



Detección y titulación de inhibidor específico anti-factor VIII de coagulación

MANLAB®

Diagnóstico Bioquímico y Genómico

 12 min.


El factor VIII de la coagulación circula en plasma sanguíneo unido al factor de von Willebrand, tiene un rol crucial en la etapa de amplificación de la generación de trombina al activarse el sistema de coagulación. La deficiencia congénita del factor VIII se denomina Hemofilia A. Existen pacientes con un síndrome clínico similar a la hemofilia A congénita pero con niveles de síntesis del factor normales, sin embargo se ha detectado la presencia de un inhibidor adquirido contra el factor VIII, a este trastorno se lo conoce como hemofilia adquirida. Ésta es una patología autoinmune que suele mostrar sangrados repentinos en pacientes sin coagulopatías previas. Es una enfermedad hemorrágica infrecuente producida por autoanticuerpos específicos contra el factor VIII. En la siguiente nota el Área de Hemostasia de laboratorios MANLAB nos presenta un informe sobre las herramientas disponibles para la detección y titulación del inhibidor específico del anti-factor VIII de coagulación destacando la importancia del diagnóstico precoz para un rápido tratamiento de pacientes con hemorragias.



Leonardo Bello*, Ricardo Raúl Forastiero**
Área Hemostasia - MANLAB

* Técnico de laboratorio

** Dr. en Bioquímica- Consultor y Jefe del Área Hemostasia

E-mail: ricardo.forastiero@manlab.com.ar



El factor VIII de la coagulación tiene un rol crucial en la etapa de amplificación de la generación de trombina al activarse el sistema de coagulación. Circula en plasma sanguíneo unido al factor von Willebrand lo que permite o facilita su estabilidad. La deficiencia congénita del factor VIII se denomina Hemofilia A y puede presentarse en grado leve, moderada o severa en relación al nivel plasmático del factor VIII. La hemartrosis (sangrado en articulaciones) es la principal complicación en casos de hemofilia A severa (FVIII <1%).

Sin embargo, se puede presentar en algunos pacientes un síndrome clínico similar a la hemofilia A congénita pero que presentan niveles de síntesis del factor normales. En esos casos se detecta la presencia de un inhibidor adquirido contra el factor VIII y el trastorno se conoce como hemofilia adquirida. Es una patología autoinmune que suele mostrar sangrados repentinos en pacientes sin coagulopatía previa. Es una enfermedad hemorrágica infrecuente producida por autoanticuerpos específicos contra el factor VIII. Se presenta en general en pacientes añosos y de sexo masculino y además en mujeres durante el embarazo y particularmente en el periodo post parto. Su incidencia es rara con una prevalencia de 0.2-1.9 pacientes/100000/año.

La hemofilia adquirida se manifiesta clínicamente como hematomas espontáneos o con mínimos traumatismos a nivel muscular y tejido celular subcutáneo. En algunos casos se producen hemorragias a nivel digestivo, pulmonar, hemorragia post-parto o del sistema nervioso central. El

sangrado puede ser severo con una alta mortalidad. El inhibidor relacionado al embarazo ocurre principalmente entre el 2do y 5to mes post parto.

Además, se puede presentar el inhibidor de factor VIII en pacientes con hemofilia A congénita severa o moderada como consecuencia de la terapia repetida en el tiempo con concentrados del factor VIII en circunstancias clínicas que la requieran. La posibilidad de que un hemofílico desarrolle inhibidores depende de factores genéticos propios en el gen del factor VIII, el número de tratamientos recibidos y el tipo de producto recibido como terapia sustitutiva. La incidencia aproximada es de 5-25% de pacientes con hemofilia. En este caso el inhibidor es un alloanticuerpo. Es más frecuente que los anticuerpos sean del tipo IgG4 no fijadores de complemento.

Diagnóstico del inhibidor en el laboratorio

El material a evaluar es plasma citratado que debe ser procesado antes de las 4-6 hs de la extracción, aunque la muestra de plasma puede conservarse a -80 °C y ser derivada para su evaluación en laboratorios especializados en hemostasia.

Pruebas de rutina

Un paciente con inhibidor anti-factor VIII presenta típicamente un tiempo de protrombina y un tiempo de trombina dentro del rango de referencia normal. Sin embargo, tiene un valor de tiempo de tromboplastina parcial activado (APTT) prolongado por sobre el límite superior normal. Esta prolongación o alteración es muy dependiente de la sensibilidad del sistema de detección / reactivo de APTT

utilizado y de la potencia del inhibidor.

