



Cátedra y Servicio Especializado de Hematología
Departamento de Bioquímica Clínica
Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas
Universidad Nacional de Rosario
Sala IX - Hospital Provincial del Centenario
Urquiza 3101 - 2000 Rosario
Te: 0341-4804592 / 4804593 Interno: 247



Carrera de Postgrado:
Especialista en Bioquímica Clínica: Hematología

Tema: Síndrome Antifosfolípido

Germán A. Detarsio

Año 2006

Directora: Dra. Alicia Blanco

Agradecimientos:

Este trabajo es el fruto de muchos años de aprendizaje y dedicación. Es el premio a la pasión por el tema y a la paciencia de todos aquellos que estuvieron presentes en este proceso.

Esta nueva etapa académica no es más que la suma del esfuerzo de mucha gente, de mi esposa Rosana y mis hijas Ana y Maite, que soportan mis ausencias, de la Dra. Angela Milani, que por esas cosas de la vida me zambulló en el universo de la Hematología y me apoyó en todos estos años, a la gente de la Academia Nacional de Medicina, entre las que me gustaría nombrar a la Dra María Lazzari, que siempre me recibió y me brindó apoyo, a la Dra Alicia Blanco, mi directora y maestra, a la Dra. Fabiana Alberto, compañera, maestra y amiga. A los Dres Ricardo Forastiero y Marta Martinuzzo por brindarme toda su experiencia y sabiduría, al Dr. Josep Ordi – Ros y a todos mis compañeros del Hospital Vall d’Hebrón en Barcelona con los que compartí momentos inolvidables, a la Dra. Mónica Harraca con quien compartí varios años de trabajo, a mis compañeros de la Cátedra, y a los alumnos porque la docencia fue el motivo fundamental de todos estos años de aprendizaje.

A todos ...Muchas gracias.

Abreviaturas:

SAF	Síndrome Antifosfolípido
ISTH	Sociedad Internacional de Hemostasia y Trombosis
AL	Anticoagulante Lúpico
ACA	Anticuerpos Anticardiolipina
VDRL	Prueba para sífilis
ELISA	Inmunoensayo en fase sólida
β_2 GPI	Beta 2 Glicoproteína I
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
TTPA	Tiempo de Tromboplastina Parcial Activado
dRVVT	Tiempo de veneno de víbora Russell diluido
TCK	Tiempo de Coagulación con Kaolín: Prueba de Exner
dRVVT - PNP	Prueba de Russell con corrección con plaquetas
TTPA – PNP	Prueba de tromboplastina parcial activada con corrección con plaquetas
E-Select	E-Selectina
VCAM – 1	Moléculas de adhesión vascular
ECAM – 1	Moléculas de adhesión a célula endotelial
EC	Célula Endotelial
TF	Factor Tisular
aPL/aFL	Anticuerpo Antifosfolípido
Plg	Plasminógeno
tPA	Activador Tisular del Plasminógeno

PAI – 1	Inhibidor del Activador Tisular del Plasminógeno
TM	Trombomodulina
EPCR	Receptor Endotelial de Proteína C
PC	Proteína C
PS	Proteína S
APC	Proteína C Activada
PT	Protrombina
T	Trombina
TFPI	Inhibidor de la Vía del Factor Tisular
AT	Antitrombina
An V	Anexina V
LES	Lupus Eritematoso Sistémico
AR	Artritis Reumatoidea
ACV	Accidente Cerebro Vascular
AIT	Accidente Isquémico Transitorio
SUH	Síndrome Urémico Hemolítico
PTT	Púrpura Trombocitopénica Trombótica
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
AO	Anticoagulantes Orales
RIN	Razón Internacional Normalizada
IR	Índice de Rosner
CV	Coefficiente de Variación
R	Coefficiente de Correlación

ÍNDICE GENERAL

1.1	Definición	Pág. 10
1.2	Reseña Histórica	Pág. 11
1.3	Subtipos de aPL clínicamente importantes	Pág. 12
1.4	Patogénesis	Pág. 14
1.5	Criterios para la clasificación y diagnóstico del SAF	Pág. 18
1.6	Epidemiología	Pág. 19
1.7	Diagnóstico Diferencial	Pág. 20
1.8	Rasgos Clínicos	Pág. 21
1.9	Rasgos Patológicos	Pág. 22
1.10	SAF en Obstetricia	Pág. 24
1.11	SAF Catastrófico	Pág. 26
1.12	Tratamiento	Pág. 27
1.13	Profilaxis	Pág. 28
1.14	Tratamiento del evento trombótico	Pág. 28
2	Evaluación del TTPA como prueba de diagnóstico del AL	Pág. 30
2.1	Objetivos	Pág. 30
2.2	Materiales y Métodos	Pág. 30
2.3	Resultados	Pág. 32
2.4	Discusión	Pág. 33
3	Bibliografía	Pág. 35

INDICE DE TABLAS

Tabla 1	Criterio clínico y de laboratorio para el diagnóstico de Síndrome Antifosfolípido ("Criterios de Sapporo")	Pág. 8
Tabla 2	Características principales de los 19 reactivos de TTPA analizados en el estudio	Pág. 33
Tabla 3	Concentración de fósforo, tamaño de los liposomas y sensibilidad para cada uno de los reactivos de TTPA estudiados.	Pág. 34

INDICE DE FIGURAS

Figura I	Diagnóstico de AL	Pág. 12
Figura II	Activación del endotelio por los aFL	Pág. 14
Figura III	Efecto de los aFL sobre los mecanismos hemostáticos	Pág. 15
Figura IV	Acción de los aFL sobre las células trofoblásticas	Pág. 15
Figura V	Correlación entre sensibilidad de TTPA al AL y concentración de fosfolípidos	Pág. 35
Figura VI	Correlación entre el tamaño de los liposomas y la sensibilidad del TTPA al AL	Pág. 36

Síndrome Antifosfolípido

1.1 Definición

Los anticuerpos Antifosfolípido constituyen una familia de autoanticuerpos que exhiben un amplio rango de especificidades. Reconocen varias combinaciones de fosfolípidos, complejos fosfolípido-proteína, o ambos. El término "Síndrome Antifosfolípido" (SAF) fue acuñado para identificar la asociación clínica entre la presencia de los anticuerpos antifosfolípido y el síndrome de hipercoagulabilidad.^{1,2} Los criterios de clasificación y diagnóstico del SAF, son revisados permanentemente en reuniones internacionales de consenso ³⁻⁹ (Tabla 1).

Tabla 1. Criterio clínico y de laboratorio para el diagnóstico de Síndrome Antifosfolípido ("Criterios de Sapporo")

Criterios clínicos (uno o más de los eventos clínicos siguientes debe estar presente)

- Trombosis vascular.
 - Uno o más episodios de trombosis arteriales, venosas, o de pequeños vasos, afectando cualquier tejido u órgano.
- Alteraciones obstétricas
 - Muerte inexplicada de un feto morfológicamente normal después de la semana 10 de gestación.
 - Nacimiento prematuro de neonatos morfológicamente normales antes de las 34 semanas de gestación, debido a preeclampsia severa, eclampsia, o insuficiencia placentaria severa.
 - Tres abortos espontáneos consecutivos inexplicados antes de la semana 10 de gestación.
- Enfermedad valvular cardíaca, endocarditis de Libman-Sachs
- Manifestaciones neurológicas: Corea, Sordera, Alteraciones de la conducta, Mielitis transversa y isquemias multifocales que pueden confundirse con enfermedad desmielinisante.
- Livedo reticularis, úlceras y necrosis cutánea

Criterios de laboratorio (uno o más de los hallazgos de laboratorio siguientes debe estar presente) *

- Anticuerpos anticardiolipina (IgG) o (IgM) a título moderado o alto en 2 o más ocasiones separadas por lo menos por 6 semanas.
- Anticoagulante Lúpico positivo, diagnosticado siguiendo el criterio de la ISTH⁹. Debe repetirse toda prueba positiva a las 6 semanas.
- Los anticuerpos anti-β₂-glicoproteína fueron incluidos recientemente como criterio de laboratorio para el diagnóstico de Síndrome Antifosfolípido en una reunión de consenso realizada en Sydney.

*El criterio de la ISTH para el diagnóstico del Anticoagulante Lúpico incluye: [1] la prolongación de un ensayo dependiente de fosfolípidos; [2] la evidencia de actividad del inhibidor en estudio de mezclas, [3] evidencia que la actividad del inhibidor es dependiente de fosfolípidos y [4] que no existan otras coagulopatías que puedan confundirse con el AL

1.2 Reseña Histórica

El primer anticuerpo antifosfolípido, se descubrió en pacientes con sífilis en 1906.¹⁰ El antígeno involucrado se identificó después como cardiolipina, un fosfolípido de origen mitocondrial.¹¹ Este descubrimiento se transformó en la base del desarrollo de la VDRL, prueba para diagnóstico de sífilis que se usa actualmente. El uso masivo de esta prueba entre los donantes de sangre puso en evidencia que los pacientes con lupus eritematoso sistémico tenían una VDRL positiva, sin evidencias clínicas o serológicas de sífilis.¹² En 1983, el Dr. Harris desarrolló un inmunoensayo en fase sólida (ELISA) para detectar los anticuerpos anticardiolipina.¹³ Este ensayo era más sensible que la VDRL para detectar los anticuerpos anticardiolipina. Además, descubre que los pacientes con Lupus y anticuerpos anticardiolipina y/o la presencia de Anticoagulante Lúpico presentaban un riesgo elevado de trombosis.¹³

A principio de los años noventa, dos grupos descubrieron que algunos anticuerpos anticardiolipina requieren la presencia de una proteína (β_2 glicoproteína I - β_2 GPI) para unirse a la cardiolipina.^{14,15} Este requisito es característico de los anticuerpos anticardiolipina encontrados en los pacientes con Lupus Eritematoso y en el SAF, pero no en los pacientes con sífilis u otras enfermedades.^{14,15,16} Los anticuerpos asociados a enfermedades infecciosas no sólo son independientes de la β_2 GPI, sino que además, ella es capaz de inhibir su unión a la cardiolipina.¹⁶ A partir de estas observaciones, se descubrió que existen anticuerpos que son capaces de unirse a las proteínas en ausencia de fosfolípidos.^{14,17} Esto nos llevó a cambiar el centro de atención desde los fosfolípidos hacia las proteínas que unen fosfolípidos.⁶

1.3 Subtipos de anticuerpos antifosfolípido clínicamente importantes

Los anticuerpos antifosfolípido más comúnmente identificados son el Anticoagulante Lúpico, los anticuerpos anticardiolipina y los anticuerpos anti- β_2 GPI. La diferencia entre ellos se basa fundamentalmente en la metodología utilizada para detectarlos. El Anticoagulante Lúpico se evidencia mediante técnicas de coagulación, ya que prolonga los tiempos de coagulación de las pruebas en las que intervienen los fosfolípidos. En cambio los anticuerpos anticardiolipina y anti β_2 GPI son detectados mediante técnicas de ELISA que miden la unión inmunológica de los anticuerpos a fosfolípidos o a complejos fosfolípido-proteína.

