



VI

CONGRESO LATINOAMERICANO DE BIOQUÍMICA CLÍNICA

II

CONGRESO INTERNACIONAL DEL COLEGIO NACIONAL DE BACTERIOLOGÍA



¡El riesgo es que te quieras quedar!



Cartagena, Colombia 3 al 6 OCTUBRE 2024



Experiencia en la implementación del estudio de ADAMTS13 para el diagnóstico de PTT





Mercedes Alcalá



Flores
Bacterióloga y laboratorista clínica de la Universidad del Valle, especialista en administración en Salud de la Universidad Católica de Manizales y docencia universitaria de la Universidad ICESI. Magister en Educación mediada por TIC de la Universidad ICESI, actualmente con 12 años de experiencia en el laboratorio de hematología, de los cuales 7 años han estado dedicados al área de Hematología especial y Hemostasia en la Fundación Valle del Lili.





Introducción

Además de las características comunes a este grupo de patologías que son el desarrollo de anemia hemolítica microangiopática, trombocitopenia y disfunción orgánica isquémica, la PTT se caracteriza por una deficiencia heredada o adquirida de la enzima ADAMTS13.

La presente experiencia considero las actuales guías de diagnóstico de la púrpura trombocitopénica trombótica, una de las entidades mas importantes y representativas de las MAT.



Clasificación de las MAT y pruebas de laboratorio

TABLA 1

Clasificación etiológica de las microangiopatías trombóticas

PTT (actividad de ADAMTS13 < 5%-10%)

Causa genética: hereditaria (síndrome de Upshaw-Schulman)

Deficiencia adquirida: autoinmune (anticuerpos anti-ADAMTS13), inducida por fármacos

SHU típico

Escherichia coli productora de toxina Shiga: cepa 0157:H7 y otras cepas

Shigella dysenteriae tipo 1

SHU atípico

Causa genética: hereditaria (mutaciones de proteínas reguladoras: FH, MCP, FI, THBD, FB y C3. Polimorfismos de riesgo en FH y MCP)

Deficiencia adquirida: anticuerpos anti-CFH, anti-CFI

MAT secundarias

Embarazo: preeclampsia y eclampsia. Síndrome HELLP, MAT del posparto

Enfermedades sistémicas: LES, vasculitis, esclerodermia, síndrome antifosfolípido

Glomerulonefritis proliferativas

HTA maligna

Infecciones: *Streptococcus pneumoniae*, VIH, VHC, H1N1, CMV, virus BK, otras infecciones

Neoplasias

Radiaciones ionizantes

Inducido por fármacos (quinina, ticlopidina, clopidogrel, metronidazol, valaciclovir, inhibidores calcineurínicos, inhibidores mTOR, OKT3, anticonceptivos orales, mitomicina, bleomicina, cisplatino, bevacizumab, sunitinib)

Consumo de drogas

Trasplante de órganos (riñón, hematopoyético)

Defecto del metabolismo de la cobalamina (hiperhomocisteinemia)

ADAMTS13: *a disintegrin and metalloproteinase with a thrombospondin type1 motif, member 13*; CMV: citomegalovirus; FB: factor B del complemento; FH: factor H del complemento; FI: factor I del complemento; HELLP: *hemolysis elevated liver enzymes low platelet count*; LES: lupus eritematoso sistémico; OKT3: muronab-CD3; MCP: proteína cofactor de membrana; mTOR: *mammalian target of rapamycin*; PTT: púrpura trombótica trombocitopénica; SHU: síndrome hemolítico urémico; SHUa: síndrome hemolítico urémico atípico; STEC: *Escherichia coli* productora de toxina Shiga; THBD: trombomodulina; VHC: virus de la hepatitis C; VIH: virus de la inmunodeficiencia humana.

TABLA 2

Pruebas diagnósticas y procedimientos recomendados en pacientes con microangiopatía trombótica

Pruebas diagnósticas generales

Historia clínica completa, incluyendo toma de fármacos, datos de enfermedades sistémicas y antecedentes personales y familiares

Exploración física completa, incluyendo examen de fondo de ojo

Análítica general habitual de sangre y orina

Frotis de sangre periférica

Estudio completo de coagulación con fibrinógeno, productos de degradación del fibrinógeno y dímero D

Determinación de niveles de haptoglobina

Niveles plasmáticos de vitamina B₁₂

Determinación de los niveles de complemento sérico

Cribado de enfermedades autoinmunitarias (ANA, anti-ADN, ANCA, anti-Scl-70, anticentrómero)

