

## Evaluación en laboratorio de nuevos anticoagulantes orales: conveniencia y variabilidad del método entre laboratorios de coagulación

Tuukka A. Helin,<sup>1</sup> Anja Pakkanen,<sup>2</sup> Riitta Lassila,<sup>1,3</sup> y Lotta Joutsu-Korhonen<sup>1\*</sup>

**ANTECEDENTES:** Las pruebas de laboratorio para valorar nuevos anticoagulantes orales (NOAC) están bajo evaluación. La supervisión habitual es innecesaria, pero en circunstancias especiales, la evaluación de bioactividad se vuelve esencial. Analizamos los efectos de los NOAC en pruebas de coagulación y la disponibilidad de ensayos específicos en diferentes laboratorios.

**MÉTODOS:** Las muestras de plasma enriquecidas con dabigatran (Dabi; 120 y 300  $\mu\text{g/l}$ ) o rivaroxaban (Riva; 60, 146 y 305  $\mu\text{g/l}$ ) se enviaron a 115 y 38 laboratorios europeos respectivamente. Se realizó el análisis del índice internacional normalizado (INR) y el tiempo parcial de tromboplastina activado (APTT) en todas las muestras; el tiempo de trombina (TT) se analizó específicamente para Dabi y la actividad calibrada del anti factor X-activado (anti-Xa) para Riva. Comparamos los resultados con muestras de pacientes.

**RESULTADOS:** Los resultados de las muestras con Dabi fueron informados por 73 laboratorios (13 reactivos INR y 9 APTT) y las muestras con Riva por 22 laboratorios (5 reactivos INR y 4 APTT). Los dos NOAC incrementaron los valores del INR; el incremento fue moderado, aunque mayor, para Dabi con mayor CV, especialmente con los métodos Quick (en comparación con Owren). Ambos NOAC, de acuerdo con la dosis, prolongaron el APTT. Nuevamente, la prolongación y los CV fueron mayores para Dabi. Los resultados de INR y APTT variaron según el reactivo ( $P < 0.005$ ), con menor prolongación en las muestras de los pacientes. Los resultados de TT (Dabi) y los de anti-Xa calibrado (Riva) se informaron solo por 11 y 8 laboratorios respectivamente.

**CONCLUSIONES:** El INR y el APTT de las pruebas de detección son insuficientes en la evaluación de los NOAC, ya que presentan una alta dependencia al reactivo y baja sensibilidad y especificidad. Pueden proporcionar información si los laboratorios reconocen sus limitaciones. Es probable que la variación se incremente y la sensibilidad difiera en las muestras clínicas. Existen ensayos específicos que miden los NOAC de manera precisa; sin embargo, pocos laboratorios los aplicaron.

© 2013 American Association for Clinical Chemistry

Los nuevos anticoagulantes orales (NOAC),<sup>4</sup> tales como el inhibidor de trombina dabigatran (Dabi) y el inhibidor del factor X activado (Xa) rivaroxaban (Riva), ofrecen alternativas efectivas para la anticoagulación (1, 2). Mientras que los antagonistas de vitamina K (VKA) tienen una farmacocinética y farmacodinámica altamente variables y requieren supervisión con el ensayo de índice internacional normalizado (INR), aquellos aspectos de los NOAC son más predecibles y la supervisión habitual no es necesaria (3, 4).

En ocasiones, la evaluación de bioactividad de los NOAC puede ser esencial; por ejemplo, en casos de hemorragia intensa o complicaciones trombóticas, infección aguda, cirugía de emergencia y sospecha de sobredosis. Las concentraciones típicas de plasma durante el tratamiento oscilan entre 50 a 400  $\mu\text{g/l}$  (ng/ml); sin embargo, no existe un intervalo terapéutico en sí (3, 4). Se han asociado ciertas hemorragias graves y mortales con altas concentraciones de Dabi en plasma, especialmente con insuficiencia renal (5, 6). El efecto de los NOAC no se ha estudiado en muchas otras afec-

<sup>1</sup> Unidad de Trastornos de Coagulación, Química Clínica, Servicios de Laboratorio HUSLAB, Hospital Central Universitario de Helsinki, Helsinki, Finlandia;

<sup>2</sup> Labquality Ltd., Helsinki, Finlandia; <sup>3</sup> Aplagon Ltd., Helsinki, Finlandia.

\* Dirigir correspondencia para estos autores a: Clinical Chemistry and Hematology, HUSLAB Laboratory Services, POB 340, 00029 Helsinki, Finlandia. Fax +358-9-471-74016; correo electrónico: lotta.joutsu-korhonen@hus.fi.

La información en este artículo se presentó previamente como póster en la reunión científica ISTH SSC 2012 del 29 de junio de 2012 en Liverpool, Reino Unido.

(Consultar editorial en la página 732)

Recibido para publicación: 4 de noviembre de 2012. Aceptado para publicación: 9 de enero de 2013.

Previously published online at DOI: 10.1373/clinchem.2012.198788

<sup>4</sup> Abreviaturas no estándar: NOAC, Nuevo anticoagulante oral; Dabi, Dabigatran, Xa, Factor X activado; Riva, Rivaroxaban; VKA, Antagonista de vitamina K; INR, Índice internacional normalizado; PT, Tiempo de protrombina; APTT, Tiempo parcial de tromboplastina activado; TT, Tiempo de trombina; EQA, Evaluación de calidad externa; ANOVA, Análisis de la varianza; ISI, Índice internacional de sensibilidad.

ciones clínicas coincidentes con incremento en diátesis hemorrágica; por ejemplo, anemia, trombocitopenia o insuficiencia hepática (7, 8).

Las pruebas de detección de coagulación, que incluyen el tiempo de protrombina (PT), INR y tiempo parcial de tromboplastina activado (APTT), se encuentran ampliamente disponibles. Para la medición de PT, se usan tanto el método Owren como Quick; el primero solo está influenciado por los factores de coagulación II, VII y X en lugar de las vías completas extrínsecas y comunes. Cuando se integra al plasma, de acuerdo con la dosis, el Dabi prolonga el APTT. Sin embargo, la prolongación no es lineal y se mantiene estable en altas concentraciones (4, 9). La respuesta del INR es más lineal, pero no es lo suficientemente sensible. El tiempo de trombina (TT) también es muy sensible en concentraciones terapéuticas pero es un indicador útil de la presencia de Dabi. Un TT con calibración de Dabi realizado en muestras diluidas permite la cuantificación de Dabi linealmente (9–11). Riva prolonga el APTT de manera no lineal pero solo moderadamente en concentraciones mínimas (12). Las respuestas del INR varían ampliamente según el reactivo del ensayo de tromboplastina, pero un ensayo calibrado anti-Xa parece ser el método adecuado para la determinación de concentraciones de Riva (13–16).