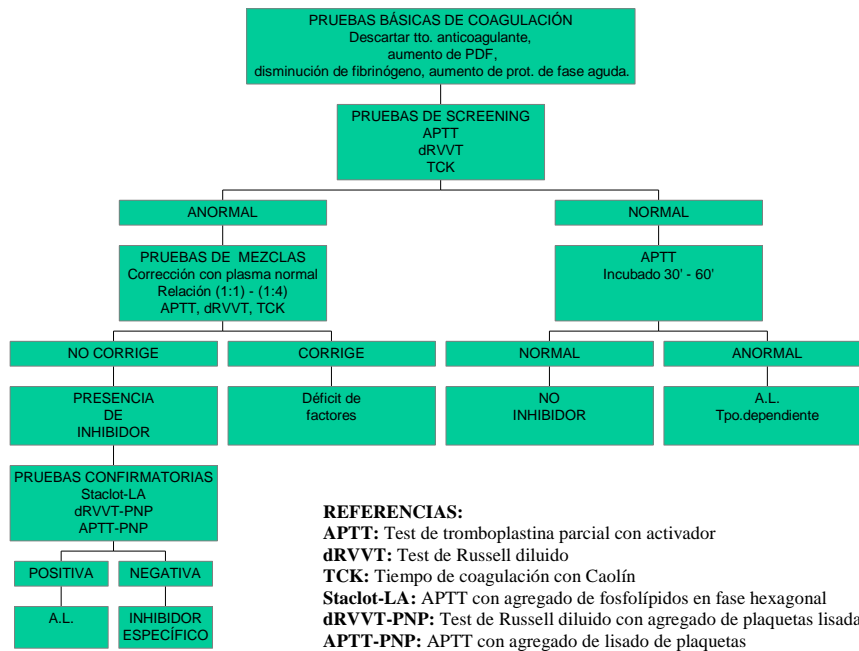
A pesar de que muchos pacientes presentan en forma simultánea AL, ACA y anti β_2 GPI, hoy sabemos que estos anticuerpos son diferentes entre sí.^{19, 20} Algunos anticuerpos con actividad de AL reaccionan con fosfolípidos diferentes a la cardiolipina o con proteínas diferentes a la β_2 GPI.^{7,21} Además los ACA o anti β_2 GPI no siempre presentan actividad de AL.^{19, 20} La mayoría de los anticuerpos anti β_2 GPI reconocen a la glicoproteína de la misma

manera cuando se encuentra asociada a cardiolipina o a otros fosfolípidos aniónicos. Esto se debe a que la β_2 GPI se une fuertemente a fosfolípidos de carga negativa, pero débilmente a fosfolípidos de carga neutra.²² En general, se considera que la presencia de AL es un marcador más específico para el diagnóstico de SAF, aunque los ACA son más sensibles.²³ La especificidad de los ACA para el diagnóstico de SAF aumenta en la medida que el título de los mismos se hace mayor y el isotipo IgG es mejor marcador que el IgM. Sin embargo, no hay ninguna asociación definitiva entre las manifestaciones clínicas y los subgrupos de anticuerpos antifosfolípido. Por consiguiente, deben usarse todas las pruebas cuando queremos detectar estos anticuerpos en un paciente con evidencia clínica de SAF, dado que pueden ser negativos para unas y positivos para otras.

A pesar de su nombre, el AL se asocia con eventos tromboembólicos, en lugar de sangrando. Los anticuerpos Antifosfolípidos pueden interferir con los mecanismos anticoagulantes y procoagulantes.²⁴ Aunque In Vitro, se observa una interferencia en la activación de trombina, In Vivo predomina la alteración de la función de los inhibidores naturales de la coagulación y por este motivo, se favorece la trombosis.²⁴

Actualmente, la Sociedad Internacional de Hemostasia y Trombosis (ISTH) ha propuesto un algoritmo diagnóstico para el AL que cuenta con la combinación de diferentes pruebas de screening, mezclas y de confirmación con alto y bajo contenido de fosfolípidos. Para descartar el diagnóstico de AL, deben dar negativos, dos o más ensayos sensibles a estos anticuerpos (Fig. I).^{3,9,18}.

Figura I: Diagnóstico de Anticoagulante Lúpico



El criterio actual para la clasificación del SAF recomienda el uso de pruebas de ELISA que detecten los ACA dependientes de β_2 GPI en sus isotipos IgG e IgM.^{3,25} (Tabla1). La relación entre los ACA y la β_2 GPI ha hecho que se desarrollaran tests de ELISA para medir la actividad de anti- β_2 GPI.^{6,14,15,17} Estos anticuerpos han sido incluidos recientemente dentro de los criterios de diagnóstico de SAF y están fuertemente relacionados con el desarrollo de trombosis y otros rasgos del SAF.^{20,26,27} La utilidad clínica de los ensayos que miden anticuerpos dirigidos contra proteínas o fosfolípidos diferentes a la β_2 GPI y a la cardiolipina, sigue siendo poco clara.^{4,5,6,7,8}

1.4 Patogénesis

Se han propuesto varias hipótesis para explicar los mecanismos celulares y moleculares por los que los anticuerpos de antifosfolípido favorecen la trombosis. La primera involucra la activación de células endoteliales. La unión de estos anticuerpos induce la activación de las

células endoteliales, que se evidencia por la exposición de moléculas de adhesión, la secreción de citocinas, etc.²⁸ Los anticuerpos antifosfolípido son capaces de unirse a la β_2 GPI unida a las células endoteliales en reposo, aunque la interacción de la β_2 GPI con las células endoteliales no se conoce con certeza.²⁹ (Fig. II) Una segunda teoría propone que estos anticuerpos interfieren o modulan la función de proteínas involucradas en los mecanismos de control de la coagulación. Entre ellas podemos nombrar a la proteína C y anexina V.^{25,34,35} Aunque sabemos poco sobre la función biológica de la β_2 GPI, se sabe que posee actividad anticoagulante.³³ (Fig. III y IV)

La trombosis en el síndrome antifosfolípido se asemeja a lo que sucede en los pacientes con Trombocitopenia Inducida por Heparina.³⁶ Ambos síndromes se presentan eventos trombóticos arteriales y venosos.^{36,37} En pacientes con Trombocitopenia Inducida por Heparina, la trombosis se relaciona con alguna enfermedad cardiovascular asociada. Considerando que en el SAF hay una proporción importante de pacientes que presentan más de un evento trombótico arterial o venoso similar, podemos sospechar que es necesaria la existencia de alguna causa predisponente, como por ejemplo, lesión vascular, para que ocurra la trombosis.

Finalmente, no se conoce con claridad aún cuales son los targets antigénicos para los anticuerpos antifosfolípido "in vivo". La ausencia de fosfolípidos aniónicos en la superficie de las células en reposo y la falta de reactividad de los anticuerpos con células intactas sugieren que sea necesaria una perturbación de la membrana celular para que los anticuerpos antifosfolípido puedan unirse a las células. De hecho, algunos anticuerpos antifosfolípido reaccionan con plaquetas activadas³⁸ y células apoptóticas,³⁹ que han perdido la distribución asimétrica normal de fosfolípidos de la membrana y exponen fosfolípidos

aniónicos en su superficie. La unión de los anticuerpos antifosfolípido a las células apoptóticas es dependiente de β_2 GPI,³⁹ como lo es también la inducción de dichos anticuerpos por estas células.⁴⁰

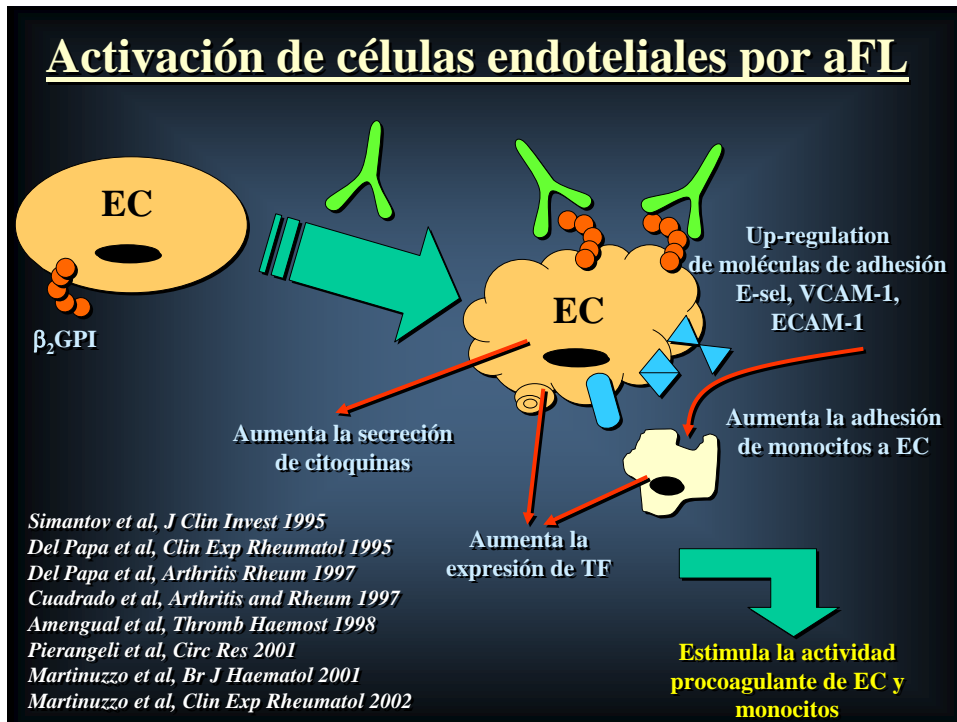


Figura II: Los anticuerpos antifosfolípido, al unirse a las células endoteliales, pueden activarlas favoreciendo la expresión de moléculas de adhesión, secreción de citocinas y exposición de factor tisular sintetizado “de novo” Todas estas situaciones favorecen la activación de la coagulación.

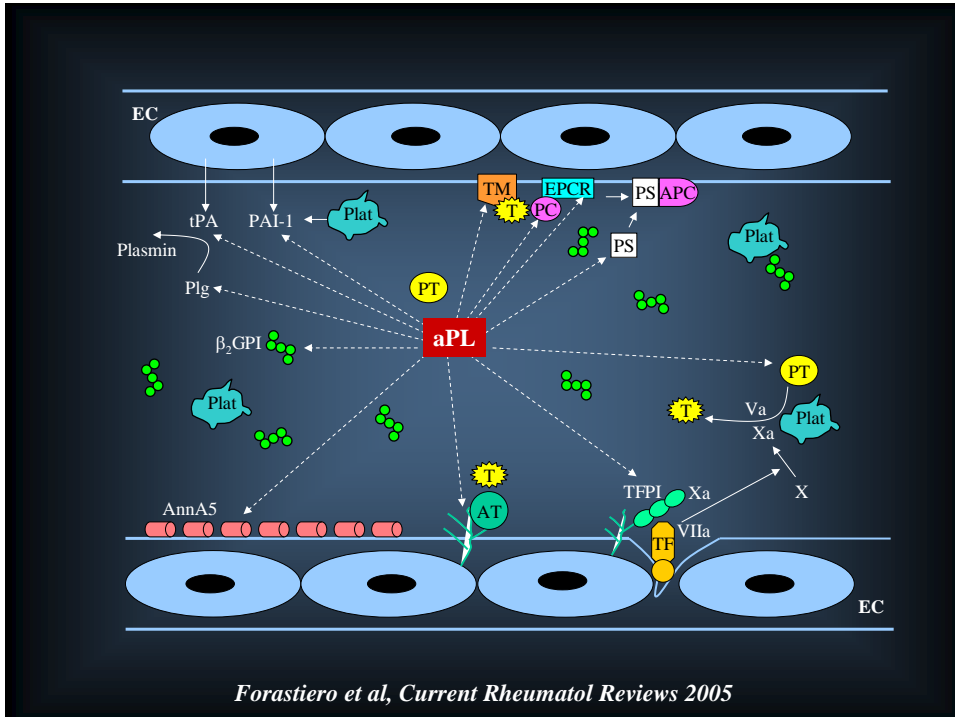


Figura III: Los anticuerpos antifosfolípido son capaces de interferir el funcionamiento de todas las etapas del sistema hemostático, tanto de sus activadores, como sus inhibidores fisiológicos. Por lo tanto pueden romper el equilibrio hemostático llevando al paciente a una situación de mayor riesgo trombótico. Algunos autores consideran que la trombosis se produce cuando se suma alguna situación predisponente. (Hanly JG, CMAJ 2003)

