

## Capítulo 3 DIAGNÓSTICO Y MONITOREO DE LABORATORIO

Steve Kitchen, Francisco de Paula Careta, Silmara A. de Lima Montalvão, Emna Gouider, Radoslaw Kaczmarek, Claude T. Tagny, Pierre Toulon, Glenn F. Pierce, Alok Srivastava

### RECOMENDACIONES

#### 3.1 | Introducción

##### Recomendación 3.1.1

La FMH recomienda que las pruebas para el diagnóstico y monitoreo de la hemofilia las realicen personal con conocimientos y experiencia en pruebas de laboratorio de coagulación, usando equipo y reactivos que han sido validados para este fin específico.

• OBSERVACIÓN: Los detalles de las pruebas de laboratorio para el diagnóstico y monitoreo de la hemofilia se describen en el Manual de laboratorio de la FMH. <sup>BC</sup>

#### 3.2 | Pruebas de laboratorio de coagulación

##### Recomendación 3.2.1

En preparación para la recolección de una muestra de sangre para determinar el tiempo de protrombina (TP), el tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPA), o la actividad del FVIII/FIX, la FMH recomienda que los pacientes con hemofilia pueden mantener su dieta habitual; no es necesario el ayuno antes de la toma de sangre.

• OBSERVACIÓN: Niveles elevados de lípidos en el plasma podrían afectar la determinación de los tiempos de coagulación cuando se utilizan coagulómetros con sistemas ópticos. <sup>BC</sup>

##### Recomendación 3.2.2:

En preparación para la recolección de una muestra de sangre para determinar el TTPA o la actividad de FVIII/FIX, la FMH recomienda que los pacientes eviten el ejercicio vigoroso antes de la toma de sangre.

• OBSERVACIÓN: El ejercicio vigoroso o el estrés pueden elevar temporalmente la actividad del FVIII de pacientes con hemofilia A leve hasta el rango de referencia; por ende, los pacientes deberían descansar durante algunos minutos antes de la venopunción. <sup>BC</sup>

##### Recomendación 3.2.3:

Para el diagnóstico y monitoreo de la hemofilia A y B, la FMH recomienda que las muestras de sangre se etiqueten inmediatamente con el nombre y apellido del paciente, un número de identificación o fecha de nacimiento, y la fecha y hora de la recolección de la muestra. Esto debería hacerse antes de alejarse del paciente.

• OBSERVACIÓN: No existe consenso en cuanto a si un tubo debería etiquetarse inmediatamente antes o inmediatamente después de la recolección de la muestra. <sup>BC</sup>

##### Recomendación 3.2.4:

La FMH recomienda que las muestras de sangre para la determinación de TP, TTPA o actividad del FVIII/FIX se recolecten en tubos de citrato que contengan 0.105-0.109M (alrededor de 3.2%) de citrato trisódico dihidratado acuoso, tapados durante su procesamiento, y mantenidos a una temperatura de 18-25°C durante su transporte y almacenamiento. Las muestras de sangre deberían centrifugarse a temperatura ambiente por un mínimo de 1700 g durante al menos 10 minutos, y ya sea analizarse dentro de las 8 horas posteriores a su recolección (4 horas para la prueba de FVIII:C) o almacenarse congeladas a una temperatura de -35°C o más baja.

• OBSERVACIÓN: Debería evitarse el almacenamiento de muestras de sangre entera citrada a temperaturas de 2-8°C ya que esto podría conducir a la pérdida de actividad del FVIII.

• OBSERVACIÓN: Las muestras de plasma desplaquetado pueden almacenarse a -35°C durante hasta 3 meses, y a -70°C durante hasta 6 meses, antes de determinar la actividad del FVIII/FIX. El almacenamiento de plasma desplaquetado a -20°C generalmente es inadecuado. No deberían utilizarse congeladores con función de autodescongelado para almacenar plasma desplaquetado antes de la determinación de TP, TTPA, o actividad del FVIII/FIX. <sup>BC</sup>

##### Recomendación 3.2.5:

La FMH recomienda que las muestras de sangre para la determinación de TP, TTPA o actividad del FVIII/FIX deberían rechazarse y reponerse cuando el tubo de recolección contenga menos del 80% del volumen de llenado objetivo.