Nuestro objetivo fue el de evaluar los efectos de los NOAC en pruebas de detección de coagulación, así como en ensayos más específicos entre diferentes laboratorios. Este estudio se realizó en conjunto con una evaluación de calidad externa (EQA) internacional de coagulación con el fin de examinar la variedad de reactivos y la disponibilidad de métodos más específicos en un número mayor de laboratorios. Además de estas muestras adicionales, controlamos algunos de los hallazgos en muestras clínicas de pacientes.

## Materiales y métodos

### MUESTRAS CON DABI Y RIVA Y MÉTODOS

Se enviaron muestras de plasma humano normal liofilizado agrupado y enriquecido con Dabi (Aniara) en concentraciones finales de 120 y 300  $\mu\text{g/l}$  a 115 laboratorios europeos (Polonia 49, Finlandia 35, Lituania 17, Letonia 9, Estonia 2 e Islandia 2) a través de la organización de EQA Labquality en julio de 2011. Las muestras fueron amablemente donadas por Boehringer Ingelheim Finland. Se indicó a los laboratorios reconstruir el plasma con 1.0 ml de agua destilada, mezclar enérgicamente e incubar por 30 minutos a temperatura ambiente, mezclando periódicamente, antes del análisis. Se solicitó a los laboratorios que usaran pruebas de detección y los ensayos disponibles más específicos (tal como TT) en las dos muestras. En total,

73 laboratorios (63.5%) informaron resultados; solo 11 laboratorios informaron el TT.

Se enviaron muestras de plasma humano normal agrupado liofilizado y enriquecido con Riva (Technoclone) en concentraciones de 60, 146 y 305  $\mu\text{g/l}$  a 38 laboratorios (Finlandia 18, Noruega 9, Irlanda 5, Dinamarca 2, Suecia 2, Estonia 1 y Lituania 1) por Labquality en enero de 2012. Las muestras fueron amablemente donadas por Bayer Schering Pharma. Se indicó a los laboratorios reconstituir el plasma con 1.0 ml de agua destilada, mezclar por rotación cuidadosamente para evitar la formación de espuma e incubar por al menos 10 minutos a temperatura ambiente antes del análisis. Luego se solicitó a los laboratorios que usaran las pruebas de detección y los ensayos disponibles más específicos (como el anti-Xa) en las 3 muestras; 22 (57.9%) de los laboratorios informaron resultados. Además, los calibradores con concentraciones de Riva de 0, 15, 60, 100 y 150  $\mu\text{g/l}$  se enviaron a 18 laboratorios finlandeses para el ensayo local anti-Xa de Riva. Los resultados anti-Xa calibrados con Riva fueron informados por 8 laboratorios.

Los diferentes reactivos usados por los laboratorios participantes se resumen en la Tabla 1. En total, se usaron 23 diferentes analizadores de coagulación de 8 diferentes fabricantes. Los efectos de los analizadores no se evaluaron en este estudio.

Para comparar las diferencias entre muestras de pacientes y muestras enriquecidas, usamos muestras clínicas de pacientes del Hospital Central Universitario de Helsinki. Se evaluaron 10 muestras de pacientes con Dabi y 10 con Riva, con PT y APTT y una prueba para determinar las concentraciones de fármaco (TT con calibración de Dabi o anti-Xa con calibración de Riva). Se utilizaron los reactivos Nycotest PT® (Axis-Shield, método Owren) y Actin FSL® (Siemens Healthcare Diagnostics) para medir el PT y APTT, respectivamente. Los pacientes tomaron Dabi ya sea para cirugía ortopédica o como indicación para fibrilación auricular; en el caso de Riva, todas las muestras fueron de pacientes sometidos a cirugía ortopédica. Se desconocen los intervalos de tiempo entre el consumo del fármaco y el muestreo de sangre.

### ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Analizamos los efectos de los reactivos con análisis de la varianza (ANOVA) y la prueba *t* de Student. Usamos los CV para examinar la variación entre laboratorios en diferentes ensayos. Los resultados se representan como diagramas de caja, en donde la longitud de las barras indica el rango intercuartil (percentil 25 a 75). Los valores atípicos (círculos en figuras) se definieron como valores 1.5 a 3.0 en la longitud de las barras del límite de la caja, y los valores atípicos extremos (asteriscos) con longitud de barra  $>3.0$ . En el ensayo de APTT, usamos

**Tabla 1. Reactivos usados por los laboratorios participantes de 10 países europeos.**

Ensayo y reactivo	Fabricante del reactivo	Laboratorios en la ronda dabigatran, n	Laboratorios en la ronda rivaroxaban, n
<b>PT/INR</b>			
Método Owren			
Nycotest PT	Axis-Shield	8	2
Owren's PT	Medirox	10	7
SPA Stago	Diagnostica Stago	19	9
Thrombotest	Axis-Shield	7	2
<b>Método Quick</b>			
Bioksel System PT	Bio-Ksel	2	0
HemosIL PT	Instrumentation Laboratory	1	0
Innovin	Siemens Healthcare Diagnostics	2	2
RecombiPlastin 2G	Instrumentation Laboratory	5	0
Roche Tromboplastina	Roche Diagnostics	1	0
STA Neoplastin CIPlus	Diagnostica Stago	2	0
Technoplastin HIS	Technoclon	1	0
Thromborel S	Siemens Healthcare Diagnostics	12	0
TriniCLOT PT HTF	Tcoag	1	0
<b>APTT</b>			
Actin FSL	Siemens Healthcare Diagnostics	16	8
Bioksel System APTT	Bio-Ksel	2	0
Dapttin TC	Technoclon	1	0
Grifols APTT	Grifols	2	0
HemosIL APTT SP	Instrumentation Laboratory	17	5
Pathromtin SL	Siemens Healthcare Diagnostics	9	0
STA Cephascreen	Diagnostica Stago	4	2
STA PTT Automate	Diagnostica Stago	18	7
TriniCLOT aPTT HS	Tcoag	3	NA <sup>a</sup>
<b>TT</b>			
Comesa Thrombin time	Comesa	1	NA
Siemens Thrombin Reagent	Siemens Healthcare Diagnostics	7	NA
STA Thrombin	Diagnostica Stago	3	NA
<b>Anti-Xa</b>			
Berichrom Heparin	Siemens Healthcare Diagnostics	NA	2
Chromogenix Coamatic Heparin	Instrumentation Laboratory	NA	4
Rotachrom Liquid Heparin	Diagnostica Stago	NA	1
STA Liquid Anti-Xa	Diagnostica Stago	NA	1

<sup>a</sup> No aplicable.

el límite superior del intervalo de referencia local informado por el laboratorio para determinar la prolongación de APTT en mayores concentraciones de fármaco debido a que se desconocían los valores iniciales. En las comparaciones de diferentes reactivos, se excluyeron del análisis estadístico los resultados obtenidos con los reactivos usados solo en un laboratorio. Los análisis

estadísticos se realizaron con los programas Microsoft Excel® (2007) e IBM SPSS® (18.03).