Determinación de anticuerpos anticardiolipina y anticoagulante lúpico

Serología para VIH, VHC, VHB, CMV y H1N1

Pruebas diagnósticas específicas

Infección por STEC

Cultivo de heces para STEC, pruebas serológicas para detectar toxina Shiga

Infección por neumococos

Cultivo de sangre/esputo/LCR, radiografía de tórax

Alteraciones de la regulación del complemento

Niveles séricos de C3, C4, AH50, FH, FI y FB

Autoanticuerpos anti-FH. Análisis de mutación en el FH, FI, MCP, C3, FB ± THBD

Deficiencia ADAMTS13 (adquirida o hereditaria)

Actividad plasmática de ADAMTS13

Metabolismo de la cobalamina

Niveles en sangre y orina de homocisteína y metionina

Análisis de mutación en el gen *MMACHC*

ADAMTS13: *a disintegrin and metalloproteinase with a thrombospondin type 1 motif, member 13*; ADN: ácido desoxirribonucleico; ANA: anticuerpo antinuclear; ANCA: anticuerpos anticitoplasma de neutrófilos; CMV: citomegalovirus; FB: factor B del complemento; FH: factor H del complemento; FI: factor I del complemento; H1N1: influenza A; LCR: líquido cefalorraquídeo; MCP: proteína cofactor de membrana; MMACHC: acidemia metilmalónica con homocistinuria tipo CblC; STEC: *Escherichia coli* productora de toxina Shiga; THBD: trombomodulina; VHC: virus de la hepatitis C; VHB: virus de la hepatitis B; VIH: virus de la inmunodeficiencia humana.

Para la diferenciación entre PTT y SHU se realizan pruebas diagnósticas específicas entre esas la actividad de ADAMTS13.



Purpura Trombocitopénica trombótica

- Se produce como consecuencia de un déficit absoluto de ADAMTS-13, por lo que el FvW recién secretado por la célula endotelial y que permanece anclado a esta conserva esos multímeros de alto peso y desencadena la agregación plaquetaria en el interior del vaso sanguíneo.
- Esto da lugar a un consumo acelerado de plaquetas, que se manifiesta por trombocitopenia y diátesis hemorrágica.





ADAMTS-13

ADAMTS-13 es una desintegrina y metaloproteasa, zinc y calcio dependiente, codificada en el cromosoma humano 9q34.

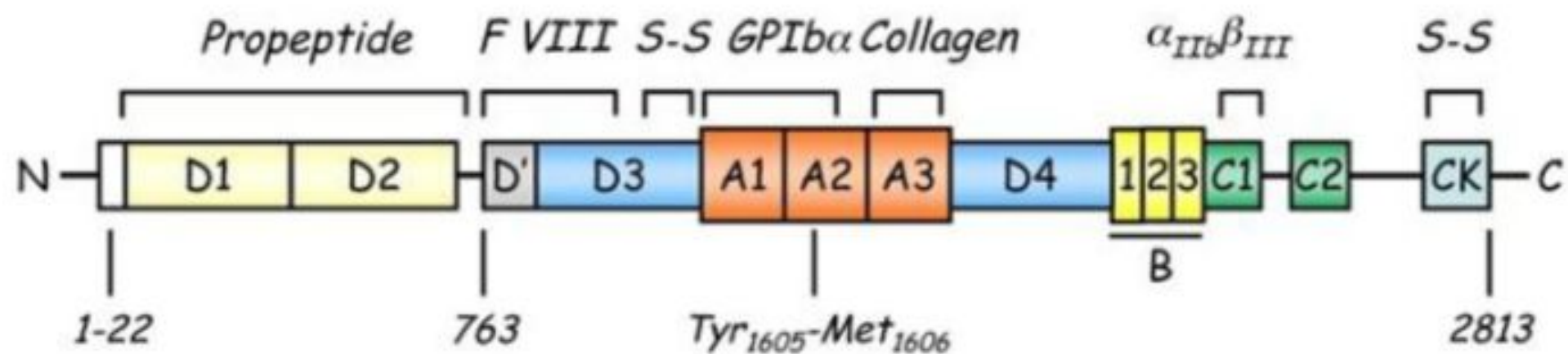
Su rol primario es clivar los multímeros ultra grandes del factor de Von Willebrand (ULVWF) originando sus diferentes formas moleculares.