• OBSERVACIÓN: Si el tubo de recolección contiene entre 80% y 90% de su volumen de llenado objetivo, los resultados obtenidos usando ciertos métodos podrían mostrar prolongaciones artefactuales menores del TP y del TTPA, y una reducción artefactual menor de la actividad del FVIII/FIX. <sup>BC</sup>

##### Recomendación 3.2.6:

La FMH recomienda que las muestras de sangre para la determinación de TP, TTPA o actividad del FVIII/FIX deberían rechazarse y sustituirse si hubieran ocurrido coagulación o hemólisis in vitro durante la recolección y el procesamiento de la muestra.

• OBSERVACIÓN: El impacto que la hemólisis in vitro tiene en el TP es insuficiente para afectar el tratamiento del paciente.

• OBSERVACIÓN: Las muestras de pacientes con hemólisis in vivo recolectadas para la determinación de TP, TTPA o actividad del FVIII/FIX pueden aceptarse y analizarse. <sup>BC</sup>

## Capítulo 3 DIAGNÓSTICO Y MONITOREO DE LABORATORIO

### Recomendación 3.2.7:

Para la investigación de laboratorio de pacientes que se valoran debido a una sospecha clínica de hemofilia A, la FMH recomienda que la prueba de tiempo de protrombina también se realice usando un reactivo de laboratorio que contenga factor tisular humano.

- OBSERVACIÓN: La hemofilia A algunas veces se descarta a pesar de la sospecha clínica de su presencia. Tales casos podrían tener otras deficiencias de factor. Algunos pacientes con ciertos defectos del FVII pueden tener síntomas similares a los de la hemofilia leve, pero presentar TP y actividad del FVII normales en el laboratorio si el reactivo del laboratorio contiene factor tisular no humano, de manera que el diagnóstico sería inexacto. <sup>BC</sup>

### Recomendación 3.2.8:

Para la investigación de laboratorio de pacientes en estudio debido a una sospecha clínica de hemofilia, la FMH recomienda que un resultado de TTPA dentro del rango de referencia no se utilice para descartar la presencia de hemofilia A o B leve.

- OBSERVACIÓN: En algunos casos de hemofilia A o B leve, el TTPA podría estar dentro del rango normal. <sup>BC</sup>

### Recomendación 3.2.9:

La FMH recomienda que un resultado de TTPA dentro del rango normal obtenido en una muestra que contenga una mezcla de volúmenes iguales de plasma del paciente y de lote de plasma normal que fue analizada inmediatamente después de la preparación de dicha mezcla no debería utilizarse para descartar la posible presencia de un inhibidor del FVIII.

- OBSERVACIÓN: El TTPA de una mezcla de volúmenes iguales de plasma del paciente y del lote de plasma normal se vuelve sustancialmente prolongada en un periodo de 1 a 2 horas de incubación a 37°C si la muestra del paciente contiene un inhibidor neutralizante anti-FVIII. <sup>BC</sup>

### Recomendación 3.2.10:

Para la investigación de laboratorio de pacientes que se valoran debido a una sospecha clínica de hemofilia A, la FMH recomienda el uso tanto del ensayo de una etapa de FVIII como del ensayo cromogénico de FVIII:C en el chequeo diagnóstico inicial.

- OBSERVACIÓN: Ambos ensayos deberían realizarse aun cuando el resultado de uno de ellos muestre actividad del FVIII dentro del rango normal.

- OBSERVACIÓN: El ensayo de una etapa de FVIII requiere el uso de plasma desprovisto de FVIII que contenga menos de 1 UI/dL (<1%) de actividad del FVIII y niveles normales de otros factores de coagulación que pueden incidir en el TTPA (fibrinógeno, FII, FV, FIX, FX, FXI, FXII, precalicreína, y cininógeno de alto peso molecular). <sup>BC</sup>

### Recomendación 3.2.11:

Para la investigación de laboratorio de pacientes que se valoran debido a una sospecha clínica de hemofilia B, la FMH recomienda el uso del ensayo de una etapa de FIX en el chequeo diagnóstico inicial.

- OBSERVACIÓN: Actualmente no hay datos suficientes para hacer recomendaciones sobre el papel del ensayo cromogénico de FIX en el chequeo diagnóstico inicial de la hemofilia B.

