

**Número especial sobre Hemostasia y Trombosis**

# Inhibidores adquiridos de la coagulación: enfoque diagnóstico y casos especiales

*Acquired inhibitors of blood coagulation: diagnostic perspective and especial cases*

*Inibidores adquiridos da coagulação: abordagem diagnóstica e casos especiais*

- Lucía Remotti<sup>1a</sup>, Silvia Haydée Grosso<sup>1a</sup>, Marcelo Francisco Ingratti<sup>1a</sup>, María Paula Vera Morandini<sup>1a</sup>, Adriana Inés Woods<sup>2b</sup>, Analía Sánchez-Luceros<sup>2a,b</sup>, Susana Sara Meschengieser<sup>3a</sup>, María Ángela Lazzari<sup>3b</sup>, Alicia Noemí Blanco<sup>2a</sup>

<sup>1</sup> MSc.

<sup>2</sup> PhD.

<sup>3</sup> MD.

<sup>a</sup> Departamento de Hemostasia y Trombosis, Instituto de Investigaciones Hematológicas "Mariano R. Castex", Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires, Argentina.

<sup>b</sup> Laboratorio de Hemostasia y Trombosis, IMEX-CONICET, Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires, Argentina.

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

Incorporada al Chemical Abstract Service.

Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957

ISSN 1851-6114 en línea

ISSN 1852-396X (CD-ROM)

## Resumen

Los inhibidores adquiridos son defectos raros. Se asocian a diferentes manifestaciones clínicas con morbimortalidad significativa. Su detección es importante para implementar el tratamiento sin demora. Hay inhibidores específicos (bloquean función), contra todos los factores de la coagulación y además VWF, o de interferencia (afectan una o varias vías de la coagulación). Los inhibidores específicos son alo-anticuerpos desarrollados en pacientes deficitarios (complicación terapéutica) o auto-anticuerpos presentes en individuos sin alteraciones previas. Hay anticuerpos específicos que pueden afectar la depuración pero no inhiben función. Inhibidores de interferencia: inmunoglobulinas u otras sustancias (heparina/heparinoides, PDF/pdf, PIVKAS, moléculas anómalas, etc.) asociadas a diferentes situaciones clínicas (asintomáticos, sangrados, trombosis y/o complicaciones obstétricas). El laboratorio es fundamental para el diagnóstico. Las pruebas globales detectan el defecto, que no corrigen por el agregado de plasma normal; se caracteriza luego el tipo de inhibidor y eventualmente se titula. Esto es complejo; hay variabilidad en los resultados y posibilidad de falsos positivos o negativos, además las pruebas no son estrictamente específicas. Los algoritmos diagnósticos son útiles, pero no contemplan la posibilidad de defectos combinados. Es crítico caracterizar al inhibidor y descartar posibles interferencias o defectos concomitantes; ello requiere aplicar las pruebas adecuadas e interpretarlas correctamente.

**Palabras clave:** inhibidores adquiridos de la coagulación \* inhibidores específicos \* inhibidores de interferencia \* inhibidor lúpico \* pruebas de coagulación \* factores de coagulación

## Summary

*Acquired inhibitors are rare disorders. They are associated with different clinical behaviours and significant morbi-mortality. Detection is important in order to start treatment urgently. There are either specific inhibitors, which*

block function, against all coagulation factors, and VWF, or with interference effects, on one or more coagulation pathways. Specific inhibitors are either allo-antibodies developed in deficient patients, which give rise to therapeutic complication; or auto-antibodies, which are present in individuals without previous defects. There are specific antibodies that can affect clearance but which cannot block the function. Inhibitors with interference effects are immunoglobulins or other substances (heparin/heparinoids, FDP/fdp, PIVKAS, abnormal molecules, etc.) associated with different clinical settings (asymptomatic, bleeding, thrombosis and/or obstetric complications). Laboratory results are fundamental for the diagnosis. Global tests are able to detect the defect, which is not corrected by the addition of normal plasma; the type of inhibitor is then characterized and titration of the inhibitor is eventually performed. This is complex; there is variability in the results and there is likelihood of false positive or negative results; moreover, the tests are not strictly specific. Diagnostic algorithms are useful tools but they do not consider combined defects. It is a critical point to characterize the inhibitor and exclude possible interferences or concomitant defects; this demands application of the correct tests without misinterpretations.

**Key words:** *acquired inhibitors of coagulation \* specific inhibitors \* inhibitors that interfere with coagulation factors \* lupus anticoagulant \* coagulation tests \* coagulation factors*

## Resumo

Os inibidores adquiridos são defeitos raros. Associam-se a diferentes manifestações clínicas com morbimortalidade significativa. Sua detecção é importante para implementar o tratamento sem demora. Há inibidores específicos (bloqueiam função), contra todos os fatores da coagulação e também VWF, ou de interferência (afetam uma ou várias vias da coagulação). Inibidores específicos: - aloanticorpos desenvolvidos em pacientes deficitários (complicação terapêutica); - autoanticorpos, em indivíduos sem alterações prévias. Existem anticorpos específicos que podem afetar a depuração, mas não inibem função. Inibidores de interferência: imunoglobulinas ou outras substâncias (heparina/heparinoides, PDF/pdf, PIVKAS, moléculas anômalas, etc.) associadas a diferentes situações clínicas (assintomáticos, sangramentos, trombose e/ou complicações obstétricas). O laboratório é fundamental para o diagnóstico. Os testes globais detectam o defeito, que não corrige pelo acréscimo de plasma normal; caracteriza-se depois o tipo de inibidor e eventualmente é titulado. Isto é complexo; há variabilidade nos resultados e possibilidade de falsos positivos ou negativos, além disso os testes não são rigorosamente específicos. Os algoritmos diagnósticos são úteis, mas não consideram a possibilidade de defeitos combinados. É crítico caracterizar o inibidor e descartar possíveis interferências ou defeitos concomitantes; isso requer aplicar os testes adequados e interpretá-los corretamente.

**Palavras-chave:** *inibidores adquiridos da coagulação \* inibidores específicos \* inibidores de interferência \* lúpus anticoagulante \* testes de coagulação \* fatores de coagulação*

## Introducción

Los inibidores adquiridos de la coagulación son, en la mayoría de los casos, defectos raros e infrecuentes (1-3). Se asocian a diferentes manifestaciones clínicas y pueden causar morbi-mortalidad significativa, de allí la importancia de su rápida detección e identificación, a fin de implementar el tratamiento adecuado sin demora.