### Resultados

Los resultados de INR y APTT de las pruebas de detección coagulación de diferentes laboratorios para las muestras con Dabi y Riva se resumen en la Tabla 2.

**Tabla 2. Resumen de los resultados informados por diferentes laboratorios para muestras de plasma enriquecidas con Dabi y Riva.**

	INR			APTT			Anti-Xa		
	n	Media (rango)	CV (%)	n	Media (rango), s	CV, %	n	Media (rango), $\mu\text{g/l}$	CV, %
Dabi, $\mu\text{g/l}$	71			72					
120		1.28 (1.00–2.18)	17.9		67.9 (26.0–91.9)	19.0			
300		1.55 (1.13–3.30)	28.4		91.3 (59.0–127.3)	18.0			
Riva, $\mu\text{g/l}$	22			22			8		
60		1.07 (0.99–1.20)	6.7		34.7 (28.7–42.1)	14.3		66.8 (59.0–74.0)	8.1
146		1.13 (1.02–1.40)	10.7		40.2 (31.9–48.5)	14.9		134.2 (110.9–154.0)	9.0
305		1.33 (1.12–1.75)	14.6		43.3 (34.0–52.6)	15.5		207.3 (137.6–313.0)	33.8

#### DABI E INR/PT

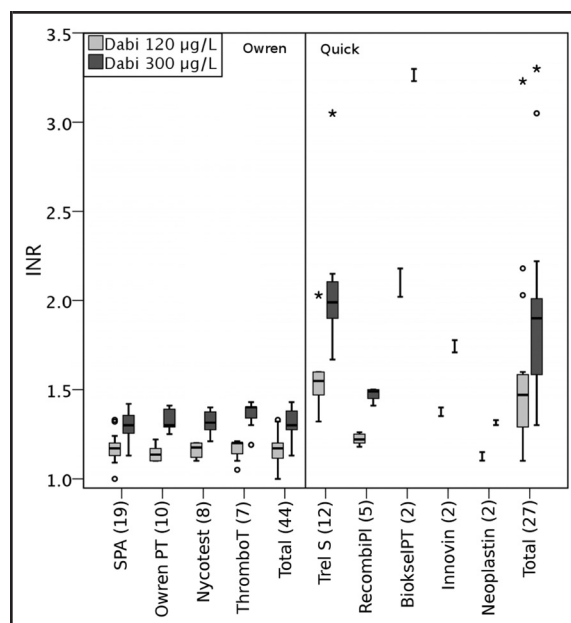
Los valores de INR para las muestras de plasma observadas con Dabi (120 y 300  $\mu\text{g/l}$ ) fueron informados por 71 laboratorios. Se utilizaron trece diferentes reactivos de tromboplastina (Tabla 1). Los valores de INR se incrementaron ligeramente en ambas muestras de plasma pero solo fueron moderadamente mayores a 300  $\mu\text{g/l}$  de Dabi. El acuerdo entre laboratorios no fue óptimo (Tabla 2). Hubo diferencias de sensibilidad entre los reactivos de tromboplastina (ANOVA  $P < 0.001$ ). El cambio medio relativo en INR entre las dos muestras con Dabi fue de 1.21 (rango 1.11 a 1.55). El tipo de método usado para el análisis de INR tuvo un impacto: el método Quick dio como resultado mayores niveles de INR y un incremento mayor en el INR con mayores concentraciones de Dabi que en el método Owren ( $P < 0.001$ ) (Fig. 1).

El PT en segundos fue algo mayor con la mayor concentración de Dabi, pero solo 17 laboratorios informaron resultados. La prolongación de PT fue menor; 21.3 s (rango 13.1 a 38.8 s) y 27.5 s (rango 15.7 a 50.2 s) con una amplia variación (CV 36.4% y 39.0%, respectivamente).

#### DABI y APTT

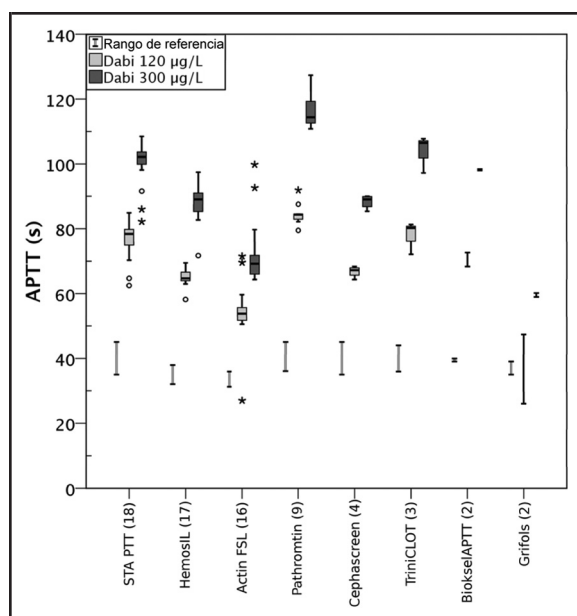
Los valores de APTT para las dos muestras de plasma con Dabi (120 y 300  $\mu\text{g/l}$ ) fueron informados por 72 laboratorios. Se usaron nueve diferentes reactivos de APTT (Tabla 1). El APTT detectó adecuadamente la presencia de Dabi, y 70 de 72 laboratorios informaron valores por encima de sus límites superiores de referencia de 120  $\mu\text{g/l}$  de Dabi. Se prolongó el APTT conforme a la dosis de Dabi (Tabla 2). La prolongación media del APTT fue de 23.4 s (rango 6.5 a 41.7 s), que excedió el límite superior de referencia por 53.8 s con 300  $\mu\text{g/l}$  de Dabi (rango 20.0 a 89.3 s). Sin embargo, la variación entre laboratorios fue amplia y dependiente de los reactivos ( $P < 0.001$ ). La prolongación relativa

del APTT tuvo una media de 1.36 (rango 1.31 a 1.62) y el incremento relativo sobre el límite superior de referencia tuvo una media de 2.45 (rango 1.61 a 2.7) (Fig. 2) con 300  $\mu\text{g/l}$  de Dabi.