- OBSERVACIÓN: El ensayo de una etapa de FIX requiere el uso de plasma desprovisto de FIX que contenga menos de 1 UI/dL (<1%) de actividad del FIX y niveles normales de otros factores de coagulación que pueden incidir en el TTPA (fibrinógeno, FII, FV, FVIII, FX, FXI, FXII, precalicreína, y cininógeno de alto peso molecular). <sup>BC</sup>

### Recomendación 3.2.12:

Para los ensayos de una etapa o cromogénicos de FVIII/FIX, el plasma de referencia/estándar usado para la calibración, ya sea de preparación comercial o local, debe tener rastreabilidad con una norma internacional de la OMS, y los resultados deberían reportarse en unidades internacionales (UI).

- OBSERVACIÓN: Los resultados deberían reportarse como UI/mL o UI/dL.

- OBSERVACIÓN: En principio, el porcentaje es la unidad apropiada de actividad solamente cuando el ensayo se realice usando lotes de plasma normal como plasma de referencia, cuya actividad no se haya establecido contrastándolo con una norma internacional de la OMS. <sup>BC</sup>

### Recomendación 3.2.13:

Para la investigación de laboratorio debida a una sospecha clínica de hemofilia usando ensayos de una etapa de FVIII/FIX, la FMH recomienda el análisis utilizando 3 diluciones diferentes de muestras de plasma de prueba

- OBSERVACIÓN: Los resultados de las diluciones de plasma de prueba y estándar deberían compararse mediante análisis de líneas paralelas. Una manera de valorar esto es calcular el coeficiente de variación (CV) de los 3 resultados usando la ecuación  $CV = ([\text{desviación estándar}/\text{media}] \times 100)$ . Si el CV de los 3 resultados fuera menor a 15%, entonces debería reportarse el promedio de los 3 resultados. Si el CV fuera mayor a 15%, deberían examinarse los resultados. La presencia de inhibidores patológicos contra factores de coagulación específicos o de anticoagulantes lúpicos podría interferir con algunos ensayos de una etapa de FVIII y FIX. Algunos anticoagulantes terapéuticos también pueden mostrar este efecto de interferencia. En todas estas instancias, la actividad del factor se incrementa en el ensayo conforme aumenta la dilución del plasma. La actividad del factor se subestima cuando el plasma se diluye menos, y se obtiene un resultado más preciso de la actividad cuando el plasma de prueba se diluye más. <sup>BC</sup>

### Recomendación 3.2.14:

En poblaciones con presencia de anticoagulante lúpico, la FMH recomienda el uso de un reactivo para el TTPA que no sea sensible al anticoagulante lúpico para realizar ensayos de una etapa de FVIII/FIX. <sup>BC</sup>

## Capítulo 3 DIAGNÓSTICO Y MONITOREO DE LABORATORIO

### Recomendación 3.2.15:

Para todos los ensayos de una etapa de FVIII/FIX, solamente deberían usarse los tiempos de coagulación de las diluciones de la muestra de prueba que se encuentren dentro del rango cubierto por la curva de calibración para calcular la actividad FVIII/FIX en la muestra de prueba.

• OBSERVACIÓN: Cuando se realizan ensayos con muestras de prueba de pacientes con hemofilia A o B moderada o grave podría necesitarse una curva de calibración ampliada o adicional. No es aceptable extender la curva de calibración por extrapolación sin analizar diluciones adicionales de plasma de referencia/calibración. <sup>BC</sup>

### Recomendación 3.2.16:

Para todos los tipos de ensayos de FVIII y FIX, debería incluirse una muestra de control interno de la calidad (CIC) con cada lote de muestras de prueba analizado. Los resultados solo deberían liberarse para fines de tratamiento del paciente después de confirmar que el resultado de CIC se encuentra dentro del rango objetivo para dicho material

• OBSERVACIÓN: Una descripción de cómo establecer rangos objetivo para materiales de CIC y cómo manejar resultados fuera del rango de CIC se encuentra disponible en el Manual de laboratorio de la FMH. <sup>BC</sup>

### Recomendación 3.2.17:

Para muestras de control interno de la calidad con actividad de FVIII/FIX en el rango de 50-150 UI/dL, el coeficiente de variación entre ensayos debería ser menor a 10%.

• OBSERVACIÓN: Algunos estudios han demostrado que el uso de una curva de calibración almacenada está relacionado con un CV entre ensayos más elevado que el uso de una nueva curva de calibración generada junto con las muestras del paciente. <sup>BC</sup>

### Recomendación 3.2.18:

Para el monitoreo de la terapia de reemplazo con concentrados de FVIII o FIX, la FMH recomienda que los laboratorios utilicen un ensayo de FVIII/FIX que haya sido validado para su uso con el concentrado específico utilizado para el tratamiento.

• OBSERVACIÓN: Esta recomendación es particularmente importante para formas moleculares modificadas de FVIII y FIX. <sup>BC</sup>

### Recomendación 3.2.19:

Para el monitoreo de la terapia de reemplazo con concentrados de FVIII derivados de plasma, la FMH recomienda el uso de un ensayo de FVIII, cromogénico o de una etapa, calibrado con plasma estándar que se haya establecido contrastándolo con una norma internacional de la OMS. <sup>BC</sup>

### Recomendación 3.2.20:

Para el monitoreo de la terapia de reemplazo con CFC que contienen FVIII recombinante de longitud completa, la FMH recomienda el uso de un ensayo de FVIII, cromogénico o de una etapa, calibrado con plasma estándar que se haya establecido contrastándolo con una norma internacional de la OMS. <sup>BC</sup>

### Recomendación 3.2.21:

Para el monitoreo de la terapia de reemplazo con efmoctocog alfa [FVIII recombinante fusionado con inmunoglobulina humana G1 (rFVIII<sub>1</sub>Fc); Elocta<sup>®</sup>/Eloctate<sup>®</sup>], la FMH recomienda el uso de un ensayo de FVIII, cromogénico o de una etapa, calibrado con plasma estándar que se haya establecido contrastándolo con una norma internacional de la OMS. <sup>BC</sup>

### Recomendación 3.2.22:

Para el monitoreo de la terapia de reemplazo con turoctocog alfa pegol [FVIII recombinante con dominio B truncado, con fracción de polietilenglicol de 40 kDa en un sitio específico (N8-GP); Esperoct<sup>®</sup>], la FMH recomienda el uso de un ensayo cromogénico de FVIII o un ensayo de FVIII de una sola etapa basado en el TTPA con reactivos validados, entre ellos algunos reactivos activadores de ácido eláxico (Actin<sup>®</sup>, Actin<sup>®</sup>FS, SynthAFax<sup>™</sup>, DG Synth<sup>™</sup>) y algunos reactivos activadores de sílica (Pathromtin<sup>®</sup>SL, SynthASil<sup>™</sup>), calibrados con un plasma estándar que se haya establecido contrastándolo con una norma internacional de la OMS.

• OBSERVACIÓN: Los ensayos de una etapa de FVIII con reactivos para TTPA de alta sensibilidad de marca APTT-SP<sup>™</sup>, STA<sup>®</sup>-PTT Automate, o TriniCLOT<sup>™</sup> subestiman considerablemente la verdadera actividad del FVIII del N8-GP y no deberían utilizarse. <sup>BC</sup>

### Recomendación 3.2.23:

Para el monitoreo de la terapia de reemplazo con damoctocog alfa pegol [FVIII recombinante con dominio B eliminado, con una fracción de polietilenglicol ramificada de 60 kDa en un sitio específico (BDD-rFVIII); Jivi<sup>®</sup>], la FMH recomienda el uso de un ensayo cromogénico de FVIII o de un ensayo de una etapa de FVIII, basado en el TTPA, con reactivos validados, entre ellos el reactivo activador de ácido eláxico Actin<sup>®</sup>FSL y algunos reactivos activadores de sílica (Pathromtin<sup>®</sup>SL, SynthASil<sup>™</sup>), calibrados con un plasma estándar que se haya establecido contrastándolo con una norma internacional de la OMS.

• OBSERVACIÓN: Los ensayos de una etapa de FVIII con el reactivo activador de ácido eláxico Actin<sup>®</sup>FS, o con el reactivo activador de caolín C. K. Presti<sup>®</sup>, sobreestiman considerablemente la verdadera actividad del FVIII y no deberían usarse. Los ensayos de una etapa de FVIII con los reactivos APTT-SP<sup>™</sup> y STA<sup>®</sup>-PTT Automate subestiman considerablemente la verdadera actividad del FVIII y no deberían usarse. <sup>BC</sup>

## Capítulo 3 DIAGNÓSTICO Y MONITOREO DE LABORATORIO

### Recomendación 3.2.24:

Para el monitoreo de la terapia de reemplazo con ruriotocog alfa pegol (FVIII recombinante de longitud completa con polietilenglicol de 20-kDa en un sitio no específico; Adynovate®/Adynovi®), la FMH considera que se requieren más estudios de ensayos de laboratorio para documentar recomendaciones sobre monitoreo de laboratorio.

- OBSERVACIÓN: Existen hallazgos conflictivos en la literatura que valora el uso de ensayos cromogénicos y de una etapa de FVIII en muestras que contienen ruriotocog alfa pegol. <sup>BC</sup>

### Recomendación 3.2.25:

Para el monitoreo de la terapia de reemplazo con lonoctocog alfa [FVIII recombinante de cadena única (rVIII-SingleChain); Afstyla®], la FMH recomienda el uso de un ensayo cromogénico de FVIII, calibrado con un plasma estándar que se haya establecido contrastándolo con una norma internacional de la OMS.

- OBSERVACIÓN: El resumen de las características del producto recomienda ensayos cromogénicos. También establece que el resultado del ensayo de una etapa de FVIII subestima el nivel de actividad del FVIII en aproximadamente 45%, en comparación con el resultado del ensayo cromogénico, y sugiere que, si se utilizara el ensayo de una sola etapa, el resultado debería multiplicarse por un factor de 2. <sup>BC</sup>

### Recomendación 3.2.26:

Para el monitoreo de la terapia de reemplazo con concentrados de FIX derivados de plasma, la FMH recomienda el uso de un ensayo de FIX, cromogénico o de una etapa, calibrado con un plasma estándar que se haya establecido contrastándolo con una norma internacional de la OMS. <sup>BC</sup>

### Recomendación 3.2.27:

Para el monitoreo de la terapia de reemplazo con concentrados de factor de coagulación que contienen FIX recombinante no modificado, la FMH recomienda el uso de un ensayo de una etapa de FIX, calibrado con un plasma estándar que se haya establecido contrastándolo con una norma internacional de la OMS.

- OBSERVACIÓN: Se ha reportado que los ensayos cromogénicos de FIX subestiman la actividad del FIX del concentrado de FIX recombinante. <sup>BC</sup>

### Recomendación 3.2.28:

Para el monitoreo de la terapia de reemplazo con eftrenonacog alfa [FIX recombinante fusionado con inmunoglobulina humana G1 (rFIXFc); Alprolix®], la FMH recomienda el uso de un ensayo cromogénico de FIX o de un ensayo de una etapa de FIX basado en el TTPA, con reactivos validados, entre ellos algunos reactivos activadores de ácido eláxico (Actin®, Actin®FS, Actin®FSL), algunos reactivos activadores de sílica (Pathromtin®SL, SynthASil™), y un reactivo activador de polifenol (Cephascreen®), calibrados con un plasma estándar que se haya establecido contrastándolo con una norma internacional de la OMS.

- OBSERVACIÓN: Los ensayos de una etapa de FIX con STA®-PTT Automate o reactivos con activador de caolín (C. K. Prest®) subestiman considerablemente la verdadera actividad del rFIXFc (Alprolix®) y no deberían usarse. <sup>BC</sup>

### Recomendación 3.2.29:

Para el monitoreo de la terapia de reemplazo con albutrepenonacog alfa [FIX recombinante fusionado con albúmina humana recombinante (rFIX-FP); Idelvion®], la FMH recomienda el uso de un ensayo de una etapa de FIX, basado en el TTPA, con reactivos validados, entre ellos algunos reactivos activadores de sílica (Pathromtin®SL, SynthASil™), calibrados con un plasma estándar que se haya establecido contrastándolo con una norma internacional de la OMS.

- OBSERVACIÓN: Los ensayos de una etapa de FIX con el reactivo activador de ácido eláxico Actin®FS, o con el reactivo activador de caolín C. K. Prest®, subestiman considerablemente la verdadera actividad del rFIX-RFP (Idelvion®) y no deberían usarse. Los ensayos de una etapa con el reactivo activador del ácido eláxico SynthAFax™ o los ensayos cromogénicos de FIX sobreestiman considerablemente la verdadera actividad del rFIX-FP (Idelvion®) y no deberían usarse. <sup>BC</sup>

### Recomendación 3.2.30:

Para el monitoreo de la terapia de reemplazo con nonacog beta pegol [FIX recombinante con una fracción de polietilenglicol de 40-kDa (N9-GP); Refixia®/Rebiny®], la FMH recomienda el uso de un ensayo cromogénico de FIX o un ensayo de una etapa de FIX basado en el TTPA, con reactivos validados, entre ellos el reactivo activador de ácido eláxico SynthAFax™, o el reactivo activador de polifenol Cephascreen®, calibrados con un plasma estándar que se haya establecido contrastándolo con una norma internacional de la OMS.

- OBSERVACIÓN: La mayoría de los ensayos de una etapa de FIX sobreestiman o subestiman considerablemente la verdadera actividad del FIX del N9-GP y no deberían usarse. Los ensayos de una etapa usando el reactivo activador de ácido eláxico SynthAFax™ o el reactivo activador de polifenol Cephascreen®, son adecuados para el monitoreo de la terapia con N9-GP. <sup>BC</sup>

### Recomendación 3.2.31:

En el caso de pacientes que reciben emicizumab y para quienes se requiere confirmación de los niveles esperados de emicizumab, la FMH recomienda usar un ensayo de una etapa modificado que incluya un paso adicional de predilución del plasma de prueba y la calibración de ensayo con calibradores específicos para emicizumab.

- OBSERVACIÓN: Incluso con niveles subterapéuticos de emicizumab, el TTPA podría ser normal o subnormal en pacientes con hemofilia A grave, con o sin inhibidores. <sup>BC</sup>

## Capítulo 3 DIAGNÓSTICO Y MONITOREO DE LABORATORIO

### Recomendación 3.2.32:

Para la determinación de la actividad del FVIII en pacientes con hemofilia A que reciben emicizumab, la FMH recomienda el uso de un ensayo cromogénico de FVIII que contenga FX bovino.

• OBSERVACIÓN: A niveles terapéuticos, el emicizumab afecta cualquier ensayo cromogénico de FVIII que contenga FX de origen humano. El emicizumab también podría afectar ensayos cromogénicos de FVIII que contengan FIXa de origen humano y FX de origen bovino, pero solo con niveles de emicizumab mayores que los esperados en pacientes que reciben las dosis recomendadas. <sup>BC</sup>

### Recomendación 3.2.33:

Para la determinación de niveles de inhibidores del FVIII en pacientes que reciben emicizumab, la FMH recomienda el uso de un ensayo cromogénico de FVIII que contenga FX bovino. <sup>BC</sup>

### Recomendación 3.2.34:

Para pacientes en los que se sospecha la presencia de un anticuerpo neutralizante antiemicizumab, la FMH recomienda medir los niveles de emicizumab usando un ensayo de una etapa modificado que incluya un paso adicional de predilución del plasma de prueba y la calibración de ensayo con calibradores específicos para emicizumab.

• OBSERVACIÓN: Si estuvieran disponibles, también pueden usarse ensayos validados de anticuerpos antifármacos para este fin. <sup>BC</sup>

### Recomendación 3.2.35:

Para la determinación de inhibidores anti-FVIII en una muestra que contenga más de 5 UI/dL de actividad del FVIII, la FMH recomienda que, antes de la prueba, la muestra se caliente a 56°C durante 30 minutos y se centrifugue a temperatura ambiente por un mínimo de 1700 g durante por lo menos 5 minutos.

• OBSERVACIÓN: El límite de cuantificación del ensayo Nijmegen-Bethesda para la detección de inhibidores del FVIII es de alrededor de 0.6 UB/mL.

• OBSERVACIÓN: El ensayo Nijmegen-Bethesda para la detección de inhibidores del FVIII requiere el uso de lotes de plasma normal tamponados como fuente de FVIII, que luego se mezclan con un volumen igual de plasma desprovisto de FVIII para preparar la mezcla de control. <sup>BC</sup>

### Recomendación 3.2.36:

Para la determinación de inhibidores anti-FIX en una mezcla que contenga más de 5 UI/dL de actividad del FIX, la FMH recomienda que, antes de la prueba, la muestra se caliente a 56°C durante 30 minutos y se centrifugue a temperatura ambiente por un mínimo de 1700 g durante por lo menos 5 minutos. <sup>BC</sup>

### Recomendación 3.2.37:

Para la cuantificación de inhibidores anti-FVIII, la FMH recomienda que se utilice el ensayo Nijmegen-Bethesda.

• OBSERVACIÓN: Los ensayos Bethesda detectan anticuerpos neutralizantes. Una pequeña proporción de los anticuerpos anti-FVIII no son neutralizantes, acortan la vida media del FVIII infundido, y no se detectan con los ensayos Bethesda.

• OBSERVACIÓN: La modificación Nijmegen describe un método específico para tamponar lotes de plasma normal; otros métodos de tamponado podrían ser adecuados. <sup>BC</sup>

### Recomendación 3.2.38:

Para la cuantificación de inhibidores del FVIII y del FIX, la FMH recomienda que solamente se utilice la actividad del FVIII/FIX residual entre 25% y 75% del FVIII/FIX en la mezcla de control para calcular las concentraciones del inhibidor.

• OBSERVACIÓN: los resultados más precisos de inhibidores se obtienen cuando la actividad de FVIII/FIX residual es cercana al 50% del nivel en la mezcla de control. <sup>BC</sup>

### Recomendación 3.2.39:

Para la cuantificación de inhibidores anti-FVIII de título bajo (<2 UB/mL), la FMH recomienda el uso de un ensayo cromogénico Nijmegen-Bethesda de FVIII para medir la actividad del FVIII residual.

• OBSERVACIÓN: El uso de un ensayo cromogénico Nijmegen-Bethesda de FVIII en lugar de un ensayo de una etapa de FVIII ofrece mayor especificidad y reduce una posible variabilidad en la medición del FVIII residual, lo cual lleva a una subestimación, hasta el grado de que se reporte un inhibidor positivo falso, cuando no hay inhibidor presente. <sup>BC</sup>

### Recomendación 3.2.40:

• Para la cuantificación de la actividad del FVIII en receptores de transferencias genéticas, la FMH considera que es necesaria mayor investigación a fin de determinar la exactitud relativa de los ensayos cromogénicos y de una etapa para pronosticar la protección hemostática.

• OBSERVACIÓN: El ensayo de una etapa parece producir consistentemente resultados de la actividad del FVIII que son aproximadamente 1.6 veces mayores que los obtenidos con el ensayo cromogénico para múltiples productos de transferencia genética de FVIII. Podría ser necesaria la correlación con la actividad específica de FVIII tanto derivados de plasma como recombinantes y con la respuesta clínica para la determinación exacta de la actividad del FVIII en los receptores. <sup>BC</sup>

## Capítulo 3 DIAGNÓSTICO Y MONITOREO DE LABORATORIO

### Recomendación 3.2.41:

Para la cuantificación de la actividad del FIX en receptores de transferencias genéticas, la FMH considera que es necesaria mayor investigación a fin de determinar la exactitud relativa de los ensayos cromogénicos y de una etapa para pronosticar la protección hemostática.

- OBSERVACIÓN: El FIX Padua (R338L) se ha utilizado para la terapia génica porque tiene una actividad específica más alta que el FIX nativo. El ensayo de una etapa parece producir consistentemente resultados de la actividad del FIX Padua que son aproximadamente 1.6 veces mayores que los obtenidos con el ensayo cromogénico. Es necesaria la correlación con la actividad específica de FIX tanto derivados de plasma como recombinantes para la determinación exacta de la actividad del FIX Padua en los receptores. <sup>BC</sup>

### 3.3 | Uso del equipo y los reactivos correctos

#### Recomendación 3.4.1:

La FMH recomienda enfáticamente que los laboratorios de coagulación implementen programas de aseguramiento de la calidad para todos los sistemas de laboratorio a fin de garantizar la observancia de la calidad, y la confiabilidad de los procedimientos y los reportes de pruebas de laboratorio hematológicas para el diagnóstico y el tratamiento de la hemofilia. <sup>BC</sup>

#### Recomendación 3.4.2:

Para pruebas de detección de la hemostasia, la FMH recomienda realizar controles internos de calidad con por lo menos dos niveles de muestras de control interno de la calidad (muestras de plasma normales y anormales) para todos los lotes de prueba, por lo menos diariamente. <sup>BC</sup>

#### Recomendación 3.4.3:

La FMH recomienda enfáticamente que los laboratorios clínicos participen de manera continua en la valoración externa de la calidad de cada uno de los ensayos utilizados para el diagnóstico y tratamiento de la hemofilia.

- OBSERVACIÓN: La participación en el Esquema Internacional de Valoración Externa de la calidad (IEQAS) de la FMH permite a los laboratorios mejorar y estandarizar las pruebas de laboratorio para la hemofilia. <sup>BC</sup>