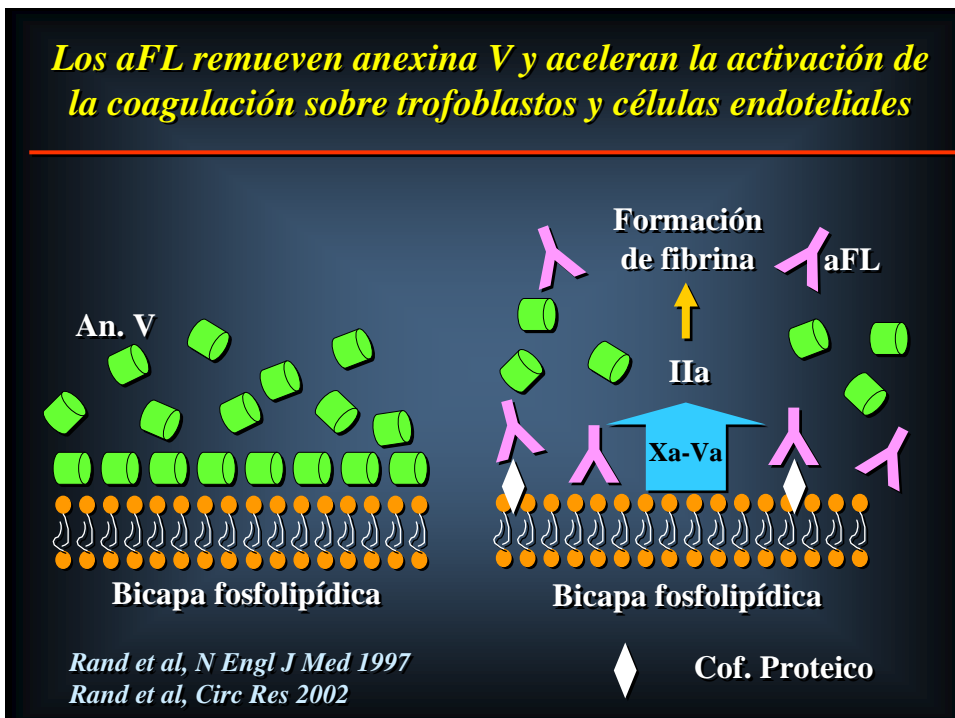


Figura IV La anexina V es un inhibidor fisiológico de la coagulación que se encuentra en alta concentración en la superficie de las células trofoblásticas. El desplazamiento competitivo de la anexina V por los aFL sobre la superficie trofoblástica es uno de los mecanismos propuestos para explicar las pérdidas fetales en el SAF.

1.5 Criterio para la clasificación y diagnóstico del SAF

Un paciente con síndrome antifosfolípido debe presentar por lo menos, un criterio clínico (trombosis vascular o complicaciones obstétricas) y al menos un criterio de laboratorio. Durante mucho tiempo la trombocitopenia ha sido considerada criterio clínico de SAF, actualmente se ha descartado ^{2,41,42,43,44,45,46} debido a que puede aparecer en una gran variedad situaciones que no se relacionan con el SAF. En la actualidad, la trombosis y las alteraciones obstétricas son las manifestaciones clínicas que presentan mayor asociación con el SAF.

El SAF puede ser dividido en al menos tres categorías:

- SAF Primario: ocurre en pacientes sin evidencia clínica de otra enfermedad autoinmune

- SAF Secundario: ocurre en asociación con otra enfermedad autoinmune u otras enfermedades. Dado que el Lupus Eritematoso Sistémico (LES) es la enfermedad autoinmune más común con la que el SAF se asocia, en un principio se dividía a los pacientes en SAF primario y los asociados a LES.⁴⁷ La asociación de anticuerpos antifosfolípido con otras enfermedades reumáticas, a excepción de la Artritis Reumatoidea (AR),⁴⁸ es más rara y se basa generalmente en reportes de casos. Muchos pacientes con Síndrome de Sneddon, definido como la tríada clínica de Stroke, Livedo Reticularis e hipertensión, pueden ser en realidad casos de SAF no diagnosticado.⁴⁹ Aunque los anticuerpos antifosfolípido también aparecen asociados a infecciones, cáncer, ciertas drogas o hemodiálisis, normalmente son anticuerpos de isotipo IgM con niveles bajos y no presentan trombosis.⁵⁰

- SAF Catastrófico: se describirá más adelante.

1.6 Epidemiología

Los anticuerpos antifosfolípido se encuentran en jóvenes, aparentemente sanos con una prevalencia de 1 a 5 por ciento tanto para ACA como para AL.⁵¹ Como sucede con otros autoanticuerpos, el predominio de ACA y AL aumenta con la edad, sobre todo en ancianos con enfermedades crónicas asociadas.⁵¹ Entre los pacientes con LES, la prevalencia de anticuerpos antifosfolípido es más alta, oscilando entre el 12 y el 30 por ciento para ACA^{48,52} y entre el 15 y el 34 por ciento para el AL.^{52,53}

Muchos pacientes presentan AL y/o ACA positivos sin manifestaciones clínicas de SAF. En la actualidad, no disponemos de datos suficientes para poder predecir que porcentaje de ellos sufrirá un evento trombótico o una complicación obstétrica a lo largo de su vida. Por el contrario, luego de 20 años de seguimiento, sabemos que entre un 50 y 70 por ciento de los pacientes con LES y anticuerpos antifosfolípido, desarrollará un SAF a lo largo de la evolución de la enfermedad.^{43,51} Otras evidencias muestran que el 30 por ciento de los pacientes con LES y ACA, podrán pasar al menos una media de 7 años sin mostrar manifestaciones clínicas de SAF.⁴³

Estudios prospectivos han demostrado una asociación entre los anticuerpos antifosfolípido y el primer episodio de trombosis venosa⁵⁴ el primer infarto de miocardio,⁵⁵ y episodios de stroke recurrentes.⁵⁶ Un problema crítico, por consiguiente, es la identificación de aquellos pacientes con anticuerpos antifosfolípido que tienen mayor riesgo y que aún no han sufrido una trombosis. Entre los factores de riesgo más comúnmente encontrados vemos, antecedentes trombóticos,^{57,58} la presencia de AL,^{18,59} y un nivel elevado de ACA (IgG),^{2,55,57} cada uno de los cuales aumenta el riesgo de trombosis cinco veces, aunque no todos los estudios están de acuerdo con ello.⁶⁰ La persistencia de anticuerpos antifosfolípido, también

parece aumentar el riesgo de trombosis.² Excepto los antecedentes de trombosis, ninguno de los factores de riesgo individuales nombrados anteriormente son suficientes para tomar la decisión de indicar un tratamiento preventivo.

1.7 Diagnóstico diferencial

El SAF es un estado protrombótico adquirido en el que la trombosis puede ocurrir tanto en el árbol vascular venoso como arterial.⁶¹ Al igual que otras condiciones que predisponen al paciente a la trombosis venosa y arterial (trombocitopenia inducida por heparina, hiperhomocisteinemia, síndromes mieloproliferativos e hiperviscosidad), el SAF primario, puede diagnosticarse mediante estudios de laboratorio de rutina, debido a que presentan AL y/o ACA positivos. Es importante tener en cuenta que un TTPA normal, no excluye la presencia de AL. Un paciente que sufre un evento trombotico por primera vez, debe ser estudiado para detectar la presencia de ACA y buscar el AL con protocolos completos que incluyan, al menos, tres pruebas de screening. En aquellos pacientes que sufren patologías crónicas en las cuales, la isquemia lleva a un deterioro progresivo de la función del órgano afectado, el SAF puede ser más difícil diagnosticar.

Deben investigarse las causas de trombosis que se asocian con la presencia de anticuerpos antifosfolípido. Evaluar la presencia de factores que afecten la integridad del árbol vascular venoso y/o arterial como pueden ser cambios hemodinámicos, lesión vascular, el uso de medicamentos, como los anticonceptivos orales, y otros factores de riesgo tradicionales para la enfermedad aterosclerótica. Eliminar o reducir el efecto de estos factores es fundamental, debido a que la presencia de ACA y/o AL solos, son insuficientes para generar la trombosis. En general, se requiere de una causa predisponente asociada para que la trombosis se manifieste.

Finalmente, incluso en pacientes con SAF documentado, discernir entre causa y efecto puede ser dificultoso. Por ejemplo, el SAF puede asociarse a Síndrome Nefrótico, el cuál de por sí es un factor predisponente de trombosis.

1.8 Rasgos clínicos

Aunque la asociación de manifestaciones clínicas con la presencia de anticuerpos antifosfolípido es más clara en el SAF primario, no hay ninguna diferencia en la clínica en los pacientes con SAF primario y SAF secundario ⁴⁴ Virtualmente cualquier órgano puede ser involucrado, y la magnitud de la afección puede variar en un espectro muy amplio. Se aprecian mejor los efectos de los anticuerpos antifosfolípido desde el punto de vista patogénico, si tenemos en cuenta la naturaleza y el tamaño de los vasos afectados y la agudeza o cronicidad del proceso trombótico.

La trombosis venosa profunda, especialmente de las piernas, es la manifestación más común del SAF, dado que ocurre entre el 29 y el 55 por ciento de pacientes. ^{42,43,44} La mitad estos pacientes sufrirán una embolia de pulmón. ^{42,43,44} Las trombosis arteriales son menos frecuentes que las venosas ^{42,43,44} y la mayoría se ponen de manifiesto con síntomas de isquemia o infarto. La severidad de la presentación se relaciona con la agudeza y magnitud de la oclusión. El cerebro es el sitio más común, ocupando casi el 50 por ciento de las trombosis arteriales y los pacientes presentan síntomas de ACV isquémico y accidentes isquémicos transitorios (AIT). ⁴² Las oclusiones arteriales coronarias ocupan un 23 por ciento adicional; y el 27 por ciento restante, involucra arterias como la subclavia, renal, retiniana y del pie. ⁴² Debemos tener en cuenta el SAF puede afectar lechos vasculares que raramente serían afectados por otros estados de hipercoagulabilidad.