Hay efectos inhibitorios que afectan específicamente a un factor de la coagulación, bloqueando su función o efectos de interferencia que pueden manifestarse en una o varias de las etapas o vías de la coagulación. Pueden ser mediados por anticuerpos o debidos a presencia de otras sustancias (heparina/heparinoides, inmunoglobulinas, PDF/pdf, PIVKAS, moléculas anómalas, etc.). Los ejemplos más significativos, dada su prevalencia, son los inibidores a-FVIII (inibidores específicos) y el inibidor lúpico (inibidores de interferencia).

Los inibidores de los factores de la coagulación pueden ser alo-anticuerpos, que se desarrollan en pacientes deficitarios en respuesta a la terapia de reemplazo y complican la terapéutica o auto-anticuerpos, en individuos sin manifestaciones o alteraciones previas de la coagulación, que presentan imprevisiblemente sangrados de diferente severidad, los cuales pueden o no estar asociados con patología subyacente o drogas (4-6). Hay otros anticuerpos que reconocen epitopes no funcionales y no inhiben su función, aunque pueden afectar su vida media (6).

Los inibidores de interferencia son inmunoglobulinas u otras sustancias que por diversos mecanismos “interfieren” en el proceso de la coagulación *in vitro* (7) y se asocian a diferentes situaciones clínicas. Se pueden detectar en individuos asintomáticos, también pueden dar manifestaciones hemorrágicas o ser factor de riesgo de trombosis y/o complicaciones obstétricas.

Los hallazgos de laboratorio son fundamentales en la confirmación de la sospecha diagnóstica. Para ello se requiere, por parte del laboratorio, el conocimiento de las posibles situaciones clínicas y los mecanismos fisiopatológicos subyacentes, así como la comprensión del comportamiento de las pruebas posiblemente afectadas, sus puntos críticos o limitaciones técnicas y en especial, la interpretación correcta de los resultados (6).

Esta revisión se refiere al enfoque diagnóstico de los inhibidores de los factores de la coagulación a partir de las pruebas de laboratorio, así como al diagnóstico diferencial, con especial atención a la posibilidad de defectos combinados.

## Inhibidores Adquiridos

Se denominan inhibidores adquiridos aquellos anticuerpos o sustancias que afectan una o varias etapas de la coagulación, prolongando las pruebas correspondientes, por ejemplo: tiempo de tromboplastina parcial activado (TTPA), tiempo de protrombina (TP) y/o tiempo de trombina (TT). Pueden afectar la actividad coagulante de uno o varios factores al inhibir específicamente algún factor de la coagulación o al interferir en su reacción. Según su modo de acción pueden ser clasificados en específicos o de interferencia (7) (8).

### Inhibidores Específicos

Son inmunoglobulinas dirigidas contra epitopes funcionales de un factor de la coagulación en particular; se los denomina anticuerpos neutralizantes. Hay además anticuerpos no-neutralizantes.

#### ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES

Actúan de modo específico sobre la actividad coagulante de un factor al bloquear sitios funcionales del mismo y se manifiestan alterando las pruebas de coagulación correspondientes (6). Pueden desarrollarse en pacientes deficitarios, de modo secundario a la terapéutica de reemplazo; como ejemplo se citan el desarrollo de inhibidores anti-factor VIII (a-FVIII) (4) o anti-factor IX (a-FIX) (5) en pacientes hemofílicos (**aloanticuerpos** o **isoanticuerpos**). Asimismo, pueden presentarse en individuos con un mecanismo hemostático previo normal (**autoanticuerpos**), asociados a enfermedades autoinmunes, neoplasias, ingesta de drogas, cirugía, o como el caso del a-FVIII, post parto (5) (6). La aparición de aloanticuerpos complica la terapéutica de reemplazo en los pacientes deficitarios. En cambio, el desarrollo de autoanticuerpos puede generar cuadros hemorrágicos que mimetizan las manifestaciones clínicas típicas del déficit del factor inhibido (Tabla I). Hay descriptos anticuerpos neutra-

lizantes dirigidos contra los diferentes factores de la coagulación y también contra el factor von Willebrand (VWF) (6) (9).

#### ANTICUERPOS NO-NEUTRALIZANTES

Reconocen específicamente epitopes no-funcionales, por lo cual no inhiben la actividad del factor, ni las pruebas de coagulación globales correspondientes (6). Su presencia puede implicar disminución de la concentración por formación de complejos antígeno-anticuerpo que pudiesen modificar la depuración del factor disminuyendo su vida media y provocando un déficit mediado por anticuerpos. La expresión clínica de estos anticuerpos es variable. En algunos individuos no se observa alteración de la coagulación, a pesar de que el anticuerpo pueda modificar la vida media del factor. En otros casos los pacientes tienen disminución de la actividad del factor y pueden presentar manifestaciones hemorrágicas. La hipoprotrombemia mediada por anticuerpos anti-factor II (a-FII), asociada a la presencia de inhibidor lúpico, es un ejemplo de anticuerpos no-neutralizantes (10); hay descriptos otros que reconocen FVIII (11), FXIII o VWF (12), con diferente efecto clínico.

### Inhibidores de Interferencia

Son inmunoglobulinas u otras sustancias que por diversos mecanismos "interfieren" en el proceso de coagulación *in vitro*, pudiendo afectar la determinación de la actividad coagulante de los factores involucrados en la vía alterada. Ejercen su efecto en una o varias de las etapas de la coagulación. Como ejemplo de inhibidores de interferencia, además del inhibidor lúpico (13-16), se pueden mencionar la heparina, los heparinoides (17), los productos de degradación de fibrinógeno/fibrina (PDF/pdf), las paraproteínas y algunas formas anómalas de fibrinógeno, entre otros, que ejercen su acción en diferentes etapas de la coagulación (6) (8).

### Laboratorio

Los inhibidores adquiridos, según su mecanismo de acción, afectarán una o varias vías de la coagulación y en consecuencia las pruebas que las evalúan (8). La no corrección de la prueba alterada, luego del agregado de plasma normal, sugiere la presencia de efecto inhibitorio, el cual deberá ser posteriormente caracterizado (12). El inhibidor, según sea específico o de interferencia, podrá afectar la actividad funcional de un factor (aquel específicamente inhibido) o de varios factores a la vez (al interferir en su función/detección) (12). Es útil y en ciertos casos, imprescindible, determinar la actividad de los factores involucrados en la vía o vías alteradas para poder confirmar el diagnóstico.

Tabla I. *Características de los inhibidores específicos (autoanticuerpos) de los factores de la coagulación y condiciones asociadas a su desarrollo.* GI: gastrointestinal; SNC: sistema nervioso central, LES: lupus eritematoso sistémico, AR: artritis reumatoidea.