El sitio específico de clivaje de ADAMTS-13 se encuentra ubicado en la posición Tyr1605-Met1606 del dominio A2 del monómero de VWF.



www.congresocolabiocli.com



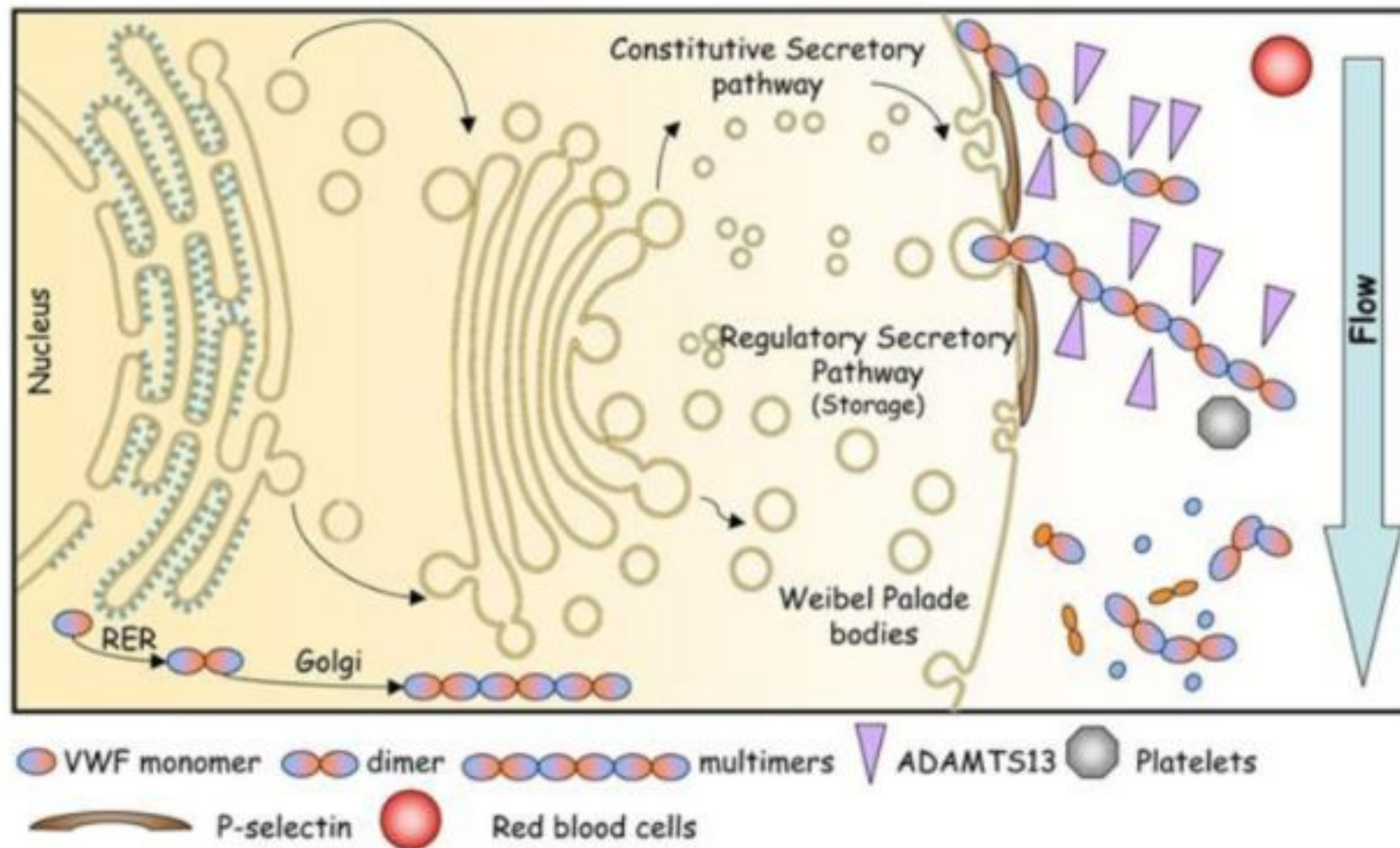


Scheme of von Willebrand factor monomer molecule with its functional domains. The prepro-VWF polypeptide is indicated with amino acids numbered from the amino- (aa 1) to carboxy-terminal portions (aa 2813). Binding sites are indicated for factor VIII (D' and D3 domains), platelet glycoprotein Iba (GPIbα) (A1 domain), collagen (A1 and A3 domains) and integrin αIIbβIII (RGDS sequence within the C1 domain). The cleavage site (Tyr1605 Met1606) for ADAMTS13 is located at the central A2 domain of von Willebrand factor. The locations of intersubunit disulfide bonds (S-S) are shown in the CK and D3 domains, which are important for the formation of VWF dimers and multimers, respectively.

