

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**VALIDAÇÃO DE UM DISPOSITIVO MÓVEL PARA MONITORAR A
ANTICOAGULAÇÃO EM PACIENTES COM SÍNDROME DO ANTICORPO
ANTIFOSFOLIPÍDEO**

GABRIELA VICTÓRIA DE MELLO JANTZCH

PORTO ALEGRE

2024

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**VALIDAÇÃO DE UM DISPOSITIVO MÓVEL PARA MONITORAR
ANTICOAGULAÇÃO EM PACIENTES COM SÍNDROME DO ANTICORPO
ANTIFOSFOLIPÍDEO**

GABRIELA VICTÓRIA DE MELLO JANTZCH

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Machado Xavier

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Medicina: Ciências Médicas, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós- Graduação em Medicina: Ciências Médicas.

Porto Alegre

2024

CIP - Catalogação na Publicação

Jantzch, Gabriela Victória de Mello
VALIDAÇÃO DE UM DISPOSITIVO MÓVEL PARA MONITORAR A
ANTICOAGULAÇÃO EM PACIENTES COM SÍNDROME DO ANTICORPO
ANTIFOSFOLIPÍDEO / Gabriela Victória de Mello Jantzch.
-- 2024.
60 f.
Orientador: Ricardo Machado Xavier.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de
Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto
Alegre, BR-RS, 2024.

1. Coagulação Sanguínea. I. Xavier, Ricardo
Machado, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Epígrafe:

“Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas, mas ao tocar uma alma humana, seja apenas outra alma humana”

(Carl Jung).

Agradecimentos

Agradeço a minha mãe, Maribel, por sempre acreditar em mim, por todo amor, por todo apoio e por todas as palavras de carinho. Obrigada por sempre ver o lado bom de tudo e por acreditar que o meu projeto daria certo antes mesmo da primeira coleta. Mãe, sem o teu suporte eu não teria conseguido chegar até aqui.

Agradeço ao Ivan, por todo amor, paciência nos dias mais difíceis e todo o companheirismo ao longo dessa trajetória. Você esteve e está ao meu lado todos os dias, me dando forças e me fortalecendo para ser uma pessoa melhor. Obrigada!

Aos meus filhos peludos e seus irmãozinhos: Eduardo, Jade, Nina e Thor, por todo o amor e carinho que me fortalece todos os dias. Amo todos vocês com todo o meu coração.

Agradeço ao apoio do meu pai e minha madrasta, Volmar e Daiana, que sempre acreditaram no meu trabalho e em todo o meu empenho como pesquisadora.

Agradeço a todos os meus amigos, mas em especial à elas: Evelyn e Brenda. Vocês foram minhas psicólogas, se fizeram presentes nos dias mais difíceis, acreditaram em mim e me deram suporte, carinho e muito amor. Sou imensamente grata à vocês.

À professora Priscila Lora, que me deu o empurrão inicial para seguir meu caminho acadêmico e ingressar no programa de mestrado. Sou eternamente grata por tudo o que você fez por mim e por ter me mostrado a importância de persistir com meus objetivos.

À minha equipe na Biosens Desenvolvimento e Indústria de Biossensores LTDA – BIOSENS, agradeço por compartilharem comigo todos os seus conhecimentos e estarem sempre de braços abertos para ajudar no que fosse preciso. Agradeço muito a equipe que é responsável por toda a produção de manufatura das tiras reativas e desenvolvimento de toda parte eletrônica do dispositivo, estes foram essenciais para o meu projeto de pesquisa e que fizeram a conclusão deste trabalho ser possível. Equipe, agradeço por compartilharem

momentos maravilhosos, abraços, risadas, cafés e todos os almoços juntos nas sextas-feiras.

Agradeço em especial a minha biomédica preferida, minha líder de equipe, minha amiga e a desenvolvedora das melhores ideias, Julia. Você é a pessoa que mais tenho admiração, faz com que todos os dias nós sejamos profissionais e seres humanos melhores e humildes. Você foi e ainda é a minha fortaleza em dias difíceis, em dias felizes, em grandes conquistas e que nunca mediu esforços em me ajudar no que fosse necessário. Você sempre fez eu acreditar que tudo daria certo, que faríamos tudo novamente quantas vezes fossem necessárias e principalmente, você sempre acreditou no meu potencial. Palavras nunca serão suficientes para agradecer pela pessoa que você é e por tudo que você faz. Eu serei eternamente grata por sua amizade e pelo seu suporte na minha vida.

Aos colegas do Laboratório de Doenças Autoimunes - LABDAI, obrigada por todo o suporte e apoio em tudo que precisei nestes dois anos de pós graduação. Agradeço em especial ao Leonardo e a Natália que sempre foram muito prestativos, resolutivos com as minhas dúvidas e me auxiliaram sempre que possível.

Prof. Xavier, obrigada por me aceitar como orientanda, por acreditar neste projeto e por toda ajuda que você me prestou nestes dois anos de pós-graduação. Todos os seus questionamentos, correções e sugestões foram de grande ajuda e aprendizado nesta trajetória. Desde já, fica o meu eterno agradecimento.

Aos funcionários e pesquisadores do Centro de Pesquisa Clínica, agradeço por seu auxílio e colaboração com meu projeto. Vocês são essenciais em todo o desenvolvimento do projeto.

Por fim, expresso minha gratidão ao Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE/HCPA) e a empresa BIOSENS pelos incentivos financeiros que tornaram este projeto possível. Agradeço também à Universidade Federal do Rio Grande do Sul, especialmente ao programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, pela oportunidade de desenvolvimento e aprendizado para a nossa carreira profissional e pessoal.

Resumo

Introdução: A síndrome do anticorpo antifosfolípide (SAF) é uma doença autoimune sistêmica caracterizada pela presença de anticorpos antifosfolípidos (AFL), que se associam à formação de trombos em artérias e veias, além de poder causarem complicações gestacionais. A SAF pode ocorrer isoladamente (SAF primária) ou em associação com outras doenças autoimunes, como o Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) (SAF secundária). Pacientes com SAF podem necessitar de anticoagulação para evitar a ocorrência de desfechos negativos, mas isso depende de vários fatores, especialmente se já houve trombose, complicações obstétricas e/ou outros fatores de risco associados a distúrbios da coagulação. O monitoramento do nível adequado de anticoagulação ocorre através de exames laboratoriais, pelo teste do tempo de protrombina (TP) e razão internacional normalizada (RNI), realizados em laboratórios de análises clínicas. A introdução de testes laboratoriais remotos (TLR) confiáveis para coagulação pode facilitar o monitoramento, com mais rapidez e conforto para o paciente. Entretanto, a utilização de TLR em pacientes com SAF ainda não está bem estabelecida, devido à escassez de estudos de validação desses testes neste grupo de pacientes. Uma hipótese já descrita na literatura relaciona interferências nos resultados dos testes de TP quando utilizado TLR, devido à presença dos anticorpos antifosfolípidos na amostra. **Objetivo:** Validar o *bSens.INR*, um dispositivo rápido e portátil, para monitorar a anticoagulação de pacientes com SAF e LES. **Métodos:** Para este estudo foram comparados resultados de TP obtidos através do *bSens.INR* utilizando amostras de sangue total da ponta de dedo com os resultados obtidos pelo método convencional que utiliza sangue venoso. Foram incluídos no estudo 20 participantes, sendo 10 participantes pacientes com SAF e LES e que fazem uso de anticoagulante oral (varfarina) (grupo caso) e 10 pacientes que fazem uso de anticoagulante oral (varfarina) sem SAF ou LES (grupo controle). Os pacientes foram recrutados no ambulatório de lúpus e coagulação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) e a partir do cadastro da Biosens Indústria e Desenvolvimento de Biossensores LTDA (Biosens) entre fevereiro e setembro de 2024. Os testes de precisão e repetibilidade foram conduzidos seguindo os padrões da Organização Internacional para Padronização (ISO) 17593 e análises de concordância entre os resultados dos testes laboratoriais do método convencional coagulométrico óptico mecânico e os resultados obtidos pelo TLR *bSens.INR*. **Resultados:** No estudo foram obtidos 40 resultados de TP e RNI no dispositivo *bSens.INR* e 20 resultados do método convencional. A análise de acurácia demonstrou que 77,5% dos resultados do *bSens.INR* foram concordantes com o método convencional, com uma acurácia de 60% no grupo caso e 95% no grupo controle. A repetibilidade dos resultados aprovados mostrou 100% de precisão. Houve uma forte correlação positiva ($r = 0,79$, $p < 0,0001$) entre as duas metodologias ($p < 0,05$). A análise de Bland-Altman sugeriu um viés de 0,26 unidades de RNI entre os métodos, com quatro pontos fora dos limites aceitáveis, todos pertencentes ao grupo caso. **Conclusão:** A presença de AFL em amostras sanguíneas é um desafio que pode interferir nos resultados de TP e RNI. Este estudo demonstrou que o dispositivo *bSens.INR* apresentou redução de acurácia para pacientes com SAF e LES, similar a outros TLR disponíveis. A dificuldade em recrutar pacientes com essas condições que utilizam varfarina impactou o tamanho amostral, sugerindo a necessidade de validações multicêntricas futuras. Futuros estudos devem investigar se o desvio em relação ao método convencional é consistente para indivíduos específicos, o que poderia permitir uma validação individualizada do TLR.

Palavras chave: Lúpus Eritematoso Sistêmico; Síndrome do Anticorpo Antifosfolípide; Razão Internacional Normalizada; Tempo de Protrombina; Teste Laboratorial Remoto;

Abstract

Introduction: Antiphospholipid syndrome (APS) is a systemic autoimmune disease characterized by the presence of antiphospholipid antibodies (aPL), which are associated with thrombus formation in arteries and veins, as well as potential pregnancy complications. APS can occur in isolation (primary APS) or in conjunction with other autoimmune diseases, such as Systemic Lupus Erythematosus (SLE) (secondary APS). Patients with APS may require anticoagulation to prevent negative outcomes, but this depends on various factors, especially if there has been previous thrombosis, obstetric complications, and/or other risk factors associated with coagulation disorders. Monitoring the appropriate level of anticoagulation is achieved through laboratory tests, including prothrombin time (PT) and international normalized ratio (INR), performed in clinical analysis laboratories. The introduction of reliable remote laboratory tests (RLT) for coagulation could facilitate monitoring with increased speed and patient comfort. However, the use of RLT in patients with APS is not yet well-established, due to the lack of validation studies for these tests in this patient group. A hypothesis described in the literature links interference with PT test results when using RLT due to the presence of antiphospholipid antibodies in the sample. **Objective:** To validate a rapid and portable device (*bSens.INR*) for monitoring blood coagulation time in patients with APS and SLE. **Methods:** This study compared PT results obtained from a rapid and portable device using fingertip whole blood samples to results from the conventional optical mechanical coagulometric method using venous blood. The study included 20 participants: 10 participants (case group) with APS and positive SLE who were using oral anticoagulant (warfarin) and 10 participants (control group) who were using oral anticoagulant (warfarin) and had a negative diagnosis for APS and SLE. Patients were recruited from the lupus and coagulation clinic at the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) and from the Biosens Indústria e Desenvolvimento de Biossensores LTDA (Biosens) registry between February and September 2024. Accuracy and repeatability tests were conducted following the International Organization for Standardization (ISO) 17593 standards and concordance analyses between the conventional method laboratory test results and the results obtained from the *bSens.INR* RLT. **Results:** The study produced 40 PT and INR results from the *bSens.INR* device and 20 results from the conventional method. Accuracy analysis showed that 77.5% of the *bSens.INR* results were concordant with the conventional method, with an accuracy of 60% in the case group and 95% in the control group. The repeatability of the approved results demonstrated 100% precision. Spearman correlation results showed a strong positive correlation ($r = 0.79$, $p < 0.0001$), considering the significance criterion ($p < 0.05$). The Bland-Altman analysis suggested a bias of 0.26 INR units between the methods, with four points outside the acceptable limits, all belonging to the case group. **Conclusion:** The presence of aPL in blood samples is a challenge that can interfere with PT and INR results. This study demonstrated that the *bSens.INR* device showed reduced accuracy for patients with APS and SLE, similar to other available RLTs. The difficulty in recruiting patients with these conditions who are using warfarin impacted the sample size, suggesting the need for future multicentric validations. Healthcare professionals should combine the use of RLT with conventional method laboratory tests to ensure proper anticoagulant dose adjustment. Future studies should investigate whether deviations from the conventional method are consistent for specific individuals, which could allow for individualized RLT validation.

Keywords: Systemic Lupus Erythematosus; Antiphospholipid Syndrome; International Normalized Ratio; Prothrombin Time; Remote Laboratory Testing.