**Figura 1. Resultados de INR para las muestras con Dabi obtenidas con reactivos de tromboplastina.**

El diagrama de caja muestra la mediana (línea), los cuartiles inferior y superior (caja), rango total (barbas), valores atípicos ( $\circ$ ), y valores atípicos extremos (\*). El número de laboratorios que usaron el reactivo se muestra entre paréntesis. Los reactivos del método Owren exhibieron menores valores de INR y menor variación ( $P < 0.001$ ) que los reactivos del método Quick. SPA, SPA Stago; Mycotest, Mycotest PT; ThromboT, Thrombotest; Trel S, Thromborel S; RecombiPI, RecombiPlastin 2G; BiokselPT, Bioksel System PT; Neoplastin, STA Neoplastin CIPlus.



**Figura 2. Resultados de APTT para las muestras con Dabi obtenidas con diferentes reactivos.**

El diagrama de caja muestra la mediana (línea), los cuartiles inferior y superior (caja), rango total (barbas), valores atípicos (○), y valores atípicos extremos (\*). El límite superior del intervalo de referencia local se usó para simular el valor inicial. Casi todos los laboratorios (70 de 72) informaron valores por encima del límite superior de referencia, aún las concentraciones más bajas de Dabi. El número de laboratorios que usaron el reactivo se muestra entre paréntesis. Rango de referencia, rango de límites superiores de intervalos locales de referencia; STA PTT, STA PTT Automate; HemosIL, HemosIL APTT SP; Pathromtin, Pathromtin SL; Cephascreen, STA Cephascreen; TriniCLOT, TriniCLOT aPTT HS; Bioksel/APTT, Bioksel System APTT; Grifols, Grifols APTT.

#### DABI Y TT

Solo 11 laboratorios (15% de los 73 que informaron resultados) informaron resultados de TT. Los 11 informaron un valor de TT superior al rango de medición para ambas concentraciones de Dabi (no se muestran los datos), por tanto demostraron la presencia de un inhibidor de trombina. Solo 1 laboratorio informó resultados como concentraciones de Dabi, obtenidas con el ensayo Hemoclot (Aniara): 110 y 320 µg/l.

#### DABI EN MUESTRAS DE PACIENTES CLÍNICOS

La concentración media de Dabi conforme a la medición del TT con calibración de Dabi en 10 muestras de plasma de pacientes clínicos fue de 119 µg/l (rango 100 a 135.5 µg/l). Para las muestras de pacientes, el INR tuvo una media de 1.08 (rango 0.96 a 1.17),

mientras que para la muestra enriquecida de 120 µg/l con el mismo reactivo (Nycotest PT), el INR fue ligeramente mayor, media de 1.16 ( $P < 0.01$ ) (Fig. 1). Tanto para la muestra clínica como para la enriquecida, el INR estuvo dentro del intervalo de referencia. La media de APTT para las muestras de los pacientes fue de 39.8 s (rango 33 a 42.6 s), mientras que para la muestra enriquecida de 120 µg/l con el mismo reactivo (Actin FSL), el APTT fue mayor, media de 54.2 s ( $P < 0.001$ ) (Fig. 2). Esta diferencia es clínicamente relevante dado que en el grupo de muestras del paciente, la prolongación de APTT fue claramente menos pronunciada en una muestra aún estando dentro del intervalo local de referencia.

#### RIVA E INR/PT

Los valores de INR fueron informados por 22 laboratorios para las 3 muestras de plasma con Riva (60, 146 y 305 µg/l). Se utilizaron cinco diferentes reactivos de tromboplastina (Tabla 1). Los valores de INR solo estuvieron ligeramente influenciados por Riva. Ningún laboratorio alcanzó el valor de INR de 1.9. El acuerdo entre los laboratorios fue relativamente bueno, con bajos CV (Tabla 2). Sin embargo, hubo diferencias significativas en las respuestas de INR entre los reactivos ( $P < 0.005$ ). El cambio relativo en INR entre las concentraciones inferiores y superiores tuvo una media de 1.25 (rango 1.14 a 1.43). El método (Quick en comparación con Owren) tuvo un efecto reducido en el resultado (Fig. 3).

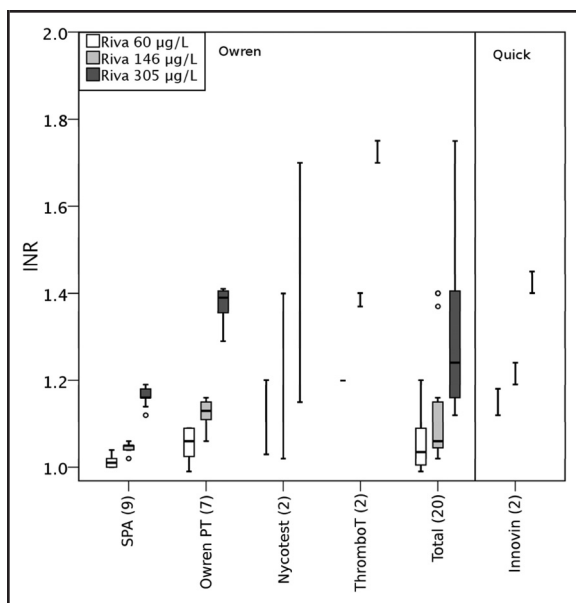
Solo 11 laboratorios informaron resultados de PT en segundos. El efecto de Riva fue moderado: 23.3 s (rango 12.1 a 39.8 s), 24.6 s (12.8 a 46.1 s) y 31.2 s (15.1 a 59.5 s), con un CV ampliamente variable de 31.3%, 35.3% y 35.7% respectivamente. Al aumentar las concentraciones de Riva, el PT se prolongó de forma clara. Para la concentración más alta de Riva, el PT excedió el límite superior de referencia en todos los laboratorios.