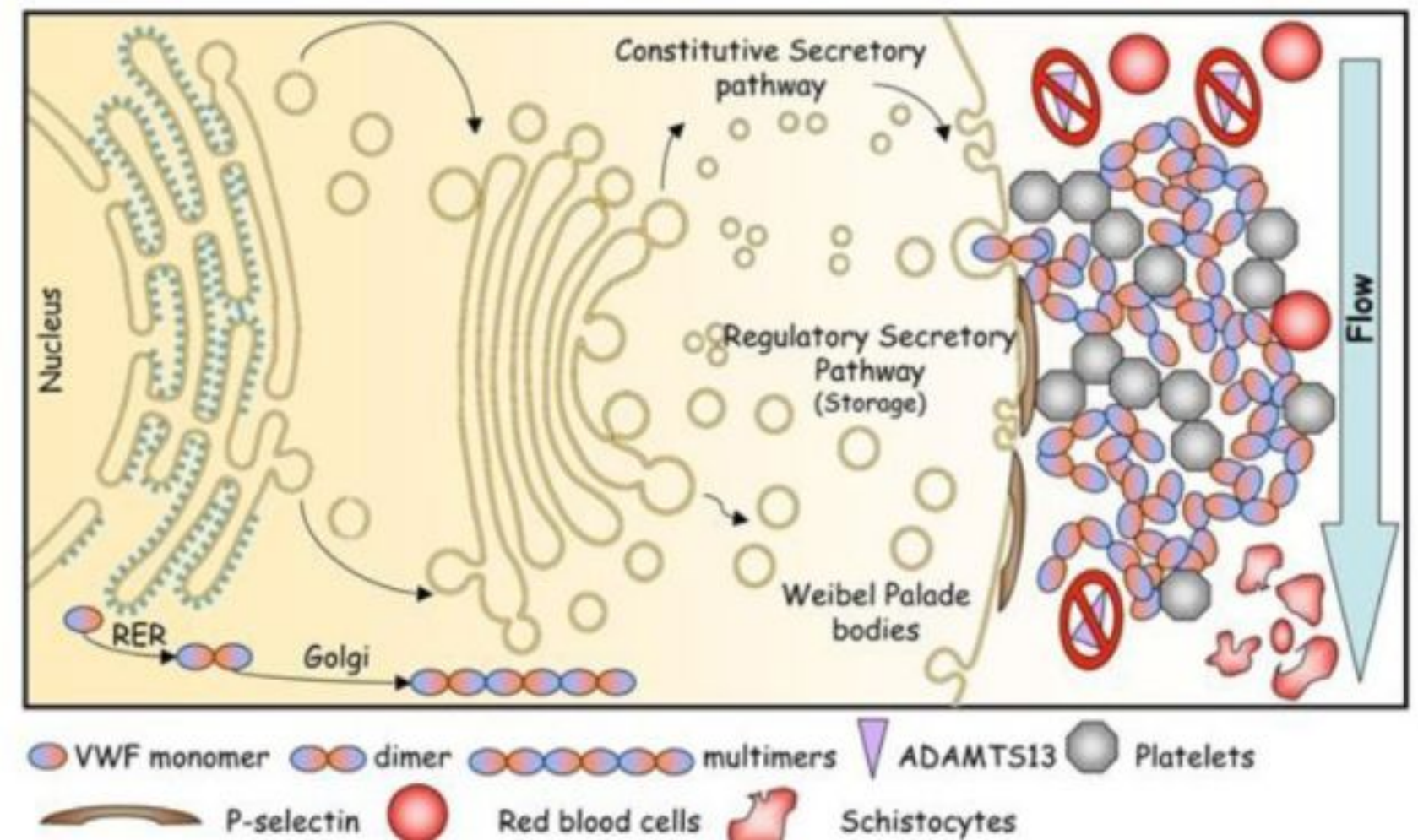


Schematic diagram of ADAM, ADAMTS and ADAMTS13 structure. The structural domains are indicated: signal peptide (S), propeptide (P), metalloprotease (M) (location of zinc-binding motif shown in red), disintegrin domain (Dis), first thrombospondin type 1 (TSP1) repeat (1), cysteine-rich domain (Cys-R), spacer domain (Spa), the second to eighth TSP1 repeats (2) through (8) and two CUB domains (C1 and C2). The metalloprotease domain is the catalytic center that cleaves von Willebrand factor (VWF). The proximal carboxyl-terminal domains from Dis to Spa interact with the A2 domain of VWF. More distal carboxyl-terminal domains (TSP1 2–8) interact with VWF under fluid shear stress. EGF indicates epidermal growth factor-like repeat and TM, transmembrane domain.

A) Basal control of VWF multimer size by ADAMTS13



B) Pathological conditions: ADAMTS13 deficiency





Nuestra experiencia

A tener en cuenta:

- Guías clínicas - ¿qué nos dice la evidencia científica?
- Utilidad de las pruebas de laboratorio
- Resultado con oportunidad y calidad - Tiempo de entrega de resultados y fase preanalítica en la toma de la muestra.





Recomendaciones de la guía ISTH

PTT

Tres situaciones: cuadro clínico de MAT y sospecha de PTT.