Lista de Figuras

Figura 1 – Estratégias para localizar e selecionar as informações da literatura	15
Figura 2 – Processo que ocorre no sistema <i>bSens.INR</i>	26
Figura 3 – Fotografia real do produto <i>bSens.INR</i>	27
Figura 4 – Exemplo de análises de curvas de pacientes não terapêuticos e pacientes terapêuticos.....	27
Figura 5 – Marco conceitual da Síndrome do anticorpo antifosfolípídeo.....	28

ARTIGO

Figure 1 – Bland-Altman analysis of the case and control group.....	44
--	----

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Critérios para classificação diagnóstica de SAF, conforme *European League Against Rheumatism (EULAR)* e *American College of Rheumatology (ACR)*.....18

Tabela 2 – Comparação dos resultados entre testes laboratoriais remotos e testes convencionais em pacientes com síndrome antifosfolípide.....24

ARTIGO

Table 1 – Study population characteristics.....42

Table 2 – Data obtained from RLT tests and conventional method tests.....43

Lista de Abreviaturas e Siglas

aCL	Anticardiolipina
ACR	<i>American College of Rheumatology</i>
AFL	Anticorpos Antifosfolípides
AINES	Anti-inflamatórios não esteroides
AL	Anticoagulante Lúpico
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASSURED	Acessível, sensível, específico, fácil manutenção, rápido, robusto e sem uso de equipamentos adicionais ao usuário final
AVKs	Antagonistas de Vitamina K
β2GPI	β2-glicoproteína I
BIOSENS	Biosens Desenvolvimento e Indústria de Biossensores LTDA
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CLSI	Instituto de Normas Clínicas e de Laboratório
CPC	Centro de Pesquisa Clínica
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
EULAR	<i>European League Against Rheumatism</i>
FIPE	Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos
FT	Fator Tecidual
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
ISI	Índice Internacional de Sensibilidade
ISO	Organização Internacional de Normalização
LES	Lúpus eritematoso sistêmico
NETs	Armadilhas Extracelulares de Neutrófilos
OMS	Organização Mundial da Saúde
PNCQ	Programa Nacional de controle de qualidade

RNI	Razão Internacional Normalizada
SAF	Síndrome do Anticorpo Antifosfolípide
TLR	Testes Laboratoriais Remotos
TP	Tempo de Protrombina

Sumário

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO DA LITERATURA	14
2.1 Síndrome do anticorpo antifosfolípideo	15
2.2 Lúpus Eritematoso Sistêmico e Anticorpos Antifosfolípeos	18
2.3 Tempo de protrombina	20
2.4 Métodos analíticos para determinação do tempo de protrombina	21
2.5 Nova proposta analítica	24
3. MARCO CONCEITUAL	27
4. JUSTIFICATIVA	28
5. OBJETIVOS	29
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30
7. ARTIGO	34
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS	53
9. PERSPECTIVAS FUTURAS	54
10. ANEXOS E/OU APÊNDICES	55

1. INTRODUÇÃO

A síndrome do anticorpo antifosfolípido (SAF) é uma trombofilia adquirida caracterizada por eventos recorrentes de trombose venosa, arterial ou microangiopática e morbidade gestacional na presença de anticorpos antifosfolípidos (AFL). O principal alvo é a β 2-glicoproteína I (β 2GPI), uma proteína plasmática que se liga às superfícies fosfolípídicas e é um importante cofator com propriedades anticoagulantes. Em torno de 1990 foi identificado que os AFL reconhecem principalmente às proteínas plasmáticas β 2GPI quando ligadas aos fosfolípidos, ao invés de reconhecerem diretamente os fosfolípidos. O anticorpo anti- β 2GPI pode ser testado por *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* (ELISA). A ligação de AFL a β 2GPI nas superfícies celulares ativa células endoteliais, monócitos e plaquetas, provocando efeitos pró-inflamatórios e pró-trombóticos e ativação do complemento, com o resultado estendendo-se à trombose (1). O termo síndrome antifosfolípide primária é utilizado quando a SAF ocorre na ausência de uma condição subjacente ou secundária. Por outro lado, quando a SAF está associada a uma doença autoimune sistêmica, especialmente ao lúpus eritematoso sistêmico (LES) — uma condição autoimune inflamatória crônica de caráter multissistêmico —, ela é denominada SAF secundária (2). Entretanto, a declaração de consenso internacional mais recente sobre critérios de classificação para SAF desaconselha essas terminologias, pois os achados clínicos em ambos os grupos são semelhantes (3).

O diagnóstico de SAF é confirmado pela presença persistente de AFL em pacientes com manifestações clínicas e critérios de classificação que auxiliam no diagnóstico. A intervenção específica pode variar conforme a extensão do acometimento; no entanto, o tratamento padrão consiste no uso de antagonistas de vitamina K (AVKs), sendo necessário um monitoramento laboratorial para manter a anticoagulação nos níveis recomendados (4, 5, 6).

O tempo de protrombina (TP), expresso pela razão internacional normalizada (RNI), é utilizado para mensurar o tempo de ativação da cascata da coagulação. Este teste, realizado em laboratórios de análises clínicas, possui a finalidade de avaliar a eficácia do tratamento com AVKs e garantir que os valores de RNI estejam dentro do alvo terapêutico, e conseqüentemente, diminuir o risco de episódios de trombose e sangramento (7, 8).

O atual monitoramento empregando TP ocorre de forma centralizada, exigindo uma estrutura de laboratórios de análises clínicas. Isso implica um fluxo de trabalho que inclui a requisição laboratorial, coleta de sangue venoso, encaminhamento ao laboratório, realização do teste e liberação do laudo. Esse processo adiciona um tempo significativo à tomada de decisão, e as condições associadas aos distúrbios de coagulação são tempo-dependentes. Ou seja, quanto maior o intervalo entre a coleta das informações clínicas e a tomada de decisão, maior a probabilidade de o paciente apresentar quadros graves (9).

Uma alternativa para esse cenário são os testes laboratoriais remotos (TLR), que visam fornecer resultados rapidamente, facilitando a tomada de decisão. Esses testes têm aplicabilidades distintas, inclusive na área da hemostasia (10, 11). O uso de TLR para medir o TP, expresso em RNI, oferece diversas maneiras de detecção do coágulo e facilita aspectos como a punção venosa e a comodidade do paciente. No entanto, apesar das vantagens do TLR, sua eficácia em pacientes com SAF ainda não está bem estabelecida. Isso se deve às interferências causadas pela presença de AFL nas amostras, que podem retardar a ativação da cascata de coagulação e o tempo para a formação da trombina, resultando em falsos-positivos e falsos-negativos (12, 13).

Alguns dispositivos já foram testados para pacientes com SAF primária e secundária. Um estudo demonstrou acurácia em grupo terapêutico baixo (RNI 2.0-4.5) e grupo terapêutico alto (RNI >4.5-6.0), mas sugeriu o uso de um método alternativo ao TLR para monitorar o TP em grupo supra-terapêutico (RNI > 6.0) (14). Outros três estudos avaliaram o dispositivo de TLR *CoaguChek*® comparando-o com o método convencional laboratorial, demonstrando resultados aceitáveis de RNI em pacientes em uso de anticoagulação e sem doenças ou distúrbios associados (grupo controle). Contudo, em pacientes com SAF, os resultados de RNI foram significativamente diferentes em comparação com o grupo controle (15, 16, 17). Desse modo, o objetivo do presente estudo é validar um novo TLR para determinação de TP e RNI em pacientes com diagnóstico de SAF e LES, e que utilizam anticoagulante oral (varfarina).

2. REVISÃO DA LITERATURA

Neste capítulo serão abordados os principais tópicos relacionados e esta pesquisa com uma síntese baseada na literatura. Para construção deste capítulo foram consultadas as bases PubMed e Google Acadêmico. Foram incluídos artigos de 1990 a 2024. Foram realizadas buscas através da lista de termos e combinações: “*point-of-care testing*” AND (“*international normalized ratio*” OR “*prothrombin time*”) AND “*antiphospholipid antibody syndrome*” AND “*systemic lupus erythematosus*” e “*point-of-care testing*” AND “*international normalized ratio*” OR “*prothrombin time*” AND “*antiphospholipid antibody syndrome*”. Os resultados da pesquisa são mostrados na Figura 1.

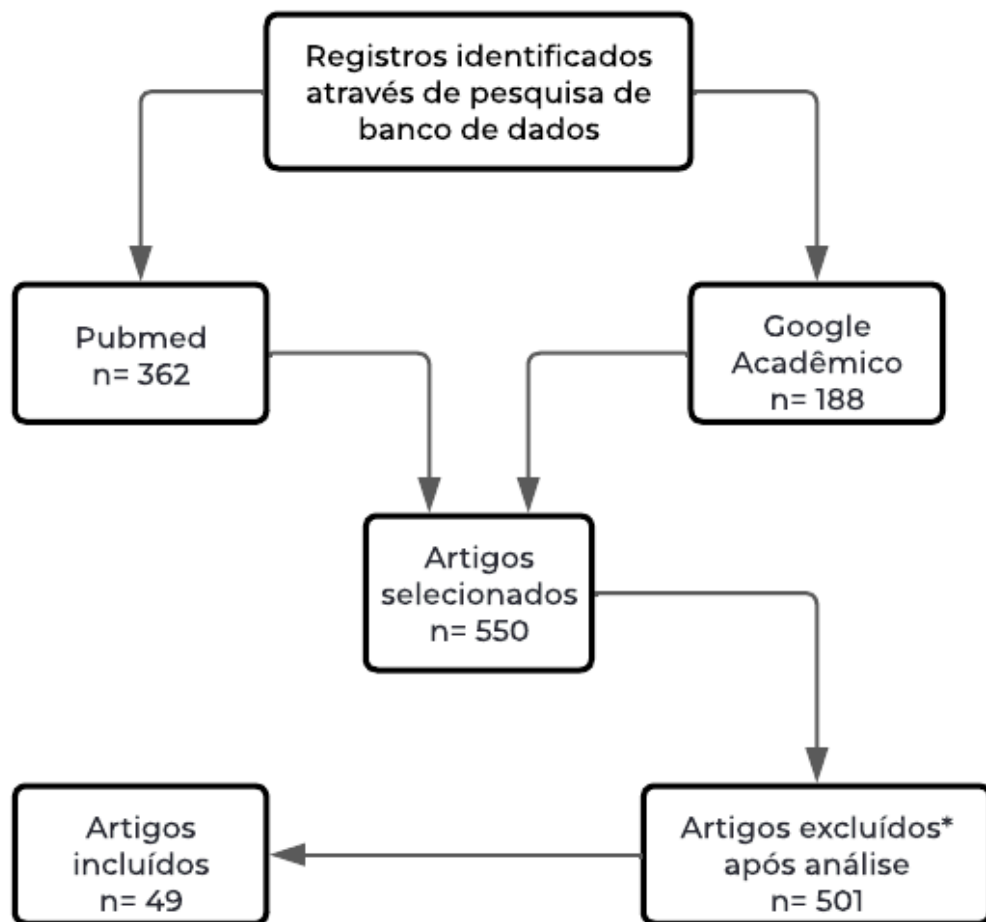


Figura 1 – Estratégias para localizar e selecionar as informações da literatura (fonte: autor)

*Critérios de exclusão dos artigos: tema não relacionado aos objetivos da pesquisa; artigos não disponíveis na íntegra; artigos não disponíveis em inglês e/ou português.

2.1 Síndrome do anticorpo antifosfolípideo

A SAF é uma doença trombótica caracterizada por eventos recorrentes de trombose arterial e venosa, morbidade gestacional e a presença de níveis séricos de AFL elevados e persistentes. A doença é reconhecida como a causa mais frequente de trombofilia adquirida (18). O mecanismo da SAF em eventos trombóticos envolve principalmente a inibição de sistemas anticoagulantes naturais, pró-coagulantes e antifibrinolíticos (19). Isso ocorre através do bloqueio de sistemas da proteína C e antitrombina, a qual inibe a atividade da trombina e outras proteases. Além disso, ocorre a ativação de células endoteliais que induz a expressão de fator tecidual (FT) e moléculas de adesão (20, 21). Ainda, há atividade de monócitos que expressam FT e citocinas pró-inflamatórias, neutrófilos que liberam armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs), e plaquetas que induzem ativação e adesão plaquetária (23).

O diagnóstico é baseado em critérios clínicos e laboratoriais. Os critérios clínicos incluem episódios de trombose vascular, morbidades gestacionais com mais de 10 semanas de idade gestacional, um ou mais nascimentos prematuros com 34 semanas ou menos causados por eclâmpsia ou insuficiência placentária, e três ou mais abortos espontâneos sem anormalidades e causas cromossômicas. Já os critérios laboratoriais abrangem a presença do anticoagulante lúpico (AL) no plasma em duas ou mais ocasiões com intervalo de 12 semanas, a presença de anticardiolipinas (aCL) Imunoglobulina G (IgG) ou Imunoglobulina M (IgM) em títulos moderados a altos, ou a presença de Anti- β 2GPI IgG ou IgM no plasma em duas ou mais ocasiões com um intervalo mínimo de 12 semanas (24).

A prevalência da síndrome na população é de 40 a 50 casos a cada 100.000 indivíduos. Normalmente é diagnosticada em indivíduos relativamente mais jovens (30-40 anos), com prevalências em pacientes do sexo feminino, com 12,7% dos pacientes diagnosticados após a idade de 50 em um estudo com 1.000 pacientes. Quando a doença acomete o sexo masculino, tende a ter a incidência mais tardia (entre 50-60 anos) (25). A SAF tem poucos estudos, e ainda são necessários mais estudos populacionais de pacientes de diversas idades e origens étnicas- raciais.

Em mulheres com AFL positivo, independente da presença de trombose, é contra-indicado o uso de anticoncepcionais combinados ou medicamentos de reposição hormonal. O consenso atual é que as tromboses arteriais ou venosas devem ser tratadas com anticoagulante, como a varfarina, que atualmente continua

a ser a base da terapia para trombose. O tratamento é feito ao longo da vida e o alvo terapêutico é determinado pelo resultado de um exame de coagulação – o RNI. O RNI deverá estar entre 2-3 para pacientes que tiveram trombose venosa e entre 3-4 para trombozes arteriais (26).