#### RIVA Y APTT

Los valores de APTT fueron informados por 22 laboratorios. Se utilizaron cuatro reactivos diferentes (Tabla 1). La prolongación de APTT dependió de la dosis, pero fue moderada para las 3 muestras (60, 146 y 305 µg/l de Riva). Sin embargo, al parecer el incremento no fue lineal (Fig. 4). Una vez más, hubo una amplia variación entre laboratorios ( $P < 0.001$ ) (Tabla 2). El reactivo usado tuvo un efecto distinto en el APTT: hubo una diferencia reducida pero significativa en la magnitud de respuesta a mayores concentraciones de Riva entre los diferentes reactivos ( $P < 0.05$ ) (Fig. 4).

#### RIVA Y ANTI-Xa CALIBRADO PARA RIVA

Ocho laboratorios informaron anti-Xa (36% de los 22 laboratorios que informaron resultados). Dos labora-



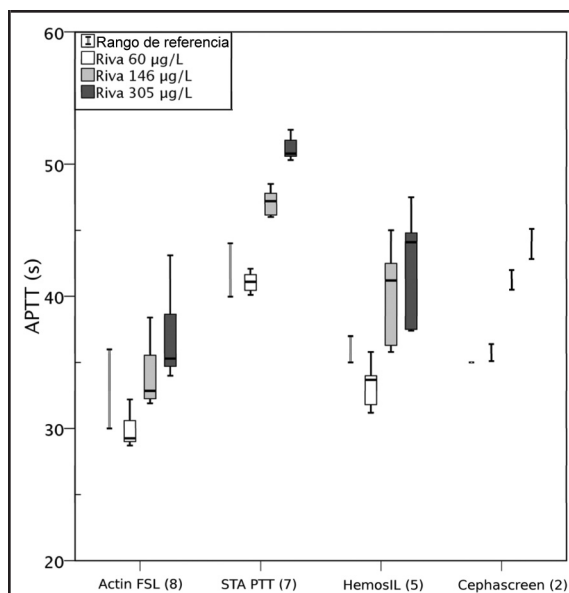
**Figura 3. Resultados de INR para las muestras Riva obtenidas con reactivos de tromboplastina.**

El diagrama de caja muestra la mediana (línea), los cuartiles inferior y superior (caja), el rango total (barbas) y los valores atípicos (○). Solo 2 laboratorios usaron un reactivo del método Quick. El número de laboratorios que usaron el reactivo se muestra entre paréntesis. SPA, SPA Stago; Nycotest, Nycotest PT; Thrombot, Thrombotest.

torios informaron resultados de concentración precisos para todas las muestras, mientras que 6 infravaloraron la mayor concentración, probablemente debido a que la concentración más alta de la muestra de calibración (150 µg/l) fue claramente muy baja para estas muestras (Tabla 2). Dos laboratorios usaron reactivos anti-Xa con antitrombina exógena (reactivo Berichrom Heparin, en la Tabla 1), mientras que 6 no lo hicieron, sin un efecto significativo en los resultados. La media de resultados con antitrombina agregada fue de 62.4, 148.3 y 255.5 µg/l y sin adición de antitrombina 68.2, 129.5 y 188.1 µg/l (valores *P* 0.210, 0.043 y 0.203), respectivamente.

#### RIVA EN MUESTRAS DE PACIENTES CLÍNICOS

La concentración media de Riva, medida con un anti-Xa calibrado con Riva en 10 muestras de plasma de pacientes clínicos, fue de 63 µg/l (rango 32 a 128 µg/l). La media de INR fue 1.00 (rango 0.88 a 1.12). Los resultados no fueron significativamente diferentes de la muestra enriquecida de 60 µg/l con el mismo reactivo (Nycotest PT), todos los resultados de INR estuvieron dentro del rango de referencia. El valor medio de APTT fue de 27.3 s (rango 25.0 a 34.0 s). Nuevamente, los



**Figura 4. Resultados de APTT para las muestras con Riva obtenidas con diferentes reactivos.**

El diagrama de caja muestra la mediana (línea), los cuartiles inferior e inferior (caja) y el rango total (barbas). Los resultados de APTT estuvieron dentro del intervalo de referencia en la mayoría de los grupos de reactivos a la menor concentración de rivaroxaban. En la concentración más alta de rivaroxaban, casi todos los laboratorios informaron valores sobre el límite superior de referencia. El número de laboratorios que usaron el reactivo se muestra entre paréntesis. Rango de referencia: rango de los límites superiores de los intervalos locales de referencia. STA PTT, STA PTT Automate; HemosIL, HemosIL APTT SP; Cephascreen, STA Cephascreen.

resultados no fueron significativamente diferentes de los de la muestra enriquecida de 60 µg/l con el mismo reactivo (Actin FSL) y todos los resultados de APTT para muestras clínicas y enriquecidas estuvieron dentro del intervalo de referencia local.

#### Análisis

Este estudio tuvo como objetivo evaluar el efecto de los NOAC Dabi y Riva en ambos ensayos habituales de anticoagulantes y específicos de fármacos en relación con un gran número de métodos y reactivos en 10 países de Europa. La evaluación de laboratorio del grado de anticoagulación puede ser necesaria en situaciones especiales y pueden requerirse ensayos de detección fácilmente disponibles. Por tanto, los laboratorios deberían estar al tanto de la sensibilidad específica a los fármacos de sus propios ensayos de PT, INR y APTT

(17). Como se esperaba, se usó una gran variedad de reactivos de detección de coagulación: en total, 13 para INR y 9 para APTT en numerosas combinaciones con 23 diferentes coagulómetros. Aquí, solamente un pequeño grupo de laboratorios (15 y 36%) informó resultados de ensayos específicos en las rondas de Dabi y Riva, respectivamente.

El PT/INR de la prueba de anticoagulación habitual tiene un valor limitado en la medición de los efectos anticoagulantes de los NOAC. Aquí, los valores de INR variaron ampliamente entre los diferentes reactivos, especialmente con las muestras con Dabi, de acuerdo con estudios previos (11, 18). Nuestra nueva observación fue que los reactivos para PT del método Owren fueron particularmente insensibles para Dabi y hubo una pequeña variación (Fig. 1). Además, en nuestro reducido grupo de pacientes clínicos que consumieron Dabi, todos presentaron valores de INR en el rango de referencia medido con el método Owren. En contraste, con los reactivos del método Quick, el rango fue de 3 veces aún con la menor concentración de Dabi. Nuestros datos contradicen los niveles de INR sugeridos de 1.5 (Owren) y 2.0 (Quick) para la detección de sobredosis de Dabi (18). Además, los dispositivos de INR de los puntos de atención pueden proporcionar lecturas altas falsas en algunos casos en que se usaron con pacientes que consumían Dabi (19). Con las muestras de Riva, ningún laboratorio alcanzó el valor de INR de 1.9 aún con la mayor concentración de 305  $\mu\text{g/l}$ . El reactivo Neoplastin CI Plus® (Diagnostica Stago), por su sensibilidad, ha sido sugerido como el apropiado como reactivo para pruebas de calidad (13, 20). De acuerdo con este estudio, eso tiene actualmente un valor práctico limitado, ya que ninguno de los laboratorios que informó resultados en la ronda de Riva, usó dicho reactivo.