- Trombocitopenia ($<100 \times 10^9 /L$)
- Anemia hemolítica microangiopática (hemoglobina y hematocrito disminuidos, haptoglobina baja, LDH elevada, esquistocitos en frotis de sangre periférica)



• Función renal relativamente conservada





Cartagena, Colombia 3 al 6 OCTUBRE 2024

Monitoreo del riesgo clínico: PLASMIC Score



TABLA 1 La puntuación PLASMIC o la puntuación francesa predicen la probabilidad de déficit grave de ADAMTS13 ante una sospecha de PTT

Parámetros	Puntuación francesa	Puntuación PLASMIC
Recuento plaquetario	<30 × 10 ⁹ /L (+1)	<30 × 10 ⁹ /L (+1)
Creatinina sérica	<2,26 mg/dL (+1)	<2,0 mg/dL (+1)
Hemólisis		
Bilirrubina indirecta >2 mg/dL	^a	+1
o recuento de reticulocitos >2,5 %		
o haptoglobina indetectable		
Sin cáncer activo en el año previo	^a	+1
Sin historial de trasplante de órgano sólido o TCM	^a	+1
INR <1,5	^a	+1
VCM <90 fL	NA	+1
Probabilidad de déficit grave de la actividad de ADAMTS13 (<10 %)	0: 2 %	0-4: 0-4 %
	1: 70 %	6: 5-24 %
	2: 94 %	6-7: 62-82 %

Nota: Cada ítem lleva asociado 1 punto (+1). La tabla está adaptada de Joly BS⁵³.

Abreviaturas: INR: cociente internacional normalizado; TCM: trasplante de células madre; VCM: volumen corpuscular medio.

^aLa puntuación francesa considera a los pacientes con microangiopatía trombótica incluyendo hemólisis y esquistocitos en la definición, y asume la ausencia de historial o evidencia clínica de cáncer asociado, trasplante o coagulación intravascular diseminada.

Por tanto, estos ítems son intrínsecos al sistema de puntuación. NA en VCM: no incorporado a la puntuación francesa (no aplicable).





Se identificaron las siguientes vías diagnósticas posibles:

Situación A: resultado de actividad de **ADAMTS13** está disponible inmediato (72 horas).

Situación B: la prueba de ADAMTS13 NO está disponible.

Situación C: resultado de la prueba de actividad de ADAMTS13 está disponible pero con retraso (después de 72 horas y antes de 7 días).

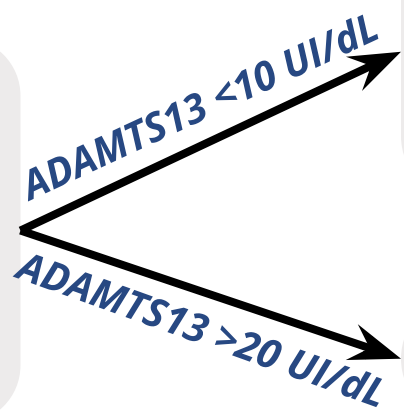


Recomendaciones sobre diagnóstico y manejo

Recomendación 1

En situaciones con acceso rápido a la prueba de actividad de ADAMTS13 y pacientes con alta sospecha clínica (probabilidad previa a la prueba $\geq 90\%$)

Paso 1: Obtener una muestra de plasma para la prueba de ADAMTS13 e iniciar la plasmaféresis y la admon de corticosteroides



Paso 2: continuar con caplacizumab y considerar también la adición de rituximab lo antes posible.

Paso 2: Interrumpir caplacizumab.

Recomendación 2

En situaciones con acceso rápido a la prueba de actividad de ADAMTS13 y pacientes con sospecha clínica intermedia o baja

Paso 1: Obtener una muestra de plasma para la prueba de ADAMTS13 e iniciar la plasmaféresis y la admon de corticosteroides

Paso 2: No iniciar caplacizumab hasta que se disponga del resultado de la prueba de actividad de ADAMTS13.

Paso 3: Cuando se tenga el resultado de la actividad de ADAMTS13, considerar añadir caplacizumab y rituximab.



Recomendación 3

En situaciones de falta de acceso a la prueba de actividad plasmática de ADAMTS13, se sugiere no utilizar caplacizumab, independientemente de la probabilidad de PTT previa a la prueba.

Es importante proporcionar a los médicos un acceso rápido a la prueba de actividad plasmática de ADAMTS13 (y de inhibidor o IgG anti-ADAMTS13) para permitir un manejo óptimo de los pacientes con PTT





Experiencia en la implementación

- Guías clínicas - ¿Qué nos dice la evidencia científica?