O mecanismo por trás da produção de autoanticorpos que interferem no sistema de coagulação ainda é desconhecido. Existem "fatores desencadeantes" que podem atuar como gatilhos para o desenvolvimento da SAF em indivíduos predispostos (aqueles com um ou mais tipos de AFL circulando no sangue) ou para novos eventos trombóticos em pessoas que já tiveram trombose relacionada à SAF no passado. Os fatores desencadeantes mais comuns incluem intervenções cirúrgicas, infecções graves (que requerem hospitalização e tratamento com antibióticos intravenosos), gestação, e, no caso de pacientes já em tratamento para SAF, falhas no monitoramento das dosagens de TP ou a suspensão do uso de anticoagulantes (27).

Em 2023, o American College of Rheumatology (ACR), em colaboração com a European League Against Rheumatism (EULAR), estabeleceu novos critérios de classificação para a SAF (tabela 1). Esses novos critérios possuem menos sensibilidade, mas apresentam uma maior especificidade. Conforme estes critérios, para se iniciar uma investigação de SAF, o paciente deve apresentar um critério de entrada (1 critério clínico + 1 anticorpo positivo dentro de 3 anos do início dos critérios clínicos). Houve a inclusão de manifestações microtrombóticas e não trombóticas, com seis domínios: obstétricos, macrovascular venoso, macrovascular arterial, microvascular, valvular e hematológico, e foram incluídos pontuações para estes critérios. As manifestações microvasculares incluídas foram a nefropatia, pele (livedo, vasculopatia livedoide), hemorragia alveolar, adrenal e cardíaca. Já as manifestações não trombóticas incluídas foram as valvulopatias e a plaquetopenia. Destacou-se ainda uma maior importância das manifestações obstétricas tardias, do AL e de anticorpos IgG. Para se obter a classificação diagnóstica de SAF, o paciente deve obter uma pontuação final de três pontos clínicos e três pontos de laboratório (28).

Tabela 1 - Critérios para classificação diagnóstica de SAF, conforme European League Against Rheumatism – EULAR e American College of Rheumatology - ACR

Critério de entrada

Pelo menos um critério clínico documentado listado abaixo (domínios 1-6)

Mais

Um teste de AFL positivo (um teste anticoagulante lúpico ou títulos moderados a altos de anticardiolipina ou anticorpos anti- β_2 -glicoproteína-I [IgG ou IgM]) dentro de três anos do critério clínico



Se ausente, não tente classificar como SAF. Se presente, aplicar critérios aditivos.

**Critérios clínicos e laboratoriais aditivos**

Não contabilize um critério clínico se houver uma explicação igual ou mais provável que a SAF. Em cada domínio, contabilize apenas o critério de maior peso para a pontuação total.

Domínios e critérios clínicos	Peso
D1. Macrovascular (tromboembolismo venoso (TEV))	
TEV com perfil de TEV de alto risco	1
TEV sem perfil de TEV de alto risco	3
D2. Macrovascular (trombose arterial (TA))	
TA com perfil de doenças cardiovasculares de alto risco	2
TA sem perfil de doenças cardiovasculares de alto risco	4
D3. Microvascular	
Suspeito (um ou mais dos seguintes)	2
Livedo racemoso (exame)	
Lesões de vasculopatia livedoide (exame físico)	
Nefropatia AFL aguda/crônica (exame físico)	
Hemorragia pulmonar (exame físico ou exame laboratorial)	
Estabelecido (um ou mais dos seguintes)	5
Vasculopatia livedoide (patologia)	
Nefropatia AFL aguda/crônica (patologia)	
Hemorragia pulmonar (lavado broncoalveolar ou patologia)	
Doença miocárdica (imagem ou patologia)	
Hemorragia adrenal (imagem ou patologia)	
D4. Obstétrico	
≥ 3 Mortes pré-fetais consecutivas (<10 semanas) e/ou fetais precoces (10 semanas 0d - 15 semanas 6d)	1
Morte fetal (16 semanas 0d - 33 semanas 6d) na ausência de pré-eclâmpsia (PEC) com características graves ou insuficiência placentária (IP) com características graves	1
PEC com características graves (<34 semanas 0d) ou IP com características graves (<34 semanas 0d) com/sem morte fetal	3
PEC com características graves (<34 semanas 0d) e IP com características graves (<34 semanas 0d) com/sem morte fetal	4
D5. Válvula Cardíaca	

Espessamento	2
Vegetação	4
D6. Hematologia	
Trombocitopenia (menor 20-130 x 10 ⁹ /L)	2
Domínios laboratoriais (AFL)	
D7. Teste AFL por ensaio funcional baseado em coagulação (teste anticoagulante lúpico [AL])	
AL positivo (uma vez)	1
AL positivo (persistente)	5
D8. Teste AFL por ensaio de fase sólida (ELISA de anticorpo anticardiolipina [aCL] e/ou ELISA de anticorpo anti-beta2-glicoproteína-I [aβ₂GPI] [persistente])	
Positivo moderado ou alto (IgM) (aCL e/ou aβ ₂ GPI)	1
Positivo moderado (IgG) (aCL e/ou aβ ₂ GPI)	4
Alto positivo (IgG) (aCL ou aβ ₂ GPI)	5
Alto positivo (IgG) (aCL e aβ ₂ GPI)	7
↓	
PONTUAÇÃO TOTAL	
Classificar como SAF para fins de pesquisa se houver pelo menos 3 pontos nos domínios clínicos E pelo menos 3 pontos nos domínios laboratoriais	

Fonte: Adaptado (28).

2.2 Lúpus Eritematoso Sistêmico e AFL

O LES é uma doença autoimune crônica que apresenta uma ampla gama de manifestações clínicas, variando desde o comprometimento leve das articulações e da pele até complicações graves nos rins, no sistema hematológico e no sistema nervoso central, que podem representar risco de vida. A SAF pode se manifestar em indivíduos saudáveis sem uma doença autoimune sistêmica subjacente (SAF primária) ou em associação com outras doenças autoimunes sistêmicas, especialmente no LES (SAF secundária) (29).

No LES, cerca de 30% a 40% dos pacientes apresentam AFL se pesquisados de forma seriada e longitudinal. Ao analisar individualmente cada tipo de AFL, a prevalência de resultados positivos para AL varia de 11% a 30%, enquanto para aCL varia de 17% a 40% e para anti-β₂GPI varia de 10% a 40% (30). Um estudo do *Patient Discharge Database* estimou que mulheres com LES, entre 18 e 44 anos, são hospitalizadas por infarto do miocárdio ou acidente vascular cerebral quase duas vezes mais frequentemente do que a população geral (31). Em outro estudo,

foi observado que entre os pacientes com LES, cerca de 40% dos pacientes positivos para AFL desenvolvem trombose arterial e/ou venosa, em comparação com 10% a 20% dos pacientes negativos para AFL (32). A frequência de morbidade obstétrica também foi estudada em pacientes com LES, revelando que aquelas pacientes sem AFL apresentam uma variação entre 0%–38% de morbidade obstétrica, enquanto as pacientes com AFL positivos apresentam variação de 25%–47% de morbidade obstétrica (33). Ainda, foi observado que pacientes com LES e AFL positivos têm maior risco de desenvolver manifestações de trombocitopenia (contagem de plaquetas menor que 100.000/mL) e anemia hemolítica em comparação com os pacientes que com LES sem AFL (34).

Alguns tratamentos são indicados como os anti-inflamatórios não esteroides (AINEs), para tratar dor e inflamação, especialmente em casos de artrite e dor muscular; corticosteróides que são eficazes no controle da inflamação e sintomas agudos, sendo indicados em casos leves, moderados a graves, embora devam ser usados com cautela devido a possíveis efeitos colaterais a longo prazo; antimaláricos como hidroxicloroquina ou cloroquina, que auxiliam no controle de sintomas cutâneos, articulares e reduzir a atividade da doença; imunossupressores para reduzir a atividade do sistema imunológico e controlar manifestações graves do LES, como envolvimento renal ou hematológico; anticoagulantes orais, como varfarina (frequentemente usada), rivaroxabana e apixabana, para prevenir eventos trombóticos em pacientes com SAF; e aspirina para prevenir trombozes em pacientes com SAF que não têm complicações graves, podendo também ser usado em combinação com anticoagulantes em algumas situações (9).

Pacientes em tratamento com o anticoagulante mais utilizado, como a varfarina, devem ser monitorados regularmente por meio de teste laboratorial do tempo de protrombina para ajustar a dosagem do medicamento e avaliar seus efeitos clínicos. Uma vez que o nível de fármaco anticoagulante for muito baixo, o risco de formação de coágulos sanguíneos é alto. Por outro lado, se o nível for muito alto, uma hemorragia grave pode ocorrer. Então o monitoramento constante da eficácia da anticoagulação a longo prazo é fundamental para estes pacientes com LES, devido à grande variação na relação entre dose e resposta terapêutica (9).

2.3 Tempo de protrombina

O TP é um teste laboratorial utilizado para avaliar desordens do sistema de coagulação. Este exame foi desenvolvido por Quick, em 1935, para mensurar o tempo de ativação da cascata da coagulação, processo dependente de uma sequência complexa de fatores biológicos que ocorrem quando um vaso sanguíneo sofre alguma lesão, desencadeando a coagulação (35).

Quando uma lesão acontece é liberado FT na corrente sanguínea e conseqüentemente ocorre a ativação do fator VII do sistema de coagulação, ativando assim a via extrínseca. A partir dessa sequência de eventos forma-se o complexo protrombinase ancorado pela tromboplastina, que leva à geração da trombina. Esta atua na molécula do fibrinogênio, formando a fibrina, que será estabilizada pelo fator XIII, formando um coágulo consistente e importante para impedir sangramentos. O tempo de formação do coágulo está relacionado ao TP e é crucial para evitar complicações (7).

O teste laboratorial que monitora esse processo é o TP, que tem como objetivo replicar o processo que ocorre *in vivo* através da adição de tromboplastina (FT, fosfolipídios e cálcio) ao plasma para iniciar um conjunto de fatores que resultam na formação de um coágulo. O resultado da mensuração é expresso em tempo de formação da protrombina, porcentagem da atividade enzimática e RNI (7).

O RNI, parâmetro mais indicado no controle de dosagem terapêutica medicamentosa, é uma razão padronizada que considera o TP do paciente em relação a uma média de TP do controle normal e o índice de sensibilidade da tromboplastina, calculado pela fórmula: $RNI = \left(\frac{TP_{teste}}{TP_{normal}} \right)^{ISI}$ (Índice internacional de sensibilidade), instituída pela Organização Mundial de Saúde (OMS) para padronizar as diferenças de resultados de TP entre laboratórios. Essas diversidades ocorrem devido a diferentes métodos, aparelhos e marcas de tromboplastina utilizada. Por isso, todos os fabricantes de tromboplastina devem determinar o ISI mediante a padronização de sua tromboplastina frente a uma outra de referência internacional (36).

A referência de RNI considerada fisiológica para pessoas que não tomam anticoagulante é entre 0,8 à 1,2, e o RNI esperado para pessoas que usam anticoagulante oral é entre 2,0 a 4,0. Valores fora dessa faixa indicam risco de complicações (37).

2.4 Métodos analíticos para determinação do tempo de protrombina

O tempo de coagulação pode ser avaliado pelo método convencional coagulométrico óptico mecânico já praticado nos laboratórios de análises clínicas e também pelas propostas descritas na literatura. O método mais tradicional para dosagem de protrombina usa sangue venoso em triplicata e é medido o tempo de coagulação com um cronômetro de forma manual e ótica. Depois da coleta de sangue utilizando uma seringa, um cronômetro é acionado, e 1mL de sangue total é transferido para um tubo de citrato que ficará em banho-maria na temperatura de 37°C, sendo inclinado entre os ângulos de 45° e 60° a cada 30 segundos, onde será verificado a mudança na espessura do sangue (coágulo). Quando o coágulo é visualizado, sinaliza-se o fim da cronometragem. É necessário ressaltar as desvantagens neste procedimento, pois diversos fatores externos podem afetar a medição, por exemplo, a inexperiência do profissional que está manuseando a amostra, temperatura não respeitada durante o procedimento, cronometragem inespecífica, entre outros problemas (38).

As tecnologias utilizadas nos equipamentos laboratoriais são baseadas em coagulometrias óptica e mecânica, que avaliam a hemostasia plasmática através de coagulômetros. O princípio da técnica é baseado no meio óptico de detecção da formação do coágulo, que ocorre quando a densidade da amostra muda, sendo registrada pela interrupção ou alterações nos feixes de luz. O método mecânico baseia-se pela constatação da desaceleração do movimento de uma microesfera em contato com a amostra de sangue (39).

Dispositivos alternativos como o chip microINR, determinam o comprimento do caminho percorrido pela amostra de sangue na presença de ativadores de coagulação pelo método de TLR. Ele utiliza sangue capilar e é projetado para análise independente do RNI. O princípio de medir o TP é baseado na detecção da borda frontal do fluxo de amostra de sangue em microcanais, já que a viscosidade do sangue muda à medida que se inicia o processo de coagulação. Esse chip possui dois canais: o primeiro é usado para análise da amostra; a segunda, do controle. A amostra de sangue capilar entra na câmara de reação e nela deposita-se o reagente. Depois de misturado, o sangue flui em microcanais. O dispositivo monitora a posição da borda frontal do fluido e converte matematicamente em velocidade e desaceleração. O RNI é calculado com base nas características das curvas. O

investimento e ajustes da referida técnica para o atual trabalho devem-se, portanto, às vantagens deste sistema (38).

O *CoaguChek*® é outro dispositivo de TLR utilizado para monitorar os níveis de coagulação do sangue, especificamente o TP e RNI, utiliza uma pequena amostra de sangue capilar ou sangue total venoso sem adição de anticoagulante, e emprega uma tecnologia eletroquímica para fornecer resultados rápidos. Possui em sua composição um dispositivo eletrônico e uma tira reativa que contém reagente de tromboplastina recombinante humana e um dipeptídeo liofilizado. O dipeptídeo liofilizado presente na tira reativa do TLR *CoaguChek*® desempenha um papel crucial no processo de medição dos níveis de coagulação. Ele atua como um substrato para a trombina, a enzima que é gerada durante o processo de coagulação. Quando a amostra biológica é depositada na tira, a tromboplastina ativa o processo de coagulação, forma a trombina e a protrombina, e posteriormente ocorre uma clivagem onde há a divisão do dipeptídeo, resultando em um sinal eletroquímico detectado pelo dispositivo. O TP é relacionado com o tempo de ocorrência da clivagem do peptídeo (40).

Porém estudos de validação já demonstraram a fragilidade dessa tecnologia de TLR em detectar o TP em pacientes que usam varfarina e possuem SAF. Um estudo com 59 pacientes com SAF e 49 sem SAF demonstrou acurácia diagnóstica de um TLR em grupos terapêuticos baixo e alto, mas sugeriu o uso de um método alternativo para monitorar o TP em grupo supra-terapêutico (14). Também em outro estudo que avaliou o dispositivo de TLR *CoaguChek*® em comparação com o teste padrão laboratorial em 13 pacientes com SAF e 28 pacientes sem SAF, 54% dos valores de RNI dos pacientes com SAF foram significativamente diferentes em comparação com 32% no grupo controle. Vários pacientes com SAF repetiram mais de uma vez o estudo, pois alguns tinham poucos ou nenhum par de RNI. O estudo recomenda o uso do TLR somente em pacientes que façam uma comparação do teste laboratorial padrão em relação ao TLR para uso no monitoramento de rotina (15).

Em adição, estudos não recomendam a utilização de TLR de rotina em pacientes com SAF, pois uma proporção razoável de pacientes apresentou diferenças nos resultados de RNI que não são aceitáveis, principalmente em grupos de RNI > 4 que apresentou menor correlação com o teste padrão ($r = 0,64$) em comparação às outras faixas (8). Esses resultados de validação podem apresentar

fragilidade quando avaliadas amostras de pessoas com SAF em TLR devido a interferências causadas pela presença de AFL. Os anticorpos aCL, AL e anti- β 2GPI na amostra afetam a acurácia dos resultados que por algum motivo não são interferentes para os testes laboratoriais convencionais, mas não é evidenciado na literatura (41-45).

Além dos AFL, em uma avaliação de três coagulômetros de uso próximo ao paciente em um ambiente de cuidados primários, focando na precisão e confiabilidade dos dispositivos, conclui-se que os níveis de hematócrito dos pacientes podem influenciar a precisão dos resultados, especialmente em valores extremos, deixando os resultados dos dispositivos de TLR menos confiáveis. Altos níveis de hematócrito podem acelerar a coagulação, devido a menor quantidade de plasma. Baixos níveis de hematócrito, ao contrário do anteriormente citado, podem desacelerar a coagulação devido ao baixo nível de plasma disponível (46).

Tabela 2 - Comparação dos resultados entre testes laboratoriais remotos e testes convencionais em pacientes com síndrome antifosfolípide.

País do estudo	TLR	Técnica	n° amostral SAF	n° amostral controle	Resultados	Referência
USA	<i>CoaguChek XS</i> ®	Eletro-química	13	28	Apresentou diferença média do RNI de 0.67 entre o TLR avaliado e o método convencional no grupo SAF.	[15]
GB	<i>CoaguChek XS</i> ®	Eletro-química	36	30	A análise de Bland Altman revelou um viés de 0.11. A faixa de RNI > 4 não apresentou boa concordância.	[16]
NL	<i>CoaguChek XS</i> ®	Eletro-química	33	Ausente	A análise de correlação de Spearman revelou ser forte e positiva, $r = 0.85$. A faixa de RNI > 3 não apresentou boa concordância.	[17]

USA	<i>Pro time</i>	Óptica	59	49	A análise de Bland Altman revelou um viés de 0.40. Não foi possível medir o RNI de pacientes com altos níveis de AL e anti-β2GPI.	[14]
IN	<i>qLabs</i> ®	Eletro-química	57	23	A análise de Bland Altman revelou um viés de 0.11. A faixa de RNI > 4 não apresentou boa concordância.	[45]

Considerando a escassez de validações com TLR em pacientes com SAF uma nova proposta analítica foi avaliada.

2.5 Nova proposta analítica

O produto avaliado nesse projeto é desenvolvido pela startup Biosens Desenvolvimento e Indústria de Biossensores LTDA (BIOSENS), incubada no parque tecnológico Tecnosinos (São Leopoldo - RS, Brasil). O TLR para TP (*bSens.INR*) está em fase final de desenvolvimento. O produto é composto por um equipamento e a tira reativa, que contém um reagente imobilizado, e os componentes reativos deste reagente são fator de tecido humano recombinante, tromboplastina, cálcio, tampões e estabilizadores. Quando a amostra de sangue capilar é aplicada na tira reativa e entra em contato com o reagente, ativa o processo de coagulação e direciona a formação da trombina (Figura 2). O *bSens.INR*, além de utilizar uma técnica eletroquímica de impedância para a medição do TP e do RNI, também se diferencia pela pasta condutiva usada na impressão dos sensores e pela combinação de reagentes com a tromboplastina. Esses aspectos permitem ao dispositivo realizar medições de coagulação com uma abordagem diferente dos métodos ópticos ou químicos comuns em outros TLRs, trazendo potencial para uma leitura em cerca de três minutos e exibindo os resultados que são processados através de um algoritmo que converte o sinal elétrico mensurado em segundos e RNI (Figura 3).

Através de uma punção capilar com um volume de sangue total de aproximadamente 8 ul, o equipamento avalia a mudança no comportamento elétrico e determina o TP a partir do ponto máximo de impedância mensurada conforme demonstrado na figura 4. O tempo de reação é de aproximadamente 3 minutos. O *bSens.INR* já passou por uma validação em ambiente laboratorial que demonstrou capacidade de detectar diferentes TPs em pacientes terapêuticos e não terapêuticos. O próximo objetivo é realizar uma validação em ambiente relevante que busque responder às recomendações da OMS para TLR constituídas pelo acrônimo acessível, sensível, específico, fácil manutenção, rápido, robusto e sem uso de equipamentos adicionais ao usuário final (ASSURED) (47). Para isso, são necessários estudos que avaliam a acurácia, repetibilidade, usabilidade e segurança do produto recomendados pela Norma da Organização Internacional de Normalização (ISO) 17593:2022 - Testes laboratoriais clínicos e dispositivos médicos *in vitro* — Requisitos para sistemas de monitoramento *in vitro* para autoteste de terapia anticoagulante oral (48).

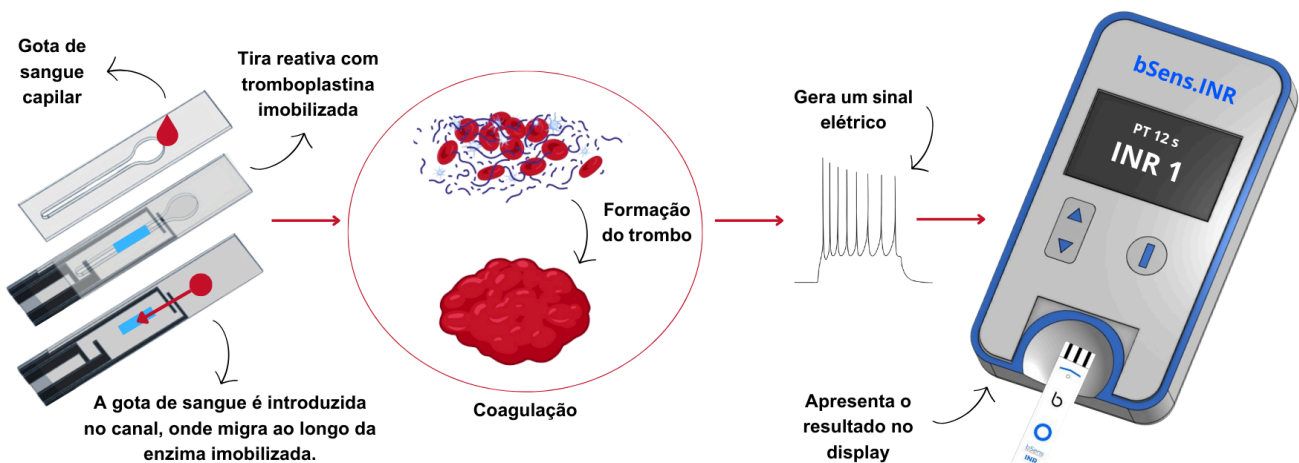


Figura 2 - Processo que ocorre no sistema *bSens.INR*



Figura 3 - Fotografia real do produto *bSens.INR* (fonte: biosens, 2024)

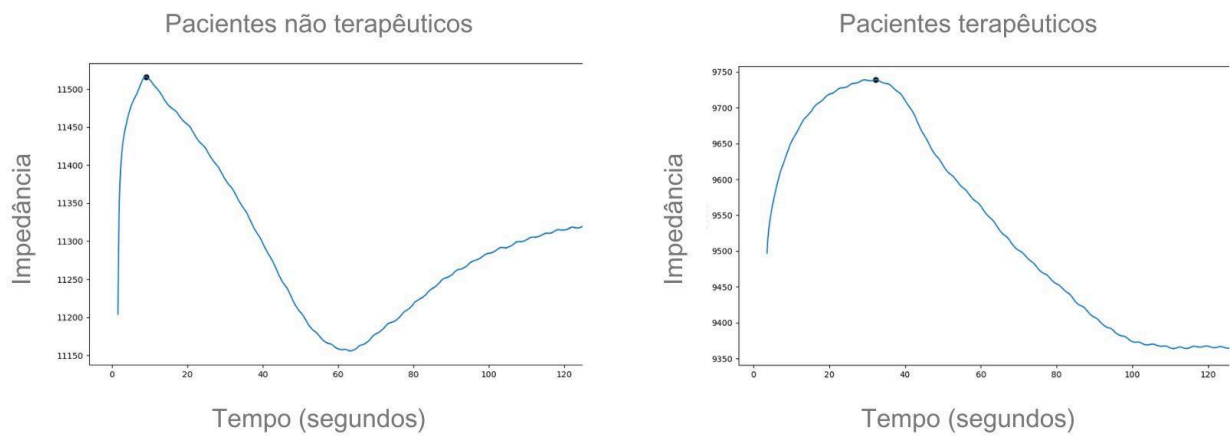


Figura 4 - Exemplo de análises de curvas de pacientes não terapêuticos e pacientes terapêuticos (fonte: biosens, 2024)

3. MARCO CONCEITUAL

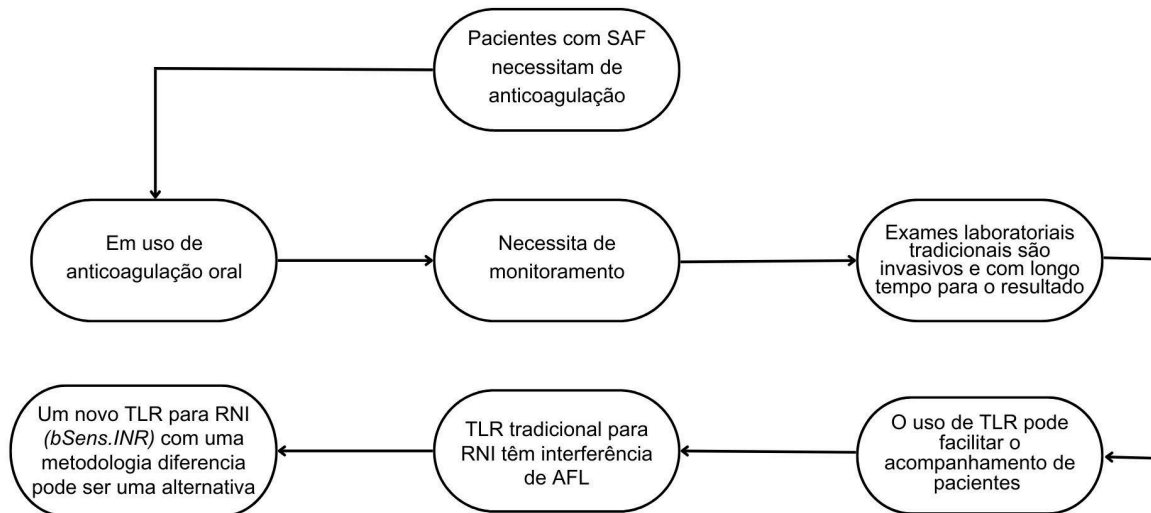


Figura 5: Marco conceitual da Síndrome do anticorpo antifosfolípido

Fonte: Elaborado pela autora.

4. JUSTIFICATIVA

O TP é realizado em laboratórios de análises clínicas para mensurar o tempo necessário para a ativação da cascata de coagulação, especificamente as vias extrínseca e comum. Este processo resulta na conversão do fibrinogênio em monômeros de fibrina, que se agregam para formar um coágulo, contribuindo para interromper uma lesão e restaurar o equilíbrio hemostático quando ocorre um desequilíbrio na coagulação sanguínea (7).

Pacientes com SAF, que apresenta uma prevalência aproximada de 40 a 50 casos por 100.000 pessoas, precisam rotineiramente realizar este teste para o acompanhamento do tratamento, de acordo com o alvo do RNI. Esta rotina envolve o deslocamento até postos de coleta, coleta por venopunção com técnico habilitado, a espera pela liberação do laudo com resultado, até a consulta para acompanhamento. Desse modo, a utilização de um dispositivo para a determinação de tempo de coagulação, sendo realizado de forma rápida e segura, em ambiente de consultório ou domiciliar, impactam o acesso, prognóstico e bem-estar dos pacientes (25, 49).

O uso de TLR para pacientes com SAF não está bem estabelecido, devido às interferências causadas pela presença de AFL e por essa razão é necessário maiores investigações sobre o uso de dispositivos nesse cenário (14). O dispositivo *bSens.INR*, desenvolvido pela Startup brasileira Biosens, trata-se de uma possível alternativa para acompanhamento de indivíduos com SAF e por isso foi avaliada nesse estudo. É importante destacar que no Brasil atualmente não existe a produção de dispositivos para esta finalidade. Assim, o desenvolvimento de tal tecnologia será de grande inovação tecnológica voltada à indústria do país.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo Primário

Validar um dispositivo rápido e portátil para monitorar o tempo da coagulação sanguínea de pacientes com SAF e LES que estão em uso de anticoagulante oral (varfarina).

5.2 Objetivos Secundários

5.2.1 Avaliar a acurácia do dispositivo de TLR (*bSens.INR*) para TP/RNI em pacientes com SAF e LES que estão em uso de anticoagulante oral (varfarina);

5.2.2 Avaliar a repetibilidade dos resultados de TP/RNI no dispositivo (*bSens.INR*) de TLR em pacientes com SAF e LES que estão em uso de anticoagulante oral (varfarina);

5.2.3 Avaliar os resultados de TP/RNI do dispositivo (*bSens.INR*) de TLR em pacientes com SAF e LES que estão em uso de anticoagulante oral (varfarina) através de testes estatísticos;

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sammaritano LR. Antiphospholipid syndrome. Best practice & research. Clinical rheumatology. 2020.
2. Kiriakidou M, Ching CL. Systemic lupus erythematosus. Ann Intern Med [Internet]. 2020;172(11):ITC81–96. Available from: <http://dx.doi.org/10.7326/aitc202006020>
3. Sangle NA, Smock KJ. Antiphospholipid antibody syndrome. Arch Pathol Lab Med [Internet]. 2011;135(9):1092–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.5858/2010-0325-RSR.1>
4. Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, Branch DW, Brey RL, Cervera R, et al. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). J Thromb Haemost [Internet]. 2006;4(2):295–306. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1538-7836.2006.01753.x>
5. Bustamante JG, Goyal A, Rout P, Singhal M. Antiphospholipid Syndrome. StatPearls Publishing; 2024.
6. Atsumi T. Diagnosis of Antiphospholipid syndrome. Nihon Kessen Shiketsu Gakkai Shi [Internet]. 2008;19(3):329–32. Available from: <http://dx.doi.org/10.2491/jjsth.19.329>
7. Hernaningsih Y, Akualing JS. The effects of hemolysis on plasma prothrombin time and activated partial thromboplastin time tests using photo-optical method. Medicine (Baltimore) [Internet]. 2017;96(38):e7976. Available from: <http://dx.doi.org/10.1097/md.0000000000007976>
8. Fonseca MES, Balbi GGM, Signorelli F, Gouvea CP, de Andrade DCO. CoaguChek® XS versus standard laboratory prothrombin time for anticoagulant monitoring in patients with antiphospholipid syndrome. Lupus [Internet]. 2022;31(5):565–74. Available from: <http://dx.doi.org/10.1177/09612033221086134>
9. Kearon C, Akl EA, Ornelas J, Blaivas A, Jimenez D, Bounameaux H, et al. Antithrombotic therapy for VTE disease. Chest [Internet]. 2016;149(2):315–52. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chest.2015.11.026>
10. Dusse LMS. Point-of-care test (POCT) INR: hope or illusion? Revista brasileira de cirurgia cardiovascular: orgao oficial da Sociedade Brasileira de Cirurgia Cardiovascular. 2012;296–301.
11. Murray ET, Fitzmaurice DA, McCahon D. Point of care testing for INR monitoring: where are we now? Br J Haematol [Internet]. 2004;127(4):373–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2141.2004.05154.x>
12. Campos NLKL de, Andrade RR de, Silva MA de M. Oral anticoagulation in carriers of mechanical heart valve prostheses: experience of ten years. Rev

- Bras Cir Cardiovasc [Internet]. 2010;25(4):457–65. Available from: <http://dx.doi.org/10.1590/s0102-76382010000400008>
13. Briggs C. British Committee for Standards in Haematology General Haematology Task Force, et al. Guidelines for point-of-care testing: haematology. *Br J Haematol*. 2008;(6):904–15.
 14. Samsa GP, Ortel TL, Perry SL. Point-of-care testing of the international normalized ratio in patients with antiphospholipid antibodies. *Thromb Haemost* [Internet]. 2005;94(12):1196–202. Available from: <http://dx.doi.org/10.1160/th05-06-0400>.
 15. Taylor JR, Richter C, Lindamood C, Liu X, Zumberg M, Fletcher B. Accuracy of CoaguChek XS in patients with antiphospholipid syndrome. *Point Care* [Internet]. 2017;16(4):161–3. Available from: <http://dx.doi.org/10.1097/poc.000000000000149>.
 16. Masucci M, Li Kam Wa A, Shingleton E, Martin J, Mahir Z, Breen K. Point of care testing to monitor INR control in patients with antiphospholipid syndrome. *EJHaem* [Internet]. 2022;3(3):899–902. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/jha2.522>
 17. Noordermeer T. Interference in point-of-care international normalized ratio monitoring in patients with lupus anticoagulant is correlated with anti- β 2-glycoprotein I antibody titers. *Research and practice in thrombosis and haemostasis*. 2023.
 18. Chaturvedi S, McCrae KR. The antiphospholipid syndrome: still an enigma. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* [Internet]. 2015;2015(1):53–60. Available from: <http://dx.doi.org/10.1182/asheducation-2015.1.53>
 19. Petri M. Use of hydroxychloroquine to prevent thrombosis in systemic lupus erythematosus and in antiphospholipid antibody-positive patients. *Curr Rheumatol Rep* [Internet]. 2011;13(1):77–80. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s11926-010-0141-y>
 20. Simantov R, LaSala JM, Lo SK, Gharavi AE, Sammaritano LR, Salmon JE, et al. Activation of cultured vascular endothelial cells by antiphospholipid antibodies. *J Clin Invest* [Internet]. 1995;96(5):2211–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1172/JCI118276>.
 21. Bu C, Gao L, Xie W, Zhang J, He Y, Cai G, et al. B2-glycoprotein i is a cofactor for tissue plasminogen activator–mediated plasminogen activation. *Arthritis Rheum* [Internet]. 2009;60(2):559–68. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/art.24262>.
 22. Kaplan MJ, Radic M. Neutrophil extracellular traps: double-edged swords of innate immunity. *J Immunol* [Internet]. 2012;189(6):2689–95. Available from: <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1201719>.
 23. Ghasemzadeh M, Hosseini E. Platelet-leukocyte crosstalk: Linking proinflammatory responses to procoagulant state. *Thromb Res* [Internet]. 2013;131(3):191–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.thromres.2012.11.028>.

24. Ruiz-Irastorza G, Crowther M, Branch W, Khamashta MA. Antiphospholipid syndrome. *Lancet* [Internet]. 2010 [cited 2024 Aug 21];376(9751):1498–509. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20822807/>.
25. Knight JS, Branch DW, Ortel TL. Antiphospholipid syndrome: advances in diagnosis, pathogenesis, and management. *BMJ* [Internet]. 2023;380:e069717. Available from: <http://dx.doi.org/10.1136/bmj-2021-069717>.
26. Levy R. Síndrome antifosfolípide. Sociedade Brasileira de Reumatologia. 2011.
27. de Reumatologia SB. Síndrome Antifosfolípide [Internet]. Sociedade Brasileira de Reumatologia. 2016. Available from: <https://www.reumatologia.org.br/orientacoes-ao-paciente/sindrome-antifosfolipide/>.
28. Barbhaiya M. The 2023 ACR/EULAR antiphospholipid syndrome classification criteria. *Arthritis & rheumatology*. 2023;10:1687–702
29. Unlu O, Zuily S, Erkan D. The clinical significance of antiphospholipid antibodies in systemic lupus erythematosus. *European journal of rheumatology*. 2016;(2):75–84.
30. Petri M. Epidemiology of the antiphospholipid antibody syndrome. *Journal of autoimmunity*. 2000;145–51.
31. Ward MM. Premature morbidity from cardiovascular and cerebrovascular diseases in women with systemic lupus erythematosus. *Arthritis and rheumatism*. 1999;42:338–46.
32. Love PE. Antiphospholipid antibodies: Anticardiolipin and the lupus anticoagulant in systemic lupus erythematosus (SLE) and in non-SLE disorders: Prevalence and clinical significance. *Annals of internal medicine*. 1990;
33. Al Arfaj AS, Khalil N. Pregnancy outcome in 396 pregnancies in patients with SLE in Saudi Arabia. *Lupus*. 2010;1665–73.
34. Deák M, Bocskai M, Burcsár S, Dányi O, Fekete Z, Kovács L. Non-thromboembolic risk in systemic lupus erythematosus associated with antiphospholipid syndrome. *Lupus* [Internet]. 2014;23(9):913–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1177/0961203314531839>
35. Mannucci PM, Tripodi A. The Prothrombin Time Test: A Historical Perspective and Current Applications. *Thrombosis Research*. 2018;171:96–103.
36. Shikdar S, Vashisht R, Bhattacharya PT. *International Normalized Ratio (INR)*. StatPearls Publishing; 2023.
37. Dorgalaleh A, Favaloro EJ, Bahraini M, Rad F. Standardization of prothrombin time/international normalized ratio (PT/INR). *Int J Lab Hematol* [Internet]. 2021;43(1):21–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/ijlh.13349>
38. Bazaev IA. Modern methods for measuring parameters of blood coagulation. *Biomedical Engineering*. 2015;(3):136–41.
39. Kitchen S, Olson JD. *Quality in Laboratory Hemostasis and Thrombosis*. Wiley-Blackwell; 2014.

40. Mruthunjaya AKV, Torriero AAJ. Electrochemical monitoring in anticoagulation therapy. *Molecules* [Internet]. 2024; 29(7):1453. Available from: <https://www.mdpi.com/1420-3049/29/7/1453>.
41. Frenkel EJ, Haerberli A, Moresi A. Electrochemical system for determining blood coagulation time. US Patent. 6352630, 2002.
42. Tripodi A. The lupus anticoagulant: Pathophysiology and implications for thrombosis and bleeding. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2011;9(11):2282–8.
43. Devreese K, Hoylaerts MF. Laboratory diagnosis of the antiphospholipid syndrome: a plethora of obstacles to overcome. *Eur J Haematol* [Internet]. 2009;83(1):1–16. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0609.2009.01243.x>
44. Favalaro EJ, Pasalic L, Selby R. Testing for the lupus anticoagulant: the good, the bad, and the ugly. *Res Pract Thromb Haemost*. 2024;8(3):102385. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rpth.2024.102385>.
45. Ganapati A, Mathew J, Yadav B, Kabeerdoss J, Gowri M, Dave RG, et al. Comparison of point-of-care PT-INR by hand-held device with conventional PT-INR testing in anti-phospholipid antibody syndrome patients on oral anticoagulation. *Indian J Hematol Blood Transfus*;39(3):450–5. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12288-022-01611-4>
46. Murray ET, Fitzmaurice DA, Allan TF, Hobbs FD. A primary care evaluation of three near patient coagulometers. *J Clin Pathol* [Internet]. 1999;52(11):842–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1136/jcp.52.11.842>
47. Kosack CS, Page A-L, Klatser PR. A guide to aid the selection of diagnostic tests. *Bulletin of the World Health Organization*. 2017;(9):639–45.
48. International Organization for Standardization. ISO 17593 - Clinical laboratory testing and in vitro medical devices - Requirements for in vitro monitoring systems for self-testing of oral anticoagulant therapy.
49. Cervera R. Antiphospholipid syndrome: clinical and diagnostic criteria. *Autoimmunity Reviews*. 2008;(1):103–5.

7. ARTIGO

O manuscrito a partir da pesquisa original deste trabalho foi intitulado:

"Validation of a mobile device for monitoring anticoagulation in patients with Antiphospholipid Antibody Syndrome: preliminary data"

Submissão de manuscrito: Em elaboração

Periódico: BMC Rheumatology

Validation of a mobile device for monitoring anticoagulation in patients with Antiphospholipid Antibody Syndrome: preliminary data

Gabriela Victória de Mello Jantzch^{1,2,6}, Julia Konzen Moreira^{3,6}, Rodrigo Ritzel Bernasconi^{5,6}, Duane da Silva Moraes^{4,6}, Leonardo Peterson dos Santos^{1,2} and Ricardo Machado Xavier^{1,2}.

¹ Autoimmune Diseases Laboratory (LabDAI), Rheumatology Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Brazil; ² Postgraduate Program in Medicine: Medical Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Brazil; ³ Postgraduate Program in Chemistry, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Brazil; ⁴ Postgraduate Program in Mining, Metallurgical and Materials Engineering, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Brazil; ⁵ Polytechnic School, Systems Analysis and Development, University of Vale do Rio dos Sinos (UNISINOS), Brazil; ⁶ Biosens Development and Biosensors Industry LTDA (BIOSENS), Brazil.

Corresponding author:

Gabriela Victória de Mello Jantzch

Autoimmune Diseases Laboratory, Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Ramiro Barcelos Street, 2350, Santa Cecília – Porto Alegre, Brazil

Email: gaby.jantzch@gmail.com

Phone: +55 51 99961-7877

Abstract

Antiphospholipid syndrome (APS) is a systemic autoimmune disorder characterized by the presence of antiphospholipid antibodies (aPL), leading to coagulation imbalance and risk of thrombosis and possible gestational issues. It can occur as a primary condition or alongside other autoimmune diseases, such as systemic lupus erythematosus (SLE). Patients with APS often require anticoagulation therapy to prevent negative outcomes. Monitoring anticoagulation levels is typically performed through laboratory tests like prothrombin time (PT) and international normalized ratio (INR). Reliable remote laboratory testing (RLT) for coagulation can improve monitoring, increasing speed and patient comfort; however, there is a limited number of validation studies of these tests in patients with APS. The objective of this study was to validate a rapid and portable device (*bSens.INR*) for monitoring blood coagulation time in patients with APS and SLE. The study included patients with APS and SLE, along with a control group of participants without APS or SLE, all taking the oral anticoagulant warfarin. Accuracy and repeatability tests were conducted following the standards guidelines, and concordance analyses comparing the *bSens.INR* RLT results to the conventional method. A p value of <0.05 was considered a statistical difference. A total of 40 PT and INR results were obtained from the *bSens.INR*, and 20 from the conventional method. Accuracy analysis showed 77.5% concordance of the *bSens.INR* with the conventional method: 60% in the patients with APS and SLE, and 95% in the control group. Repeatability of

approved results showed 100% precision. Spearman correlation between the results obtained by the *bSens.INR* and the conventional method showed a strong positive correlation ($r = 0.79$, $p < 0.0001$). Bland-Altman analysis, which assesses the agreement between two measurement methods by comparing the differences relative to the mean of the results, suggested a bias of 0.26 INR units. The presence of aPL seems to interfere with PT and INR results in the *bSens.INR* device, resulting in reduced accuracy in patients with APS and SLE. The *bSens.INR* device shows promising performance in determining PT and INR, although it presents specific limitations for patients with autoimmune conditions.

Keywords: Systemic Lupus Erythematosus; Antiphospholipid Syndrome; International Normalized Ratio; Prothrombin Time; Remote Laboratory Testing.

Background

Antiphospholipid syndrome (APS) is a systemic autoimmune disorder characterized by recurrent venous, arterial, or microangiopathic thrombosis and gestational morbidity in the presence of antiphospholipid antibodies (aPL). The primary target is β 2-glycoprotein I (β 2GPI), a plasma protein that binds to phospholipid surfaces and acts as a key anticoagulant cofactor. Around the 1990s, it was discovered that aPL primarily binds to β 2GPI plasma protein when it is attached to phospholipids, rather than binding directly to the phospholipids themselves. The anti- β 2GPI antibody test, using the Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA), now provides an additional method for detecting the presence of aPL. The binding of aPL to β 2GPI on cell surfaces activates endothelial cells, monocytes, and platelets, leading to pro-inflammatory and pro-thrombotic phenotypes, complement activation, and ultimately thrombosis (1).

Treatment approaches may vary depending on the severity of the disease. However, the standard treatment consists of the use of vitamin K antagonists (VKAs), with regular laboratory monitoring required to maintain anticoagulation within recommended levels (2, 3).

The prothrombin time (PT), expressed as international normalized ratio (INR), is a key parameter in this monitoring process, used to measure the activation time of the coagulation cascade (4). This test, performed in clinical laboratories, assesses the effectiveness of VKA therapy and ensures that INR values remain within the therapeutic target, thereby reducing the risk of thrombosis and bleeding episodes (5).

Current monitoring is centralized and relies on clinical laboratory infrastructure, which involves a multi-step process: ordering the test, venous blood collection, sample referral to the laboratory, test execution, and report generation. This workflow introduces delays in decision-making, which is critical in time-sensitive conditions like coagulation disorders. The longer the interval between clinical data collection and therapeutic decisions, the greater the risk of the patient developing severe complications (6).

An alternative to this scenario is a reliable remote laboratory testing (RLT), which aims to provide rapid results, facilitating decision-making. These tests have several applications, including in hemostasis (7, 8). When used to measure PT, expressed as INR, the RLTs simplify procedures such as venous puncture and improve patient convenience. However, despite these advantages, their reliability remains uncertain, particularly in patients with APS. The presence of aPL in samples may interfere with the coagulation cascade, delaying thrombin formation and leading to inaccurate results, such as false positives or negatives (9, 10). Although some devices have shown acceptable accuracy in patients without associated conditions, studies have reported significant discrepancies in INR results for APS patients (11, 12, 13). Therefore, the objective of this study is to validate a new RLT for determining PT and INR in patients with APS and SLE who are on oral anticoagulants (warfarin).

Materials and Methods

Study Design

This is a transversal diagnostic accuracy study conducted at the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), including 10 patients with coagulation disorders and 10 patients with APS associated with SLE. The institutional review board of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), HCPA, Brazil (registered under numbers 20230156) approved this study. The declaration of Helsinki principles was followed and all subjects gave written informed consent. We conducted this study in accordance with the 2015 STARD Reporting Guideline for Studies of Diagnostic Accuracy (14).

Participants

Patients in the case group and control group were conveniently recruited among January and September 2024. The case group included patients diagnosed with APS and SLE, who were receiving oral anticoagulants (warfarin), who were recruited from the lupus clinic of HCPA. The control group consisted of patients on warfarin without a diagnosis of APS and SLE, who were recruited from the coagulation clinic of HCPA and the Biosens patient registry. Exclusion criteria included patients under 18 years of age or those who were not receiving oral anticoagulants, as the study focused on evaluating the performance of an RLT in patients undergoing anticoagulant therapy.

Diagnosis of Systemic Lupus Erythematosus and Antiphospholipid Syndrome

Systemic Lupus Erythematosus is diagnosed according to the 2019 American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism (ACR/EULAR) criteria (15), which establish the presence of positive antinuclear antibodies (ANA) at a titer of 1:80 or higher as a mandatory entry criterion. Following this confirmation, the diagnosis is based on the cumulative score of points assigned to various clinical and immunological manifestations, requiring a total of 10 points or more to confirm the diagnosis. Conversely, APS is diagnosed based on the ACR/EULAR criteria updated in 2023 (16), which combine clinical and laboratory findings. Among the clinical criteria are episodes of vascular thrombosis or obstetric complications, such as recurrent miscarriages or premature births. In terms of laboratory criteria, the persistent presence of antiphospholipid antibodies, such as aCL, anti- β 2GPI, or LA, must be detected on at least two occasions, with a minimum interval of 12 weeks.

Test methods

A venous blood sample was collected from each participant and stored in a tube containing Sodium Citrate (0.109 mol/L and 0.105 mol/L [3.2%]), following the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines, with a blood-to-citrate ratio of 9:1 for the conventional laboratory test. In addition, two capillary blood samples were collected for analysis using *bSens.INR* device. Clinical characteristics such as age (years), disease duration (years), and self-reported race/color (white, black, brown) were assessed through medical record review. Duration of warfarin use (years), weekly warfarin dose (mg), frequency of PT testing (days), comorbidities, thrombotic events (yes/no), hemorrhagic events (yes/no), and the presence of

antiphospholipid antibodies were recorded by the research team during the consultation.

Reference standard

The venous blood sample, used for the conventional laboratory test and analyzed in a clinical laboratory accredited by the National Quality Control Program (NQCP), was evaluated using an optical coagulometry in the ACL TOP 750 equipment. For PT measurement, the venous sample was centrifuged to separate the plasma from blood cells. In the coagulometer, the plasma sample was mixed with a reagent containing calcium and human thromboplastin, which reverses the action of the citrate anticoagulant in the storage tube, initiating the coagulation cascade. The coagulometer then monitors the reaction as the coagulation process progresses, detecting changes in viscosity until clot formation occurs.

Testing with the *bSens.INR* device

Each capillary blood sample was immediately evaluated using the *bSens.INR* device. During the collection procedure, a test strip containing immobilized thromboplastin reagent was inserted into the device, initiating the heating process. Once the strip reached the ideal temperature for the reaction (33.5°C), the device signalled for the deposition of a capillary blood drop. After the biological sample filled the microfluidic channel, ensuring contact between the blood, reagent, and sensors, the coagulation began. The sample's viscosity was measured over a 3 minutes period using an electrochemical impedance technique, and the result, expressed in seconds and INR, was displayed on the device's screen.

Statistical analysis

The sample calculation was based on Taylor et al. (2017) using software developed by researchers at the University of São Paulo (USP), which provides a standard error of the limit of agreement of 95%, with a 95% confidence level, and considers a minimum acceptable difference of ± 0.5 INR units (with the addition of 10% to account for potential losses and refusals). To assess the agreement between the standard optical mechanical coagulometric method and the electrochemical method of the *bSens.INR* device, a sample size of 15 individuals per group (n=30) was suggested (11, 17).

The Shapiro-Wilk method was used to test for normality. Results are expressed as mean \pm standard deviation (SD), median (interquartile range, IQR), and number (%), as appropriate.

To assess the diagnostic accuracy of the *bSens.INR* device in measuring PT and INR, predetermined acceptable deviation limits were applied, based on the INR values obtained from the conventional laboratory test. These limits were calculated according to the criteria established by International Organization for Standardization (ISO) 17593:2022. For INR values < 2 , the acceptable deviation was ± 0.4 INR units, for values between 2 and 4.5, a deviation of $\pm 20\%$ was considered; and for INR values > 4.5 , a deviation of $\pm 25\%$ was acceptable. The INR result obtained from the *bSens.INR* was considered accurate if it fell within these predefined limits (18).

Additionally, the repeatability of the results obtained from the *bSens.INR* device was assessed by analyzing the duplicate measurements for each participant. This evaluation followed the guidelines of ISO 17593:2022, which recommends determining the acceptable interval between replicates for the same patient, using the following equation: mean of the replicates $\times 0.10 \times 4.2$, where 0.10 represents a 10% coefficient of variation and 4.2 is a constant (18).

A Spearman analysis was performed to identify the relationship between the INR result of the conventional method compared to the *bSens.INR*. The correlation strength was determined from the classification suggested by Dancey and Reidy: $r = 1.0$ indicates perfect association; $r = 0.7-0.9$, strong association; $r = 0.4-0.6$, moderate association; $r = 0.1-0.3$, weak association; and $r = 0$, no association (19).

Bland-Altman analysis was conducted to graphically demonstrate the agreement between the methods, verifying whether the differences between measurements were within acceptable limits. Finally, an Intraclass Correlation Coefficient (ICC) analysis was performed to evaluate the reliability between the INR measured by the *bSens.INR* and the conventional method. The significance level was set at $p \leq 0.05$ for all analyzes. Statistical analyzes were performed in Statistical Package for Social Sciences (SPSS) 17.0.

Results

The study included 20 participants: 10 patients with APS and SLE who were on oral anticoagulant therapy (warfarin), and 10 participants in the control group.

Table 1 demonstrates the characterization of the population studied through the demographic data collected (sex, race and age) and clinical aspects in relation to each group evaluated. From the data, it is possible to observe that the case group has a female predominance due to the higher prevalence of SLE in women. As expected, this group presents a high prevalence of thrombotic events.

Table 1. Study population characteristics

	Case Group	Control Group
Women (%)	100	60
Men (%)	0	40
Race - White (%)	90	90
Race- Mixed race (%)	10	10
Age in years (mean \pm SD)	42 \pm 13	52 \pm 13
Hypertension (%)	60	80
Time of use of Warfarin medication (years \pm SD)	9 \pm 5	9 \pm 6
Weekly Warfarin dose (mean in mg \pm SD)	53 \pm 25	44 \pm 25
Frequency of PT laboratory testing (days \pm SD)	24 \pm 10	37 \pm 14
Patients with thrombotic events (%)	60	10
Patients with hemorrhagic events (%)	10	30

From the experimental test, it was possible to obtain 40 PT and INR results on the *bSens.INR* device due to duplicate evaluations, and 20 results from the conventional laboratory test. Through the medical records, it was also possible to identify the antibodies present in the patients in the case group. All data are presented in Table 2. The diagnostic accuracy analysis, which included both groups, demonstrated that 77.5% of the results obtained through the *bSens.INR* RLT were approved for accuracy according to the ISO criteria. When performing the same analysis by separating the groups, a reduction in accuracy was observed in the case group, which showed 60% accuracy compared to the control group, which showed 95% of results approved for accuracy. The results also demonstrate that the *bSens.INR* only showed accuracy deviations in tests performed on patients from the case group with high levels of aCL. Furthermore, in the repeatability analysis, which included only the results that met the accuracy criteria in both groups (31 out of 40 results), the precision rate was 100%.

Table 2. Data obtained from RLT tests and conventional method tests

Group	Code	Antibodies	PT 1 <i>bsens.INR</i>	PT 2 <i>bsens.INR</i>	INR 1	INR 2	Conventional PT test	INR	*	*
									-	+
case	1	aCL (high)	50.00	47.50	5.04 **	4.73 **	31.30	2.78	2.22	3.33
case	2	LA +, aCL (high) and Anti-β2GPI (moderate)	22.70	18.60	1.95 **	1.54 **	44.20	3.97	3.17	4.76
case	3	LA + and Anti-β2GPI (moderate)	17.10	18.60	1.39	1.54	13.20	1.14	0.74	1.54
case	4	LA + and aCL (high)	16.80	20.80	1.36 **	1.76 **	27.50	2.43	1.94	2.91
case	5	aCL (moderate)	28.10	25.30	2.52	2.22	28.00	2.48	1.98	2.97
case	6	Anti-β2GPI (high)	20.73	17.20	1.75	1.40	15.80	1.37	0.97	1.77
case	7	aCL (high)	24.50	26.40	2.14 **	2.34 **	40.00	3.56	2.84	4.27
case	8	aCL (moderate)	20.30	20.90	1.71	1.77	18.90	1.65	1.25	2.05
case	9	aCL (moderate)	35.60	29.00	3.35	2.62	33.70	3.00	2.40	3.60
case	10	aCL (moderate)	22.10	18.00	1.89	1.48	18.40	1.65	1.25	2.05
control	11	NA	14.80	15.40	1.17	1.23	13.10	1.13	0.73	1.53
control	12	NA	34.80	33.90	3.26	3.16	37.60	3.36	2.68	4.03
control	13	NA	37.10	43.70	3.52	4.28	50.00	4.55	3.41	5.68
control	14	NA	24.20	26.50	2.11	2.35	27.10	2.44	1.95	2.92
control	15	NA	22.10	24.20	1.89	2.11	26.30	2.37	1.89	2.84
control	16	NA	23.20	21.80	2.00	1.86	23.30	2.02	1.61	2.42
control	17	NA	38.90	35.80	3.73	3.37 **	54.40	4.96	3.72	6.20
control	18	NA	27.30	29.10	2.44	2.63	29.90	2.70	2.16	3.24
control	19	NA	27.70	29.32	2.48	2.65	29.00	2.66	2.12	3.19
control	20	NA	22.92	22.31	1.97	1.91	24.90	2.23	1.78	2.67

*The INR acceptability limits were established based on the guidelines of the ISO 17593:2022 standard, using the values obtained by the conventional laboratory method of INR measurement. PT 1 refers to the first replicate of the sample collected from the patient's fingertip. PT 2 refers to the second replicate of the sample collected from

the patient's fingertip. Limit (-) corresponds to the minimum acceptable INR value, while the Limit (+) represents the maximum acceptable value within the criteria defined by the standard. ** Results outside the established limits, that is, results that do not agree with the conventional method result. LA: + (present), - (absent) and aCL/anti-β2GPI: moderate (≥40-79U) and high (≥80U) according to criteria (18). NA: (not available).

The Spearman correlation analysis revealed a strong, positive, and statistically significant correlation between the INR result of the conventional laboratory method compared to the *bSens.INR* ($r = 0.79$, $p < 0.0001$). The Bland-Altman analysis revealed a bias of 0.26, indicating that the *bSens.INR* method tends to provide INR values that are 0.26 units higher or lower than the conventional method. Most data points fell within the limits of agreement (± 2 standard deviations), suggesting overall concordance between the *bSens.INR* and the laboratory method (figure 1). However, four results from the case group (green) were outside the acceptable limits, which were also flagged in the accuracy analysis. No deviations were observed in the control group (blue).

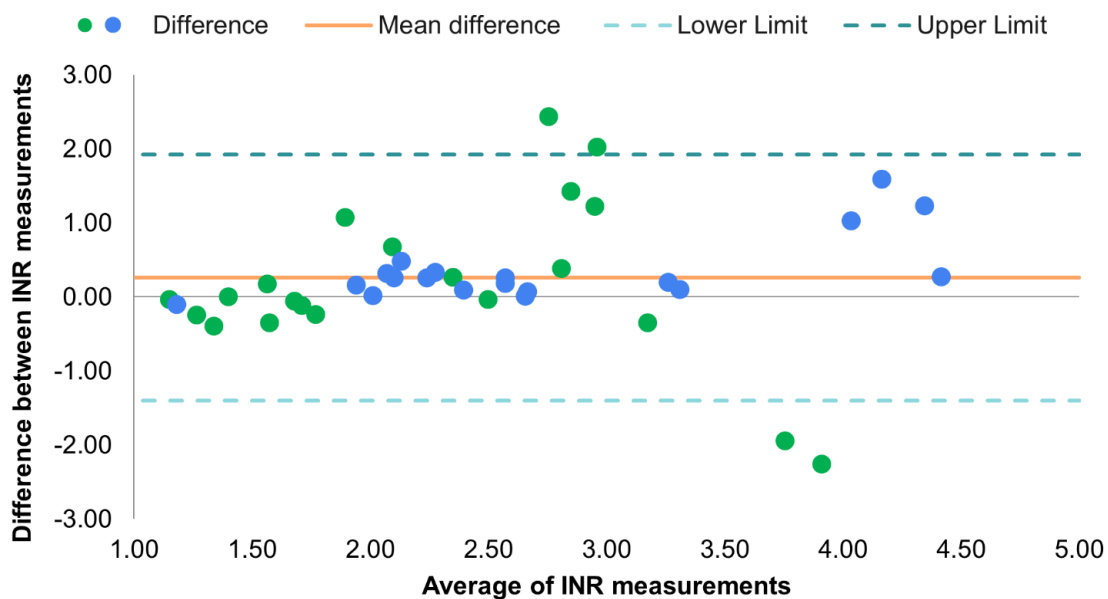


Figure 1 - Bland-Altman analysis of the case and control groups

Regarding the ICC, the value obtained was 0.64 (95% Confidence Interval: 0.29 to 0.84) indicating moderate consistency between the INR measurements performed by the *bSens.INR* and the conventional method.

Discussion

We tested a RLT system for blood coagulation using electrochemical methodology and, based on the accuracy analysis, it became evident that the *bSens.INR* had low accuracy in the case group. The control group showed satisfactory accuracy with 95% correct results, 100% repeatability in the precision analysis, and a bias of 0.34 in the Bland-Altman analysis. In the case group, it showed 60% accuracy and 100% repeatability in the precision analysis, with a bias of 0.18 in the Bland-Altman analysis, demonstrating that the results were not satisfactory.

The Spearman analysis showed a strong and positive correlation between the methods; as the INR of the *bSens.INR* increases, the results of the conventional method tend to increase consistently. The Bland-Altman analysis showed a bias of 0.26 when both groups were observed together, which may indicate that the *bSens.INR* could overestimate INR values compared to the conventional laboratory test.

Although the *bSens.INR* demonstrates good precision in most cases, the observed bias, low accuracy and low agreement in the case group suggest that the device may not be ideal for exclusive use in monitoring these patients. This finding has been corroborated by other studies that evaluated the precision and accuracy of RLT devices like *CoaguChek*® in patients with APS, which found significant variations compared to conventional laboratory tests. These results are consistent with the observation that the *bSens.INR* exhibits low accuracy in the case group, as noted by Taylor et al. (2017). This reinforces that RLT devices, such as *bSens.INR*, *CoaguChek*®, *Pro Time* and *qLabs*®, are unable to detect PT and INR in patients with APS with the same accuracy as they detect these parameters in individuals without this combination of diseases (5, 11-13, 20-21).

An analysis of the antibodies present in the case group, regarding PT and INR results that deviated from the accuracy limits established by the conventional method, revealed that the increase in aCL antibody levels was the most evident common factor, suggesting a possible interference with the results obtained by the *bSens.INR* device. Two other studies reported similar findings with RLT devices, but involving different antibodies. In a study with 33 participants with APS, anti- β 2GPI antibody levels were correlated with interference in INR results from these RLT devices, particularly showing discrepancies in INR values > 3 . Patients with high antibody titers were more likely to have inconsistent INR results in RLT tests, suggesting that these antibodies may distort the readings (13).

Another study with 59 APS patients investigated antibody presence and found that anti- β 2GPI, specifically, had a negative impact on INR results obtained by RLT. In some patients with high LA levels, coagulation time could not be measured with RLT, possibly due to interactions with thromboplastin on the test strips, where the binding of antibodies to the phospholipid in thromboplastin may alter the formation of the coagulation activation complex, resulting in erroneous INR readings, either overestimating or underestimating the true value. Another hypothesis of interference is that antiphospholipid antibodies may form immune aggregates with lipids or proteins in the blood, and these aggregates could affect the measurements, as aggregation may interfere with blood viscosity or with the detection of clot formation in the devices (20). It is believed that the inclusion of additional reagents in the device that selectively bind to antiphospholipid antibodies or their aggregates could help neutralize the interference. These reagents could be designed to modify the properties of the blood and reduce the formation of immune aggregates, allowing for more accurate coagulation measurement.

Conclusion

Based on the results of this study, it is evident that the *bSens.INR* device showed reduced diagnostic accuracy in determining PT and INR in patients with SLE and APS. The hypothesis of interference from antiphospholipid antibodies is suggested, but further studies to explore the impact of these antibodies on portable technologies, clarify their effects, and enable improvements in clinical application are needed. Future studies may evaluate whether measurements taken from the same

patient on different days result in deviations from the conventional test, investigating whether the observed discrepancies may be related to the presence of high levels of aCL or if the error in determining INR occurs randomly. Additionally, these studies should include larger sample sizes and multicenter validation to increase the robustness and reliability of the study.

List of abbreviations

ACR	American College of Rheumatology
ANA	Antinuclear antibodies
APS	Antiphospholipid Syndrome
aCL	Anticardiolipin
aPL	Antiphospholipid Antibodies
β 2GPI	β 2-glycoprotein I
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EULAR	European League Against Rheumatism
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
ICC	Intraclass Correlation Coefficient
INR	International Normalized Ratio
ISO	International Organization for Standardization
LA	Lupus Anticoagulant
NQCP	National Quality Control Program
PT	Prothrombin Time
RLT	Remote Laboratory Testing
SD	Standard Deviation
SLE	Systemic Lupus Erythematosus
SPSS	Statistical Package for Social Sciences
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
USP	University of São Paulo
VKAs	Vitamin K antagonists

Statements

Ethics approval and consent to participate

This study was approved by the Ethics and Research Committee of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) under registration number 20230156. All participants agreed and signed ethical consent.

Availability of data and materials

The datasets generated and/or analyzed during the current study are available in the repository

https://docs.google.com/spreadsheets/d/14flnctrg_kqcGvEG3HFKEF2dfZMmU9_U/e/dit?usp=sharing&ouid=107025160705232668239&rtpof=true&sd=true

Conflict of interest

The authors declare the following potential conflicts of interest: Gabriela Victória de Mello Jantzch, Julia Konzen Moreira, Rodrigo Ritzel Bernasconi, and Duane da Silva Moraes are affiliated with Biosens Desenvolvimento e Indústria de Biossensores LTDA, which manufactures the *bSens.INR*. All other authors declare that there is no conflict of interest.

Funding

Fundo de Incentivo à Pesquisa (FIPE/HCPA), the company Biosens Desenvolvimento e Indústria de Biossensores LTDA and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Authors' contributions

GVMJ: Study conception, data collection, results analysis, and manuscript drafting.

JKM: Methodological support, data analysis, critical review, data interpretation, and assistance in manuscript drafting.

RRB: Software development and data analysis.

DSM: Technical support and development of test strips.

LPS: Assistance with manuscript writing and revision.

RMX: Study conception, overall supervision, final review, and manuscript approval.

ORCID iD

Gabriela Victória de Mello Jantzch

<https://orcid.org/0009-0005-3758-4921>

Acknowledgements

The authors would like to thank the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) for providing excellent facilities and equipment, the company Biosens Desenvolvimento e Indústria de Biossensores for their support and for providing the materials used in this study; to Professor Priscila Lora, who developed the concept for this project. We gratefully acknowledge the financial support provided by the Fundo de Incentivo à Pesquisa (FIPE/HCPA) and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

References

1. Sammaritano LR. Antiphospholipid syndrome. Best practice & research. Clinical rheumatology. 2020.
2. Bustamante JG, Goyal A, Rout P, Singhal M. Antiphospholipid Syndrome. StatPearls Publishing; 2024.
3. Atsumi T. Diagnosis of Antiphospholipid syndrome. Nihon Kessen Shiketsu Gakkai Shi [Internet]. 2008;19(3):329–32. Available from: <http://dx.doi.org/10.2491/jjsth.19.329>
4. Hernaningsih Y, Akualing JS. The effects of hemolysis on plasma prothrombin time and activated partial thromboplastin time tests using photo-optical method. Medicine (Baltimore) [Internet]. 2017;96(38):e7976. Available from: <http://dx.doi.org/10.1097/md.0000000000007976>
5. Fonseca MES, Balbi GGM, Signorelli F, Gouvea CP, de Andrade DCO. CoaguChek® XS versus standard laboratory prothrombin time for anticoagulant monitoring in patients with antiphospholipid syndrome. Lupus [Internet]. 2022;31(5):565–74. Available from: <http://dx.doi.org/10.1177/09612033221086134>
6. Kearon C, Akl EA, Ornelas J, Blaivas A, Jimenez D, Bounameaux H, et al. Antithrombotic therapy for VTE disease. Chest [Internet]. 2016;149(2):315–52. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chest.2015.11.026>
7. Dusse LMS. Point-of-care test (POCT) INR: hope or illusion? Revista brasileira de cirurgia cardiovascular: orgao oficial da Sociedade Brasileira de Cirurgia Cardiovascular. 2012;296–301.
8. Murray ET, Fitzmaurice DA, McCahon D. Point of care testing for INR monitoring: where are we now? Br J Haematol [Internet]. 2004;127(4):373–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2141.2004.05154.x>
9. Campos NLKL de, Andrade RR de, Silva MA de M. Oral anticoagulation in carriers of mechanical heart valve prostheses: experience of ten years. Rev Bras Cir Cardiovasc [Internet]. 2010;25(4):457–65. Available from: <http://dx.doi.org/10.1590/s0102-76382010000400008>
10. Briggs C. British Committee for Standards in Haematology General Haematology Task Force, et al. Guidelines for point-of-care testing: haematology. Br J Haematol. 2008;(6):904–15.

11. Taylor JR, Richter C, Lindamood C, Liu X, Zumberg M, Fletcher B. Accuracy of CoaguChek XS in patients with antiphospholipid syndrome. *Point Care* [Internet]. 2017;16(4):161–3. Available from: <http://dx.doi.org/10.1097/poc.000000000000149>.
12. Masucci M, Li Kam Wa A, Shingleton E, Martin J, Mahir Z, Breen K. Point of care testing to monitor INR control in patients with antiphospholipid syndrome. *EJHaem* [Internet]. 2022;3(3):899–902. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/jha2.522>
13. Noordermeer T. Interference in point-of-care international normalized ratio monitoring in patients with lupus anticoagulant is correlated with anti- β 2-glycoprotein I antibody titers. *Research and practice in thrombosis and haemostasis*. 2023.
14. Bossuyt P, Reitsma J, Bruns D, Gatsonis C, Glasziou P, Irwig L, et al. STARD 2015: an updated list of essential items for reporting diagnostic accuracy studies. *BMJ* [Internet]. 2015; 351. Available from: <https://www.equator-network.org/reporting-guidelines/stard/>
15. Aringer M, Costenbader K, Daikh D, Brinks R, Mosca M, Ramsey-Goldman R, et al. 2019 European League Against Rheumatism/American College of Rheumatology classification criteria for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheumatol* [Internet]. 2019;71(9):1400–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/art.40930>
16. Barbhaiya M. The 2023 ACR/EULAR antiphospholipid syndrome classification criteria. *Arthritis & rheumatology*. 2023;10:1687–702.
17. USP. Tamanho amostral para teste de diferença entre médias independentes. Disponível em: http://estatistica.bauru.usp.br/calculoamostral/ta_diferenca_media_independente.php.
18. International Organization for Standardization. ISO 17593 - Clinical laboratory testing and in vitro medical devices - Requirements for in vitro monitoring systems for self-testing of oral anticoagulant therapy.
19. Dancey C.P., Reidy J. *Statistics without Maths for Psychology*. 4th ed. Pearson Education; Essex, UK: 2007.
20. Samsa GP, Ortel TL, Perry SL. Point-of-care testing of the international normalized ratio in patients with antiphospholipid antibodies. *Thromb Haemost*

[Internet]. 2005;94(12):1196–202. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1160/th05-06-0400>.

21. Ganapati A, Mathew J, Yadav B, Kabeerdoss J, Gowri M, Dave RG, et al. Comparison of point-of-care PT-INR by hand-held device with conventional PT-INR testing in anti-phospholipid antibody syndrome patients on oral anticoagulation. *Indian J Hematol Blood Transfus.* 2023;39(3):450–5. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12288-022-01611-4>

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A disponibilidade limitada de pacientes com SAF e LES no hospital representou um desafio considerável para o recrutamento, impactando tanto o tamanho da amostra quanto a duração do estudo. Ainda assim, os resultados demonstraram que o dispositivo *bSens.INR* tem um desempenho promissor na determinação de TP e RNI, embora apresente limitações específicas para pacientes com condições autoimunes.

Estudos futuros devem aprofundar a análise das variações observadas em diferentes dias de teste para investigar se as discrepâncias em relação ao método convencional são decorrentes dos níveis elevados de anticorpos ou se ocorrem de maneira aleatória. Além disso, a realização de estudos com amostras maiores e a validação multicêntrica é essencial para fortalecer a robustez dos achados e ampliar a aplicabilidade clínica do dispositivo.

Embora o *bSens.INR* tenha potencial como uma ferramenta ágil e conveniente de monitoramento, seu uso em pacientes com doenças autoimunes requer cautela. Pequenas variações no RNI podem ter implicações clínicas graves para esses pacientes, tornando necessária uma abordagem combinada, em que o *bSens.INR* seja complementado por testes laboratoriais convencionais. Isso garantirá maior precisão no monitoramento da coagulação e na gestão terapêutica desses indivíduos, assegurando tanto a segurança quanto a eficácia do tratamento anticoagulante.

9. PERSPECTIVAS FUTURAS

- Encontrar novos centros de atendimento com pacientes anticoagulados;
- Encontrar novos centros com pacientes anticoagulados e com diagnóstico de Síndrome do anticorpo antifosfolípideo;
- Aumentar o número amostral, a fim de avaliar a acurácia e repetibilidade dos resultados com uma validação clínica mais ampla;
- Publicação do artigo proposto;

10. ANEXOS E/OU APÊNDICES

APÊNDICE A- FORMULÁRIO DE COLETA DE INFORMAÇÕES DOS PACIENTES

PESQUISADOR

- Local de Coleta
- Data da Coleta
- Coletador

PACIENTE

- Código de identificação do prontuário:
- Data de Nascimento:
- Diagnóstico:
- Medicações em uso:
- Dose de cada medicação e tempo de uso da mesma:
- Frequência de realização de teste de TP:
- Presença de comorbidades?
 - Insuficiência cardíaca congestiva
 - Hipertensão
 - Idade superior a 75 anos
 - Diabetes mellitus tipo 1
 - Diabetes mellitus tipo 2
- Episódios de trombose ou sangramento?
 - Se sim, qual?
 - Data?

APÊNDICE B - MODELO DE CONVITE DE PARTICIPAÇÃO EM PESQUISA - ROTEIRO DE LIGAÇÃO TELEFÔNICA

Nº do projeto GPPG ou CAAE 69937123.7.0000.5327

Bom dia/Boa tarde, o meu nome é Gabriela Victória de Mello Jantzch, sou pesquisador do projeto que está sendo realizado no Hospital de Clínicas de Porto Alegre “Validação de um dispositivo móvel para determinação da coagulação sanguínea (*bSens.INR*) no contexto de pacientes com Síndrome do anticorpo antifosfolípido.

Poderia falar com o Sr/ a Sra

O objetivo do projeto é validar um dispositivo rápido e portátil para determinação do tempo da coagulação sanguínea no contexto de pacientes com síndrome do anticorpo antifosfolípido.

Estou ligando para convidar o senhor (a) a participar desta pesquisa, pois verificamos que você realizou acompanhamento no Ambulatório de Lúpus, e o senhor (a) está sendo convidado a participar da pesquisa por ter os requisitos que a minha pesquisa está buscando, que são: Pacientes com Lúpus e positivos para Síndrome do anticorpo antifosfolípido.

Se tiver interesse em participar, você será agendado (a) para uma coleta de sangue e coleta à ponta de dedo.

Ressaltamos que caso não tenha interesse em participar, isto não interfere em nada no seu atendimento ou em consultas e exames já agendados.

Se estiver de acordo, pergunte em qual contato de preferência gostaria de receber o Termo de Compromisso Livre e Esclarecido do projeto, onde constam as informações detalhadas.

Contato para envio do TCLE (Email/Whatsapp/mensagem):

Você gostaria de participar: Sim

Não

Se não aceitar, agradecer pelo tempo e atenção.

Perguntar se a pessoa possui mais alguma dúvida e ressaltar que os contatos dos pesquisadores e do CEP estão no Termo enviado.

Pesquisador responsável: Ricardo Machado Xavier

Contato disponibilizado: (51) 99961-7877 (Gabriela)

Observação: Este roteiro é apenas um guia para o diálogo, sendo que os pesquisadores tomarão todo o cuidado para evitar qualquer constrangimento, bem como responderão perguntas ou dúvidas adicionais que se apresentem durante a ligação.

Dados a serem preenchidos pelo pesquisador depois da ligação:

Participante:

Dia da ligação:

Hora da ligação:

Gravação da ligação () Sim () Não

Pesquisador que realizou a ligação:

Assinatura do Pesquisador:

APÊNDICE C - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nº do CAAE 69937123.7.0000.5327

Título do Projeto: **Validação de um dispositivo móvel para determinação da coagulação sanguínea (*bSens.INR*) no contexto de pacientes com Síndrome do anticorpo antifosfolípido.**

Você está sendo convidado(a) a participar de uma pesquisa cujo objetivo é validar um dispositivo rápido e portátil para determinação do tempo da coagulação sanguínea no contexto de pacientes com síndrome do anticorpo antifosfolípido.

Esta pesquisa está sendo realizada pelo Laboratório de Doenças Autoimunes do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) e também pela empresa Biosens Desenvolvimento e Indústria de Biossensores LTDA (BIOSENS).

Se você aceitar o convite, sua participação na pesquisa envolverá uma coleta por venopunção para realização do exame do Tempo de Protrombina (TP), e coletas á ponta de dedo para realização de um teste Point-of-care para dosar o TP e assim fazer a comparação dos métodos. Se você aceitar o convite para participar da pesquisa, gostaríamos de sua autorização para acessar o prontuário e consultar as seguintes informações: peso, altura, data de nascimento, diagnóstico, medicações que estão em uso, dose de cada medicação e tempo de uso, frequência de realização de teste de TP, presença de comorbidades, episódios de trombose ou sangramento.

Os possíveis riscos ou desconfortos decorrentes da participação na pesquisa poderá ser sangramento e/ou dor no local da punção venosa e/ou dor nos dedos que serão feitas as coletas a ponta de dedo. Os possíveis benefícios decorrentes da participação na pesquisa são o resultado do seu exame de Tempo de Protrombina no teste padrão ouro e a contribuição para a validação dessa tecnologia nacional desenvolvida, assim como a promoção do conhecimento sobre o assunto.

Sua participação na pesquisa é totalmente voluntária, ou seja, não é obrigatória. Caso você decida não participar, ou ainda, desistir de participar e retirar seu consentimento, não haverá nenhum prejuízo ao atendimento que você recebe ou possa vir a receber na instituição. Não está previsto nenhum tipo de pagamento pela sua participação na pesquisa e você não terá nenhum custo com respeito aos procedimentos envolvidos.

Caso ocorra alguma intercorrência ou dano, resultante de sua participação na pesquisa, você receberá todo o atendimento necessário, sem nenhum custo pessoal. Os dados coletados durante a pesquisa serão sempre tratados confidencialmente. Os resultados serão apresentados de forma conjunta, sem a identificação dos participantes, ou seja, o seu nome não aparecerá na publicação dos resultados.

Caso você tenha dúvidas em relação a esta pesquisa ou a este Termo, antes de decidir participar você poderá entrar em contato com o pesquisador responsável: Ricardo Machado Xavier, email: rxavier10@gmail.com, ou com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), pelo e-mail cep@hcpa.edu.br, telefone (51) 33596246 ou Av. Protásio Alves, 211 - Portão 4 - 5º andar do Bloco C - Rio Branco - Porto Alegre/RS, de segunda à sexta, das 8h às 17h.

APÉNDICE D - CHECKLIST STARD 2015

Section & Topic	No	Item
TITLE OR ABSTRACT		
	1	Identification as a study of diagnostic accuracy using at least one measure of accuracy (such as sensitivity, specificity, predictive values, or AUC)
ABSTRACT		
	2	Structured summary of study design, methods, results, and conclusions (for specific guidance, see STARD for Abstracts)
INTRODUCTION		
	3	Scientific and clinical background, including the intended use and clinical role of the index test
	4	Study objectives and hypotheses
METHODS		
<i>Study design</i>	5	Whether data collection was planned before the index test and reference standard were performed (prospective study) or after (retrospective study)
<i>Participants</i>	6	Eligibility criteria
	7	On what basis potentially eligible participants were identified (such as symptoms, results from previous tests, inclusion in registry)
	8	Where and when potentially eligible participants were identified (setting, location and dates)
	9	Whether participants formed a consecutive, random or convenience series
<i>Test methods</i>	10a	Index test, in sufficient detail to allow replication
	10b	Reference standard, in sufficient detail to allow replication
	11	Rationale for choosing the reference standard (if alternatives exist)
	12a	Definition of and rationale for test positivity cut-offs or result categories of the index test, distinguishing pre-specified from exploratory
	12b	Definition of and rationale for test positivity cut-offs or result categories of the reference standard, distinguishing pre-specified from exploratory
	13a	Whether clinical information and reference standard results were available to the performers/readers of the index test
	13b	Whether clinical information and index test results were available to the assessors of the reference standard
<i>Analysis</i>	14	Methods for estimating or comparing measures of diagnostic accuracy
	15	How indeterminate index test or reference standard results were handled
	16	How missing data on the index test and reference standard were handled
	17	Any analyses of variability in diagnostic accuracy, distinguishing pre-specified from exploratory
	18	Intended sample size and how it was determined
RESULTS		
<i>Participants</i>	19	Flow of participants, using a diagram
	20	Baseline demographic and clinical characteristics of participants
	21a	Distribution of severity of disease in those with the target condition
	21b	Distribution of alternative diagnoses in those without the target condition
	22	Time interval and any clinical interventions between index test and reference standard
<i>Test results</i>	23	Cross tabulation of the index test results (or their distribution) by the results of the reference standard
	24	Estimates of diagnostic accuracy and their precision (such as 95% confidence intervals)
	25	Any adverse events from performing the index test or the reference standard
DISCUSSION		
	26	Study limitations, including sources of potential bias, statistical uncertainty, and generalisability
	27	Implications for practice, including the intended use and clinical role of the index test
OTHER INFORMATION		
	28	Registration number and name of registry
	29	Where the full study protocol can be accessed
	30	Sources of funding and other support; role of funders