Autoanticuerpo	Características	Condiciones asociadas	Características clínicas
aFI	IgG, IgA, IgM	Idiopáticos, embarazo, desórdenes autoinmunes, terapia con interferón, gammapatías.	Sangrados habitualmente severos: GI, génito-urinarios, retroperitoneal, SNC. También equimosis y hematomas.
aFII	IgG	Idiopáticos, cirugía con exposición a trombina bovina (" <i>fibrin glue</i> "), desórdenes autoinmunes (LES, AR), gammapatías. No-neutralizantes, asociados con inhibidor lúpico, pueden dar hipoprotrombinemia, especialmente en niños con cuadro viral previo a la aparición de equimosis o sangrados.	Clínica variable, incluso trombosis.
aFV	IgG	Exposición a trombina bovina, cirugía, terapia con antibióticos (grupo $\beta$ -lactámicos o aminoglucósidos), enfermedades oncohematológicas.	Clínica variable, desde epistaxis y gingivorragia hasta sangrado retroperitoneal, GI, hematuria e incluso trombosis.  Puede coexistir con aFII
aFVII	IgG	Idiopáticos, enfermedades oncohematológicas, desórdenes autoinmunes.  Antecedentes: globulina anti-timocito (anemia aplásica), penicilina, ciclosporinas, sepsis, pancreatitis y neoplasia.	Clínica habitualmente severa, sangrado SNC. Hemartrosis: son raras.
aFVIII	IgG <sub>4</sub>	Idiopáticos, desórdenes autoinmunes, enfermedades oncohematológicas, postparto.	Cuadro clínico similar a hemofilia, mayor morbimortalidad.
aFIX	IgG <sub>4</sub>	Idiopáticos, desórdenes autoinmunes, postparto	Cuadro clínico similar a hemofilia A adquirida (inhibidor aFVIII)
aFX	IgG	Idiopáticos, enfermedades oncohematológicas, desórdenes autoinmunes, antibióticos.  Extremadamente raros; asociados con infección respiratoria y neoplasia (incluso leucemia mieloide aguda).	Sangrado GI, hematuria, equimosis y hemartrosis; 29% asintomáticos.
aFXI	IgG	Asociados a colagenopatías, enfermedades oncohematológicas, enfermedades autoinmunes intestinales y tratamiento con fenotiazinas.	Clínica impredecible; frecuentemente asintomáticos.
aFXIII	IgG contra subunidades (A o B) o A2B2	MGUS, desórdenes autoinmunes (AR, LES), drogas (isoniazida, penicilina, fenitoína, amiodarona).	Patrón de sangrado más severo que en déficit congénito: hemartrosis, hematomas, menorragia, sangrado quirúrgico, mala cicatrización de heridas y aborto recurrente.

#### ALGORITMO DIAGNÓSTICO

El patrón de pruebas, incluyendo los estudios de mezcla, puede orientar acerca del tipo de inhibidor que podría estar presente (Figura 1).

#### Pruebas globales

Las pruebas globales de evaluación como el TP, el TTPA y el TT son empleadas habitualmente en las fases iniciales del estudio de la coagulación. Cada laboratorio debe establecer los valores de referencia para los reactivos y la metodología de medida aplicados para cada una de las pruebas. La prolongación de una

o varias de las pruebas más allá de los valores de referencia, puede orientar la sospecha inicial de la alteración (6) (8).

Un inhibidor específico de la vía intrínseca, por ejemplo inhibidor a-FVIII (4) (18), a-FIX (19) (20) o a-FXI (21), provoca prolongación del TTPA; en cambio, el TP y el TT serán normales. Frente a un inhibidor específico a-FVII, factor exclusivo de vía extrínseca, se espera encontrar un valor de TP anormal, con valores de TTPA y de TT normales (5) (6). Los inhibidores a-FV, a-FX o a-FII, que participan de la vía común, dan lugar tanto a la prolongación del TTPA como del TP; el TT en estos casos es normal (5) (6).

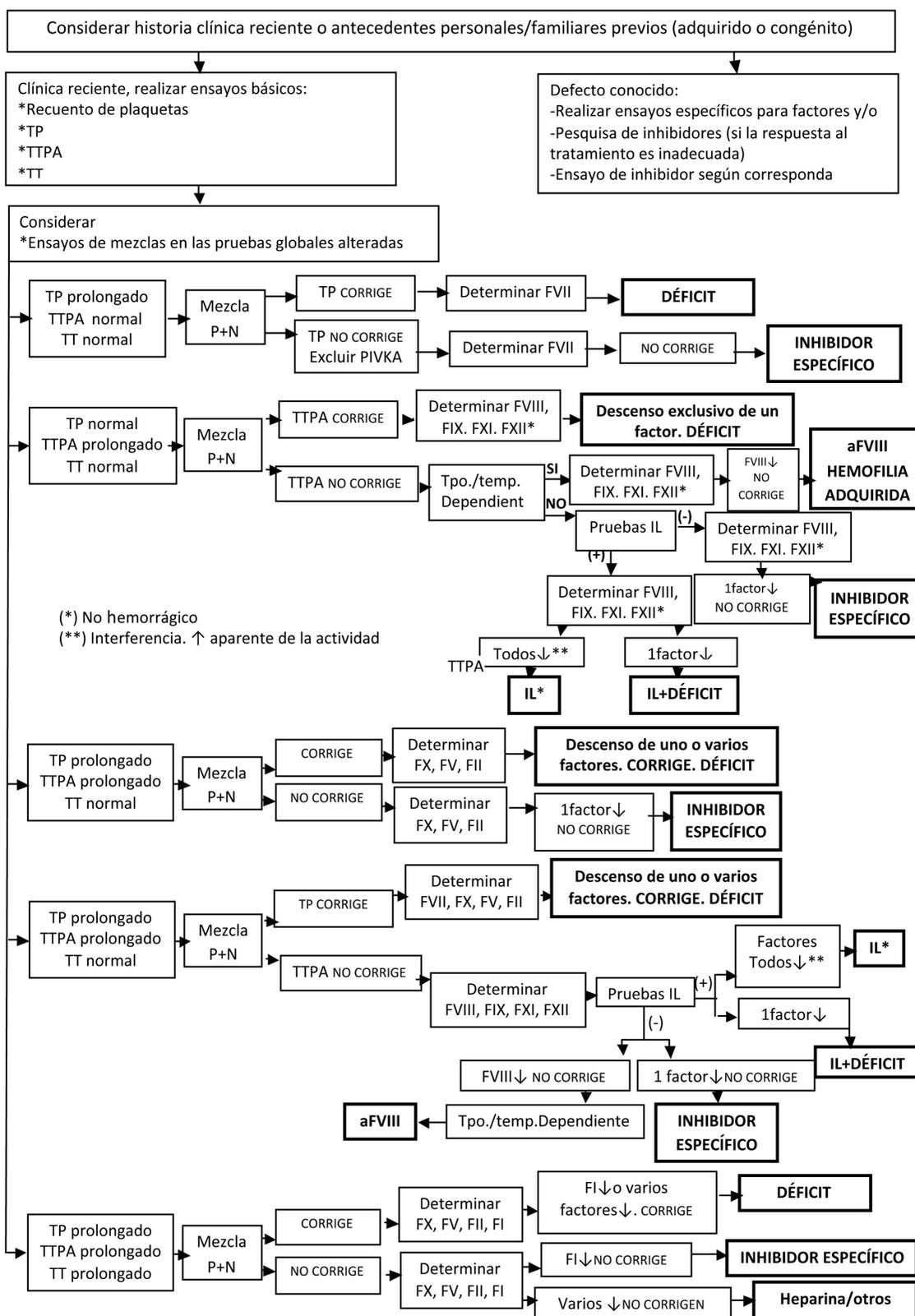


Figura 1. Algoritmo diagnóstico. El patrón de las pruebas, incluyendo los estudios de mezclas y la determinación de la actividad coagulante de los factores de coagulación permite orientar, considerando los antecedentes personales y familiares del caso, respecto al tipo de defecto que podría estar presente. TP: tiempo de protrombina; TTPA: tiempo de tromboplastina parcial activado; TT: tiempo de trombina; P+N: paciente + normal; FI: fibrinógeno; FII: factor II; FV: factor V; FVII: factor VII; FVIII: factor VIII; FIX: factor IX; FX: factor X; FXI: factor XI; FXII: factor XII; aFVIII: inhibidor anti-FVIII; IL: inhibidor lúpico.

Un inhibidor a-fibrinógeno o a-trombina prolonga las tres pruebas: TT, TP y TTPA (5)(6); el tiempo de reptilasa (TR) se altera por un inhibidor a-fibrinógeno, pero no por a-trombina, que no es capaz de inhibir la actividad enzimática del veneno (12). Los inhibidores a-FXIII alteran las pruebas de solubilidad (urea 5M o ácido monocloroacético 1%), pero presentan pruebas de coagulación normales (TP, TTPA, TT) (6).

Si el inhibidor es de interferencia, afecta una o varias de las pruebas globales, según su mecanismo de acción (6)(8). El inhibidor lúpico, por ejemplo, no prolonga el TP (excepto utilizando algún reactivo en particular) ni el TT; puede alterar el TTPA, si se utiliza un reactivo sensible, y/u otras pruebas con bajo aporte de fosfolípidos como el tiempo con veneno de víbora Russell diluido (DRVVT), el tiempo de coagulación con caolín (KCT) o el tiempo de coagulación con sílica (SCT), especialmente sensibles al inhibidor (22). No se debe olvidar que el efecto denominado inhibidor lúpico es heterogéneo (13)(15)(16)(22); cuando el objetivo es poner en evidencia la presencia del inhibidor, es preciso utilizar al menos dos pruebas sensibles, que evalúen mecanismos de activación diferentes. Otros inhibidores de interferencia (heparinoides, PDF/pdf, paraproteínas, fibrinógenos anómalos), afectan generalmente el TT, pudiendo en algunos casos provocar alteración también del TP y del TTPA; también requieren de pruebas complementarias para su caracterización (6). Una causa probable de efecto inhibitorio de interferencia sobre el TT es la presencia de heparina en el plasma, causado por potenciación de la inhibición mediada por antitrombina; dependiendo de la concentración de la droga, puede afectar también el TTPA y el TP (aunque éste es menos sensible) (6)(8). El TR es una herramienta útil para dilucidar el defecto, dado que la heparina no lo afecta.

#### ENSAYOS DE MEZCLAS CON PLASMA NORMAL

El paso siguiente luego de detectar una prueba alterada, es analizar el efecto del agregado del plasma normal al plasma del paciente (ensayos de mezclas o de corrección). Esto permitirá discernir entre un déficit de factor o factores, en el cual el defecto corrige, de un efecto inhibitorio, en el cual el agregado de normal no corrige la alteración.

El criterio ampliamente utilizado para definir "no corrección" se basa en el cálculo del Índice de Rosner o  $ICA = [(P+N)-N/P] \times 100$ . Se considera que la prueba de mezcla (1:1) no corrige, cuando el valor del índice es mayor al valor de corte (8)(22). Cada laboratorio debe establecer el valor de corte para los reactivos y el método de medida utilizados; se recomienda tomar el valor del percentil 99 de los estudios de mezcla, en al menos 40 plasmas de individuos sin inhibidor. Se recomienda realizar este procedimiento en más de 2 jornadas de trabajo, separadas al menos 3 días, para evitar desviaciones (*bias*).

Hay inhibidores con efecto progresivo, tiempo y temperatura dependiente; es decir, a mayor tiempo de interacción del anticuerpo con el plasma problema a 37 °C, mayor es la inhibición de la actividad (6)(8)(12)(23)(24). Hoy se acepta que este efecto es exclusivo de los inhibidores a-FVIII y por lo tanto característico de los mismos (18). Para ponerlo en evidencia se evalúa la corrección luego de la incubación de la mezcla (paciente+normal) durante al menos una hora a 37 °C y se analiza la potenciación de la inhibición luego de la incubación (8). El efecto de potenciación, descrito en algunas series de inhibidores lúpicos, se considera hoy producto de un defecto técnico (cambios de pH-inestabilidad de los factores) (25). Los anticuerpos no neutralizantes pueden manifestarse disminuyendo la concentración y por ende la actividad del factor al cual reconocen; como consecuencia, se prolongan las pruebas de coagulación, según el factor afectado (8). El defecto, a diferencia de los anticuerpos neutralizantes, corrige con el agregado de plasma normal (6)(8)(23). Estos anticuerpos pueden ser detectados por técnicas de ELISA o *immunoblotting* (8).

El plasma normal utilizado en los ensayos de mezcla, puede ser plasma liofilizado de origen comercial o un *pool* de plasmas de voluntarios sanos, que puede ser conservado a -80 °C. Es importante el nivel de factores presente en el plasma, en especial de aquellos lábiles como el FV y el FVIII, no sólo para las pruebas de corrección, sino también para la titulación de inhibidores específicos, donde influye en la variabilidad inter-ensayo (12).

#### Determinación de la actividad de los factores

Ante la sospecha de inhibidor, dada la no corrección de una prueba por el agregado de plasma normal, es útil determinar la actividad coagulante de los factores involucrados en la misma, a fin de identificar cuál es el factor o los factores cuya actividad se halla disminuida. Se aplica en general el método en una etapa (26). El efecto inhibitorio sobre la actividad funcional de un factor se evidencia en la mezcla (1:1) con plasma normal; la actividad observada es menor a la actividad teórica esperada en la misma (8). Lo ideal es determinar la actividad en más de dos diluciones progresivas del plasma problema y del calibrador; ello permite evaluar el comportamiento paralelo o no del plasma problema respecto al normal o calibrador (8). Cuando se trata de inhibidores específicos (anticuerpos de alta afinidad), los complejos antígeno-anticuerpo presentes en el plasma no se disocian por dilución. Las curvas son paralelas a la curva del calibrador, al igual que lo observado en un déficit de factor (8)(12)(23)(24); no se observa aumento aparente de la actividad. Estos anticuerpos inhiben exclusivamente a un factor, al cual reconocen específicamente.

En cambio, los inhibidores de interferencia afectan por igual a la actividad coagulante de todos los factores involucrados en la vía alterada. El efecto es eliminado por dilución; dado el no paralelismo respecto a la curva del calibrador se observa aumento aparente de la actividad al diluir, a diferencia de lo que ocurre en caso de un déficit de factor o inhibidor específico (8).

En presencia de títulos altos de inhibidor específico surge un problema técnico, por inhibición del factor presente en el reactivo de trabajo (plasma deficiente) (27); el cual se manifiesta en una interferencia en la determinación de la actividad de otros factores de la misma vía del factor inhibido, medidos aplicando el mismo principio (8)(23). Ejemplo: en un individuo con un título elevado de a-FVIII, se puede detectar una disminución falsa, muy marcada, de FIX, FXI y FXII; al determinar la actividad de estos factores en diluciones progresivas, no hay paralelismo respecto al plasma de referencia, pudiéndose normalizar la actividad, a diferencia del comportamiento observado para el FVIII (8)(12)(24). Es importante distinguir esta situación, del descenso aparente de varios factores por efecto de inhibidor lúpico (8)(23).

De lo expuesto surge porqué se recomienda determinar la actividad de los factores en varias diluciones del plasma y verificar el paralelismo con respecto al plasma calibrador de referencia (8)(23).

### Titulación del inhibidor

Caracterizado el efecto inhibitorio específico y detectado el factor inhibido, puede realizarse la titulación del inhibidor, mediante la modificación de Nijmegen del método Bethesda que aumenta la sensibilidad del ensayo (24)(28). El método no es específico, puede ser afectado por ejemplo, por la presencia de inhibidor lúpico (8)(12)(24). Fue descripto inicialmente para la titulación de inhibidores a-FVIII, con efecto tiempo-temperatura dependiente; requiere la incubación del plasma problema con el plasma normal (aporta FVIII) durante dos horas a 37 °C (8)(12)(24). Se define como una unidad Bethesda (UB/mL), la cantidad de inhibidor que deja el 50% de FVIII residual, luego de 2 horas de incubación a 37 °C (8)(28). Los títulos inferiores a 0,6 UB/mL son considerados negativos. La inter-variabilidad del ensayo es muy elevada ( $\leq 50\%$ ), al igual que los posibles falsos negativos o positivos ( $\leq 30\%$ ) (12)(24). El control estricto de las variables pre-analíticas, analíticas y post-analíticas, con la confirmación del ensayo en una nueva muestra, disminuye la variabilidad y mejora la exactitud (24). Este método, descripto originalmente para el a-FVIII, se ha extendido modificando las condiciones del ensayo, a prácticamente todos los inhibidores específicos. La diferencia es que no requiere la incubación durante dos horas a 37 °C, dado que el efecto de otros inhibidores es inmediato (6)(8)(23).

### Inhibidores - Caracterización

En caso de no-corrección del defecto con plasma normal, se deberá discriminar entre un inhibidor específico de un factor y un inhibidor de interferencia (8). El comportamiento de las pruebas de laboratorio se suma a los antecedentes clínicos, para contribuir a la confirmación diagnóstica. Aquí surge el inconveniente de que la mayoría de las pruebas disponibles no son específicas para la detección de los diferentes inhibidores; pueden presentar interferencias, inclusive por otros tipos de inhibidor. Si bien los algoritmos, como el mostrado en la Figura 1, orientan al diagnóstico no hay una secuencia indiscutida y validada para el diagnóstico. Esto se complica aún más cuando hay defectos combinados. Es crítico para el diagnóstico poner en evidencia las características propias de cada inhibidor y realizar una adecuada interpretación de los resultados.

### Inhibidores Específicos

En general son sintomáticos (6)(23)(29). Se sospecha su presencia en pacientes deficitarios, en los que no se logra la respuesta terapéutica esperada o en individuos sin alteraciones o antecedentes previos que presentan en un determinado momento complicaciones hemorrágicas, en general a edad adulta (6)(23)(29). El defecto de coagulación no corrige por el agregado de plasma normal. En caso de un inhibidor específico, estará disminuida la actividad del factor contra el cual se halla dirigido el anticuerpo, sin observarse aumento progresivo de la actividad con la dilución de la muestra, dado que no existe disociación del complejo antígeno-anticuerpo, por la alta constante de afinidad de estos anticuerpos (8)(27). Los inhibidores específicos de alto título pueden provocar un efecto de interferencia, con aumento aparente de la actividad por dilución, sobre la determinación de otros factores de la misma vía (8)(27).

Se mencionarán algunas situaciones especiales a tener en cuenta en casos de inhibidores específicos.

*aFVIII.* No debe descartarse inhibidor aFVIII sin realizar los ensayos de mezclas con incubación prolongada a 37 °C, respetando estrictas condiciones de trabajo (control de pH, no- evaporación, etc.) (8)(18)(27).

*aFV.* Dependiendo del epitope reconocido por el anticuerpo, puede alterar la función procoagulante (prolongación de TP, TTPA; disminución de FV-método en una-etapa) y/o la anticoagulante (resistencia a la acción de la proteína C activada) (6)(23)(30).

*aFibrinógeno.* Si bien afecta principalmente el TT y el TR, también puede provocar prolongación del TP y del TTPA (5)(6).

*aTrombina.* Son anticuerpos contra trombina bovina que dan reacción cruzada con la trombina humana o di-

rectamente contra trombina humana; prolongan el TT, el TP y el TTPA (5).

*aFXIII.* Al igual que los déficits de FXIII, no afectan las pruebas de coagulación (TP, TTPA, TT); pueden alterar las pruebas de solubilidad del coágulo (urea 5M o ácido monocloroacético 1%) o inhibir la actividad del factor, medida por diferentes métodos (espectrométricos o fluorométricos) (6)(8)(23)(31). Hay, además, aFXIII no-neutralizantes que reconocen la molécula purificada o sus subunidades (23)(31).

*aVWF.* Algunos casos de síndrome de von Willebrand adquirido (AVWS) se producen por anticuerpos. Los aVWF pueden inhibir al VWF, afectando una o varias de las diferentes pruebas (VWF:RCo, VWF:CB, VWF:Ag, TTPA/FVIII) según el epítope contra el cual estén dirigidos; las pruebas no corrigen por el agregado de normal (6)(8)(23). Si los anticuerpos no neutralizan la función, sino que incrementan la depuración, se observa un patrón semejante al del déficit congénito: disminución de la función que corrige con normal; el tipo y duración de la respuesta a la desmopresina (DDAVP)L o a los concentrados de FVIII/VWF puede evidenciarlos (6)(8)(23).

### Inhibidor Lúpico

Puede ser un hallazgo en pacientes asintomáticos; sin embargo, adquiere relevancia por su asociación con el riesgo de desarrollar trombosis venosas o arteriales, así como complicaciones obstétricas (32). También puede estar presente en individuos que cursan procesos infecciosos o presentan otras situaciones clínicas (33-36). En general, no se observan manifestaciones de sangrado, excepto se asocie a otro defecto como déficit o inhibidor específico de factor u otra alteración de la hemostasia (hipoprotrombinemia, trombocitopenia, etc.) (10)(37). Es imprescindible extremar las medidas para controlar las variables pre analíticas y analíticas, a fin de permitir poner en evidencia al inhibidor, minimizando la posibilidad de falsos negativos (13)(22). Además de las pruebas globales de rutina, el estudio incluye pruebas especialmente sensibles al inhibidor y, dada la heterogeneidad de estos anticuerpos, que evalúen diferentes mecanismos de activación. Se recomienda evaluar el TTPA (utilizando un reactivo probadamente sensible) y el DRVVT (22)(38); pueden eventualmente incluirse otras pruebas adicionales. La concentración y la composición fosfolípídica del reactivo (39), el tipo de activador, así como el mecanismo de activación desencadenado son críticos en cuanto a la sensibilidad al inhibidor (22)(38). La detección y caracterización del inhibidor se realiza siguiendo los criterios y las recomendaciones del comité de estandarización de la Sociedad Internacional de Hemostasia y Trombosis (*Scientific and Standardization Committee: Lupus anticoagulant/Phospholipid-antibodies-ISTH*) y además pautas dadas en la actualización de las guías (13)(22)(38). Se basa en

evidenciar el efecto dependiente de fosfolípidos mediante un procedimiento que incluye tres pasos: la evaluación inicial utilizando pruebas con bajo aporte de fosfolípidos (*screening* o pesquisa), los ensayos de mezclas con plasma normal y la realización de las llamadas pruebas confirmatorias (neutralización por fosfolípidos o demostración de la dependencia de fosfolípidos del efecto) (13)(22)(38). Considerando además el diagnóstico diferencial con otros defectos o la posibilidad de defectos combinados (13).

El inhibidor lúpico altera la determinación de la actividad de los factores, evaluados aplicando el mismo principio que la vía afectada por el inhibidor, si se utilizan reactivos sensibles al inhibidor. Este efecto puede ser eliminado por dilución, observándose aumento progresivo de la actividad. Es preciso recordar la posibilidad de falsos positivos en presencia de heparina o heparinoides y la importancia de descartarlos mediante la realización del TT (22)(38). El efecto de la heparina puede ser obviado utilizando reactivos que contengan sustancias que la neutralicen (polibrene, protamina) o eliminándola del plasma (tratamiento con heparinasas, filtración a través de ecteola-celulosa). Sin embargo, se prefiere evitar evaluar el inhibidor en individuos que reciban heparina, tanto heparina no-fraccionada como de bajo peso molecular. Esta última, en dosis terapéuticas, puede dar falsos positivos, al igual que los inhibidores directos de trombina.

### Otros Inhibidores de Interferencia

Pueden asociarse o no a manifestaciones hemorrágicas.

En caso de interferencias por la presencia de paraproteínas o más raramente por los productos de degradación de fibrinógeno/fibrina, además de la prolongación del TT, puede detectarse alteración del TP y/o TTPA (7)(12). El efecto inhibitorio puede también interferir en la determinación de la actividad coagulante de los factores; en esos casos hay disminución simultánea y semejante de todos los factores determinados siguiendo el mismo principio de la prueba alterada, el efecto desaparece al diluir (aumento aparente de la actividad) (7)(8).

La inhibición por heparina o heparinoides, dependiendo de su concentración plasmática, puede manifestarse no solo a nivel del TT, sino también sobre la vía intrínseca (TTPA) y muy raramente sobre la extrínseca (TP) (7). El TR será normal; esta prueba es clave en la orientación diagnóstica, para diferenciar heparina/heparinoides de otros defectos que alteren la transformación fibrinógeno en fibrina (6). También depende de la concentración de heparina o heparinoide en plasma, que pueda observarse la interferencia sobre la actividad coagulante de los factores, con aumento aparente de la actividad por dilución (13)(27).

## Efectos combinados

La sospecha de defectos combinados puede surgir por la clínica, al observar un comportamiento no relacionado al tipo de inhibidor detectado.

Los resultados de laboratorio pueden sugerir efectos combinados cuando se observan por ejemplo, alteraciones de las pruebas básicas no compatibles con el efecto inhibitorio detectado. Otro indicio puede ser la observación de corrección y/o neutralización parcial en los ensayos de mezclas y/o en las pruebas confirmatorias para inhibidor lúpico.

Es importante tener presente que puede haber casos de inhibidor sumado a déficit de factor/es (hemofilia A y aFVIII; hemofilia B y aFIX; VWD y aVWF; VWD e inhibidor lúpico; hipoprotrombinemia e inhibidor lúpico) (10) (12) (27) (28). También puede darse la coexistencia de tipos diferentes de inhibidor (a-FVIII e inhibidor lúpico (37) (40) (41); aFV e inhibidor lúpico) o situaciones más complejas aún, en la cuales se suman al déficit de un factor más de un efecto inhibitorio (hemofilia A, a-FVIII e inhibidor lúpico (37) (40)). La tabla II resume algunas de las posibles combinaciones de resultados y la orientación diagnóstica en cada caso. La confirmación diagnóstica requerirá de pruebas complementarias, como la determinación de a-FVIII utilizando sustratos cromogénicos en caso de sospecha de a-FVIII e inhibidor lúpico, la cual no es afectada por este último inhibidor (42).

Dado que el inhibidor lúpico es el más frecuente de los inhibidores adquiridos de la coagulación, es el inhibidor con mayor probabilidad de estar combinado con otro u otros defectos. En un análisis retrospectivo de 1000 exámenes consecutivos para inhibidor lúpico (TTPA, DRVVT) se observó que el 10,8% de los

casos presentó inhibidor en individuos sin clínica de síndrome antifosfolipídico, de los cuales el 34,3% presentaban sangrado (epistaxis, gingivorragia, equimosis, hematomas espontáneos), presentación clínica no habitual; en el 55,4% de estos casos se detectaron otras alteraciones de la hemostasia. Esto representa un desafío particular, al requerir evaluar otros posibles defectos subyacentes, que pudiesen justificar el comportamiento clínico (43).

La detección e identificación de defectos combinados requiere de un análisis minucioso, a fin de alcanzar un diagnóstico correcto, esencial para tomar decisiones terapéuticas adecuadas.

## Comentario

La detección, caracterización y diagnóstico de los inhibidores adquiridos de la coagulación tiene aspectos complejos. No hay consenso respecto a la secuencia a seguir, luego de detectar un efecto inhibitorio en los ensayos de mezclas. Hay alta variabilidad en los resultados, además de alta proporción de falsos positivos o negativos. La mayoría de las pruebas disponibles no son estrictamente específicas; pueden presentar interferencias, inclusive producidas por otros inhibidores. Las causas más frecuentes de no corrección en los ensayos de mezclas con plasma normal son la presencia de inhibidor lúpico o la contaminación de la muestra con heparina; ambas deben ser excluidas o confirmadas antes de proseguir el análisis. Los algoritmos diagnósticos son una herramienta útil para interpretar los resultados de laboratorio; sin embargo, no contemplan en general la posibilidad de defectos combinados. Es crítico poner en evidencia las características propias de cada inhibi-

Tabla II. Orientación diagnóstica en base a las diferentes combinaciones de los resultados de las pruebas de detección y su correspondiente confirmatoria, efectuadas en el plasma del paciente y en la mezcla con plasma normal.

P+N: paciente + normal; a-FVIII: inhibidor anti-factor VIII

	Pruebas de detección	Pruebas confirmatorias	Diagnóstico probable
PACIENTE MEZCLA (P+N)	Prolongada	Neutraliza	INHIBIDOR LÚPICO
	No corrige	Neutraliza	
PACIENTE MEZCLA (P+N)	Prolongada	No neutraliza	INHIBIDOR NO-LÚPICO*
	No corrige*	No neutraliza	
PACIENTE MEZCLA (P+N)	Prolongada	No neutraliza	DÉFICIT
	Corrige	No neutraliza	
PACIENTE MEZCLA (P+N)	Prolongada	Neutraliza parcial	INHIBIDOR LÚPICO + INHIBIDOR NO-LÚPICO*
	No corrige*	Neutraliza parcial	
PACIENTE MEZCLA (P+N)	Prolongada	Neutraliza parcial	INHIBIDOR LÚPICO + DÉFICIT
	Corrige parcial	Neutraliza	
PACIENTE MEZCLA (P+N)	Prolongada	Neutraliza parcial	INHIBIDOR LÚPICO + DÉFICIT + INHIBIDOR NO-LÚPICO*
	Corrige parcial*	Neutraliza parcial	
*Si potencia con incubación a 37 °C			*a-FVIII

dor y realizar una adecuada interpretación de los resultados, descartando posibles interferencias, para conseguir un diagnóstico correcto.

#### CORRESPONDENCIA

MSc. LUCIA REMOTTI

J. A. Justo 3081

C.P.: C1425AUM, CABA, Argentina.