Los criterios de atención (tratamiento) depende en gran medida a la disponibilidad de existencia o de oportunidad de la prueba de ADAMTS13 (además, al PLASMIC SCORE).

- Utilidad de las pruebas de laboratorio

Se tenía como objetivo brindar la prueba para confirmar el diagnóstico de PTT y no solo limitarlo a una clasificación netamente clínica (o con el uso del PLASMIC SCORE). La prueba mencionada por las guías resaltan la utilidad de la prueba de **actividad**.





Experiencia en la implementación

- Resultado con oportunidad y calidad - Tiempo de entrega de resultados y fase preanalítica en la toma de la muestra.

La implementación debía estar acorde a necesidad y teniendo en cuenta los tiempos de espera recomendados en la guía (como máximo 72 horas): tiempo logrado 48 horas.

IMPORTANTE: La muestra debe ser tomada antes del inicio de la plasmaferesis.



Entrenamiento integral respecto a la prueba y al manejo en el contexto clínico

www.congresocolabiocli.com





Prueba de actividad de ADAMTS13

El ensayo de actividad ADAMTS13 utilizado es un inmunoensayo de dos pasos para cuantificar la actividad en plasma citratado humano utilizando partículas magnéticas como fase sólida y un sistema de detección quimioluminiscente.

Es altamente sensible y específica, automatizada, que requiere sólo 33 minutos para un resultado.





Prueba de actividad de **ADAMTS13**

Tipo de muestra: Tubo con citrato de sodio al 3.2% - Se obtiene plasma pobre en plaquetas - **Se debe tomar preferiblemente antes del inicio de la plasmaféresis.**

El procesamiento de la muestra se realiza entre **2 a 48 horas después.**

Cuando no se va a procesar la muestra inmediatamente, se separa el plasma del tubo primario y se congela a -20°C .

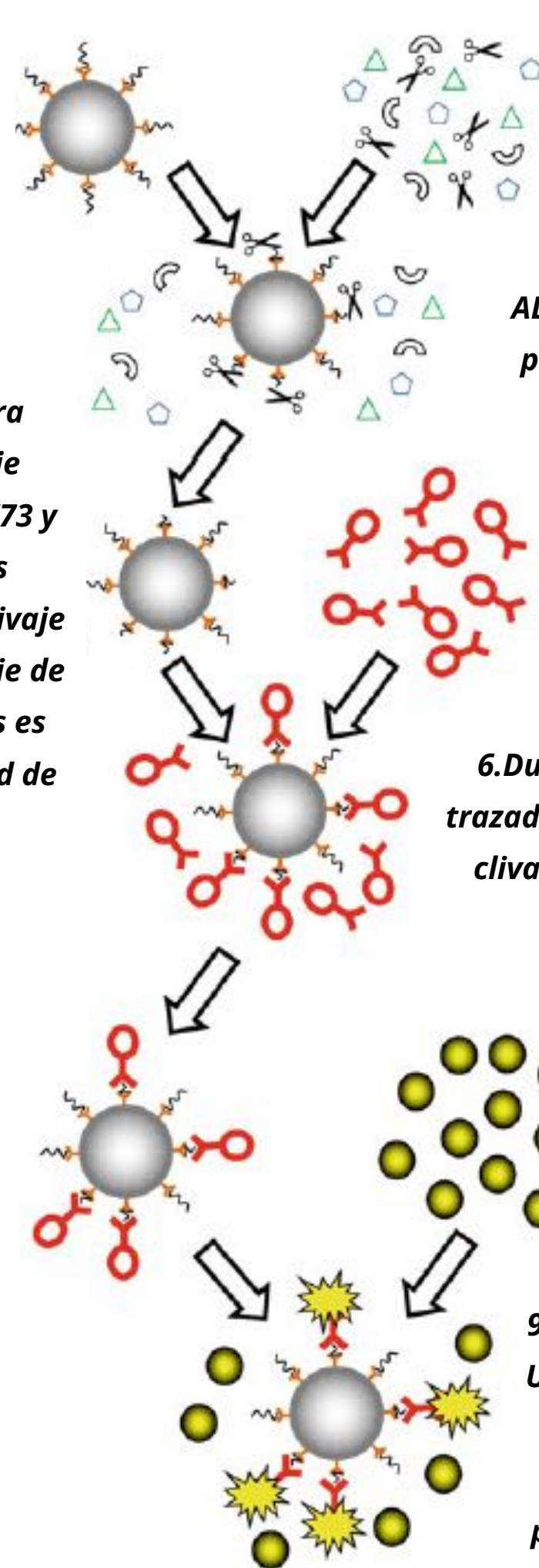


Prueba de actividad de ADAMTS13: Fundamento

1. Partículas magnéticas recubiertas con un sustrato peptídico recombinante GST-VWF73 que contiene el sitio de escisión Tyr1605-Met1606 de ADAMTS13 mediante un anticuerpo monoclonal específico anti-glutatión S-transferasa (GST).