Cuando se evalúan los efectos de los NOAC, se ha sugerido el PT en lugar del INR, dado que el INR está calibrado solo para VKA. Las diferencias entre los reactivos se amplían con reactivos de tromboplastina de alto índice internacional de sensibilidad (ISI) (16, 21). Los valores de ISI de los reactivos en nuestro estudio fueron bastante similares y cercanos a 1.0 (de acuerdo con los fabricantes, rango 0.9 a 1.3). Las diferencias en los resultados de PT fueron ligeramente mayores con mayores concentraciones de fármacos para ambos NOAC. Recientemente, se han realizado esfuerzos por estandarizar los métodos de PT mediante la creación de un ISI para Riva, análogo al ISI para VKA. Sin embargo, esta calibración se aplica solamente al método Quick y está disponible solo en un número limitado de laboratorios (21). El INR/PT, que está ampliamente disponible, es más factible de utilizar para medir los NOAC a pesar de no ser el óptimo. Aquí, los resultados de INR fueron similarmente inertes entre las muestras

de pacientes clínicos y las muestras in vitro con bajas concentraciones de fármacos.

Todos los reactivos de APTT detectaron de forma correcta la presencia y dependencia a dosis de Dabi. El APTT fue prolongado aún en la concentración más baja casi de manera uniforme, pero con una varianza dos veces mayor entre los reactivos. De los reactivos más frecuentemente usados, el Actin FSL® (Siemens Healthcare Diagnostics) fue uno de los menos sensibles, mientras que Stago PTT® (Stago) respondió con más fuerza (Fig. 2). Estos hallazgos relacionados con los reactivos concuerdan con los de Lindahl y cols (18), pero no coinciden con los de Douxfils y cols (10). El APTT se recomienda como una prueba indicadora de la presencia de Dabi debido a su alta sensibilidad, una manifestación respaldada por los resultados de nuestras muestras enriquecidas (17). Sin embargo, en muestras de pacientes, el APTT fue menos sensible que en las muestras enriquecidas. De hecho, los médicos deberían tener precaución con el uso del APTT para evaluar los efectos de Dabi, ya que el APTT puede ser normal aún en concentraciones terapéuticas (22). La respuesta a la dosis es curvilínea y se ve claramente afectada por la situación clínica. El efecto de Riva en el APTT fue moderado y no lineal, de acuerdo con estudios previos (13).

Hubo ensayos específicos disponibles en relativamente pocos centros. Los resultados de TT fueron proporcionados por 11 laboratorios (15%), pero solamente 1 de ellos tuvo el ensayo calibrado diluido de TT disponible para medir la concentración con resultados precisos. Con el anti-Xa pudo medirse la concentración de Riva, cuando se calibró específicamente, lo que resulta compatible con estudios previos (16). Generalmente, los ensayos anti-Xa están disponibles con facilidad, se usan ampliamente, y pueden ser relativamente fáciles de calibrar para medir de forma precisa las concentraciones del inhibidor del factor Xa. Sin embargo, los laboratorios del hospital también están validando pruebas apropiadas para la detección de los efectos anticoagulantes para el uso habitual (11, 13, 15, 16, 18, 23). Se requiere una mayor disponibilidad de los calibradores y posteriores rondas de EQA para ayudar a los laboratorios a configurar y mantener los ensayos específicos.

Al examinar los resultados de nuestro estudio, deben reconocerse las limitaciones de los materiales de las muestras. Al no ser óptimo, el plasma liofilizado puede reducir las actividades del factor de coagulación y prolongar los valores de PT y APTT en comparación con el plasma fresco (24, 25). Sin embargo, las muestras enviadas a diferentes laboratorios se obtuvieron de una manera estandarizada similar. Asimismo, actualmente el uso del plasma de pacientes en lugar del plasma normal enriquecido sería posible solo en un limitado

número de laboratorios y con los NOAC, dicho material sigue siendo escaso. Por lo tanto, la aplicación de estos datos a la práctica clínica debería realizarse con precaución.

Las muestras de pacientes con NOAC difieren ligeramente de las muestras enriquecidas. A concentraciones de fármacos similares, el APTT fue menos sensible a Dabi en las muestras de pacientes que en las muestras enriquecidas, un hecho que tiene significancia clínica dado que el APTT no alerta necesariamente sobre la presencia de Dabi. Dado que se observó una variación significativa entre los reactivos de PT y APTT con plasma normal enriquecido *in vitro*, la variación entre las muestras de pacientes también puede llegar a exceder esta cantidad *in vivo*. Las situaciones clínicas de estado de coagulación variable; es decir, insuficiencia renal o hepática, infección, cirugía, hemorragia o trombosis; modifican los resultados de los ensayos de coagulación general y la eficacia de los NOAC, lo que complica aún más la interpretación. Desafortunadamente, los datos de la supervisión en laboratorio de los pacientes con hemorragia aún son limitados (6, 26). Dado que no se ha realizado la supervisión de rutina, no se adquirirá experiencia sobre las concentraciones de plasma de los NOAC a dosis deseables o sub/supraterapéuticas. Con mayor frecuencia, el conocimiento sobre las concentraciones de NOAC se vuelve necesario de forma repentina durante los horarios de guardia. En ausencia de antídotos específicos, los agentes no específicos de desvío (es decir, concentrados complejos de protrombina y FVIIa recombinante) pueden proporcionar beneficios clínicos (27, 28). Sin embargo, estos agentes influyen tanto en el PT como el APTT, lo que puede no reflejar la eficacia clínica de la inversión, y luego complicar la interpretación. En su lugar, los ensayos TT y anti-Xa calibrados ofrecen un control específico y preciso de la concentración en situaciones especiales.