No todos los episodios de isquemia o infarto arterial son originariamente trombóticos. La embolia, sobre todo la producida por vegetaciones de la válvula mitral o aórtica, puede ocasionar eventos de isquemia cerebral. La frecuencia de anomalías en las válvulas cardíacas parece ser bastante alta entre los pacientes con SAF, alcanzando hasta un 63 por ciento.⁴⁴ Aunque muchas de estas anomalías casi no presentan consecuencias clínicas, las vegetaciones de la válvula mitral o la válvula aórtica, están presentes en aproximadamente el 4 por ciento de pacientes con SAF primario o secundario.⁴⁴

La afección aguda a nivel de los capilares, arteriolas o venulas puede generar un cuadro clínico indistinguible de otras enfermedades que presentan microangiopatía trombótica como son el Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) o la Púrpura Trombocitopénica Trombótica (PTT). La microangiopatía trombótica también puede ocurrir como un proceso crónico, produciendo una pérdida lenta y progresiva de la función del órgano. Por lo tanto, en el SAF, la función del órgano afectado, puede perderse en forma aguda o progresiva y silenciosa. Dependiendo del tamaño de los vasos afectados, la falla del órgano puede explicarse de dos maneras, por un proceso de microangiopatía trombótica o por embolia secundaria a un evento trombótico.

Otras manifestaciones clínicas comunes en el SAF, incluyen trombocitopenia (en 40 a 50 por ciento de pacientes), anemia hemolítica (en 14 a 23 por ciento), y lívido reticularis (en 11 a 22 por ciento).^{42,43,44} Aunque las manifestaciones renales son un rasgo muy común del LES, muchos de ellos también tienen diagnóstico de SAF. Los pacientes con SAF y afección renal, casi siempre presentan hipertensión.⁶³

1.9 Rasgos patológicos

El SAF presenta hallazgos histopatológicos que reflejan una combinación de efectos patológicos mayores como son: la microangiopatía trombótica, isquemia secundaria a una trombosis arterial o venosa y la embolia de venas o arterial periféricas, o de origen cardíaco.^{46,63,64} El patrón histopatológico que observamos en el SAF, no difiere del encontrado en otras trombofilias.

La microangiopatía trombótica, en el SAF, ocurre cuando se afecta la microcirculación. Sus hallazgos histológicos tampoco son específicos del SAF y pueden verse en una gran variedad de otras enfermedades y síndromes, incluyendo el SUH, la PTT, hipertensión maligna, esclerodermia, lesión inducida por radiación, falla renal en el embarazo, y la microangiopatía trombótica inducida por drogas (ciclosporina, mitomicina C, etc). Si bien, los cambios agudos producidos por la microangiopatía trombótica son bastante prominentes, los cambios crónicos pueden ser sutiles y fácilmente pasados por alto. Los cambios agudos incluyen congestión capilar y depósito de fibrina, generalmente sin inflamación.^{45,46,63,65,66}

Las técnicas de inmunofluorescencia revelan predominio de fibrina sin evidencia de complejos inmunes.^{63,66} Los cambios crónicos, provocados por la falta de perfusión, llevan a la atrofia y fibrosis.^{45,63,66,67} Durante la fase aguda, el depósito de fibrina y las células sanguíneas fragmentadas, ocluyen la luz vascular progresando hacia oclusiones vasculares fibrosas.^{63,66} El flujo de sangre puede ser restaurado por el desarrollo de vasos colaterales.⁶³

La vasculitis prácticamente no presenta asociación con el SAF primario.^{46,63} En el SAF secundario, la vasculitis, se atribuye más al LES que al SAF. Aunque hay una confusión enorme con respecto a la terminología usada para describir las lesiones vasculares asociadas al LES, en el SAF, la enfermedad vaso oclusiva, independientemente del tamaño del vaso involucrado, se debe a trombosis.⁴⁶

1.10 SAF en Obstetricia

Las mujeres con anticuerpos antifosfolípido tienen un riesgo mayor de pérdidas de embarazo dentro del periodo fetal (10 o más semanas de gestación).^{68,69} En contraste, en mujeres no seleccionadas con aborto esporádico o recurrente, las pérdidas de embarazo normalmente ocurren en el periodo preembrionario (menos de seis semanas de gestación) o el periodo embrionario (seis a nueve semanas de gestación). Los embarazos en mujeres que presentan anticuerpos antifosfolípido también pueden complicarse debido a patología hipertensiva o insuficiencia placentaria.^{70,71} Estudios recientes han implicado también a los anticuerpos antifosfolípido como responsables de abortos recurrentes en fase preembrionaria y embrionaria.^{72,73,74} Entre la población de mujeres estudiadas, un 10 a 20 por ciento presentó anticuerpos antifosfolípido sin otra causa médica de aborto.^{72,73,74,75,76,77} En 1999 se promulga un acuerdo internacional que provee criterios separados para estas dos poblaciones aparentemente diferentes.³ (Tabla 1).

Las complicaciones obstétricas en mujeres con SAF pueden ser el resultado de alteraciones en la perfusión placentaria⁷⁸ debido a trombosis localizadas, quizás a través de la interacción de los anticuerpos con anexina V.³⁵ Los anticuerpos también puede alterar la invasión trofoblástica y la producción de hormonas, por eso no sólo pueden provocar pérdidas preembrionarias y embrionarias sino también la pérdida fetal y la insuficiencia uteroplacentaria.⁷⁹

El tratamiento ha evolucionado considerablemente. En los primeros protocolos se utilizaban glucocorticoides, pero luego se demostró que la heparina era tan eficaz como la prednisona para evitar la pérdida del embarazo.⁸⁰ Recientemente dos ensayos prospectivos mostraron que heparina más aspirina en bajas dosis es más eficaz que la aspirina sola para evitar la

pérdida del embarazo en mujeres con anticuerpos antifosfolípido, especialmente cuando las pérdidas se producían en el primer trimestre de embarazo.^{75,76} Un tercer ensayo prospectivo con mujeres con anticuerpos antifosfolípido y pérdidas de embarazo sin historia previa de trombosis o de LES encontró proporciones similares de nacimientos vivos (aproximadamente 80 por ciento) tanto con el uso aspirina a bajas dosis como con placebo.⁷⁷ Esto sugiere que el tratamiento puede ser innecesario en algunas mujeres. Aunque la globulina inmune intravenosa se ha usado para tratar algunos desórdenes autoinmunes en el embarazo, un estudio controlado encontró que la globulina inmune intravenosa no ofrecía ninguna ventaja cuando se la comparó con heparina y aspirina para reducir las pérdidas de embarazo en mujeres con SAF.⁸¹

Actualmente, los expertos reconocen a las complicaciones obstétricas del SAF como una patología científicamente probada y tratable.^{82,83} Administrar heparina a las mujeres embarazadas después de comprobar la existencia de un embrión viable por ecografía es el tratamiento de elección, aunque todavía no haya buen consenso con respecto a la dosis. Las mujeres con historia de pérdidas de embarazo en fase preembrionaria y embrionaria sin historia de tromboembolismo pueden tratarse con dos dosis diarias de 5000 U de heparina,⁷⁵ pero los expertos recomiendan dosis más altas, para las mujeres con historia previa de trombosis.⁸⁴ El tratamiento óptimo para las mujeres con pérdida de embarazo durante el periodo fetal sin historia de tromboembolismo es polémico debido al riesgo potencial de tromboembolismo materno durante este período. Algunos proponen tromboprolifaxis a dosis altas (15,000 a 20,000 U de heparina por día) o tromboprolifaxis ajustada,^{70,71,80} pero no hay ningún estudio correctamente diseñado que sirva de guía. Los expertos también están de acuerdo en que puede sustituirse la heparina de bajo peso molecular por la heparina no

fraccionada para el tratamiento de mujeres embarazadas con SAF, aunque en la actualidad se usa casi exclusivamente heparina de bajo peso molecular.⁸⁴

1.11 Síndrome Antifosfolípido Catastrófico

En la mayoría de los pacientes con SAF, los eventos trombóticos ocurren individualmente. Las recidivas pueden ocurrir meses o años después del evento inicial. Sin embargo, una minoría de pacientes con SAF, pueden debutar con un cuadro agudo y devastador caracterizado por múltiples oclusiones vasculares simultáneas a lo largo del cuerpo, a menudo produciendo muerte. Este síndrome, llamado "síndrome antifosfolípido catastrófico", se caracteriza por la afección clínica de por lo menos tres sistemas u órganos diferentes a lo largo de un periodo de días o semanas con evidencia histológica de oclusiones múltiples de grandes o pequeños vasos.⁸⁵ Aunque las mismas manifestaciones clínicas vistas en el SAF primario y secundario también ocurren como parte del síndrome antifosfolípido catastrófico, hay diferencias importantes en la prevalencia y en el calibre de los vasos afectados. En el año 2003 un grupo europeo ha presentado una gran revisión de casos de pacientes con SAF catastrófico.⁸⁵

La trombosis venosa o arterial de vasos grandes es poco común en pacientes con SAF catastrófico porque tienden a presentar un cuadro agudo de microangiopatía trombótica que afecta vasos pequeños de múltiples órganos.⁸⁵ El riñón es el órgano que normalmente se encuentra afectado (en 78 por ciento de pacientes), seguido por los pulmones (en 66 por ciento), el sistema nervioso central (en 56 por ciento), el corazón (en 50 por ciento), y la piel (en 50 por ciento). La coagulación intravascular diseminada que no ocurre en SAF primario y secundario, ocurre en aproximadamente el 25 por ciento de pacientes con SAF catastrófico. Las manifestaciones de afección microvascular incluyen microangiopatía trombótica renal,

síndrome de distrés respiratorio del adulto, microtrombos y microinfartos cerebrales y microtrombos coronarios. La mayoría de los pacientes con afección renal tiene hipertensión, a menudo maligna, y aproximadamente el 25 por ciento requiere diálisis. La mortalidad es del 50 por ciento, y la muerte es normalmente debida a falla multiorgánica.⁸⁵

Los factores precipitantes del SAF catastrófico pueden ser: infecciones, procedimientos quirúrgicos, supresión de la terapia anticoagulante y el uso de drogas como los anticonceptivos orales.⁸⁵ Aunque la fisiopatología de este desorden no es clara, la trombosis puede desencadenarse en pacientes con un estado trombofílico subyacente. Así, una trombosis inicial en un paciente con SAF puede perturbar el equilibrio hemostático y puede poner en marcha un proceso llamado "Tormenta Trombótica" que produce trombosis múltiples a lo largo de todo el cuerpo.⁸⁶

Las recomendaciones para el tratamiento del SAF catastrófico son las siguientes: Combinación de anticoagulantes y esteroides más plasmaféresis o inmunoglobulina intravenosa.⁸⁵ La razón para el plasmaféresis deriva de su efectividad documentada en el tratamiento del SUH y de la PTT. También se ha usado con éxito estreptoquinasa y uroquinasa como agentes fibrinolíticos para tratar la microangiopatía trombótica aguda.^{85,86} Debido a que la trombosis tiende a perpetuarse,⁸⁶ en estos pacientes, debe utilizarse un protocolo terapéutico agresivo⁸⁵.

1.12 Tratamiento

El tratamiento puede planearse de acuerdo a cuatro áreas principales: la profiláctica, la prevención de trombosis extensas de grandes vasos, tratamiento de la microangiopatía trombótica aguda, y manejo del embarazo en asociación con anticuerpos antifosfolípidos.

Solo se describirá el tratamiento en las primeras dos áreas. La terapéutica indicada en las dos áreas restantes ya fue expuesta al describir el SAF catastrófico y las complicaciones obstétricas asociadas al SAF.