4. Un paso de lavado para detener cualquier clivaje adicional del péptido VWF73 y también remover otras proteínas del plasma. El clivaje del VWF73 en la superficie de las partículas magnéticas es proporcional a la actividad de ADAMTS13.

7. Un segundo paso de lavado remueve los trazadores no unidos.



2. Muestra que contiene ADAMTS13 y otras proteínas son adicionadas.

3. Durante la incubación, el ADAMTS13 del paciente cliva el péptido VWF73 que recubre las partículas magnéticas.

5. Un anticuerpo anti VWF marcado con isoluminol (trazador) es adicionado el cual se unirá con el péptido VWF clivado en las partículas.

6. Durante la incubación, el trazador se une al péptido VWF clivado sobre las partículas magnéticas

8. Se añaden reactivos que desencadenan la reacción luminiscente

9. La luz emitida es medida como Unidades Relativas de Luz (RLUs) por el luminómetro. Las RLUs son directamente proporcionales a la actividad de ADAMTS13

Fig. 2 The performance of ADAMTS13 testing by CLIA on AcuStar



Experiencia en la implementación

Nos ha permitido documentar la incidencia de la enfermedad en la población atendida que brinda información local sobre el actual estado de esta patología en nuestra comunidad.



Experiencia en la implementación

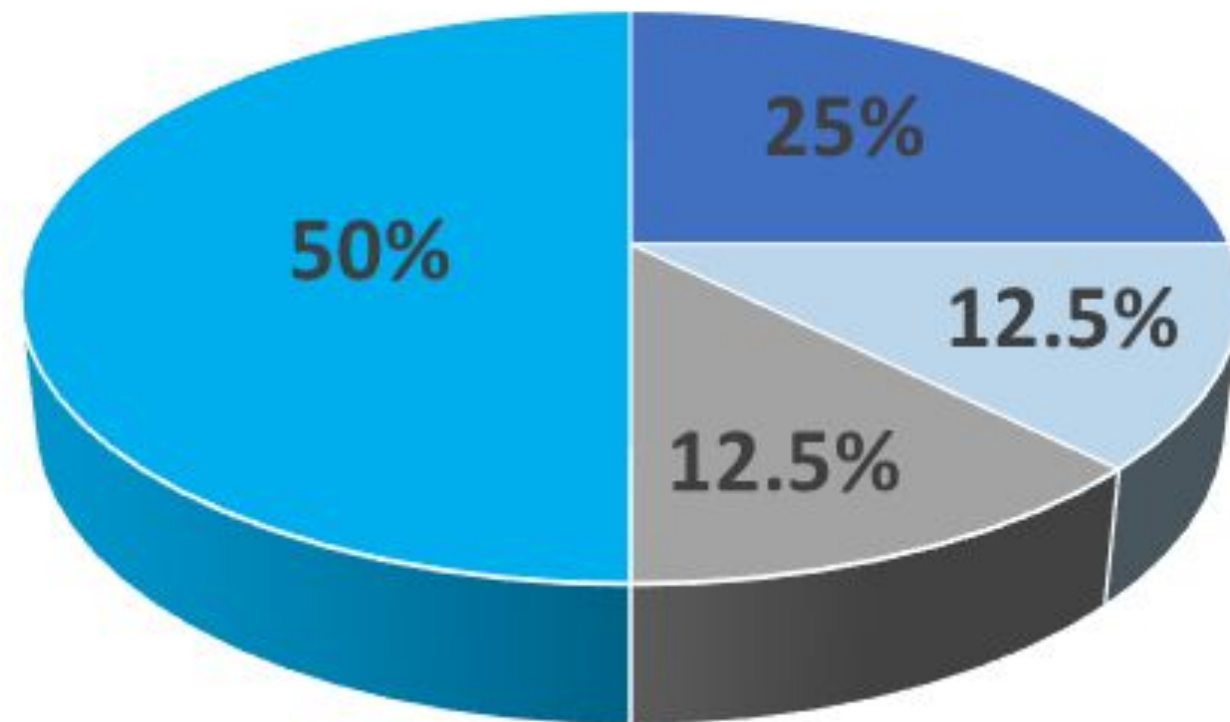
Genero	n	Niños	Adultos
Femenino	41	3	38
Masculino	17	2	15

Genero	Actividad $\leq 10\%$ (No de casos menores de edad)	Actividad $> 11\%$ (No de casos menores de edad)
Femenino	7 (0)	34 (3)
Masculino	1 (0)	16 (2)



Experiencia en la implementación

Diagnóstico de ingreso



■ Embarazo ■ Autoimmune ■ Proceso inflamatorio o infeccioso ■ Idiopático

Síndrome HELP - Diagnóstico extrahospitalario PTI

Los casos idiopáticos inicialmente fueron clasificados como PTI





Experiencia en la implementación

El total de pacientes presentaban trombocitopenia (por debajo de 150.000/uL.