E-mail: lremotti@hematologia.anm.edu.ar

## Referencias bibliográficas

1. Watson HG, Chee YL, Greaves M. Rare acquired bleeding disorders. *Rev Clin Exp Hematol* 2001; 5: 405-29.
2. Cohen AJ, Kessler CM. Acquired inhibitors. *Baillieres Clin Haematol* 1996; 9: 331-54.
3. Franchini M, Veneri D. Acquired coagulation inhibitor-associated bleeding disorders: an update. *Hematology* 2005; 10: 443-9.
4. Coppola A, Favalaro EJ, Tufano A, Di Minno MN, Cerbone AM, Franchini M. Acquired inhibitors of coagulation factors: part I-acquired hemophilia A. *Semin Thromb Hemost* 2012; 38: 433-46.
5. Franchini M, Lippi G, Favalaro EJ. Acquired inhibitors of coagulation factors: part II. *Semin Thromb Hemost* 2012; 38: 447-53.
6. Franchini M, Castaman G, Coppola A, Santoro C, Zanon E, Di Minno G, *et al.* AICE Working Group. Acquired inhibitors of clotting factors: AICE recommendations for diagnosis and management. *Blood Transfus* 2015; 13: 498-513.
7. Exner T. Diagnostic methodologies for circulating anticoagulants. *Thromb Haemost* 1995; 74: 338-44.
8. Blanco A. Inhibidores adquiridos de la coagulación y otros desórdenes inmunológicos. En: Blanco A, Kordich L, Bermejo E, Forastiero R, Lauricella AM, Pieroni G, Quintana I, Scazziota A, editores. *Fundamentos para el manejo práctico en el laboratorio de hemostasia*. 2da. ed. La Plata: Federación Bioquímica de la Provincia de Buenos Aires; 2013. p 517-83.
9. Collins P, Budde U, Rand JH, Federici AB, Kessler CM. Epidemiology and general guidelines of the management of acquired haemophilia and von Willebrand syndrome. *Haemophilia* 2008; 14 Suppl 3: 49-55.
10. Mazodier K, Arnaud L, Mathian A, Costedoat-Chalumeau N, Haroche J, Frances C, *et al.* Lupus anticoagulant-hypoprothrombinemia syndrome: report of 8 cases and review of the literature. *Medicine (Baltimore)* 2012; 91: 251-60.
11. Whelan SF, Hofbauer CJ, Horling FM, Allacher P, Wolfsegger MJ, Oldenburg J, *et al.* Distinct characteristics of antibody responses against factor VIII in healthy individuals and in different cohorts of hemophilia A patients. *Blood* 2013; 121: 1039-48.
12. Kershaw G, Favalaro EJ. Laboratory identification of factor inhibitors: an update. *Pathology* 2012; 44: 293-302.
13. Brandt JT, Triplett DA, Alving B, Scharrer I. Criteria for the diagnosis of lupus anticoagulants: an update. *Thromb Haemost* 1995; 74: 1185-90.
14. Pengo V, Denas G, Bison E, Banzato A, Jose SP, Gresele P *et al.* Prevalence and significance of anti-prothrombin (aPT) antibodies in patients with lupus anticoagulant (LA). *Thromb Res* 2010; 126: 150-3.
15. Devreese K, Hoylaerts MF. Challenges in the diagnosis of the antiphospholipid syndrome. *Clinical Chemistry* 2010; 56: 930-40.
16. Pierangeli SS, de Groot PG, Dlott J, Favalaro E, Harris EN, Lakos G, *et al.* 'Criteria' aPL tests: Report of a Task Force and preconference workshop at the 13th International Congress on Antiphospholipid Antibodies, Galveston, Texas, April 2010. *Lupus* 2011; 20: 182-90.
17. Torjemane L, Guerhazi S, Ladeb S, Ben Romdhane N, Lakhal A, Abdelkefi A, *et al.* Heparin-like anticoagulant associated with multiple myeloma and neutralized with protamine sulfate. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2007; 18: 279-81.
18. Astermark J. FVIII inhibitors: pathogenesis and avoidance. *Blood* 2015; 125: 2045-51.
19. Largo R, Sigg P, von Felten A, Straub PW. Acquired factor-IX inhibitor in a nonhaemophilic patient with autoimmune disease. *Br J Haematol* 1974; 26: 129-40.
20. Ozsoylu S, Ozer FL. Acquired factor IX deficiency. A report of two cases. *Acta Haematol* 1973; 50: 305-14.
21. Castro O, Farber LR, Clyne LP. Circulating anticoagulants against factors IX and XI in systemic lupus erythematosus. *Ann Intern Med* 1972; 77: 543-8.
22. Pengo V, Tripodi A, Reber G, Rand JH, Ortel TL, Galli M, *et al.* Subcommittee on Lupus Anticoagulant/Antiphospholipid Antibody of the Scientific and Standardisation Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. Update of the guidelines for lupus anticoagulant detection. *J Thromb Haemost* 2009; 7: 1737-40.
23. W Collins P, Chalmers E, Hart D, Jennings I, Liesner R, Rangarajan S, *et al.* Diagnosis and management of acquired coagulation inhibitors: a guideline from UKH-CDO. *Br J Haematol* 2013; 162: 758-73.
24. Favalaro EJ, Verbruggen B, Miller CH. Laboratory testing for factor inhibitors. *Haemophilia* 2014; 20 Suppl 4: 94-8.
25. Exner T. Conceptions and misconceptions in testing for lupus anticoagulants. *J Autoimmun* 2000; 15: 179-83.
26. Duboscq C. Coagulación. Pruebas globales y determinación de factores. En: Blanco A, Kordich L, Bermejo E, Forastiero R, Lauricella AM, Pieroni G, Quintana I, Scazziota A, editores. *Fundamentos para el manejo práctico en el laboratorio de hemostasia*. 2da. ed. La Plata: Federación Bioquímica de la Provincia de Buenos Aires; 2013. p249-333.
27. Kershaw G, Jayakodi D, Dunkley S. Laboratory identification of factor inhibitors: the perspective of a large tertiary hemophilia center. *Semin Thromb Hemost* 2009; 35: 760-8.
28. Verbruggen B, van Heerde WL, Laros-van Gorkom BA. Improvements in factor VIII inhibitor detection: From

- Bethesda to Nijmegen. *Semin Thromb Hemost* 2009; 35: 752-9.
29. Cugno M, Gualtierotti R, Tedeschi A, Meroni PL. Autoantibodies to coagulation factors: from pathophysiology to diagnosis and therapy. *Autoimmun Rev* 2014; 13: 40-8.
  30. Matsumoto T, Nogami K, Shima M. Coagulation function and mechanisms in various clinical phenotypes of patients with acquired factor V inhibitors. *J Thromb Haemost* 2014; 12: 1503-12.
  31. Franchini M, Frattini F, Crestani S, Bonfanti C. Acquired FXIII inhibitors: a systematic review. *J Thromb Thrombolysis* 2013; 36: 109-14.
  32. 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.
  33. Shimura H, Imai Y, Ieko M, Shiseki M, Mori N, Teramura M, *et al.* Transient lupus anticoagulant with a prolonged activated partial thromboplastin time secondary to cytomegalovirus-related infectious mononucleosis. *Ann Hematol* 2013; 92: 143-4.
  34. Male C, Lechner K, Eichinger S, Kyrle PA, Kapiotis S, Wank H, *et al.* Clinical significance of lupus anticoagulants in children. *J Pediatr* 1999; 134: 199-205.
  35. de Larrañaga GF, Forastiero RR, Martinuzzo ME, Carreras LO, Tsariktsian G, Sturno MM, *et al.* High prevalence of antiphospholipid antibodies in leprosy: evaluation of antigen reactivity. *Lupus* 2000; 9: 594-600.
  36. Conley CL, Hartmann RC. A hemorrhagic disorder caused by circulating anticoagulant in patients with disseminated lupus erythematosus. *J Clin Invest* 1952; 31: 621-2.
  37. Blanco AN, Lazzari MA. Simultaneous occurrence of lupus anticoagulant and factor VIII inhibitors in hemophilia. *Am J Hematol* 1998; 58: 248.
  38. Moore GW, Henley A, Greenwood CK, Rangarajan S. Further evidence of false negative screening for lupus anticoagulants. *Thromb Res* 2008; 121: 477-84.
  39. Blanco AN, Grand BE, Pieroni G, Peñalva LB, Voto LS, Lazzari MA. Behavior of diluted activated partial thromboplastin time in pregnant women with a lupus anticoagulant. *Am J Clin Pathol* 1993; 100: 99-102.
  40. Blanco AN, Cardozo MA, Candela M, Santarelli MT, Pérez Bianco R, Lazzari MA. Anti-factor VIII inhibitors and lupus anticoagulants in haemophilia A patients. *Thromb Haemost* 1997; 77: 656-9.
  41. Triplett DA. Simultaneous occurrence of lupus anticoagulant and factor VIII inhibitors. *Am J Hematol* 1997; 56: 195-6.
  42. Blanco AN, Alcira Peirano A, Grosso SH, Gennari LC, Pérez Bianco R, Lazzari MA. The chromogenic substrate method for the detection and titration of anti-factor VIII antibodies in the presence of lupus anticoagulant. *Haematologica* 2002; 87: 271-8.
  43. Remotti L, Grosso SH, Ingratti MF, Vera Morandini MP, Woods AI, Bermejo EI, *et al.* Inhibidor lúpico en situaciones clínicas diferentes al síndrome antifosfolípido. *Boletín de la Academia Nacional de Medicina* 2015 (en prensa).

**Recibido: 5 de mayo de 2016.**

**Aceptado: 10 de mayo de 2016.**