

Diagnóstico de hemofilia y otros trastornos hemorrágicos: Un manual de laboratorio

Tercera edición

Editado por

Silmara de Lima Montalvao, PharmD, MSc, PhD

JEFE DE LABORATORIO DE DIAGNÓSTICO E INVESTIGACIÓN EN HEMOSTASIA, Director Científico, Sistema Nacional de Evaluación Externa de la Calidad de la Coagulación Sanguínea (PAEQ-Hemostasia), Centro de Sangre, Universidad de Campinas-UNICAMP, São Paulo, Brasil

Steve Kitchen, PhD

CIENTÍFICO CLÍNICO, Centro de Hemofilia y Trombosis de Sheffield, Hospital Royal Hallamshire, Sheffield; y Director Científico del Plan Nacional de Evaluación Externa de la Calidad (NAECS) para la Coagulación Sanguínea del Reino Unido, Director Científico de la OMS y de la Evaluación Internacional de la Calidad Externa de la FMH

Publicado por la Federación Mundial de Hemofilia (FMH)

© Federación Mundial de Hemofilia, 2025

La FMH fomenta la redistribución de sus publicaciones con fines educativos por parte de organizaciones sin fines de lucro dedicadas a la hemofilia. Para obtener permiso para reproducir o traducir este documento, comuníquese con el Departamento de Ayuda Humanitaria y Capacitación Médica a la siguiente dirección: wfh@wfh.org

Esta publicación está disponible en el sitio web de la Federación Mundial de Hemofilia: www.wfh.org. También se pueden solicitar copias adicionales a la FMH en:

World Federation of Hemophilia
1184 rue Sainte-Catherine Ouest
Bureau 500 Montréal, Québec H3B 1K1 Canada
Tel.: (514) 875-7944
Correo-e: wfh@wfh.org

www.wfh.org

Tabla de contenidos

PARTE 1	Planificación general de la calidad en el laboratorio de hemostasia, <i>Pierre Toulon</i>	3
PARTE 2	Validación de la prueba de hemostasia, intervalos de referencia y rendimiento, <i>Silmara Montalvão</i>	15
PARTE 3	Integridad de la muestra y variables preanalíticas, <i>Kieron Hickey</i>	23
PARTE 4	Investigación de laboratorio utilizando solo pruebas manuales, <i>Steve Kitchen</i>	27
PARTE 5	Evaluación inicial de la hemostasia, <i>Anastasia Khasiani</i>	34
PARTE 6	Investigación de la hemofilia en el laboratorio, <i>Annette Bowyer</i>	49
PARTE 7	Detección y cuantificación de inhibidores funcionales congénitos y adquiridos en la hemostasia, <i>Silmara Montalvão</i>	68
PARTE 8	Investigación de laboratorio de la enfermedad de von Willebrand, <i>Tulasi Geevar, Nitty S. Mathews and Annette Bowyer</i>	76
PARTE 9	Investigación de laboratorio de otros factores de coagulación, <i>Annette Bowyer</i>	114
PARTE 10	Plaqueta, <i>Tulasi Geevar</i>	122
PARTE 11	Investigación de laboratorio del síndrome de anticuerpos antifosfolípidos (SAF), <i>Silmara Montalvão</i>	141
PARTE 12	Investigación de laboratorio de la fibrinólisis, <i>Silmara Montalvão</i>	146
PARTE 13	Parámetros de coagulación en poblaciones pediátricas, <i>Pierre Toulon</i>	149
PARTE 14	Análisis Genético Molecular, <i>Carlos De Brasi & Megan Sutherland</i>	153
PARTE 15	Solución de problemas con las pruebas de laboratorio de coagulación, <i>Steve Kitchen</i>	163

Colaboradores

Anastasia Khasiani, Clinisys Associates Ltd., Atlanta, Georgia, EE. UU.

Annette Bowyer, Departamento de Coagulación, Fundación de Hospitales Docentes de Sheffield (Sheffield Teaching Hospitals NHS Foundation Trust), Sheffield, Reino Unido

Carlos De Brasi, Instituto de Medicina Experimental (IMEX), CONICET-Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires, Argentina

Kieron Hickey, Thrombosis Lead Scientist, Sheffield Haemophilia and Thrombosis Centre, UK

Megan Sutherland, Centro del Laboratorio Genómico del Noroeste, Fundación NHS de la Universidad de Manchester, Manchester, Reino Unido

Nitty Mathews, Colegio Médico Cristiano, Vellore, India

Pierre Toulon, Centro Hospitalario Universitario de Niza, Universidad de Niza-Costa Azul, Francia

Tulasi Geevar, Colegio Médico Cristiano, Vellore, India

TEMAS TRATADOS

- ✓ Control de sustancias potencialmente peligrosas para la salud
 - ✓ Seguridad en el laboratorio
 - ✓ Oficiales de seguridad
 - ✓ Manual de seguridad
 - ✓ Medidas de seguridad-precauciones universales
 - ✓ Equipos generales de laboratorio
 - ✓ Metrología
 - ✓ Evaluación y uso de coagulómetros
 - ✓ Reactivos
-

Control de sustancias potencialmente peligrosas para la salud: La norma EN ISO 15189 especifica los requisitos de calidad y competencia específicos de los laboratorios de análisis de biología médica. La norma ISO 15189 está pensada para ser utilizada en todas las disciplinas practicadas por los laboratorios médicos. Por lo tanto, su aplicación es fundamental para los laboratorios, ya que sus servicios deben satisfacer las necesidades tanto de los pacientes como de los clínicos responsables de la atención prestada a sus pacientes. Esos servicios incluyen los requisitos de procesamiento, la preparación e identificación de pacientes, y la recolección, transporte, almacenamiento, preprocesamiento y análisis de muestras, seguidos de la validación de los resultados, su interpretación, informes y asesoramiento, al tiempo que garantizan la seguridad del personal y el respeto por la ética.

Seguridad del laboratorio: Los laboratorios que manejan productos químicos y muestras biológicas son lugares potencialmente peligrosos. En los últimos años, se ha apreciado cada vez más la importancia de las prácticas de trabajo seguras en la industria, tanto por razones sanitarias como medioambientales. Esta concienciación ha llevado a un mayor énfasis en temas como la documentación de seguridad, la formación del personal y la evaluación de riesgos. Los empleadores tienen la responsabilidad de proporcionar la ropa y el equipo de protección necesarios, y están obligados a ofrecer capacitación sobre prácticas de trabajo seguras. La implementación de tales prácticas de trabajo seguro debería reducir en gran medida la probabilidad de lesiones graves para usted, sus colegas y miembros del público.

Oficiales de seguridad: Es importante nombrar un oficial u oficiales de seguridad para cada departamento. Estas personas asumirán las responsabilidades de introducir y mantener los procedimientos de seguridad. Sin embargo, la seguridad es responsabilidad de todo el personal del laboratorio.

Manual de seguridad: Debe haber un manual de seguridad integral que cubra todos los aspectos de las prácticas de trabajo seguras para todo el departamento. Todos los miembros del personal deben leer el manual y firmar una declaración para indicar que lo han comprendido. Las copias deben conservarse con los oficiales de seguridad y también estar disponibles en lugares que sean de fácil acceso para todos los miembros del personal, ya sea en forma impresa o, preferiblemente, en formato electrónico, para garantizar que la última versión esté disponible.

Medidas de seguridad-precauciones universales: El sistema de precauciones universales requiere que cualquier peligro de infección de cualquier fuente sea evitado o minimizado por buenas prácticas de trabajo. Se debe considerar que todas las muestras de sangre, los hemoderivados (incluidos los reactivos y kits a base de plasma) y otros materiales del cuerpo humano presentan un posible peligro de infección. Siempre se deben tomar las medidas de protección más completas posibles cuando se trabaja con cualquier material. No se debe hacer ninguna otra clasificación de riesgo. Todos los fluidos corporales

y materiales que no sean sangre, ya sea que se recojan o se introduzcan en la unidad para su análisis o cualquier otro propósito, deben manipularse con el mismo cuidado que se le da a la sangre.

El laboratorio: El laboratorio debe estar siempre limpio y ordenado. La documentación debe mantenerse separada de las áreas de pruebas de laboratorio. Trate de no usar el laboratorio para almacenar artículos a granel. Trate de asegurarse de que todos participen en mantener el laboratorio ordenado.

Vestimenta protectora: Todas las personas que ingresan al laboratorio, incluidos los visitantes, deben usar una bata de laboratorio. Deben reemplazar inmediatamente la bata si se contamina.

Guantes desechables: Aunque a muchas personas no les gusta usar guantes, se recomienda usar guantes desechables de látex o poliacrilamida, ya que cada muestra manipulada en el laboratorio es potencialmente peligrosa. Siempre se deben usar guantes cuando se manipula cualquier material tóxico. Obviamente, los guantes y las batas no protegerán contra un accidente por pinchazo con una aguja, pero evitarán, por ejemplo, que cualquier corte o abrasión en la piel entre en contacto con el suero o plasma VIH positivos. Es obligatorio reemplazar siempre los guantes de inmediato si están rotos o pinchados.

Lavado de ojos: Lávese los ojos inmediatamente con abundante agua corriente fría si pudo haberse producido contacto con un posible material infeccioso, ya que muchas infecciones pueden adquirirse fácilmente por contacto con las membranas mucosas de los ojos.

Objetos punzantes: Los objetos punzantes, en forma de agujas y cristales rotos, representan un gran peligro. Utilice un contenedor de seguridad capaz de contener objetos punzocortantes sin ser perforado. Ha habido casos de trabajadores que se han infectado como resultado de lesiones por pinchazos con agujas.

Aerosoles: Evite todas las prácticas en el laboratorio abierto que puedan causar salpicaduras o la diseminación por el aire de gotitas o polvo. Las operaciones que provoquen aerosoles deben realizarse siempre en una campana de gases adecuada, y se deben usar gafas de seguridad. Todos los derrames deben limpiarse de inmediato, usando lejía o un agente neutralizante según sea necesario.

Sustancias tóxicas e inflamables: Los materiales tóxicos o inflamables deben estar siempre contenidos dentro de una campana de gases o una caja fuerte adecuada.

Equipo eléctrico: Tenga especial cuidado con cualquier equipo que utilice líquidos, como tanques de electroforesis y baños de agua. Deje siempre la instalación, el servicio y las reparaciones a personal calificado.

Artículos personales y comportamiento: Nunca lleve artículos personales, como bolígrafos, bolsos y peines, al laboratorio. Evite que sus manos entren en contacto con su cara o mucosas (ojos, nariz y boca) mientras esté en el laboratorio, pero si debe hacerlo, lávese siempre las manos primero. Lávese siempre bien las manos antes de salir del laboratorio. Nunca se lleve una pipeta a la boca. Los alimentos, los cigarrillos y los cosméticos nunca deben introducirse en el laboratorio. Esto implica que se debe evitar comer, beber y fumar en el laboratorio.

Accidentes: Todos los accidentes deben ser reportados inmediatamente y deben ser registrados en una bitácora de accidentes llevada por el Oficial de Seguridad de la unidad. Esto es particularmente importante en relación con las lesiones por pinchazos con agujas. En estas situaciones, siga los sistemas que usan los hospitales locales para registrar e reportar, junto con cualquier acción recomendada u obligatoria localmente.

Control de Sustancias Potencialmente Peligrosas para la Salud: Los laboratorios deben cumplir con la regulación local, que a menudo emite una guía útil para identificar riesgos y peligros, como el Control de Sustancias Peligrosas para la Salud (COSHH) en los laboratorios del Reino Unido.

Peligro y riesgo: El peligro que presenta una sustancia es su potencial para causar daño. El riesgo de esa sustancia es la probabilidad de que dañe a alguien en las condiciones reales de uso.

Identificación de peligros: La identificación de peligros es un requisito previo esencial de la evaluación de riesgos. El tiempo dedicado a identificar los peligros variará según la sustancia.

Evaluación de riesgos: Considere los siguientes hechos:

- Peligros
- Condiciones de uso
- Cantidades a utilizar
- Rutas o sitios probables de exposición (inhalación, ingestión, piel u ojos)

El resultado de la evaluación de riesgos determinará:

- Condiciones de almacenamiento
- Procedimientos de manipulación
- Procedimientos de disposición
- Requisitos de seguimiento y vigilancia de la salud
- Procedimientos de emergencia

La evaluación de riesgos debe revisarse anualmente y actualizarse si es necesario. En la Tabla 1 se muestra un ejemplo de cómo registrar información para las evaluaciones de riesgos, utilizando el procedimiento COSHH que se usa en los laboratorios del Reino Unido. El propósito de dichos formularios es identificar los peligros y las medidas de control asociadas con el equipo utilizado en un procedimiento en particular. Solo el personal registrado como competente debe realizar cualquier procedimiento, y deben realizar ese procedimiento solo después de revisar la documentación de salud y seguridad relacionada con esa prueba en particular.

Tabla 1. Control de sustancias potencialmente peligrosas para la salud (COSHH) para el tiempo de protrombina y los ensayos de factor de coagulación (F) basados en TTPA

Ensayos COSHH No Ref.. 1		Referencia de laboratorio para ensayos de coagulación de una etapa para FII, FV, FVII, FVIII, FIX, FX, FXI y FXII
Título del Procedimiento/Experimento:		
Sustancia	Cantidad aproximada	Peligro identificado
Solución amortiguadora de glioxalina (imidazol), contiene (ver**)	<5 ml	Nocivo si se ingiere.
**Imidazol	3.4 g/l	Corrosivo: provoca quemaduras. Dañino si se inhala, ingiere o absorbe a través de la piel. Irritante para los ojos.
**Cloruro de sodio	5.85 g/l	Irritante para los ojos y los pulmones. Evite el contacto con la piel.
Plasma con deficiencia de factor	1 ml	Riesgo de infección
Tromboplastina	2 ml	Riesgo bajo
Reactivo TTPA	2 ml	Riesgo bajo
Cloruro de calcio 0.025M	5 ml	Riesgo bajo
Solución amortiguadora de Owren	<500 ml	Contiene barbitona. Nocivo si se ingiere. Puede causar sensibilización por contacto con la piel o inhalación.

Solución de lavado del analizador de coagulación 1	<50 ml	Provoca quemaduras: perjudiciales para los ojos, la piel, etc. No mezclar con otros desinfectantes. Corrosivo. El contacto con materiales combustibles puede provocar un incendio. El contacto con el ácido libera gases tóxicos. Reacciona violentamente con las sales de amonio; Disolvente orgánico - Riesgo de explosión.
Solución de lavado del analizador de coagulación 2	<50 ml	Contiene 0,16% de ácido clorhídrico y detergente. Irritante: puede dañar los ojos y la piel.
Estándar/control/ plasma del paciente	<1000 μ l	Riesgo de infección.

Equipo general de laboratorio: Cualquier laboratorio involucrado en el diagnóstico y seguimiento del tratamiento de los trastornos hemorrágicos que emplee algunas o todas las técnicas descritas en este manual requerirá un mínimo de equipo básico.

Equipo general: Los requisitos básicos del equipo son:

- 1) Refrigerador a 4°C para almacenamiento de reactivos. Normalmente, los reactivos deben mantenerse a 2-8 °C, a menos que el fabricante indique lo contrario. Una unidad de grado doméstico de buena calidad puede ser adecuada.
- 2) Un arcón congelador capaz de mantener al menos -20 °C (preferiblemente -35 °C). Una temperatura más baja, como -70 °C, es útil para un almacenamiento más prolongado, ya que los factores de coagulación son estables a esta temperatura durante al menos 6 meses. Los congeladores con un ciclo de descongelación automática son completamente inadecuados.
- 3) Baño(s) de agua regulado(s) capaces de mantener temperaturas de 37 \pm 0,5 °C. Normalmente, la temperatura se mantiene mejor en un baño maría que en bloques térmicos secos, que pueden o no ser adecuados, dependiendo de la unidad.
- 4) Un medidor de pH.
- 5) Una fuente de luz.
- 6) Cronómetro(s).
- 7) Pipetas automáticas calibradas capaces de suministrar con exactitud y precisión el volumen de muestra y reactivo en el rango de 0 μ l-200 μ l y hasta 1000 μ l. Es importante comprobar la precisión de estas pipetas con regularidad.
- 8) Una pipeta calibrada para la administración de volúmenes de líquido de hasta 5 ml.
- 9) Una centrífuga capaz de generar al menos 1700 g, y preferiblemente de 2200 a 2500 g. Para la mayoría de los análisis de coagulación, la centrifugación a temperatura ambiente (20-25 °C) es aceptable, aunque se recomienda la centrifugación a 4 °C en algunas técnicas.
- 10) Una báscula/balanza analítica calibrada capaz de medir con precisión gramos con tres decimales.

Se requiere equipo adicional para algunos procedimientos, que incluyen:

- 11) Un analizador de coagulación (coagulómetro).
- 12) Un lector de microplacas para ensayos de inmunoadsorción enzimática (ELISA).
- 13) Un agregador de plaquetas. Equipo especificado en hojas de método particulares.

El aire acondicionado en cada habitación es una gran ventaja en países donde las temperaturas son altas.

Debe haber un suministro adecuado de consumibles. Debe evitarse la reutilización de tubos de ensayo de laboratorio y puntas de pipeta después del lavado, ya que el material residual puede afectar los resultados negativamente, causando desperdicio de reactivos y tiempo. Lo mismo aplica a los tubos de recolección, que están diseñados para un solo uso y no deben reutilizarse incluso después de un lavado prolongado.

Metrología: Para ayudar a la gestión de la calidad, las calibraciones del volumen y la balanza de la pipeta deben comprobarse de forma regular, por ejemplo, cada 3-6 meses. Los aparatos que estén significativamente descalibrados deben retirarse inmediatamente de su uso hasta que se haya realizado la recalibración. Todas las pipetas deben llevar un identificador único.

Método para comprobar la calibración de la pipeta: Las pipetas pueden ser para un solo volumen, para dos o tres volúmenes, o tener un rango continuo de volúmenes.

- Las pipetas con uno o dos ajustes fijos se comprueban en cada ajuste.
- Las pipetas con tres ajustes fijos se comprueban en el ajuste mínimo y máximo.
- Pipetas con un rango continuo de ajustes de volumen: compruebe el ajuste máximo, así como un volumen de alrededor del 25% del ajuste máximo. Es decir:
 - Pipeta de 10 ml – 10 ml y 2,5 ml
 - Pipeta de 5 ml – 5 ml y 1,25 ml
 - Pipeta de 1 ml – 1 ml (1000 µl) y 0,25 ml (250 µl)
 - Pipeta de 0,2 ml – 0,2 ml (200 µl) y 0,05 ml (50 µl)
 - Pipeta de 0,1 ml – 0,1 ml (100 µl) y 0,025 ml (25 µl)
 - Pipeta de 50 l – 50 l y 15 µl

Verifique la calibración pesando cinco volúmenes repetidos de agua destilada (a temperatura ambiente) en una balanza. Cada peso se registra en gramos (con tres decimales). A efectos prácticos, 1.000 ml de agua destilada pesa 1.000 g.

Se deben registrar los resultados y las medidas adoptadas. Es preferible que las pipetas tengan una precisión significativamente inferior al 10% (consulte los ejemplos a continuación). Cuando se demuestre que una pipeta es inexacta porque el volumen medio pipeteado difiere en más de un 10% del volumen indicado, debe retirarse de uso inmediatamente y no utilizarse hasta que se vuelva a calibrar siguiendo las instrucciones del fabricante.

Nota: Si una pipeta es imprecisa más allá de los siguientes límites (peso medio), debe retirarse de uso inmediatamente.

Pipeta de 10 ml

10 ml: 9.000 – 11.000 g
2.5 ml: 2.250 – 2.750 g

Pipeta de 5 ml

5 ml: 4.500 – 5.500 g
1.25 ml: 1.125 – 1.375 g

Pipeta de 1 ml

1 ml: 0.900 – 1.100 g
0.25 ml: 0.225 – 0.275 g

Pipeta de 0,2 ml

0.2 ml: 0.180 – 0.220 g
0.05 ml: 0.045 – 0.055 g

Pipeta de 0,1 ml

0.1 ml: 0.090 – 0.110 g
0.025 ml: 0.0225 – 0.0275 g

Pipeta de 50 µl

50 µl: 0.045 – 0.055 g
15 µl: 0.013 – 0.0165 g

Para obtener información adicional, consulte el documento ISO 8655-2-2002, disponible en diferentes idiomas.

Método de control de las balanzas: Para garantizar su exactitud, las pesas calibradas se pesan a intervalos de seis meses y se registran los valores.

- 1) Poner la balanza a cero.
- 2) Pesar tres pesas calibradas, uno a la vez. Registre los pesos con tres decimales (por ejemplo, 1,003 g).
- 3) Si alguna pesa está fuera de los límites establecidos (en >2%), retírela de uso hasta que se solucione el problema.

Método para comprobar la temperatura de las cámaras frigoríficas: La temperatura interna de los frigoríficos debe mantenerse a +4 °C (normalmente en el rango de +2 °C a +7 °C) mediante una sonda de temperatura, e idealmente debe registrarse constantemente, ya sea utilizando un disco impreso local o electrónicamente. Lo mismo se aplica a los congeladores, que deben mantenerse a temperaturas de -20 °C, -35 °C o incluso inferiores a -70 °C.

Evaluación y uso de coagulómetros: La automatización en los laboratorios de coagulación es ahora de uso generalizado en la mayor parte del mundo. Ha contribuido a mejorar la normalización y a facilitar la realización de pruebas que exigen una formación específica y unas condiciones de trabajo especiales, para que los laboratorios puedan mejorar su eficiencia y su repertorio. La automatización en hemostasia es relativamente reciente. Los métodos manuales basados en la detección visual del coágulo de fibrina y el uso de incubadoras a 37 °C fueron en el pasado las únicas técnicas para los estudios de coagulación. Luego, en la década de 1970, aparecieron nuevos equipos semiautomáticos basados en principios fotométricos o mecánicos para detectar coágulos de fibrina. Más recientemente, los instrumentos totalmente automatizados se han vuelto comunes en los laboratorios modernos. Los nuevos equipos conectados a los sistemas de información de laboratorio, que suelen incluir sistemas específicos de procesamiento de datos, pueden realizar pruebas de coagulación, cromogénicas e inmunológicas.

En la actualidad existen dos metodologías principales, que se basan en sistemas de detección mecánicos y ópticos. Los sistemas mecánicos solo permiten realizar ensayos de coagulación, mientras que los sistemas ópticos permiten realizar ensayos cronométricos, cromogénicos e inmunológicos basados en principios fotoópticos, nefelométricos, cromogénicos e inmunológicos. Además, se están haciendo cada vez más disponibles en el mercado los analizadores basados en fluorescencia y quimioluminiscencia, lo que permite realizar ensayos específicos con una amplia gama de mediciones.

Principio mecánico: Los métodos electromagnéticos se basan en la detección de un aumento de la viscosidad del plasma cuando se forma la fibrina. Dos variaciones de este principio se aplican a los equipos de laboratorio que existen en la actualidad.

El primero utiliza un campo electromagnético aplicado a las cubetas de prueba que detectan el movimiento dentro de una esfera de acero inoxidable colocada en la muestra de plasma. La esfera de acero sigue un movimiento de péndulo, oscilando de un lado al otro en una solución de reactivo de plasma con un movimiento constante. A medida que la fibrina comienza a formarse, la viscosidad aumenta y el movimiento de la esfera se ralentiza. Cuando el movimiento de oscilación de la esfera alcanza un nivel predeterminado, el cronómetro se detiene, indicando el tiempo de coagulación del plasma.

Un segundo método de detección mecánica también utiliza una esfera de acero inoxidable, ubicada esta vez en una ranura de un solo punto. Un sensor magnético detecta la posición de la esfera y, a medida que gira, la esfera mantiene su inclinación mientras que la muestra líquida permanece fluida. Cuando se forma la fibrina, el coágulo atrapa la esfera, moviéndola de su posición original. A medida que se mueve fuera del alcance del sensor, el circuito se interrumpe y el cronómetro se detiene.

Principios ópticos o espectrofotométricos:

Principio fotoóptico: Los sistemas ópticos se basan en el concepto de que la formación de coágulos induce un cambio en la densidad óptica del plasma. A medida que se forma el coágulo, se producen cambios en las características ópticas desde la lectura inicial del plasma/reactivos. Estos cambios se supervisan y se utilizan para derivar el tiempo necesario para que se produzca un grado determinado de cambio.

Principio nefelométrico: El principio nefelométrico es empleado por algunos sistemas. En los ensayos de coagulación, una fuente de luz láser monocromática es transmitida, por ejemplo, por una fibra óptica. Las lecturas de dispersión de la luz son posibles gracias a un sensor que puede instalarse a 90 o 180 grados de la trayectoria de la luz, dependiendo del sistema, que luego mide la luz dispersa en un ángulo o registra el

cambio en la transmisión de la luz. Cuando la luz alcanza complejos insolubles como las fibras de fibrina, se esparce en ángulos dispersos hacia adelante (180 grados) y ángulos dispersos laterales (90 grados). El cronómetro se detiene cuando la cantidad de luz dispersa o transmitida alcanza un nivel predeterminado específico. La diferencia entre la luz dispersada o transmitida antes y después de la formación del coágulo es normalmente proporcional a la cantidad de fibrina formada.

Principio cromogénico: Se basa en el uso de una sustancia generadora específica del color conocida como cromóforo, de la cual la para-nitroanilina (pNA) es la más común. Tiene una absorbancia máxima de 405 nm. El principio de las pruebas cromogénicas reside en la adherencia del pNA a los sustratos sintéticos. El pNA se une a una serie de aminoácidos que imitan la secuencia diana del factor de coagulación activado que queremos determinar. La proteína de coagulación escinde el sustrato cromogénico en un sitio específico entre una secuencia de aminoácidos definida y libera el pNA. La intensidad del color amarillo es proporcional a la cantidad de pNA liberada. Esto se mide mediante fotodetección a una longitud de onda de 405 nm. A medida que se escinde y libera más pNA, la capacidad de absorción de la muestra aumenta, lo que conduce a un mayor cambio en la densidad óptica de la solución. Los primeros equipos de coagulación solamente tenían un único parámetro de definición, tal como uno mecánico o fotoóptico. Las herramientas fotoópticas se diseñaron inicialmente para leer a una sola longitud de onda (por ejemplo, 500 nm o 600 nm) que solo podía usarse para la detección de la formación de coágulos. Más recientemente, algunos coagulómetros pueden leer a dos o más longitudes de onda, que a menudo incluye 405 nm, aumentando así la capacidad para nuevas reacciones (métodos de sustrato cromogénico). En la década de 1990, varios fabricantes incluyeron con éxito múltiples métodos de cribado que ahora le permite a un solo laboratorio la posibilidad de utilizar el mismo equipo para diferentes metodologías.

Principio inmunológico: Las micropartículas de látex recubiertas con un anticuerpo específico se utilizan generalmente contra el analito (antígeno) que se está midiendo. Un haz de luz monocromática atraviesa una suspensión de micropartículas de látex. Cuando la longitud de onda es mayor que el diámetro de la partícula en suspensión, las partículas absorben una pequeña cantidad de luz. Sin embargo, cuando las micropartículas de látex recubiertas de antígeno específicas entran en contacto con el antígeno presente en la solución, se adhieren al anticuerpo, formando enlaces entre las partículas, lo que produce aglutinación. Cuando el diámetro de las partículas se acerca a la longitud de onda del haz de luz monocromático, se absorbe una mayor cantidad de luz. Este aumento de la absorbancia de luz es proporcional a la aglutinación, que, a su vez, es proporcional a la cantidad de antígeno presente en la muestra. Este tipo de tecnología está disponible en los analizadores de coagulación más sofisticados introducidos en el mercado en la década de 1990. Por lo general, los ensayos inmunológicos estándar que requieren mucho tiempo se pueden realizar en minutos cuando se utiliza cualquiera de estas herramientas automatizadas.

Tabla 2. Ventajas y desventajas de los métodos de detección en la definición de parámetros

Método	Ventajas	Desventajas
Mecánico	Sin interferencias debidas a características físicas como lipemia o ictericia. Puede utilizar volúmenes de muestra pequeños	Gráficos imposibles de observar de la formación de coágulos. Puede presentar problemas de detección de puntos finales en algunas muestras con fibrinógeno bajo
Foto-óptico	Posibilidad de gráficos sobre la formación de coágulos Comprobaciones ópticas de hemólisis/lipemia/ictericia en algunos sistemas ópticos Puede utilizar pequeños volúmenes de muestra	Interferencia debida a lipemia, hemólisis, hiperbilirrubinemia o aumento de proteínas en algunos sistemas Algunos sistemas pueden presentar dificultades con la detección de coágulos cuando se utilizan algunos reactivos completamente transparentes Los períodos de coagulación muy cortos pueden pasar desapercibidos debido a la demora antes del inicio de la monitorización
Nefelométrico	Puede medir las reacciones antígeno-anticuerpo en proteínas presentes en cantidades muy pequeñas	Limita el número de pruebas disponibles Costo de los reactivos
Cromogénico	Los ensayos completamente específicos pueden ser más sencillos. Es posible que existan parámetros adicionales que no sean adecuados para la medición mediante la detección de coágulos Aumenta el repertorio de posibles pruebas. Posibles mejoras en la precisión en comparación con los análisis basados en coágulos	Limitado por la longitud de onda del instrumento. Requiere grandes volúmenes de prueba para una relación costo-beneficio positiva. Costo de los instrumentos y reactivos.
Inmunológico	Puede automatizar métodos manuales que consumen mucho tiempo Aumenta el número de pruebas posibles	Número limitado de pruebas disponibles. Costo de los instrumentos. Costo de los reactivos.

Ventajas de la automatización en el laboratorio de coagulación:

- 1) Mejora la capacidad y flexibilidad del tiempo profesional empleado (Kodak, 1995).
- 2) Mejora el rendimiento de las pruebas. En el pasado, las pruebas de coagulación manual eran inexactas, con coeficientes de variación superiores al 20%; El equipo semiautomático proporcionó una mayor precisión en las pruebas de coagulación. Sin embargo, con el envío manual de muestras y reactivos, las pruebas debían realizarse por duplicado. Con equipos totalmente automatizados, la precisión mejoró, alcanzando coeficientes de variación de menos del 5 % e incluso del 1 % para algunas pruebas. Esto ha llevado a los autores a introducir la noción de pruebas únicas y la posibilidad de reducir a la mitad los costes de reactivos y cubetas.
- 3) Reduce el costo en muestras y reactivos, al permitir el uso de volúmenes más bajos de plasma y reactivos (al menos la mitad).
- 4) Facilita el almacenamiento y los sistemas de recuperación de datos mediante programas informáticos.
- 5) Permite la reproducción automática de los resultados cuando se cometen errores en la primera corrida.
- 6) Ofrece la posibilidad de realizar diferentes pruebas utilizando una sola muestra.
- 7) Permite la toma de muestras de un tubo cerrado (el llamado "cap-piercing" o perforación de la tapa), lo que mejora la seguridad y la eficiencia en las pruebas de coagulación. Esto reduce,

- en gran medida, la posibilidad de exponer al operador a aerosoles o derrames de muestras de pacientes, o errores en el etiquetado. Como anécdota, un fabricante ofreció un sistema de cribado patentado que separa automáticamente el plasma de los eritrocitos antes de las pruebas sin centrifugación previa.
- 8) Provee la capacidad para diluir muestras, calibradores y controles. El equipo puede programarse para diluciones adicionales si los resultados iniciales escapan a la linealidad del método. También puede realizar automáticamente otras pruebas sin la intervención del operador si está clínicamente indicado o debido a los resultados de la corrida inicial.
 - 9) La mayoría de los analizadores incluyen sistemas de alarma que advierten al operador de lecturas que superan los límites preestablecidos, lo que puede identificar problemas del equipo (por ejemplo, pequeña cantidad de reactivo, fallo de temperatura, volumen de muestra demasiado pequeño y errores de control de calidad), así como errores preanalíticos (tubos con llenado insuficiente, hemólisis, ictericia, lipemia y presencia de coágulos).

Los diferentes tipos metodológicos disponibles tienen ventajas y desventajas que deben conocerse y entenderse para garantizar la precisión y validez de los resultados de las pruebas. Es importante tener en cuenta que los laboratorios son responsables de obtener resultados confiables. La principal preocupación de un laboratorio es seleccionar el equipo de coagulación que generará resultados apropiados a pesar de las restricciones presupuestarias. Dichos instrumentos exigen un mantenimiento técnico regular, conocimiento permanente y control del sistema, ya que un error o falla puede influir decisivamente en una serie de resultados. Por lo tanto, son obligatorios los sistemas de control que garanticen la confianza analítica.

Muchos laboratorios pueden tener la suerte de poder evaluar el equipo antes de comprarlo. Si esto no es posible, es muy importante obtener información y asesoramiento adecuados de un laboratorio de referencia, además de la revisión de la literatura.

Al evaluar un nuevo equipo antes de comprarlo, primero compare los analizadores de acuerdo con criterios como:

- Costos de equipo y mantenimiento
- Periodo de inactividad y fiabilidad
- Tiempo de respuesta de reparación
- Facilidad de uso
- Disponibilidad de un mantenimiento adecuado en un plazo adecuado
- Proceso de validación y rendimiento
- Costo de los elementos descartables
- Flexibilidad en el uso de reactivos de otros fabricantes
- Posibilidad de añadir nuevos protocolos de pruebas
- Capacidad y costo de la conexión con el sistema de información del laboratorio
- Cursos de formación y apoyo a la formación continua

La sensibilidad de los diferentes tipos de equipos a múltiples parámetros variará según cómo se calibren las máquinas y cómo se detecten los puntos finales. Los laboratorios tienen diferentes necesidades, y es recomendable clasificar las prioridades. Por ejemplo, consulte la Tabla 3.

Tabla 3. Características de los equipos especializados (adaptado de Rodak, 1995)

Características	Descripción
Acceso aleatorio	Con la muestra de los pacientes, son posibles varias pruebas diferentes en cualquier orden y al mismo tiempo.
Tubo primario de muestra	La muestra de plasma se toma directamente por aspiración en un tubo de recolección abierto colocado en el analizador.
Tapón penetrante y tubo de muestreo cerrado	El analizador aspira la muestra de plasma dentro del tubo de recolección con el tapón de goma colocado.
Código de barras	Permite la identificación de reactivos, muestras de pacientes o ambos mediante un código de barras. Esto reduce la entrada manual de datos.
Interfase bidireccional	El analizador consulta a un equipo centralizado para determinar el número solicitado de pruebas. El operador no necesita programar manualmente la información en el equipo.
Indicador de muestra	Advierte al operador de problemas con la integridad de la muestra.
Sensor de nivel de líquido	Advierte al operador de un volumen insuficiente de muestra o reactivo para una prueba adecuada, o si el equipo no aspiró lo suficiente de la muestra para realizar la prueba solicitada.
Programas integrados de control de calidad	El programa informático del instrumento almacena y organiza los datos de control de calidad. Puede incluir la aplicación completa de las reglas de Westgard para indicar los resultados fuera de límite.
Capacidades STAT	Permite al operador cancelar la secuencia de verificación de prueba para colocar una nueva muestra STAT en la isla de verificación.
Capacidad de refrigeración de las muestras integradas	Preserva la integridad de las muestras, el reactivo o ambos durante el proceso de verificación.
Capacidad de almacenamiento de muestras integradas	Indica la cantidad de muestra de paciente que se puede cargar en el analizador en un momento dado.
Capacidad de prueba confirmatorias	Permite programar el equipo para repetir o agregar pruebas bajo parámetros específicos establecidos por el operador para fines confirmatorios.
Almacenamiento de datos de pacientes	Capacidad del analizador para almacenar resultados de pruebas que pueden ser recuperados en cualquier momento. Puede almacenar curvas de formación de coágulos.
Monitorización del volumen de reactivos	Advierte al operador de que el reactivo es insuficiente para las pruebas programadas.
Procesamiento	Número de pruebas que se pueden procesar en un período determinado (generalmente clasificado como número de pruebas por hora).
Curva de formación de coágulos	Permita que el operador visualice la formación de coágulos dentro de la cubeta. Ayuda a detectar ciertas condiciones rebeldes o estados mórbidos, o la ubicación y solución de fallas desviadas en los resultados de las pruebas.
Controles preanalíticos	Detección de tubos con llenado insuficientes, hemólisis, ictericia, lipemia, coágulo.

La tecnología está en auge y las crecientes demandas diarias generan la necesidad de instrumentos de esta naturaleza en el laboratorio. Constituirán un gran avance en el campo del laboratorio, dada la posibilidad de realizar pruebas de manera fiable, exacta y precisa, y entregar resultados más rápidamente (menor tiempo de respuesta) y bajo un mejor control. Las ventajas de la automatización son numerosas. La tecnología avanza continuamente para satisfacer los nuevos desarrollos en el campo y reducir los tiempos de respuesta, lo que permite que las pruebas sean confiables, exactas y precisas, manteniendo la calidad.

Reactivos: Además de los reactivos específicos dedicados a ensayos específicos, que se detallarán en los capítulos correspondientes, algunos reactivos son ampliamente utilizados en el laboratorio de hemostasia

(por ejemplo, solución de cloruro de calcio, varios tampones). Pueden comprarse a los fabricantes de reactivos o prepararse localmente a partir de reactivos a granel o soluciones concentradas.

Solución de cloruro de calcio de 25 mM: Por ejemplo, si se compra una solución molar, para obtener una solución de 25 mM, diluir 25 ml de solución 1 M a 1 litro en un matraz aforado con agua destilada.

Solución amortiguadora:

- **Solución amortiguadora de barbitúricos de Owren pH 7,35**

Peso: 5.875 g de dietilbarbitúrico de sodio (barbitona sódica) y 7.335 g de cloruro de sodio.

Colocar en un matraz aforado y disolver en aproximadamente 780 ml de agua destilada.

Añadir 215 ml de ácido clorhídrico 0,1 M.

Ajuste el volumen a 1 litro con agua destilada.

Verifique el pH y ajústelo a pH 7.35, si es necesario.

- **Solución salina tamponada de Owren**

200 ml de solución amortiguadora antibarbitúricos de Owren (ver arriba).

Añadir 800 ml de solución salina normal (cloruro sódico al 0,9%).

- **Solución amortiguadora de imidazol (glioxalina)**

Pesa 2,72 g de imidazol (glioxalina) y 4,68 g de cloruro de sodio.

Colocar en un matraz aforado y disolver en aproximadamente 650 ml de agua destilada.

Añadir 148,8 ml de HCl 0,1 M y ajustar el pH a 7,3.

Ajuste el volumen a 1 litro con agua destilada, si es necesario.

Reactivos para las pruebas de cribado de la coagulación: En las etapas iniciales de la investigación y el diagnóstico de los trastornos hemorrágicos, la selección y aplicación de los reactivos adecuados para las pruebas de cribado, en particular para las pruebas de tiempo de protrombina (TP) y tiempo de trombo-plastina parcial activada (TTPA), son de gran importancia. Hay muchos reactivos diferentes disponibles en todo el mundo. Cuando se dispone de una amplia variedad, la selección debe tener en cuenta la variación de la sensibilidad. En el cribado de un trastorno hemorrágico mediante TP y TTPA, se pueden tener en cuenta las siguientes fuentes de información en relación con el rendimiento probable de un reactivo en particular:

- Datos comparativos en relación con otros reactivos de esquemas de evaluación externa de la calidad (AEC), como el esquema internacional de AEC
- Datos publicados
- Pruebas locales de plasma de pacientes con defectos conocidos
- Fichas técnicas de los fabricantes

La producción local de reactivos TP y TTPA puede ser atractiva desde el punto de vista financiero, pero puede causar dificultades de estandarización y, por lo tanto, debe evitarse. También hay que tener en cuenta que algunos fabricantes ofrecen diferentes reactivos. Además, la composición de los reactivos que llevan el mismo nombre puede modificarse de vez en cuando. Esto significa que no se pueden dar recomendaciones para el uso de una fuente particular de material.

Referencias

Graves S, Holman B, Rossetti M, Estey C, Felder R. Automatización robótica del análisis de la coagulación. *Clínica Chimica Acta* 1998; 278: 269-279.

Kitchen S, Olson JD, Preston FE (eds). Calidad en hemostasia y trombosis de laboratorio 2ª ed. Oxford, Reino Unido: Wiley Blackwell, 2013.

Lippi G, Plebani M, Favaloro EJ. Avances tecnológicos en el laboratorio de hemostasia. *Semin Thromb Hemost* 2014; 40: 178-185.

Qari MH. Revisión de analizadores de coagulación de alto rendimiento. *Criba de alto rendimiento Comb Chem* 2005; 8: 353-360.

Kodak BF (ed). Hematología diagnóstica. Filadelfia: WB Saunders, 1995.

Sasaki M, Kageoka T, Ogura K, Kataoka H, Ueta T, Sugihara S. Automatización total de laboratorio en Japón: pasado, presente y futuro. *Clínica Chimica Acta* 1998; 278: 217-227.

Walenga JM, Fareed J. Automatización y control de calidad en el laboratorio de coagulación. *Clin Lab Med* 1994; 14: 709-728.

Woodhams B, Girardot O, Blanco MJ, Go I esse G, Gourmelin Y. Estabilidad de las proteínas de coagulación en plasma congelado. *Fibrinólisis de coágulos sanguíneos* 2001; 12: 229-236.

TEMAS TRATADOS

- ✓ Método para la Preparación de PNP
- ✓ Cómo validar equipos y pruebas de coagulación
- ✓ Muestras para equipos/Procesos de validación de reactivos
- ✓ Validación o verificación
- ✓ Precisión y exactitud
- ✓ Establecimiento de un intervalo de referencia
- ✓ Validación frente a verificación del intervalo de referencia
- ✓ Análisis estadístico del intervalo de referencia
- ✓ Control de Calidad Interno y Evaluación Externa de la Calidad

El plasma normal combinado (PNP) es un componente esencial para el laboratorio de hemostasia, ya que se utiliza en diferentes protocolos de prueba, desde la evaluación de un TTPA prolongado hasta la evaluación de inhibidores específicos e inespecíficos. También se puede utilizar como material de referencia para la calibración y el control normal si se observan las condiciones ideales para este fin. El siguiente es un protocolo sobre cómo se debe preparar el PNP.

Tabla 4. Requisitos para la elaboración del PNP

Donantes	Mínimo 20 individuos sanos normales que no tomen medicamentos que interfieran con los factores de coagulación y la reacción de coagulación. Es aceptable incluir a mujeres que toman anticonceptivos orales. Es deseable un número aproximadamente igual de varones y mujeres. El rango de edad debe ser de 20 a 50 años.
Anticoagulante	0,109 M (3,2%) de citrato trisódico dihidratado tamponado con N-2-hidroxiethylpiperazina. Ácido N-2-etanessulfónico (HEPES) a 5 g por 100 ml de citrato trisódico.
Recolección	A los donantes se les extrae la sangre entre las 9:00 a.m. y las 11:00 a.m. utilizando jeringas desechables de plástico de 60 ml y agujas de mariposa de calibre 21.

Método de preparación de PNP:

- ✓ Recoger 54 ml de sangre y mezclar con 6 ml de anticoagulante en recipientes de plástico.
- ✓ Almacene la muestra sobre hielo derretido durante la preparación del pool.
- ✓ Centrifugar a 4°C durante 15 minutos a 2500g.
- ✓ Plasma combinado en recipiente de plástico sin contacto.
- ✓ Alícuota en viales de plástico de 1,5 ml en alícuotas de 0,5 ml.
- ✓ Congelación instantánea en hielo seco/CO2 sólido si está disponible. Alternativamente, colóquelo inmediatamente en un estante abierto a -70 ° C.
- ✓ Complete el procedimiento anterior dentro de las cuatro horas.
- ✓ Estable a -70°C durante > seis meses.

Un PNP preparado de esta manera tendrá niveles de factor II (FII), factor V (EV), factor VII (FVII), factor IX (FIX), factor X (FX), factor XI (FXI), factor XII (FXII), quininógeno de alto peso molecular (HMWK) y precalicreina (PK) de alrededor de 1 U/ml o 100 U/dl, aunque los niveles de FVI 11 y factor de von Willebrand (FVW) varían ampliamente en los diferentes grupos de PNP. Un PNP local debe calibrarse en Unidades Internacionales (UI), ya que ahora se dispone de estándares internacionales para todos los factores de coagulación mencionados anteriormente, excepto para FXII. El pool se puede utilizar sin calibrar con una potencia supuesta de 100 U/dl o 1 U/ml para EXH. Para calibrar en UI, es necesario obtener preparaciones

de referencia calibradas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) (que se encuentran en el Instituto Nacional de Estándares y Control Biológicos, South Mimms, Potters Bar, Herts, Reino Unido) o comprar plasma de referencia comercial adecuado que haya sido calibrado en UI por el fabricante. Se debe considerar la posibilidad de sustituir un pool de plasma de este tipo cada 12 a 18 meses, a menos que los resultados del control de calidad interno (CCI) demuestren que se ha mantenido la estabilidad.

Método para la calibración del PNP local:

- ✓ Obtener un patrón calibrado, como el estándar internacional (EI) de la OMS (mínimo dos viales).
- ✓ En dos días diferentes, use un vial del EI y cuatro alícuotas de PNP local.
- ✓ El primer día pruebe el EI, local, local, local, local, EI, y repita usando diluciones frescas de cada plasma.
- ✓ En el segundo día pruebe local, local, EI, EI, local, local, local, local, y repita esto usando diluciones frescas de cada plasma.

Calcule la potencia de cada alícuota del estándar local frente a la media de los resultados con los dos EI.

- ✓ La media del resultado de 4 alícuotas x 2 diluciones x 2 días ($n = 16$) se asigna al patrón local como su potencia.

Cómo validar el equipo y las pruebas de coagulación: Antes de utilizar un nuevo método, es esencial que se evalúe su idoneidad para el propósito previsto. Este capítulo ofrece una recomendación general sobre cómo planificar y llevar a cabo los procesos necesarios para la selección y evaluación de analizadores/sistemas de prueba de hemostasia. Estas recomendaciones no pretenden sustituir a las reglamentaciones o normas, sino más bien ofrecer orientación sobre los pasos necesarios para cumplir con las buenas prácticas de laboratorio.

El alcance de la evaluación de un sistema de prueba dependerá de varios factores, entre ellos: (a) el uso previsto del sistema de prueba, (b) si el sistema de prueba ha sido considerado aprobado para uso clínico por organismos regionales o estatutos, (c) los recursos disponibles del laboratorio. Al elegir un sistema de prueba, se debe llevar a cabo una investigación para determinar qué analizadores de hemostasia están disponibles. Se debe elaborar una lista de requisitos para identificar el mejor sistema para su laboratorio, detallando las características físicas del laboratorio, así como el rendimiento requerido del equipo. La planificación de la validación es una etapa importante y está relacionada con los resultados obtenidos, ya que una buena planificación puede generar una validación técnicamente adecuada. Con este fin, es importante estimar un marco temporal realista para la evaluación, basado en los recursos disponibles y el alcance de la evaluación. Es necesario definir los detalles del proceso de evaluación (por etapas), los cuales deben ser revisados y aprobados por el responsable del sector. El plan de validación debe detallar el parámetro de evaluación (por ejemplo, imprecisión), la(s) prueba(s) que se va a realizar y el resultado deseado (por ejemplo, límites estadísticos). Dado que algunos sistemas de prueba pueden requerir muestras inusuales o que cubren una amplia gama de valores, puede ser aconsejable comenzar a recolectar y congelar muestras con semanas o incluso meses de anticipación. Las cantidades de consumibles (incluidos los reactivos) necesarias para la evaluación del sistema de ensayo deben estimarse, con margen para planes de contingencia en caso de que se requiera trabajo adicional. El laboratorio debe documentar cada etapa del proceso de evaluación, incluido el mantenimiento preventivo de los instrumentos, las evaluaciones de temperatura y los datos generados en las etapas de validación o verificación. El responsable del laboratorio debe analizar los datos y registrar el resultado del análisis. Es aconsejable disponer de una carpeta de registro digital específica y etiquetada para la validación y evaluación del sistema. En cualquier caso, cualquier forma de evaluación del sistema de ensayo debe estar fácilmente disponible para cualquier necesidad de verificar la idoneidad del laboratorio.

Muestras para procesos de validación de equipos/reactivos: El procesamiento de muestras utilizado en el proceso de validación debe ser el mismo que para las muestras de prueba de pacientes. Para la prueba

TP, los estudios muestran que la estabilidad del plasma procesado es de 24 horas cuando se mantiene a temperatura ambiente, sin embargo, cuanto más rápido se procesa, mejor es la garantía de calidad. Las muestras de plasma para otras pruebas deben analizarse dentro de las 4 horas posteriores a la recolección. Si las muestras no pueden analizarse dentro de los límites de estabilidad aceptables, se deben producir, alícuotar y almacenar muestras de plasma pobre en plaquetas (PPP) congeladas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Favaloro et al, 2008). Antes del análisis, las muestras congeladas deben descongelarse a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ (de 3 a 5 minutos para alícuotas de hasta 1 ml) y mezclarse inmediatamente antes de la prueba (Kitchen et al, 2021).

Validación o verificación: En general, la validación es un proceso que debe llevarse a cabo en sistemas de prueba completamente nuevos o en una prueba desarrollada en el laboratorio. La verificación, por otro lado, es un proceso que se puede aplicar a sistemas de prueba ya validados que se han introducido recientemente en el mercado del diagnóstico. La verificación también se puede aplicar a la evaluación después de que el equipo haya sido reubicado. Si un sistema de prueba ha sido aprobado por la autoridad reguladora regional, solo el proceso de verificación del sistema de prueba se puede llevar a cabo localmente. En este caso, la verificación puede definirse como el aporte de pruebas objetivas de que un determinado sistema de ensayo cumple localmente con las especificaciones establecidas por el fabricante. La desviación de las instrucciones de uso del fabricante para un sistema de prueba requerirá un seguimiento para la validación del sistema (Castellone, 2017).

Precisión y exactitud: Después de instalar el equipo, es importante evaluar el grado de imprecisión intracorrida de las pruebas a evaluar. Esta práctica es útil para identificar valores atípicos y variabilidad en el sistema de medición. El número de pruebas necesarias para una evaluación dependerá de si el sistema o sistemas de pruebas requieren validación o verificación (Gardiner et al, 2021a). Para los estudios de precisión, las muestras analizadas dependerán del tipo de muestras de pacientes que se espera analizar en el laboratorio. La precisión es una evaluación importante, definida como la concordancia entre una medición y el valor real. La precisión generalmente se lleva a cabo comparando instrumentos o sistemas de reactivos nuevos con un método existente o predeterminado (Eusebi, 2013). La comparación entre sistemas debe realizarse mediante análisis estadísticos. La comparabilidad entre sistemas puede analizarse mediante regresión lineal (normal, ponderada, de Deming o de Passing-Bablok, según corresponda), gráficos de tendencias de Altman y pruebas t pareadas (o pruebas U de Mann Whitney si los datos no se distribuyen normalmente) (Jensen y Kjelgaard-Hansen, 2006). Los criterios de aceptabilidad serán específicos de la prueba. Para la prueba TTPA, por ejemplo, dos sistemas de prueba diferentes que utilizan diferentes reactivos podrían generar resultados con diferencias que podrían ser clínicamente significativas (Montalvão et al, 2020). Las evaluaciones de la sensibilidad, la especificidad y el valor predictivo negativo y positivo de la prueba también son información relevante y fundamental para algunas pruebas. Los ensayos calibrados para los que existe un estándar internacional (por ejemplo, FVIII) y una metodología estandarizada, deben producir una línea de regresión con una pendiente cercana a 0,90-1,10, con una fuerte correlación ($r > 0,95$) y sin sesgo clínicamente significativo (Gardiner et al, 2021 b). El número exacto de muestras para la evaluación estadística del proceso de verificación/validación dependerá de los criterios de aceptabilidad de cada ensayo. Participar en un programa de evaluación externa de la calidad (EEC) puede ser útil para establecer la precisión del sistema antes de usarlo de rutina con los pacientes (Montalvão et al, 2022).

Establecer un intervalo de referencia: Establecer un intervalo de referencia normal es una de las tareas más importantes que se llevan a cabo en el laboratorio, ya que la mayoría de las decisiones médicas se toman en función de los resultados de laboratorio. Las pruebas de coagulación presentan un conjunto único de desafíos. Los reactivos utilizados en las pruebas de rutina pueden tener diferentes sensibilidades a la coagulación en función de la concentración y el tipo de fosfolípidos y activadores. Un ejemplo clásico de esto son los reactivos utilizados para la prueba TTPA, que utilizan partículas (por ejemplo, caolín, celita, sílice) o productos químicos (por ejemplo, ácido elágico) que afectan directamente a la sensibilidad y especificidad de la prueba. En este contexto, las diferentes partículas, así como la clase de fosfolípidos y la composición de ácidos grasos, no están estandarizadas. Por lo tanto, los reactivos de diferentes

proveedores pueden tener diferentes composiciones. Todas estas propiedades de los reactivos deben tenerse en cuenta a la hora de establecer un intervalo de referencia normal. Por lo tanto, es fundamental que el laboratorio lleve a cabo una determinación local del rango de referencia normal para que el conjunto de reactivos, equipos y procedimientos pueda tenerse en cuenta a la hora de evaluar al paciente. La salud no es una condición bien definida y a menudo es un término relativo. En algunos casos, el grupo ideal podría estar estrechamente relacionado con la población investigada en cuanto a edad y sexo. Sin embargo, una selección tan cuidadosa no es esencial para muchas pruebas de coagulación. En la práctica, la selección de sujetos sanos y normales para el establecimiento de un rango normal estará influenciada por consideraciones prácticas. Los empleados sanos del hospital que no reciben ningún medicamento y los donantes de sangre sanos pueden ser utilizados con éxito. Hay consideraciones importantes en relación con los rangos normales, que se dan a continuación. El estado de los sujetos normales en el momento de la extracción de sangre puede influir en los resultados obtenidos. Esto incluye una revisión de la evidencia de los efectos del estrés físico (p. ej., persistencia de hasta 10 horas de un aumento de 2,5 veces en FVIII/FVW), estrés mental (p. ej., aumento en FVIII y FVW después de estrés mental agudo), efectos hormonales, variaciones circadianas y los efectos de la postura y la dieta. Se hicieron algunas recomendaciones generales, que no se limitaron a la investigación de pacientes femeninas. Estos fueron los siguientes:

- ✓ Abstenerse de realizar ejercicio físico intenso durante las 24 horas previas a la venopunción.
- ✓ Utilizar un entorno donde se reduzca el estrés físico y mental.
- ✓ Abstenerse de consumir alimentos grasos y de fumar en la mañana de la venopunción.
- ✓ Obtener las muestras temprano en la mañana (de 7 a.m. a 9 a.m.), después de que el sujeto haya estado sentado en una posición relajada durante 20 a 30 minutos.

Validación versus verificación del intervalo de referencia: Los resultados del intervalo de referencia se evalúan estadísticamente y el tipo de evaluación estadística se basa en el número de individuos utilizados. El proceso puede incluir la validación o la verificación completa, donde se establece previamente el intervalo de referencia. La validación requiere un estudio de un mínimo de 120 individuos, mientras que la verificación de un rango de referencia requiere solo 20 individuos para demostrar que una prueba funciona como se estableció previamente. El intervalo de referencia debe verificarse con cualquier cambio de reactivo, número de lote e instrumento o sistema de recolección. Se puede calcular la media y la desviación estándar (DE) (Gardiner et al, 2021a).

Análisis estadístico del intervalo de referencia: La DE es la dispersión de los datos alrededor de la media. Cuanto más dispersos estén los datos, mayor será la desviación. El intervalo de confianza mide el nivel de incertidumbre. Si se elige el nivel de confianza del 95%, los intervalos se estimarán en los percentiles 2,5 y 97,5 de la distribución de resultados. Esto garantiza que su intervalo de confianza de valores contenga el promedio real del 95% de la población. Los niveles de confianza más altos tendrán intervalos de referencia más amplios, mientras que los intervalos de confianza más bajos son más estrechos (Henny et al, 2016).

Se pueden utilizar diferentes métodos estadísticos para evaluar los datos:

- (1) Método paramétrico: se utiliza cuando la distribución de la población es normal o gaussiana.
- (2) Método no paramétrico: no requiere leyes de probabilidad debido a la cuidadosa selección de sujetos y a un número suficiente de (>120) individuos evaluados.
- (3) Método robusto: para su uso en un número limitado de individuos sin necesidad de que la distribución sea gaussiana y mide la posición (ubicación) y la dispersión (propagación) en lugar de la media y la desviación estándar.

Los medidores de posición ordenan los datos de menor a mayor en partes iguales, mientras que los análisis de dispersión analizan la distancia entre los valores de la distribución desde el centro. Para comprobar si

hay valores atípicos, los datos pueden inspeccionarse visualmente y evaluarse en un método propuesto por Dixon (Henny et al, 2016). Con un tamaño de muestra de 20 (comprobación del intervalo de referencia), se permiten dos valores atípicos. Si hay más de dos valores atípicos, se deben analizar 20 muestras adicionales. Si hay otros dos valores atípicos, se deben investigar otras fuentes de error, como reactivos, problemas con el analizador o variación biológica (Henny et al, 2016). Puede ser necesario llevar a cabo un intervalo de referencia completo.

Control de calidad interno y evaluación externa de la calidad: El aseguramiento de la calidad (AC) es un término general que se puede utilizar para describir todas las medidas adoptadas para garantizar la fiabilidad de las pruebas y los informes de laboratorio. Esto incluye la elección de la prueba, la recogida de una muestra válida del paciente, el análisis de la muestra y el registro de los resultados de manera oportuna y precisa, hasta la interpretación de los resultados, cuando proceda, y la comunicación de estos resultados a los médicos remitentes. El control de calidad interno (CCI) y el aseguramiento externo de la calidad (AEC) (a veces denominada prueba de aptitud) son dos componentes distintos, pero complementarios, de un programa de aseguramiento de la calidad de laboratorio. El CCI se utiliza para establecer si una serie de técnicas y procedimientos funcionan de manera consistente durante un período. Por lo tanto, se implementa para garantizar la consistencia del laboratorio en el día a día. La AEC se utiliza para identificar el grado de concordancia entre los resultados de un laboratorio y los obtenidos por otros centros.

Control de calidad interno: el CCI se utiliza para establecer si una serie de técnicas y procedimientos tienen un rendimiento coherente a lo largo del tiempo. La expresión "control de calidad" se usa comúnmente para describir el conjunto de procedimientos utilizados para verificar que los resultados de las investigaciones de laboratorio son lo suficientemente confiables como para ser publicados para ayudar a la toma de decisiones clínicas, el seguimiento de la terapia y el diagnóstico de anomalías hemostáticas. Los procedimientos de control de calidad deben aplicarse de manera que se garantice un control inmediato y constante de la generación de resultados.

Dentro de un entorno de laboratorio, la calidad de los resultados obtenidos está influenciada por muchos factores, entre ellos:

- Recolección y manipulación adecuada de muestras
- Selección de técnicas adecuadas y mantenimiento de un manual actualizado de procedimientos operativos estándar
- Uso de reactivos y materiales de referencia fiables
- Selección de la automatización adecuada y el mantenimiento adecuado
- Registros adecuados
- Sistema para el reporte de los resultados

Además, la calidad de los resultados obtenidos en la práctica rutinaria depende en gran medida de la selección, formación y motivación de una dotación apropiada de personal adecuado.

El CCI es particularmente útil para identificar el grado de precisión de una técnica en particular, siendo la precisión el grado de concordancia entre las mediciones repetidas en una muestra. Para garantizar que los resultados obtenidos en el laboratorio sean fiables, deben ser precisos en sus análisis. El CCI garantiza la consistencia diaria de un proceso analítico y, por lo tanto, ayuda a determinar si los resultados del paciente son lo suficientemente confiables como para ser publicados. Un programa de CCI debe referirse a instituciones que apoyen las Guías de calidad de laboratorio, como la Organización Internacional de Normalización (ISO) o el Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio (CLSI). Las pruebas de laboratorio deben ser capaces de identificar resultados fisiológicos y patológicos, independientemente del momento en que se realice la prueba. En las recomendaciones de la norma ISO 15189:2022, el laboratorio debe contar con un procedimiento de CCI para supervisar la validez continua de los resultados de los exámenes, de acuerdo con criterios definidos, que verifique el logro de la calidad prevista y garantice una validez coherente pertinente para la toma de decisiones clínicas. El CCI se realizará con una frecuencia que se

base en la estabilidad y solidez del método de examen y en el riesgo de daño al paciente por un resultado erróneo. En el CLSI H47-A2 Vol. 28 No 207.8, para todos los sistemas de prueba de coagulación no manuales, como mínimo, el laboratorio debe incluir al menos dos niveles de material de control por cada 8 horas de funcionamiento y cada vez que se cambie un reactivo.

Materiales de control de calidad interno: Para evaluar la precisión de un método en particular, es necesario realizar análisis repetidos de alícuotas de la misma muestra. Es importante incluir muestras de control de calidad (CC) con valores normales y anormales para garantizar que un método esté bajo control en diferentes niveles de un analito en particular, ya que los cambios relativamente menores en un proceso analítico pueden ser más evidentes cuando se prueba un control anormal. El material de control debe tener propiedades similares a las muestras de prueba y analizarse simultáneamente. Es más probable que los materiales de control de calidad de origen humano se parezcan mucho a las muestras de prueba humanas. Todos los viales o alícuotas del material de control deben ser prácticamente idénticos, de modo que cualquier variación en los resultados de las pruebas no sea consecuencia de una variación de un vial a otro. El material de control de calidad también debe ser estable durante el período de uso previsto. Con respecto a las pruebas y ensayos hemostáticos, las muestras de plasma deben congelarse (preferiblemente a $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$ o menos) o liofilizarse para garantizar una estabilidad adecuada para su uso como material de control de calidad. Para la reconstitución de muestras liofilizadas, es importante utilizar agua destilada con un pH de 6,8-7,2 y esperar al menos cinco minutos para la reconstitución. Si se utiliza material de control de calidad comercial, este debe reconstituirse de acuerdo con las instrucciones del fabricante utilizando un sistema de pipeteo preciso. Si se utiliza material de control de calidad ultracongelado, este debe descongelarse rápidamente a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante cinco minutos. En la selección del material de control de calidad, se debe considerar el riesgo de transmisión de virus transmitidos por la sangre. No se debe utilizar material de alto riesgo. Se debe incluir al menos un material de control de calidad con cada grupo de pruebas o ensayos de cribado. Para las pruebas de cribado, puede ser más apropiado incluir un control de calidad normal de esta manera y analizar los materiales de control de calidad anormales una vez al día o por turno, o cuando existan dudas sobre si un método está bajo control. Un material de control de calidad con un nivel reducido debe incluirse en las pruebas utilizadas para el diagnóstico y seguimiento de los estados de deficiencia congénita asociados con el sangrado. En todos los casos, el material de control debe tratarse exactamente igual que las muestras de ensayo, si es posible

Límites aceptables de variación: Para el CCI comercial, los fabricantes de muestras a menudo proporcionan un rango objetivo de valores aceptables. En el caso de las pruebas de cribado y ensayos ocasionales, los resultados obtenidos dependerán de los reactivos y del sistema de detección de criterios de valoración utilizado para realizar las pruebas. El rango objetivo debe tener en cuenta estos efectos. Cuando no se dispone de un rango de objetivos para una técnica en particular, esto se puede establecer localmente. El material CCI se prueba repetidamente (mínimo 10 veces) en diferentes días cuando se sabe que el método está bajo control (como se indica, por ejemplo, por los resultados dentro del objetivo en un material de control de calidad alternativo). A continuación, se calcula la media y la desviación estándar de estos resultados. La DE es la raíz cuadrada de la suma de d^2 dividida por $n-1$, donde d es la diferencia de los resultados individuales con respecto a la media y n es el número de determinaciones. La DE es una medida de la dispersión de los resultados; cuanto mayor sea la DE, mayor será la dispersión de los resultados. Otro parámetro importante es el coeficiente de variación (CV), que es la DE expresada como porcentaje de la media ($\text{CV} = \text{DE} \text{ dividido por la media, multiplicado por } 100\%$). El CV de los resultados en diferentes días para TP y TTPA de una muestra de CC siempre debe ser inferior al 8%, preferiblemente si es inferior. En el caso de ensayos como FVIII:C y FIX, se deben poder alcanzar CV inferiores al 10% para pruebas realizadas durante varios días. En la mayoría de los casos, los resultados obtenidos para una muestra de CCI mostrarán una distribución normal (gaussiana). Es una práctica común establecer el rango objetivo para los resultados de CCI como la media ± 2 DE, ya que debe incluir el 95% de los valores. Los resultados individuales deben registrarse en un gráfico que identifique el rango objetivo. Los resultados fuera de este rango indican que el material de control de calidad se ha deteriorado o se ha manipulado incorrectamente, o que el método no se controla adecuadamente. Las pruebas repetidas de material de

control de calidad adicional diferenciarán entre estas dos posibilidades, con resultados adicionales fuera de límite que confirman que el sistema de prueba está fuera de control.

Aseguramiento externo de la calidad: En los grandes esquemas de AEC, el análisis retrospectivo de los resultados obtenidos por los laboratorios participantes permite identificar, no solo el bajo rendimiento individual del laboratorio, sino también los reactivos y métodos que producen resultados poco fiables o engañosos. La función principal de AEC es la prueba de aptitud de las pruebas de laboratorio individuales. El Plan Internacional de Evaluación Externa de la Calidad (IEQAS, por sus siglas en inglés) de la Federación Mundial de Hemofilia (FMH) incluye análisis de particular relevancia para el diagnóstico y el tratamiento de los trastornos de la coagulación (para más información, comuníquese con la FMH). Los datos de este esquema se han publicado en las siguientes referencias:

- Jennings I, Kitchen S, Woods TAL, Preston FE. Desarrollo de un Plan de Evaluación Externa de la Calidad de la Federación Mundial de Hemofilia: resultados de un estudio piloto. *Hemofilia* 1996; 2: 4-46.
- Jennings I, Kitchen S, Woods TAL, Preston FE. Rendimiento del laboratorio de los centros de hemofilia en los países en desarrollo: 3 años de experiencia del Plan de Evaluación Externa de la Calidad de la Federación Mundial de Hemofilia. *Hemofilia* 1998; 4: 739-746.
- Jennings I, Kitchen DP, Woods TA, Kitchen S, Walker ID, Preston FE. Desempeño del laboratorio en el programa AEC de la FMH 2003-2008. *Hemofilia*. Año 2009; 15:571-7.
- Silmara Montalvao, Ian Jennings, Christopher Reilly-Stitt, Dianne Kitchen, Steve Kitchen. Calidad del diagnóstico y seguimiento de laboratorio de las personas con hemofilia y otros trastornos de la coagulación en todos los continentes: Programa IEQAS de la FMH 2016-2023.

El IEQAS de la FMH se lanzó en 2004 para monitorear y mejorar el rendimiento de los laboratorios en los centros de tratamiento de hemofilia (HTC) en todo el mundo. Los laboratorios pueden participar en este programa para evaluar sus sistemas de aseguramiento de la calidad y la fiabilidad de los resultados de sus ensayos. El IEQAS mejora y estandariza el diagnóstico de laboratorio mediante la auditoría de la eficacia de los sistemas internos de aseguramiento de la calidad establecidos y brindando una medida de la competencia del laboratorio. El Sistema Nacional de Evaluación de la Calidad Externa del Reino Unido (UK NAECs) con sede en Sheffield, gestiona el sistema de coagulación de la sangre, que ha sido inspeccionado por el Servicio de Acreditación del Reino Unido Ltd (UKAS) y se le ha concedido la acreditación completa de la norma ISO 17043 para todas las pruebas enumeradas. El mandato de la IEQAS de la FMH es proporcionar un AEC para las pruebas de coagulación sanguínea y promover altos estándares de rendimiento y práctica. La AEC, junto con los procedimientos CCI, son componentes vitales de la garantía de calidad general del laboratorio. Además, el IEQAS de la FMH brinda un servicio de asesoramiento a los participantes a través de intercambios sobre diagnóstico de laboratorio, incluida una reunión de participantes durante el Congreso Mundial de la FMH que se celebra cada dos años y visitas presenciales/virtuales para brindar capacitación, según sea necesario. El Comité IEQAS de la FMH es responsable de supervisar el programa IEQAS. El comité está compuesto por un presidente independiente designado por la FMH, el director del programa Scheme, el personal del programa IEQAS en los Hospitales Universitarios de Sheffield (institución anfitriona) y el personal y los voluntarios de la FMH. El Comité IEQAS supervisa todos los aspectos operativos del programa, revisa la participación en el esquema, analiza los resultados, monitorea el desempeño global del laboratorio y brinda apoyo de asesoramiento para los centros registrados en el esquema. Las encuestas IEQAS de la FMH se distribuyen tres veces al año, por lo general en marzo, julio y noviembre. Todas las encuestas suelen incluir TP, TTPA, FVIII y FIX. Dos de las tres encuestas incluyen el ensayo de antígeno del FVW y el ensayo de actividad del cofactor de ristocetina del FVW. Una de las tres encuestas incluye otros dos ensayos factoriales, de modo que los ensayos FII, FV, FVII, FX y FXI se evalúan en alguna etapa, junto con el fibrinógeno. Para obtener más información, póngase en contacto con neqas@coageqa.org.uk.

Referencias

Castellone DD. Establecimiento de intervalos de referencia en el laboratorio de coagulación. *Int J Lab Hematol* 2017; 39 Supl 1: 121-127.

Eusebi P. Medidas de precisión diagnóstica. *Cerebrovasc Dis.* 2013; 36(4): 267-272.

Favaloro EJ, Lippi G, Adcock DM. Variables preanalíticas y posanalíticas: ¿las principales causas de error diagnóstico en la hemostasia? *Semin Thromb Hemost* 2008; 34(7): 612-634.

Gardiner C, Coleman R, de Maat MPM, Dorgalaleh A, Echenagucia M, Gosselin RC, Ieko M, Kitchen S. Guía de laboratorio del Consejo Internacional de Normalización en Hematología (ICSH) para la evaluación de los sistemas de prueba de analizadores y reactivos de hemostasia. Parte 1: Problemas específicos del instrumento y pruebas de detección de coagulación de uso común. *Int J Lab Hematol* 2021 a; 43(2): 169-183.

Gardiner C, Coleman R, de Maat MPM, Dorgalaleh A, Echenagucia M, Gosselin RC, Ieko M, Kitchen S. Guía de laboratorio del Consejo Internacional de Normalización en Hematología (ICSH) para la verificación de los sistemas de prueba de analizadores y reactivos de hemostasia. Parte 2: Pruebas especializadas y ensayos calibrados. *Int J Lab Hematol* 2021b; 43(5): 907-916.

Henny J, Vassault A, Boursier G, Vukasovic I, Mesko Brguljan P, Lohmander M et al. Recomendación para la revisión de los intervalos de referencia biológicos en laboratorios médicos. *Clin Chem Lab Med* 2016; 54(12): 1893-1900.

Jensen AL, Kjelgaard-Hansen M. Comparación de métodos en el laboratorio clínico. *Veterinario Clin Pathol* 2006; 35(3): 276-286.

Kitchen S, Adcock DM, Dauer R, Kristoffersen AH, Lippi G, Mackie I, Marlar RA, Nair S. Recomendaciones del Consejo Internacional de Normalización en Hematología (ICSH) para el procesamiento de muestras de sangre para pruebas de coagulación. *Int J Lab Hematol* 2021; 43(6): 1272-1283.

Montalvao SAL, Francisco AP, da Silva BLQ, Huber SC, Aguiar! HJ, Fernandes MCGL et al. De la hemofilia a la trombosis venosa profunda Muestras de pacientes: Cómo realizar un proceso sencillo de validación del coagulómetro según las Guías disponibles. *Clin Appl Thromb Hemost* 2020; 26: 1076029620915512.

Montalvão SAL, Lowe A, Kitchen S. Ventajas de los programas de evaluación externa de la calidad-AEC. *Hemofilia* 2022; 28(4): 679-686.

TEMAS TRATADOS

- ