en los laboratorios de hemostasia, aunque probablemente en los próximos años vayan implantándose de forma gradual. Asimismo, es de gran importancia el desarrollo de los sistemas informáticos que han permitido añadir funcionalidad a los sistemas de información del laboratorio, y facilitar la realización de múltiples tareas garantizando una integración de la información dentro del laboratorio, y de éste con el hospital y las áreas de atención extrahospitalaria (atención primaria y especializada).

Bibliografía

- Asociación Española de Normalización y Certificación. Sistemas de Gestión de Calidad. Requisitos ISO 9001; 2008.
- Benítez AJ, Caballé I, García A, Hornos JI, Sarrión D. Los costes de la calidad y no calidad en el laboratorio clínico. *Química Clínica*. 2005; 24 (3): 164-71.
- Benítez AJ, Caballé I, Torra M. Recomendaciones para la elaboración de un cuadro de mando integral en el laboratorio clínico. *Rev Lab Clin*. 2008; 1 (3): 122-32.
- Caballé I. Gestión del laboratorio clínico. Barcelona: Masson; 2007. p. 189-221.
- García A, Batista J. Recomendaciones para la recogida de datos estadísticos y evaluación de la actividad del laboratorio clínico. *Química Clínica*. 2003; 22 (1): 19-28.
- García A, Caballé I, Giménez A. Uso adecuado del laboratorio clínico: necesidad y tendencias. *Rev Lab Clin*. 2008; 1 (2): 75-82.
- Hawker CD. Laboratory automation: total and subtotal. *Clin Lab Med*. 2007; 27 (4): 749-70.
- Jou JM, Reverter JC, Villarrubia J. IV Curso de actualización en automatización y sistemas de calidad en los laboratorios de hematología y hemostasia. Septiembre de 2008.
- Markin RS, Whalen SA. Laboratory automation: trajectory, technology and tactics. *Clin Chem*. 2000; 46: 764-71.
- Owen CA. A history of blood coagulation. *Foundation for Medical Education and Research*. p 189-221.
- Rodrigues S. Guidelines for implementing automation in a hospital laboratory setting, part II. *Clin Leadersh Manag Rev*. 2007; 2 1 (2): E3.
- Rodrigues S. Guidelines for implementing automation in a hospital laboratory setting, part I. *Clin Leadersh Manag Rev*. 2007; 21 (1): E2.