En conclusión, los ensayos de anticoagulación de PT, INR y APTT habituales son altamente dependientes del reactivo y no proporcionan mediciones precisas de la actividad de los NOAC. Sin embargo, cada laboratorio debería probar la sensibilidad a los NOAC en sus ensayos. También creemos que los laboratorios necesitan validar más ampliamente los ensayos calibrados específicos. Por lo tanto, deberían establecerse las rondas de EQA para los NOAC a fin de estandarizar y armonizar las prácticas de laboratorio, dado que un número creciente de laboratorios aplicará estas pruebas a la práctica clínica.

**Contribuciones de los autores:** Todos los autores confirmaron que han contribuido al contenido intelectual de este documento y han cumplido con los siguientes 3 requerimientos: (a) contribuciones significativas a la concepción y el diseño, la adquisición de datos o el análisis e interpretación de estos; (b) redacción o revisión del artículo en relación con su contenido intelectual; y (c) aprobación final del artículo publicado.

**Declaración de los autores o posibles conflictos de interés:** Tras la presentación del manuscrito, todos los autores completaron el formulario de declaración de autor. Declaraciones o posibles conflictos de interés:

**Empleo o liderazgo:** No se declara.

**Papel del consultor o asesor:** No se declara.

**Propiedad:** No se declara.

**Honorarios:** No se declara.

**Financiamiento de la investigación:** Boehringer Ingelheim Finland y Bayer Schering Pharma Finland (muestras del estudio).

**Testimonio de expertos:** No se declara.

**Otras remuneraciones:** T. Helin, Leo Pharma Ltd.

**Papel del patrocinador:** Las organizaciones patrocinadoras no jugaron papel alguno en el diseño del estudio, la elección de los pacientes, la revisión e interpretación de datos ni la preparación o aprobación del manuscrito.

**Agradecimientos:** Se reconoce a Bayer Finland y Boehringer Ingelheim Finland por proporcionar las muestras de plasma con Riva y Dabi, respectivamente. Se reconoce a los laboratorios que participaron en estos estudios de EQA por sus esfuerzos.

## Referencias

1. Connolly SJ, Ezekowitz MD, Yusuf S, Eikelboom J, Oldgren J, Parekh A et al. *Dabigatran versus warfarin in patients with atrial fibrillation* (Dabigatran frente a warfarina en pacientes con fibrilación auricular). *N Engl J Med* 2009;361:1139–51.
2. Patel MR, Mahaffey KW, Garg J, Pan G, Singer DE, Hacke W, et al. *Rivaroxaban versus warfarin in nonvalvular atrial fibrillation* (Rivaroxaban frente a warfarina en fibrilación auricular no valvular). *N Engl J Med* 2011;365:883–91.
3. Mueck W, Lensing AW, Agnelli G, Decousus H, Prandoni P, Misselwitz F. *Rivaroxaban: population pharmacokinetic analyses in patients treated for acute deep-vein thrombosis and exposure simulations in patients with atrial fibrillation treated for stroke prevention* (Rivaroxaban: análisis farmacocinético de la población en pacientes bajo tratamiento de trombosis venosa profunda aguda y simulaciones de exposición en pacientes con fibrilación auricular bajo tratamiento de prevención de accidente cerebrovascular). *Clin Pharmacokinet* 2011;50:675–86.
4. Stangier J, Rathgen K, Stähle H, Gansser D, Roth W. *The pharmacokinetics, pharmacodynamics and tolerability of dabigatran etexilate, a new oral direct thrombin inhibitor, in healthy male subjects* (La farmacocinética, farmacodinámica y tolerancia del dabigatran etexilato, un nuevo inhibidor oral directo de trombina, en hombres sanos). *Br J Clin Pharmacol* 2007;64:292–303.
5. Mack DR, Kim JJ. *Pharmacokinetic and clinical implications of dabigatran use in severe renal impairment for stroke prevention in nonvalvular atrial fibrillation* (Implicaciones farmacocinéticas y clínicas del uso de dabigatran en insuficiencia renal severa para prevención de ataque cerebrovascular en fibrilación auricular no valvular). *Ann Pharmacother* 2012;46:1105–10.
6. Lillo-Le Louët A, Wolf M, Soufir L, Galbois A, Dumenil AS, Offenstadt G, et al. *Life-threatening bleeding in four patients with an unusual excessive response to dabigatran: implications for emergency surgery and resuscitation* [Letter] (Hemorragia potencialmente mortal en cuatro pacientes con una respuesta inusual excesiva al dabigatran: consecuencias para cirugía de emergencia y resucitación [Carta]). *Thromb Haemost* 2012;108:583–5.
7. Favaloro EJ, Lippi G, Koutts J. *Laboratory testing of anticoagulants: the present and the future*