Siempre tener en cuenta que un dato de APTT prolongado aislado también puede ser encontrado en individuos con inhibidor lúpico, inhibidor específico de un factor, o bien al déficit de uno o varios factores de la coagulación de la vía intrínseca (VIII, IX, XI, XII). Por lo tanto, hay varias pruebas específicas que se deben utilizar para la correcta identificación de la alteración encontrada en el APTT.

Estudios de mezcla con plasma normal

Ante un APTT prolongado debe realizarse siempre el estudio de mezcla con pool de plasmas normales. Para ello se prepara en un tubo la mezcla en partes iguales de plasma del paciente (PP) con un pool de plasmas normales (PN). Luego se procede a realizar el APTT en ese tubo de mezcla. El efecto de corrección o de inhibidor se calcula con el Índice de Rosner $[(\text{APTT mezcla} - \text{APTT PN}) / \text{APTT PP}] \times 100$. Un valor de referencia podría ser 11-12% y si el resultado de la mezcla es mayor a ese valor

se considera la presencia de un efecto inhibitorio en el plasma del paciente. Si no se observa corrección, o la corrección es parcial, debe realizarse el ensayo con incubación en tiempo prolongado. Esto es porque el inhibidor anti-factor VIII requiere más tiempo y temperatura para ejercer su efecto inhibitorio. Este patrón es casi exclusivamente observado en pacientes con este tipo de inhibidores.

Estudio del efecto dependiente del tiempo y la temperatura

Ante la sospecha o solicitud de evaluación de la presencia de inhibidor anti-VIII siempre se debe realizar el estudio de mezcla en una reacción de incubación que llevamos a cabo durante 2 horas a 37°C.

Para ello se incuban tres tubos con PN, PP y una con una mezcla en partes iguales de PN con PP. Luego de las dos horas, realizar en un 4to tubo una nueva mezcla (inmediata o control) que preparamos con PN y PP que estuvieron incubados a 37°C. Luego realizamos el APTT en cada uno de esos 4 tubos. Se debe comparar particular-

mente el APTT de la mezcla inmediata con el APTT de la mezcla incubada. Si la diferencia es mayor al 10% el efecto inhibitorio indica que se potencia con la incubación, es decir que el inhibidor es temperatura y tiempo dependiente. Ver un ejemplo positivo para inhibidor en Figura 1.

El APTT normal se prolonga ligeramente por el descenso de la actividad de factor VIII y el de la mezcla se prolongará en mayor grado durante la incubación, porque el inhibidor inactiva el factor VIII del plasma normal. La reacción entre el FVIII y su inhibidor es tiempo dependiente, pero el grado de prolongación también depende de la potencia del inhibidor.



Figura 1. Ejemplo ilustrativo de un inhibidor tiempo y temperatura dependiente y como calcular ese índice a partir de los resultados en segundos del APTT. Valor de referencia <10%.

	APTT basal	APTT 2 hr 37°C
Normal	40	42
Paciente	100	111
PN	50	60
Mezcla control	-	52

 **Inova
Diagnostics**
A Werfen Company

Enfermedades Autoinmunes

Quimioluminiscencia

BIO-FLASH



Síndrome Anti Fosfolípido

Cardiolipina IgG
Cardiolipina IgM
Cardiolipina IgA
β2 GPI IgM
β2 GPI IgG
β2 GPI IgA
β2 GPI Domain 1

Enfermedad Celíaca

DGP Screen
DGP IgA
DGP IgG
TG IgA
TG IgG

Artritis Reumatoidea

CCP3

Enfermedades del Tejido Conectivo

ENA 7
Jo-1
RNP
Sm
Ro60
Ro52
SS-B
Scl-70
Centrómero
DFS70
dsDNA
CTD Screen Plus
Ribosomal P

Vasculitis

MPO
PR3
GMB

Características

- Totalmente automatizado
- Acceso Random
- Almacena las curvas de calibración
- Elimina el procesamiento por lotes de reactivos
- Hasta 450 resultados en un solo turno
- Primer resultado en tan solo 30 minutos
- Almacena hasta 20 reactivos a bordo, refrigerados
- Pantalla Touch Screen

 **BIODIAGNOSTICO**

Av. Ing. Huergo 1437 P.B. "I" C1107APB - Buenos Aires - Argentina Tel./Fax: +5411 4300-9090

info@biodiagnostico.com.ar www.biodiagnostico.com.ar

Cálculo: $(80 - 52 / 80) \times 100 = 35\%$ (Indica Inhibidor tiempo y temperatura dependiente)

Cuantificación de factor VIII

El concepto general es el hallazgo de un nivel plasmático de factor VIII disminuido o indetectable, con todos los otros factores de coagulación normales en el caso de hemofilia A y/o hemofilia adquirida. No obstante, cuando se realiza el dosaje de todos los factores se puede encontrar más de un factor disminuido, lo cual pone en duda la especificidad del inhibidor. Siempre tener en cuenta que los sustratos comerciales deficitarios de factor IX, XI y XII, contienen factor VIII que puede ser inactivado por el inhibidor presente en el plasma del paciente. Esta disminución en el factor VIII presente en el plasma deficitario, producirá una falsa disminución de la actividad de los otros factores. Por lo tanto, si se sospecha la presencia de un inhibidor de factor VIII, el dosaje de todos los factores debe realizarse en diluciones múltiples.

En las Figuras 2 y 3 se ven ejemplos del efecto de diluciones crecientes cuando realizamos el dosaje de factores de coagulación. En un plasma normal o de paciente hemofílico o que tenga un inhibidor de anti-VIII, el nivel de factor VIII permanecerá bajo en todas las diluciones y en un patrón paralelo. En cambio, en la presencia de un inhibidor lúpico que también puede afectar el nivel aparente del factor VIII, se observa que las curvas se cortan con la curva del pool normal en alguna dilución. Esto es consecuencia de la dilución del inhibidor lúpico y el cruce de curvas demuestra que el descenso observado en el factor VIII o en otro factor de la vía intrínseca en la dilución estándar 1/10 es aparente y en realidad el paciente tendría nivel normal de ese factor inicialmente hallado como deficiente. Cuando se realiza el dosaje de factores, el mismo aumentará a medida que incrementamos las diluciones del plasma del paciente (porque el inhibidor se está diluyendo).

Titulación del inhibidor anti-VIII

Los ensayos de inhibidor de factor VIII se basan en un método que mide la disminución de la actividad de factor VIII en

una mezcla entre una fuente exógena del factor de coagulación (por ejemplo, pool de plasmas normales o algún concentrado de factores) y el plasma del paciente, incubado a 37°C durante un período de 2 horas. La actividad de factor VIII residual en el ensayo de mezclas se mide por el método coagulable en una etapa. Existen dos métodos para la titulación del inhibidor.



Figura 2. Dosaje de factor VIII (en segundos) en muestras de plasma en diluciones crecientes (1\10, 1\100, 1\1000, etc) y su patrón en plasma normal (PN), hemofilia A (HA), inhibidor anti-VIII e inhibidor lúpico (LA)

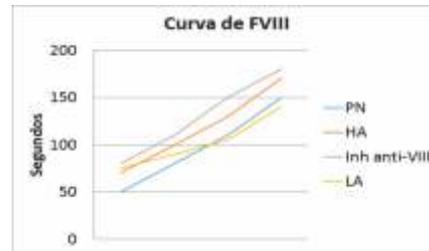
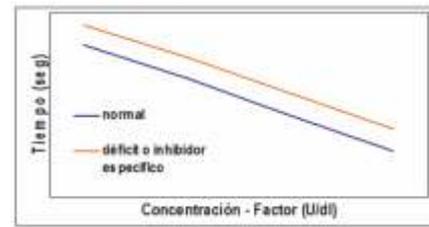


Figura 3. Dosajes de factores (tiempo en segundos) en muestras de plasma en diluciones crecientes (1\10, 1\100, 1\1000, etc) y su patrón en plasma normal, déficit o inhibidor específico anti-factor de coagulación e inhibidor de interferencia tipo lúpico



Método Bethesda

El ensayo Bethesda que se convirtió en método de referencia para evaluar la potencia de los inhibidores anti-VIII, fue descrito en 1975. El fundamento es la mezcla de volúmenes iguales de plasma del paciente en diluciones crecientes con pool de plasma normal que arbitrariamente contiene 100% de factor VIII. El control consiste de partes iguales de plasma normal y tampón imidazol.

La definición de Unidad Bethesda (UB) es la concentración de inhibidor presente en el plasma del paciente diluido, capaz de inactivar la mitad del factor VIII (VIII residual 50%) de la mezcla control incubada 2 horas a 37°C. El punto de corte de sensibilidad para este ensayo es de 0.6

UB/ml.

En la Figura 4 se muestra el esquema que se utiliza habitualmente en los laboratorios. Se deben identificar una serie de tubos que contengan volúmenes iguales de PP (sin diluir y diluciones seriadas apropiadas) y PN. Además, se prepara el tubo 1 con volúmenes iguales de PN y buffer Owren. Incubar durante 2 horas a 37°C en tubos tapados.



Figura 4. Esquema de preparación de los tubos a incubar 2 horas a 37°C para la obtención del factor VIII residual en cada uno de ellos y el posterior cálculo de unidades Bethesda



Luego de ese tiempo se determina la actividad de factor VIII en las mezclas incubadas por método coagulable en una etapa de todos los tubos preparados.

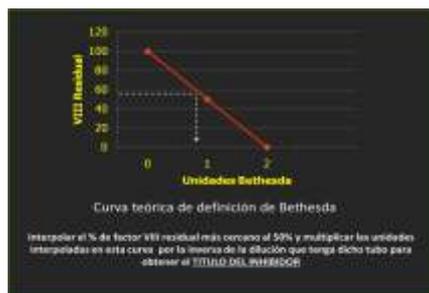
Cálculo de factor VIII residual en cada tubo:

$(VIII \text{ en } PP+PN / VIII \text{ en la muestra control o tubo 1}) \times 100\%$

Luego con los resultados de factor VIII residual en cada tubo se calculan las unidades Bethesda. Para ello se utiliza la curva teórica (Figura 5) que se prepara en escala semi logarítmica. Se grafica factor VIII residual (%) vs potencia del inhibidor considerando los siguientes puntos: el 100% de FVIII residual corresponde a 0 unidades Bethesda y 50% de FVIII residual a 1 UB/ml. Como se indica en la figura se debe tomar para el cálculo de la potencia del inhibidor el factor VIII residual más cercano a 50%, extrapolar el título del inhibidor de la curva teórica y multiplicar por la inversa de la dilución del plasma del paciente, con el cual se logró ese valor de factor VIII residual. Tener en cuenta que para calcular la potencia del inhibidor no debe utilizarse un VIII residual < de 25% ni > de 75%.



Figura 5. Curva teórica de definición de unidades Bethesda para la obtención del título del inhibidor



Método de Nijmegen

Este ensayo surgió en 1995 como una modificación del ensayo Bethesda porque se demostró que el ensayo Bethesda tenía una alta sensibilidad, pero una baja especificidad y que los coeficientes de variación eran altos. El método Nijmegen es considerado actualmente como método de referencia para detección de inhibidores de factor VIII. La modificación de Nijmegen

consiste en tamponar el pool de plasma normal con buffer imidazol y usar plasma deficiente en factor VIII en lugar de buffer en la mezcla control y en las diluciones subsiguientes del PP. La inactivación del factor VIII por inhibidores es dependiente del pH y la estabilización del pH de la mezcla de incubación soluciona este problema y aumenta la especificidad y sensibilidad del método.

Conclusiones

La presencia de un inhibidor anti-VIII requiere de un diagnóstico precoz, que permita el rápido tratamiento del paciente con hemorragia. El paciente presentara siempre un APTT prolongado y estudio de mezcla que no corrige o corrige parcialmente con plasma normal. El dosaje de FVIII estará siempre disminuido y los otros factores pueden estar normales o falsamente disminuidos. La titulación del inhibidor anti-VIII requiere de un laboratorio de hemostasia con experiencia en el área. La titulación tiene relevancia clínica

para evaluar la respuesta a la terapéutica instituida pero la potencia no tiene relación directa con el grado de hemorragia.

MANLAB®
Diagnóstico Bioquímico y Genómico

Referencias bibliográficas

1. Weibert KE. Acquired hemophilia A. Semin Thromb Hemost 2012; 38:735-41.
2. Baudo F, de Cataldo F. Acquired hemophilia: a critical bleeding syndrome. Haematologica 2004; 89:96-100.
3. Verbruggen B. Diagnosis and quantification of FVIII inhibitors. Haemophilia 2010; 16:20-24.
4. Grosso S, Blanco A. Inhibidores anti FVIII: titulación. En: Grupo Argentino de Hemostasia editores Fundamentos para el manejo práctico en el laboratorio de Hemostasia. 2da edición 2013: 532-535.
5. Favaloro EJ, Verbruggen B, Miller CH. Laboratory testing for factor inhibitors. Haemophilia 2014; 20 (Suppl) 4: 94-98.
6. Verbruggen B, Novakova I, Wessels H et al. The Nijmegen modification of the Bethesda assay for FVIII:C inhibitors improved specificity and reliability. Thromb Haemost 1995; 247-251.
7. Kasper CK. Laboratory diagnosis of FVIII inhibitors in Kessler C, Garvey MB, Green D, et al. Acquired Hemophilia. 2nd Edition. 1995; p: 9-23.

 **BD Vacutainer®**

Líder en Soluciones Preanalíticas

Calidad y Bioseguridad:
Su interés y nuestro compromiso



Para contactarse, llámenos al: 0800-444-55BD (23)
o escribanos a: vacutainer@bd.com