El 75% de casos por debajo de 30.000/uL

(PLASMIC Score).

En la mitad de los casos, se reportaron esquistocitos en el frotis de sangre periférica - ofrece una ventaja en su inmediatez en el reporte por lo que es importante el rol del bacteriólogo en estar

atentos a este reporte.

Un estudio básico de laboratorio inicial puede orientar a una sospecha clínica de PTT - indicadores de hemólisis

El 88% de los casos presentaron hemoglobina menor de 10 gr/dL

Los pacientes a quienes se les calculo el porcentaje de reticulocitos presentaron un valor elevado.



Experiencia en la implementación

En la bioquímica básica se presenta una elevación de bilirrubina total en base al aumento de la bilirrubina indirecta y de la LDH (lactato deshidrogenasa).



Experiencia en la implementación

En la bioquímica básica se presenta una elevación de bilirrubina total en base al aumento de la bilirrubina indirecta y de la LDH (lactato deshidrogenasa).

Otro parámetro medido en la totalidad de los casos que permite confirmar una AH son los niveles de LDH.



Experiencia en la implementación

En la bioquímica básica se presenta una elevación de bilirrubina total en base al aumento de la bilirrubina indirecta y de la LDH (lactato deshidrogenasa).

Otro parámetro medido en la totalidad de los casos que permite confirmar una AH son los niveles de LDH.

La lesión renal suele manifestarse únicamente como proteinuria o hematuria aisladas y es rara la insuficiencia renal (10-27%) que si aparece, suele ser leve o moderada, a diferencia de la presente en el síndrome hemolítico-urémico, que suele ser de mayor gravedad.

Experiencia en la implementación

En la bioquímica básica se presenta una elevación de bilirrubina total en base al aumento de la bilirrubina indirecta y de la LDH (lactato deshidrogenasa).

La lesión renal suele manifestarse únicamente como proteinuria o hematuria aisladas y es rara la insuficiencia renal (10-27%) que si aparece, suele ser leve o moderada, a diferencia de la presente en el síndrome hemolítico-urémico, que suele ser de mayor gravedad.

Otro parámetro medido en la totalidad de los casos que permite confirmar una AH son los niveles de LDH.

Con respecto al compromiso renal, el 88% de los casos presentaron un valor de creatinina menor

de 2 mg/dL
www.congresocolabiocli.com



Experiencia en la implementación

Todos los pacientes sobrevivieron y recibieron el tratamiento adecuado incluso cuando fueron egresados de la hospitalización.

Sin embargo, se presentó una paciente con muerte fetal debido a retraso en el diagnóstico (paciente remitida desde otra institución).

Se realizaron otras pruebas para determinar una posible causa de la presencia de PTT en los casos idiopáticos (pruebas virales, ANAS, ac





Consideraciones finales

Su diagnóstico requiere medir la actividad de ADAMTS13 antes de iniciar el recambio plasmático, aún sin tener un diagnóstico certero, para conocer el valor basal de la actividad de ADAMTS-13.

La disponibilidad y el tiempo de respuesta de las pruebas de actividad plasmática de ADAMTS13 podrían afectar directamente al manejo de nuestros pacientes con sospecha de PTT.





Consideraciones finales

La púrpura trombocitopénica trombótica tiene una presentación clínica heterogénea, los resultados de laboratorio se destacan por una marcada elevación de LDH con elevación incipiente de bilirrubina y/o reticulocitos, Coombs directo negativo y otros signos de anemia.

Es necesario interpretar el resultado con cautela según el contexto, así como evaluar la necesidad de medir los niveles de inhibidor.





Consideraciones finales

Dentro del abordaje integral, es fundamental evaluar la presencia de LES tanto en el inicio como en el seguimiento a largo plazo, especialmente en aquellas con enfermedad renal y anticuerpos antinucleares positivos, así como asegurar un seguimiento adecuado de las mujeres en edad reproductiva con antecedentes de PTT (preconcepcional y durante el embarazo).





Gracias



www.congresocolabiocli.com





XXVI CONGRESO LATINOAMERICANO DE BIOQUÍMICA CLÍNICA

II CONGRESO INTERNACIONAL DEL COLEGIO NACIONAL DE BACTERIOLOGÍA

¡El riesgo es que te quieras quedar!