- (Pruebas de laboratorio para anticoagulantes: el presente y el futuro). *Pathology* 2011;43:682–92.
8. Salmela B, Jouts-Korhonen L, Armstrong E, Lassila R. Active online assessment of patients using new oral anticoagulants: bleeding risk, c, and coagulation analysis (Evaluación activa en línea de pacientes que consumen nuevos anticoagulantes orales: riesgo de hemorragia, distensibilidad y análisis de coagulación). *Semin Thromb Hemost* 2012;38:23–30.
  9. van Ryn J, Stangier J, Haertter S, Liesenfeld KH, Wiene W, Feuring M, et al. Dabigatran etexilate: a novel, reversible, oral direct thrombin inhibitor: interpretation of coagulation assays and reversal of anticoagulant activity (Dabigatran etexilato: un inhibidor oral directo de trombina nuevo y reversible: interpretación de ensayos de coagulación e inhibición de la actividad anticoagulante). *Thromb Haemost* 2010;103:1116–27.
  10. Douxfils J, Mullier F, Robert S, Chatelain C, Chatelain B, Dogné JM. Impact of dabigatran on a large panel of routine or specific coagulation assays. Laboratory recommendations for monitoring of dabigatran etexilate (Impacto del dabigatran en un amplio panel de ensayos de coagulación habituales o específicos). Recomendaciones de laboratorio para la supervisión del dabigatran etexilato. *Thromb Haemost* 2012;107:985–97.
  11. Harenberg J, Giese C, Marx S, Krämer R. Determination of dabigatran in human plasma samples (Determinación de dabigatran en muestras de plasma humano). *Semin Thromb Hemost* 2012;38:16–22.
  12. Mani H, Hesse C, Stratmann G, Lindhoff-Last E. Rivaroxaban differentially influences ex vivo global coagulation assays based on the administration time (El rivaroxaban influye de forma diferencial en ensayos generales de coagulación ex vivo basados en el tiempo de administración). *Thromb Haemost* 2011;106:156–64.
  13. Hillarp A, Baghaei F, Fagerberg Blixter I, Gustafsson KM, Stigendal L, Sten-Linder M, et al. Effects of the oral, direct factor Xa inhibitor rivaroxaban on commonly used coagulation assays (Efectos del inhibidor directo del factor Xa oral rivaroxaban en ensayos de coagulación comúnmente usados). *J Thromb Haemost* 2011;9:133–9.
  14. Samama MM, Contant G, Spiro TE, Perzborn E, Guinet C, Gourmelin Y, et al. Evaluation of the anti-factor Xa chromogenic assay for the measurement of rivaroxaban plasma concentrations using calibrators and controls (Evaluación del ensayo cromogénico del anti-factor Xa para la medición de concentraciones de rivaroxaban en plasma con calibradores y controles). *Thromb Haemost* 2012;107:379–87.
  15. Samama MM, Martinoli JL, LeFlem L, Guinet C, Plu-Bureau G, Depasse F, et al. Assessment of laboratory assays to measure rivaroxaban: an oral, direct factor Xa inhibitor (Evaluación de ensayos de laboratorio para medición de rivaroxaban: un inhibidor directo del factor Xa oral). *Thromb Haemost* 2010;103:815–25.
  16. Barrett YC, Wang Z, Frost C, Shenker A. Clinical laboratory measurement of direct factor Xa inhibitors: anti-Xa assay is preferable to prothrombin time assay (Medición de laboratorio clínico de inhibidores directos del factor Xa: preferencia del ensayo anti-Xa en lugar del ensayo de tiempo de protrombina). *Thromb Haemost* 2010;104:1263–71.
  17. Baglin T, Keeling D, Kitchen S. Effects on routine coagulation screens and assessment of anticoagulant intensity in patients taking oral dabigatran or rivaroxaban: guidance from the British Committee for Standards in Haematology (Efectos en exámenes de coagulación habituales y evaluación de intensidad anticoagulante en pacientes que toman dabigatran o rivaroxaban por vía oral: guía del Comité Británico de Estándares en Hematología). *Br J Haematol* 2012;159:427–9.
  18. Lindahl TL, Baghaei F, Blixter IF, Gustafsson KM, Stigendal L, Sten-Linder M, et al. Effects of the oral, direct thrombin inhibitor dabigatran on five common coagulation assays (Efectos del inhibidor oral directo de trombina en cinco ensayos comunes de coagulación). *Thromb Haemost* 2011;105:371–8.
  19. van Ryn J, Baruch L, Clemens A. Interpretation of point-of-care INR results in patients treated with dabigatran (Interpretación de resultados de INR del punto de atención en pacientes tratados con dabigatran). *Am J Med* 2012;125:417–20.
  20. Samama MM, Guinet C. Laboratory assessment of new anticoagulants (Evaluación de laboratorio de nuevos anticoagulantes). *Clin Chem Lab Med* 2011;49:761–72.
  21. Tripodi A, Chantarangkul V, Guinet C, Samama MM. The International Normalized Ratio calibrated for rivaroxaban has the potential to normalize prothrombin time results for rivaroxaban-treated patients: results of an in vitro study [Letter] (El índice internacional normalizado calibrado para rivaroxaban tiene el potencial de normalizar los resultados de tiempo de protrombina para pacientes tratados con rivaroxaban: resultados de un estudio in vitro [Carta]). *J Thromb Haemost* 2011;9:226–8.
  22. Smith TW, Zypchen L, Carter CJ, Tran A, Colley P, Gin K, et al. Effects of dabigatran and rivaroxaban on routine and specialized coagulation assays: a study using actual patient samples [Abstract] (Efectos del dabigatran y rivaroxaban en ensayos de coagulación habituales y especializados: un estudio con muestras de pacientes reales [Resumen]). *Blood* 2012;120:A23.
  23. Asmis LM, Alberio L, Angelillo-Scherrer A, Korte W, Mendez A, Reber G, et al. Rivaroxaban: quantification by anti-FXa assay and influence on coagulation tests: a study in 9 Swiss laboratories (Rivaroxaban: cuantificación por ensayo anti-FXa e influencia en pruebas de coagulación: un estudio en 9 laboratorios suizos). *Thromb Res* 2012;129:492–8.
  24. Samama MM, Contant G, Spiro TE, Perzborn E, Flem LL, Guinet C, et al. Evaluation of the prothrombin time for measuring rivaroxaban plasma concentrations using calibrators and controls: results of a multicenter field trial (Evaluación del tiempo de protrombina para medición de concentraciones de rivaroxaban en plasma con calibradores y controles: resultados de un ensayo de campo multicentro). *Clin Appl Thromb Hemost* 2012;18:150–8.
  25. Martinaud C, Cividier C, Ausset S, Verret C, Deshayes AV, Sailliol A. In vitro hemostatic properties of French lyophilized plasma (Propiedades hemostáticas in vitro de plasma liofilizado francés). *Anesthesiology* 2012;117:339–46.
  26. Warkentin TE, Margetts P, Connolly SJ, Lamy A, Ricci C, Eikelboom JW. Recombinant factor VIIa (rFVIIa) and hemodialysis to manage massive dabigatran-associated postcardiac surgery bleeding [Letter] (Factor VIIa [rFVIIa] recombinado y hemodiálisis para el control de hemorragia intensa posterior a intervención quirúrgica cardiaca relacionada con dabigatran) [Carta]. *Blood* 2012;119:2172–4.
  27. Eerenberg ES, Kamphuisen PW, Sijpkens MK, Meijers JC, Buller HR, Levi M. Reversal of rivaroxaban and dabigatran by prothrombin complex concentrate: a randomized, placebo-controlled, crossover study in healthy subjects (Disminución de rivaroxaban y dabigatran por concentrado complejo de protrombina: un estudio cruzado, aleatorio y controlado con placebo en sujetos sanos). *Circulation* 2011;124:1573–9.
  28. Marlu R, Hodaj E, Paris A, Albaladejo P, Crackowski JL, Pernod G. Effect of non-specific reversal agents on anticoagulant activity of dabigatran and rivaroxaban: a randomized crossover ex vivo study in healthy volunteers (Efecto de agentes inversos no específicos en la actividad anticoagulante del dabigatran y rivaroxaban: un estudio cruzado aleatorio ex vivo en voluntarios sanos). *Thromb Haemost* 2012;108:217–24.