1.13 Profilaxis

Un estudio caso–control evaluó el papel de aspirina (325mg por día) como agente profiláctico.⁵⁴ La aspirina no ofreció protección contra la trombosis venosa profunda y la embolia pulmonar en médicos masculinos con ACA.⁵⁴ Por el contrario, la aspirina puede proporcionar protección en mujeres con SAF y antecedentes de pérdidas de embarazos.⁸⁷ La hidroxicloroquina puede ser útil para evitar la trombosis en pacientes con LES y SAF secundario.⁸⁸

Siempre deben tenerse en cuenta los factores que predisponen a la trombosis. Los factores de riesgo secundarios para aterosclerosis también deben ser tenidos en cuenta, dado el papel que cumple la lesión endotelial en el desarrollo de la trombosis asociada con los anticuerpos antifosfolípido^{30,36} y a las LDL oxidadas.^{31,32,56}

1.14 Tratamiento del evento trombótico

Tres estudios retrospectivos mostraron que la anticoagulación presenta un efecto beneficioso para disminuir la recurrencia de trombosis.^{60,89,90} En una serie pequeña de 19 pacientes con SAF, la proporción de recurrencia a ocho años era 0 por ciento para los pacientes tratados con anticoagulantes orales (AO).⁹⁰ Entre pacientes cuya terapia anticoagulante fue suspendida, la proporción de recurrencia ascendía al 50 por ciento en dos años y al 78 por ciento a los ocho años.⁹⁰ En dos series más grandes, el nivel de protección

contra trombosis venosa y arterial se correlacionaba directamente con el nivel de anticoagulación.^{60,89} En 70 pacientes con SAF, el tratamiento con AO a intensidad intermedia (RIN de 2.0 a 2.9) y a intensidad alta (RIN de 3.0 o más) redujo significativamente la recurrencia de trombosis mientras que el tratamiento de baja intensidad (RIN 1.9 o menos) no produjo el mismo efecto.⁸⁹ Resultados similares fueron observados en una serie de 147 pacientes con SAF.⁶⁰ En ambos estudios, la aspirina sola era incapaz de reducir la recurrencia de trombosis.^{60,89}

Varios puntos adicionales apoyan los efectos beneficiosos de la anticoagulación oral. Primero, la interrupción del uso del anticoagulante está asociada con un riesgo aumentado de trombosis^{59,60,90,91} e incluso la muerte,⁵⁹ sobre todo en los primeros seis meses después de suspender la terapia anticoagulante. Teniendo en cuenta que la tasa de recurrencia entre los que no recibieron tratamiento anticoagulante era tan alta como el 70 por ciento,^{60,89,90} el tratamiento con anticoagulantes orales debe ser indicado por largo tiempo, o bien de por vida. Segundo, no se sabe con certeza si es seguro tratar a los pacientes con SAF con AO a intensidad intermedia (RIN, 2.0 a 2.9) o si ellos requieren tratamiento de alta intensidad (RIN, 3.0 o más). Éste es un problema importante sin resolver ya que el tratamiento de alta intensidad expone a los pacientes a mayor riesgo de sangrado.⁹² En algunos estudios, el tratamiento a intensidad intermedia ha mostrado ser totalmente eficaz en la prevención de recurrencia de trombosis^{59,91,93,94,95} Finalmente, el control de laboratorio de los pacientes con SAF, que reciben tratamiento anticoagulantes orales, es complicado por la falta de reactivos estandarizados para la determinación del RIN y la interferencia potencial de los anticuerpos en el tiempo de protrombina.^{96,97}

2 Evaluación del TTPA como prueba de diagnóstico de AL

2.1 Objetivos

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la sensibilidad de 19 reactivos comerciales de TTPA para detectar el AL. Además, analizamos el tipo de activador, el origen de los fosfolípidos, la concentración fosfolipídica y el diámetro de los liposomas de cada uno de ellos, con el propósito de comprender o explicar las diferencias observadas.

2.2 Materiales y métodos

Pacientes: Se analizaron 56 plasmas de pacientes con AL positivo que concurrían al Hospital para su control y tratamiento. La edad promedio de los pacientes fue de 40 años (rango: 17 – 72 años). El diagnóstico clínico fue el siguiente: lupus eritematoso sistémico (LES) (n: 5), síndrome antifosfolípido (SAF) primario (n: 20), SAF secundario (n: 21) y sin enfermedad autoinmune conocida (n: 10). El SAF secundario, siempre se encontró asociado a LES, excepto en un caso que se asoció a dermatopolimiositis.

Pool normal: Fue preparado a partir de plasma de 20 voluntarios sanos, que no estaban tomando medicamentos y no presentaban antecedentes de alteraciones hemostáticas.

Muestras: Las muestras de plasma fueron obtenidas por punción venosa utilizando tubos de sistema de vacío que contenían citrato de sodio 0,11M, en una relación de 9 partes de sangre con 1 parte de anticoagulante. El plasma pobre en plaquetas se obtuvo por doble centrifugación a 2500 G durante 15 minutos, en una centrífuga refrigerada a 4°C. Las alícuotas de plasma así obtenidas se congelaron a –80°C hasta ser procesadas.

Diagnóstico de AL: La presencia del AL fue definida siguiendo los criterios del subcomité de estandarización de la Sociedad Internacional de Hemostasia y Trombosis (SSC-ISTH)⁹. Se detectó la presencia del inhibidor a través de la prolongación de al menos una prueba de coagulación dependiente de fosfolípidos y su no corrección por el agregado

de plasma normal; confirmándose luego la dependencia del efecto inhibitorio de la concentración de fosfolípidos en el sistema. En los pasos de detección y mezcla con plasma normal se utilizaron las siguientes pruebas: TTPA empleando un reactivo de probada sensibilidad al inhibidor lúpico⁹⁸(PTT-LA, Stago, tiempo de coagulación con caolín⁹⁹ (KCT) y tiempo de coagulación con veneno de víbora Russell diluido¹⁰⁰ (dRVVT) (RVV, Stago). La dependencia de fosfolípidos se confirmó utilizando la prueba de inhibición con fosfolípidos hexagonales (StacLOT-LA, Stago) y el cociente Textarín/Ecarín (Stago)

Reactivos de TTPA: Se emplearon 19 reactivos comerciales diferentes [PTT-R[®], PTT-a[®], PTT-a liquid[®] y PTT-LA[®] (Stago); Actin FSL[®] y Actin FS[®] (Dade-Behring); Cefalina-L[®], APTT-L y APTT-LA (Grifols); Platelin LS[®] y Automated APTT[®] (Organon Teknika); APTT-P[®] y APTT-EA[®] (Biopool); Neothrontin[®] y Pathrontin[®] (Behring); Trombosil[®], Trombofax[®] y Synthasil[®] (Ortho) y APTT-S[®] (IL)]. Cada reactivo fue utilizado siguiendo las especificaciones recomendadas por los fabricantes. Las características de cada uno de ellos se muestran en la tabla 1. La respuesta de cada uno de los reactivos (un solo lote) fue evaluada frente a los plasmas con AL positivo y sus respectivas mezclas (1:1) con plasma normal, utilizando un coagulómetro ACL 300 Research (Instrumentation Laboratory). Todas las determinaciones fueron procesadas por duplicado.

Estudio del contenido fosfolipídico: Se realizó una extracción clorofórmica, siguiendo el método de Bligh and Dyer¹⁰¹ y el extracto se conservó bajo atmósfera de nitrógeno a -70°C hasta el momento de realizar los estudios. La cuantificación de los fosfolípidos se realizó según el método de Bartlett modificado¹⁰², para trabajar con pequeñas muestras y la concentración se expresó en micro moles de fósforo orgánico por mililitro ($\mu\text{mol/ml}$).

El tamaño de los liposomas de cada reactivo se midió con un analizador de partículas ultrafinas 'Microtrac' (Leeds & Northrup, Pennsylvania), cuyo principio de funcionamiento se

basa en medir la dispersión de la luz generada por las partículas.

Análisis de los datos: Para cada reactivo de TTPA se determinaron los coeficientes de variación (CV) y la amplitud de los valores obtenidos para el pool de 20 plasmas normales, procesado en diferentes días. En la evaluación de los plasma AL (+), el valor de corte aplicado para definir la presencia de inhibidor (no corrección con plasma norma) con cada uno de los reactivos de TTPA fue un Índice de Rosner (IR) $\geq 15\%$ ¹⁰³. La sensibilidad de cada reactivo, definida como el porcentaje de plasma AL (+) detectados, fue calculada siguiendo el criterio del IR. Se analizó además, la relación entre sensibilidad y concentración de fosfolípidos y sensibilidad y tamaño de los liposomas, calculándose en cada caso el coeficiente de correlación (r) mediante la curva de regresión lineal.

2.3 Resultados

-Comportamiento de los reactivos de TTPA frente al pool de plasma normal

El CV de los 18 de los reactivos que pudieron ser estudiados varió entre 1,05% (reactivo XVII) y 5,21% (reactivo XIX). El valor normal de TTPA más corto fue obtenido con el reactivo XV y el más largo con el reactivo IV (Tabla 2). A pesar de que el reactivo Pathromtin (reactivo XIII) puede ser utilizado en una gran variedad de coagulómetros automáticos, con el ACL 300 Research obtuvimos valores muy erráticos, posiblemente debido a su mayor turbidez.

-Comportamiento de los reactivos de TTPA frente a los plasma AL (+)

Los reactivos de TTPA difirieron considerablemente, en su habilidad para detectar la presencia de inhibidores AL (+). La sensibilidad, expresada en porcentaje, para cada reactivo de TTPA se muestra en la Tabla 2. En las condiciones de trabajo del presente estudio, los reactivos menos sensibles fueron: PTT-a liquid, Actin FS y Neothromtin (51,7% a 60,7%) y los más sensibles fueron: PTT-a, Cefalina L, Platelin LS, y Automated APTT

(100%). Acorde con el criterio adoptado para definir AL (+), la sensibilidad del PTT-LA fue 100%.

-Efecto de la concentración de fosfolípidos y el tamaño de los liposomas

La tabla 3 muestra la concentración de fosfolípidos y el tamaño de los liposomas obtenidos para cada uno de los reactivos analizados. La concentración de fósforo varió entre 0,039 $\mu\text{mol/ml}$ (Automated APTT) y 0,265 $\mu\text{mol/ml}$ (Actin FS) y los liposomas de los reactivos PTT-LA y Actin FS fueron los más pequeños y de tamaño más uniforme. Observamos una correlación significativa entre la sensibilidad para detectar AL y la concentración de fosfolípidos ($r=-0,9371$; $p<0.0001$) (Figura V). En cambio, no existe correlación significativa entre el tamaño de los liposomas y la sensibilidad al AL ($r=0,0062$; $p=0,982$) (Figura VI).

2.4 Discusión

La detección del AL es cada vez más solicitada en la práctica médica. Varias determinaciones han sido propuestas para su detección, siendo el TTPA una de las más utilizada en el paso de screening. Estudios previos han demostrado que la sensibilidad del TTPA para detectar la presencia del AL varía considerablemente, según el tipo de reactivo utilizado^{104,105,106}. Es por este motivo que decidimos realizar el presente estudio comparativo, en el cual evaluamos la sensibilidad de 19 reactivos comerciales de TTPA de diferentes marcas y presentaciones frente a 56 plasmas de pacientes que reunían criterios de LA (+). Discutiremos a continuación las conclusiones del análisis efectuado.

La sensibilidad al AL disminuye conforme aumenta el contenido de fosfolípidos del reactivo. Observamos una correlación negativa entre la concentración de fosfolípidos y la prolongación de las pruebas de TTPA.

Stevenson y otros autores^{104,107} postularon que la presentación de los fosfolípidos procoagulantes sobre la superficie de liposomas uniformemente organizados, aumenta la interacción de los mismos con los factores de coagulación. Usando un analizador de partículas ultrafinas, no hemos podido demostrar que a menor dispersión de tamaño liposomal, hubiera mayor sensibilidad para detectar los plasmas AL (+).

El origen de los fosfolípidos (vegetal, animal o sintético) y el tipo de activador de contacto en los reactivos de TTPA, no parecen poder explicar las diferencias encontradas en la sensibilidad al AL, dado que el mismo tipo de activador y de fosfolípidos fueron encontrados tanto entre los reactivos de mayor sensibilidad, como en los de menor sensibilidad. Los reactivos con fosfolípidos de origen animal no mostraron ser más sensibles que aquellos con fosfolípidos de origen vegetal.

En conclusión, según los datos obtenidos en el presente estudio, la característica más importante a la hora de seleccionar un reactivo de TTPA para el estudio de AL, es su concentración de fosfolípidos totales. Mientras menor sea la concentración total de fosfolípidos, mayor será la sensibilidad del TTPA frente al AL.

Tabla 2. Características principales de los 19 reactivos de TTPA analizados en el estudio

Reactivo	Fabricante	Activador	Origen de los Fosfolípidos	Amplitud del valor del pool normal (Segundos)	CV (%)	Sensibilidad(%) al AL (IR \geq 15%)
I. PTT-Reagent	Stago	Caolin	Cerebro de conejo	34,2 – 37,2	2,24	96,4
II. PTT-a	Stago	Sílica Micronizada	Cerebro de conejo	31,7 – 36,2	4,76	100
III. PTT-a liquid	Stago	Ácido Elágico	Cerebro de conejo	27,2 – 31,2	3,79	58,9
IV. PTT-LA	Stago	Sílica	Cerebro de conejo	36,4 – 39,4	2,92	100
V. Actin FSL	Dade	Ácido Elágico	Cerebro de Conejo y Soja	26,4 – 29,0	2,56	96,4
VI. Actin FS	Dade	Ácido Elágico	Soja	26,9 – 28,7	2,01	51,7
VII. Cefalina L	Grifols	Ácido Elágico	Soja	30,6 – 34,2	3,44	100
VIII. Platelin LS	Organon Teknika	Sílica Micronizada	Cerebro de conejo	29,7 – 32,4	3,06	100
IX. Automated APTT	Organon Teknika	Sílica Micronizada	Cerebro de conejo	30,2 – 33,2	3,10	100
X. APTT-P	Biopool	Silicato de Al-Mg	Cerebro de conejo	26,2 – 28,7	1,97	98,2
XI. APTT-EA	Biopool	Ácido Elágico	Cerebro de conejo	26,0 – 28,4	2,46	98,2
XII. Neothromtin	Behring	Ácido Elágico	Soja	26,5 – 29,7	3,53	60,7
XIII. Pathromtin	Behring	Caolín	Placenta humana	n.d	n.d	n.d
XIV. Trombosil	Ortho	Sílica	Cerebro de conejo	26,9 – 30,2	3,26	87,5
XV. Trombofax	Ortho	Ácido Elágico	Cerebro bovino	24,0 – 25,4	1,39	89,3
XVI. Synthasil	Ortho	Sílica	Fosfolípidos sintéticos	28,4 – 31,4	3,27	96,4
XVII. APTT-L	Grifols	Micro caolín	Soja	26,9 – 27,9	1,05	91,1
XVIII. APTT-LA	Grifols	Ácido Elágico	Soja	29,2 – 30,7	1,38	100
XIX. APTT-S	Instrumentation Laboratory	Sílica	Cerebro bovino	30,4 – 37,4	5,21	98,2

n.d.: no determinado; IR: Índice de Rosner

Tabla 3. Concentración de Fósforo, tamaño de los liposomas y sensibilidad para cada uno de los reactivos de TTPA estudiados.

Reactivo	Concentración de Fósforo ($\mu\text{mol/ml}$)	Rango de tamaño de los liposomas (μm)	Sensibilidad (%) al AL ($\text{IR} \geq 15\%$)
I. PTT-Reagent	0,110	0,07 - 3,0	96,4
II. PTT-a	0,045	0,09 - 2,0	100
III. PTT-a liquid	0,250	0,20 - 3,0	58,9
IV. PTT-LA	0,040	0,005 – 0,009	100
V. Actin FSL	0,115	0,07 - 2,0	96,4
VI. Actin FS	0,265	0,005 – 0,015	51,7
VII. Cefalina L	0,061	n.d.	100
VIII. Platelin LS	0,050	0,08 - 1,0	100
IX. Automated APTT	0,039	0,10 - 1,0	100
X. APTT-P	0,128	0,10 - 2,0	96,2
XI. APTT-EA	0,095	0,08 - 2,5	98,2
XII. Neothromtin	0,235	0,06 - 3,0	60,7
XIII. Pathromtin	0,073	0,04 - 3,5	n.d.
XIV. Trombosil	0,150	0,06 - 3,5	87,5
XV. Trombofax	0,140	0,07 - 7,0	89,3
XVI. Synthasil	0,118	0,03 - 2,0	96,4
XVII. APTT-L	0,127	0,10 - 1,0	91,1
XVIII. APTT-LA	0,060	0,01 - 1,3	100
XIX. APTT-S	0,126	0,08 - 2,0	96,2

n.d.: no determinado

Figura V: Curva de regresión entre sensibilidad de los reactivos de TTPA y la concentración de fosfolípidos de cada uno.

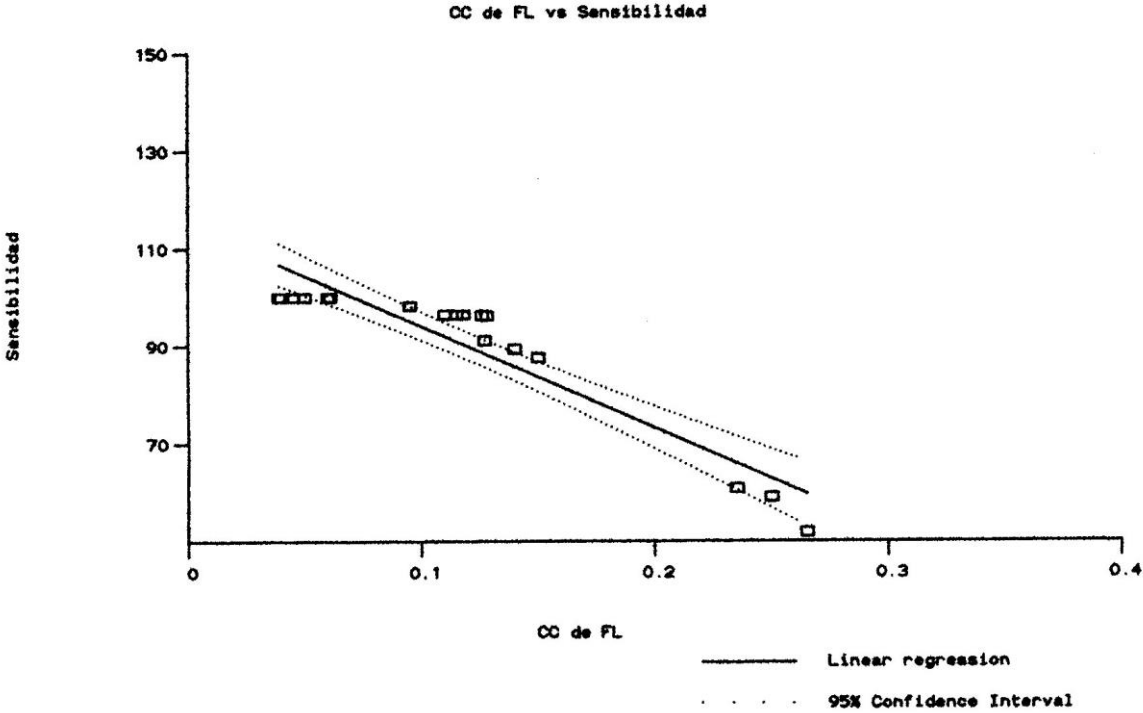
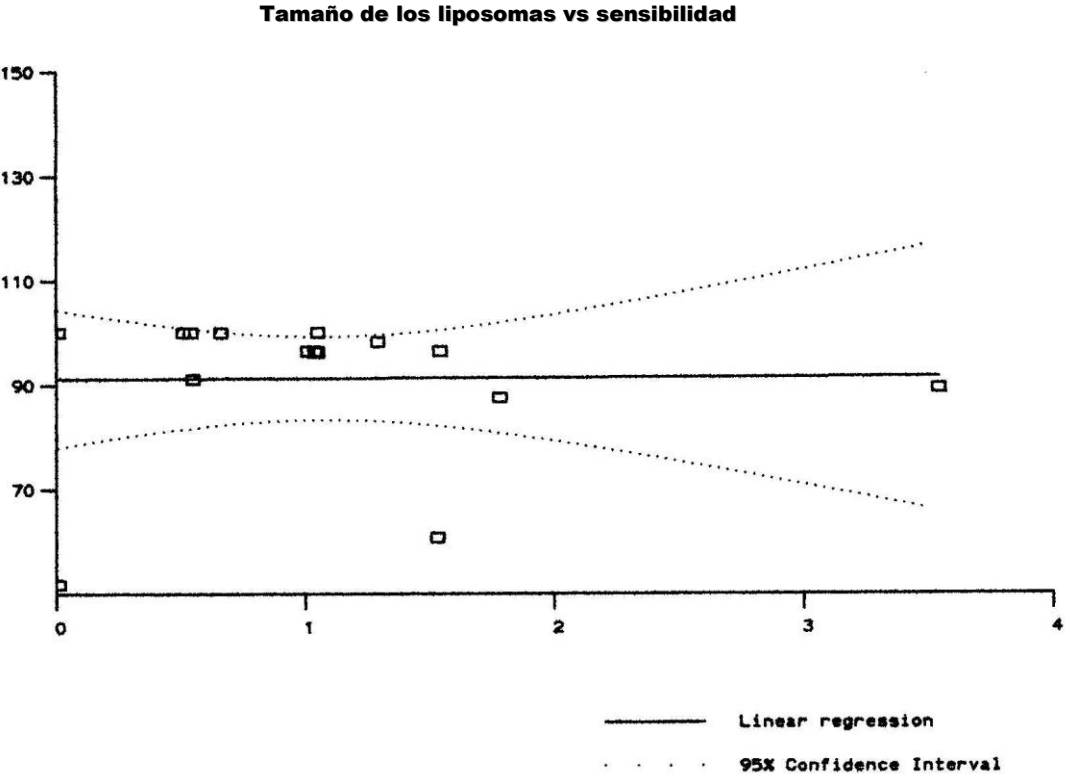


Figura VI: Curva de regresión entre sensibilidad de los reactivos de TTPA y el tamaño de los liposomas de cada uno.



3 Bibliografía

1. Hughes GRV, Harris EN, Gharavi AE. The anticardiolipin syndrome. *J Rheumatol* 1986;13:486-489.
2. Alarcón-Segovia D, Delezé M, Oria CV, et al. Antiphospholipid antibodies and the antiphospholipid syndrome in systemic lupus erythematosus: a prospective analysis of 500 consecutive patients. *Medicine (Baltimore)* 1989;68: 353-365.
3. Wilson WA, Gharavi AE, Koike T, et al. International consensus statement on preliminary classification criteria for definite antiphospholipid syndrome: report of an international workshop. *Arthritis Rheum* 1999;42:1309-1311.
4. McNeil HP, Chesterman CN, Krilis SA. Immunology and clinical importance of antiphospholipid antibodies. *Adv Immunol* 1991;49:193-280.
5. McIntyre JA, Wagenknecht DR. Anti-phosphatidylethanolamine (aPE) antibodies: a survey. *J Autoimmun* 2000;15:185-193.
6. Roubey RAS. Immunology of the antiphospholipid antibody syndrome. *Arthritis Rheum* 1996;39:1444-1454.
7. Oosting JD, Derksen RHWM, Bobbink IWG, Hackeng TM, Bouma BN, de Groot PG. Antiphospholipid antibodies directed against a combination of phospholipids with prothrombin, protein C or protein S: an explanation for their pathogenic mechanism? *Blood* 1993;81:2618-2625.
8. Galli M. Should we include anti-prothrombin antibodies in the screening for the antiphospholipid syndrome? *J Autoimmun* 2000;15:101-105.

9. Brandt JT, Triplett DA, Alving B, Scharrer I. Criteria for the diagnosis of lupus anticoagulants: an update. *Thromb Haemost* 1995;74:1185-1190.
10. Wassermann A, Neisser A, Bruck C. Eine serodiagnostische Reaktion bei Syphilis. *Deutsche Med Wochenschr* 1906;32:745-6.
11. Pangborn MC. A new serologically active phospholipid from beef heart. *Proc Soc Exp Biol Med* 1941;48:484-486.
12. Haserick JR, Long R. Systemic lupus erythematosus preceded by false-positive serologic tests for syphilis: presentation of five cases. *Ann Intern Med* 1952;37:559-565.
13. Harris EN, Gharavi AE, Boey ML, et al. Anticardiolipin antibodies: detection by radioimmunoassay and association with thrombosis in systemic lupus erythematosus. *Lancet* 1983;2:1211-1214.
14. Galli M, Comfurius P, Maassen C, et al. Anticardiolipin antibodies (ACA) directed not to cardiolipin but to a plasma protein cofactor. *Lancet* 1990;335:1544-1547.
15. McNeil HP, Simpson RJ, Chesterman CN, Krilis SA. Anti-phospholipid antibodies are directed against a complex antigen that includes a lipid-binding inhibitor of coagulation: B2-glycoprotein I (apolipoprotein H). *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87:4120-4124.
16. Hunt JE, McNeil HP, Morgan GJ, Cramer RM, Krilis SA. A phospholipid-beta 2-glycoprotein I complex is an antigen for anticardiolipin antibodies occurring in autoimmune disease but not with infection. *Lupus* 1992;1:75-81.
17. Arvieux J, Roussel B, Jacob MC, Colomb MG. Measurement of anti-phospholipid antibodies by ELISA using beta 2-glycoprotein I as an antigen. *J Immunol Methods* 1991;143:223-229.

18. Triplett DA. Lupus anticoagulant. In: Jespersen J, Bertina RM, Haverkate F, eds. Laboratory techniques in thrombosis — a manual: 2nd revised edition of the ECAT assay procedures. Dordrecht, the Netherlands: Kluwer Academic, 1999:183-7.
19. Galli M, Comfurius P, Barbui T, Zwaal RFA, Bevers EM. Anticoagulant activity of B2-glycoprotein I is potentiated by a distinct subgroup of anticardiolipin antibodies. *Thromb Haemost* 1992;68:297-300.
20. Viard J-P, Amoura Z, Bach J-F. Association of anti-B2 glycoprotein I antibodies with lupus-type circulating anticoagulant and thrombosis in systemic lupus erythematosus. *Am J Med* 1992;93:181-186.
21. Bevers EM, Galli M, Barbui T, Comfurius P, Zwaal RFA. Lupus anticoagulant IgG's (LA) are not directed to phospholipids only, but to a complex of lipid-bound human prothrombin. *Thromb Haemost* 1991;66:629-632.
22. Wurm H. B2-Glycoprotein-I (apolipoprotein H) interactions with phospholipid vesicles. *Int J Biochem* 1984;16:511-515.
23. de Groot PG, Derksen RHW. Specificity and clinical relevance of lupus anticoagulant. *Vessels* 1995;1:22-6.
24. Esmon NL, Safa O, Smirnov MD, Esmon CT. Antiphospholipid antibodies and the protein C pathway. *J Autoimmun* 2000;15:221-225.
25. Amengual O, Atsumi T, Khamashta MA, Hughes GR. The role of the tissue factor pathway in the hypercoagulable state in patients with the antiphospholipid syndrome. *Thrombosis & Haemostasis* 1998;79(2):276–81.

26. Cabral AR, Amigo MC, Cabiedes J, Alarcón-Segovia D. The antiphospholipid/cofactor syndromes: a primary variant with antibodies to B2-glycoprotein-I but no antibodies detectable in standard antiphospholipid assays. *Am J Med* 1996;101:472-481.
27. Carreras LO, Forastiero RR, Martinuzzo ME. Which are the best biological markers of the antiphospholipid syndrome? *J Autoimmun* 2000;15:163-172.
28. Meroni PL, Raschi E, Camera M, et al. Endothelial activation by aPL: a potential pathogenetic mechanism for the clinical manifestations of the syndrome. *J Autoimmun* 2000;15:237-240.
29. Meroni PL, Del Papa N, Raschi E, et al. B2-Glycoprotein I as a 'cofactor' for anti-phospholipid reactivity with endothelial cells. *Lupus* 1998;7:Suppl 2:S44-S47.
30. Ames PRJ. Antiphospholipid antibodies, thrombosis and atherosclerosis in systemic lupus erythematosus: a unifying 'membrane stress syndrome' hypothesis. *Lupus* 1994;3:371-377.
31. Vaarala O, Alfthan G, Jauhainen M, Leirisalo-Repo M, Aho K, Palosuo T. Crossreaction between antibodies to oxidised low-density lipoprotein and to cardiolipin in systemic lupus erythematosus. *Lancet* 1993;341:923-925.
32. Hörkkö S, Miller E, Dudl E, et al. Antiphospholipid antibodies are directed against epitopes of oxidized phospholipids: recognition of cardiolipin by monoclonal antibodies to epitopes of oxidized low density lipoprotein. *J Clin Invest* 1996;98:815-825.
33. Kandiah DA, Krilis SA. Beta2-glycoprotein I. *Lupus* 1994;3:207-212.
34. Roubey RAS. Tissue factor pathway and the antiphospholipid syndrome. *J Autoimmun* 2000;15:217-220.

35. Rand JH, Wu X-X, Andree HAM, et al. Pregnancy loss in the antiphospholipid-antibody syndrome -- a possible thrombogenic mechanism. *N Engl J Med* 1997;337:154-160. [Erratum, *N Engl J Med* 1997;337:1327.]
36. Arnout J. The pathogenesis of the antiphospholipid syndrome: a hypothesis based on parallelisms with heparin-induced thrombocytopenia. *Thromb Haemost* 1996;75:536-541.
37. Gruel Y. Antiphospholipid syndrome and heparin-induced thrombocytopenia: update on similarities and differences. *J Autoimmun* 2000;15:265-268.
38. Shi W, Chong BH, Chesterman CN. B2-Glycoprotein I is a requirement for anticardiolipin antibodies binding to activated platelets: differences with lupus anticoagulants. *Blood* 1993;81:1255-1262.
39. Price BE, Rauch J, Shia MA, et al. Anti-phospholipid autoantibodies bind to apoptotic, but not viable, thymocytes in a B2-glycoprotein I-dependent manner. *J Immunol* 1996;157:2201-2208.
40. Levine JS, Subang R, Koh JS, Rauch J. Induction of anti-phospholipid autoantibodies by B2-glycoprotein I bound to apoptotic thymocytes. *J Autoimmun* 1998;11:413-424. [Erratum, *J Autoimmun* 1999;12:143.]
41. Alarcón-Segovia D, Sanchez-Guerrero J. Primary antiphospholipid syndrome. *J Rheumatol* 1989;16:482-488. [Erratum, *J Rheumatol* 1989;16:1014.]
42. Asherson RA, Khamashta MA, Ordi-Ros J, et al. The "primary" antiphospholipid syndrome: major clinical and serological features. *Medicine (Baltimore)* 1989;68:366-374.
43. Alarcón-Segovia D, Pérez-Vázquez ME, Villa AR, Drenkard C, Cabiedes J. Preliminary classification criteria for the antiphospholipid syndrome within systemic lupus erythematosus. *Semin Arthritis Rheum* 1992;21:275-286.

44. Vianna JL, Khamashta MA, Ordi-Ros J, et al. Comparison of the primary and secondary antiphospholipid syndrome: a European multicenter study of 114 patients. *Am J Med* 1994;96:3-9.
45. Hughson MD, McCarty GA, Brumback RA. Spectrum of vascular pathology affecting patients with the antiphospholipid syndrome. *Hum Pathol* 1995;26:716-724.
46. Lie JT. Pathology of the antiphospholipid syndrome. In: Asherson RA, Cervera R, Piette J-C, Shoenfeld Y, eds. *The antiphospholipid syndrome*. Boca Raton, Fla.: CRC Press, 1996:89-104.
47. Piette J-C, Wechsler B, Frances C, Papo T, Godeau P. Exclusion criteria for primary antiphospholipid syndrome. *J Rheumatol* 1993;20:1802-1804.
48. Merkel PA, Chang YC, Pierangeli SS, Convery K, Harris EN, Polisson RP. The prevalence and clinical associations of anticardiolipin antibodies in a large inception cohort of patients with connective tissue diseases. *Am J Med* 1996;101:576-583.
49. Lotz BP, Schutte C-M, Colin PF, Biermann LD. Sneddon's syndrome with anticardiolipin antibodies -- complications and treatment. *S Afr Med J* 1993;83:663-664.
50. Asherson RA. Antiphospholipid antibodies and syndromes. In: Lahita RG, ed. *Systemic lupus erythematosus*. 2nd ed. New York: Churchill Livingstone, 1992:587-635.
51. Petri M. Epidemiology of the antiphospholipid antibody syndrome. *J Autoimmun* 2000;15:145-151.
52. Cervera R, Khamashta MA, Font J, et al. Systemic lupus erythematosus: clinical and immunologic patterns of disease expression in a cohort of 1,000 patients. *Medicine (Baltimore)* 1993;72:113-124.

53. Love PE, Santoro SA. Antiphospholipid antibodies: anticardiolipin and the lupus anticoagulant in systemic lupus erythematosus (SLE) and in non-SLE disorders: prevalence and clinical significance. *Ann Intern Med* 1990;112:682-698.
54. Ginsburg KS, Liang MH, Newcomer L, et al. Anticardiolipin antibodies and the risk for ischemic stroke and venous thrombosis. *Ann Intern Med* 1992;117:997-1002.
55. Vaarala O, Manttari M, Manninen V, et al. Anti-cardiolipin antibodies and risk of myocardial infarction in a prospective cohort of middle-aged men. *Circulation* 1995;91:23-27.
56. Levine SR, Brey RL, Joseph CLM, Havstad S. Risk of recurrent thromboembolic events in patients with focal cerebral ischemia and antiphospholipid antibodies. *Stroke* 1992;23:Suppl 1:I-29.
57. Finazzi G, Brancaccio V, Moia M, et al. Natural history and risk factors for thrombosis in 360 patients with antiphospholipid antibodies: a four-year prospective study from the Italian Registry. *Am J Med* 1996;100:530-536.
58. Schulman S, Svenungsson E, Granqvist S, Duration of Anticoagulation Study Group. Anticardiolipin antibodies predict early recurrence of thromboembolism and death among patients with venous thromboembolism following anticoagulant therapy. *Am J Med* 1998;104:332-338.
59. Wahl DG, Guillemin F, de Maistre E, Perret C, Lecompte T, Thibaut G. Risk for venous thrombosis related to antiphospholipid antibodies in systemic lupus erythematosus -- a meta-analysis. *Lupus* 1997;6:467-473.
60. Khamashta MA, Cuadrado MJ, Mujic F, Taub NA, Hunt BJ, Hughes GRV. The management of thrombosis in the antiphospholipid-antibody syndrome. *N Engl J Med* 1995;332:993-997.

61. Rodgers GM. Thrombosis and antithrombotic therapy. In: Lee GR, Foerster J, Kukens J, Paraskevas F, Greer JP, Rodgers GM, eds. *Wintrobe's clinical hematology*. Baltimore: Williams & Wilkins, 1999:1781-820.
62. Crofford LJ, Oates JC, McCune WJ, et al. Thrombosis in patients with connective tissue diseases treated with specific cyclooxygenase 2 inhibitors: a report of four cases. *Arthritis Rheum* 2000;43:1891-1896.
63. Nochy D, Daugas E, Droz D, et al. The intrarenal vascular lesions associated with primary antiphospholipid syndrome. *J Am Soc Nephrol* 1999;10:507-518.
64. Levine JS, Rauch J. Renal involvement in the anti-phospholipid syndrome. In: Adu D, Emery P, Madaio M, eds. *Rheumatology and the kidney*. New York: Oxford University Press, 2001:132-66.
65. Glueck HI, Kant KS, Weiss MA, Pollak VE, Miller MA, Coots M. Thrombosis in systemic lupus erythematosus: relation to the presence of circulating anticoagulants. *Arch Intern Med* 1985;145:1389-1395.
66. Kincaid-Smith P, Fairley KF, Kloss M. Lupus anticoagulant associated with renal thrombotic microangiopathy and pregnancy-related renal failure. *Q J Med* 1988;69:795-815.
67. Leaker B, McGregor A, Griffiths M, Snaith N, Neild GH, Isenberg D. Insidious loss of renal function in patients with anticardiolipin antibodies and absence of overt nephritis. *Br J Rheumatol* 1991;30:422-425.
68. Lockshin MD, Druzin ML, Goei S, et al. Antibody to cardiolipin as a predictor of fetal distress or death in pregnant patients with systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* 1985;313:152-156.

69. Oshiro BT, Silver RM, Scott JR, Yu H, Branch DW. Antiphospholipid antibodies and fetal death. *Obstet Gynecol* 1996;87:489-493.
70. Branch DW, Silver RM, Blackwell JL, Reading JC, Scott JR. Outcome of treated pregnancies in women with antiphospholipid syndrome: an update of the Utah experience. *Obstet Gynecol* 1992;80:614-620.
71. Lima F, Khamashta MA, Buchanan NM, Kerslake S, Hunt BJ, Hughes GR. A study of sixty pregnancies in patients with the antiphospholipid syndrome. *Clin Exp Rheumatol* 1996;14:131-136.
72. Kutteh WH. Antiphospholipid antibody-associated recurrent pregnancy loss: treatment with heparin and low-dose aspirin is superior to low-dose aspirin alone. *Am J Obstet Gynecol* 1996;174:1584-1589.
73. Rai R, Cohen H, Dave M, Regan L. Randomised controlled trial of aspirin and aspirin plus heparin in pregnant women with recurrent miscarriage associated with phospholipid antibodies (or antiphospholipid antibodies). *BMJ* 1997;314:253-257.
74. Pattison NS, Chamley LW, Birdsall M, Zanderigo AM, Liddell HS, McDougall J. Does aspirin have a role in improving pregnancy outcome for women with the antiphospholipid syndrome? A randomized controlled trial. *Am J Obstet Gynecol* 2000;183:1008-1012.
75. Clifford K, Rai R, Watson H, Regan L. An informative protocol for the investigation of recurrent miscarriage: preliminary experience of 500 consecutive cases. *Hum Reprod* 1994;9:1328-1332.
76. Yetman DL, Kutteh WH. Antiphospholipid antibody panels and recurrent pregnancy loss: prevalence of anticardiolipin antibodies compared with other antiphospholipid antibodies. *Fertil Steril* 1996;66:540-546.

77. Branch DW, Silver R, Pierangeli S, van Leeuwen I, Harris EN. Antiphospholipid antibodies other than lupus anticoagulant and anticardiolipin antibodies in women with recurrent pregnancy loss, fertile controls, and antiphospholipid syndrome. *Obstet Gynecol* 1997;89:549-555.
78. De Wolf F, Carreras LO, Moerman P, Vermeylen J, Van Assche A, Renaer M. Decidual vasculopathy and extensive placental infarction in a patient with repeated thromboembolic accidents, recurrent fetal loss, and a lupus anticoagulant. *Am J Obstet Gynecol* 1982;142:829-834.
79. di Somone N, Meroni PL, del Papa N, et al. Antiphospholipid antibodies affect trophoblast gonadotropin secretion and invasiveness by binding directly and through adhered beta2-glycoprotein I. *Arthritis Rheum* 2000;43:140-150.
80. Cowchock FS, Reece EA, Balaban D, Branch DW, Plouffe L. Repeated fetal losses associated with antiphospholipid antibodies: a collaborative randomized trial comparing prednisone with low-dose heparin treatment. *Am J Obstet Gynecol* 1992;166:1318-1323.
81. Branch DW, Peaceman AM, Druzin M, et al. A multicenter, placebo-controlled pilot study of intravenous immune globulin treatment of antiphospholipid syndrome during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 2000;182:122-127.
82. Sullivan A, Branch DW. Can you manage antiphospholipid syndrome during pregnancy? *Cont Obstet Gynecol* 2001;46:100-22.
83. Management of recurrent pregnancy loss. ACOG practice bulletin. No. 24. Washington, D.C.: American College of Obstetricians and Gynecologists, 2001.
84. Ginsberg JS, Greer I, Hirsh J. Use of antithrombotic agents during pregnancy. *Chest* 2001;119:Suppl:122S-131S.

85. Asherson RA, Cervera R, de Groot PG, Erkan D, Boffa MC, Piette JC, et al. Catastrophic antiphospholipid syndrome: International consensus statement on classification criteria and treatment guidelines. review [9 refs]. *Lupus* 2003;12(7):530–4.
86. Kitchens CS. Thrombotic storm: when thrombosis begets thrombosis. *Am J Med* 1998;104:381-385.
87. Erkan D, Merrill JT, Yazici Y, Sammaritano L, Buyon JP, Lockshin MD. High thrombosis rate after fetal loss in antiphospholipid syndrome: effective prophylaxis with aspirin. *Arthritis Rheum* 2001;44:1466-1467.
88. Petri M. Hydroxychloroquine use in the Baltimore Lupus Cohort: effects on lipids, glucose and thrombosis. *Lupus* 1996;5:Suppl 1:S16-S22.
89. Rosove MH, Brewer PMC. Antiphospholipid thrombosis: clinical course after the first thrombotic event in 70 patients. *Ann Intern Med* 1992;117:303-308.
90. Derksen RH, de Groot PG, Kater L, Nieuwenhuis HK. Patients with antiphospholipid antibodies and venous thrombosis should receive long term anticoagulant treatment. *Ann Rheum Dis* 1993;52:689-692.
91. Prandoni P, Simioni P, Girolami A. Antiphospholipid antibodies, recurrent thromboembolism, and intensity of warfarin anticoagulation. *Thromb Haemost* 1996;75:859-859.
92. al-Sayegh FA, Ensworth S, Huang S, Stein HB, Klinkhoff AV. Hemorrhagic complications of long-term anticoagulant therapy in seven patients with systemic lupus erythematosus and antiphospholipid syndrome. *J Rheumatol* 1997;24:1716-1718.

93. Douketis JD, Crowther MA, Julian JA, et al. The effects of low-intensity warfarin on coagulation activation in patients with antiphospholipid antibodies and systemic lupus erythematosus. *Thromb Haemost* 1999;82:1028-1032.
94. Ginsberg JS, Wells PS, Brill-Edwards P, et al. Antiphospholipid antibodies and venous thromboembolism. *Blood* 1995;86:3685-3691.
95. Rance A, Emmerich J, Fiessinger JN. Anticardiolipin antibodies and recurrent thromboembolism. *Thromb Haemost* 1997;77:221-222.
96. Moll S, Ortel TL. Monitoring warfarin therapy in patients with lupus anticoagulants. *Ann Intern Med* 1997;127:177-185.
97. Tripodi A, Chantarangkul V, Clerici M, Negri B, Galli M, Mannucci PM. Laboratory control of oral anticoagulant treatment by the INR system in patients with the Antiphospholipid syndrome and lupus anticoagulant. results of a collaborative study involving nine commercial thromboplastins. *Br J Haematol* 2001;115(3):672–8.
98. Forastiero R.R, Cerrato G.S, Carreras L.O. Evaluation of recently described tests for detection of the lupus anticoagulant. *Thromb Haemostasis*, 1994; 72, 5: 728 – 733.
99. Exner T, Richard KA, Kronembourg H. A sensitive test demonstrating lupus anticoagulant and its behavioural patterns. *Br J Haematol* 1978; 40: 143-151.
100. Thiagarajan P, Pengo V, Shapiro SS. The use of dilute Russell's viper venom time for the diagnosis of lupus anticoagulant. *Blood* 1986; 68: 869-884.
101. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 1959; 37: 911-917.
102. Barrowcliffe TW and Gray E. Studies of phospholipid reagents used in coagulation. I: some general properties and their sensitivity to factor VIII. *Thromb Haemost* 1981; 46: 629-633.
103. Rosner E, Pazner R, Lusky A, Modan M, Many A. Detection and quantitative evaluation of lupus circulating anticoagulant activity. *Thromb Haemost* 1987; 57: 144-147.
104. Stevenson KJ, Easton AC, Curry A, Thompson JM, Poller L. The reliability of partial thromboplastin time methods and the relationship to lipid composition and ultrastructure. *Thromb Haemost* 1986; 55: 250-258.

105. Denis-Magdelaine A, Flahault A and Verdy E. Sensitivity of sixteen APTT reagents for the presence of lupus anticoagulants. *Haemostasis* 1995; 25: 98-105.
106. Mannucci PM, Canciani MT, Mari D and Meucci P. The varied sensitivity of partial thromboplastin and prothrombin time reagents in the demonstration of the lupus-like anticoagulant. *Scand J Haematol* 1979; 22: 423-432.
107. Zwaal RFA, Comfurius P, van Deenen LLM. Membrane asymmetry and blood coagulation. *Nature* 1977; 268: 358-60.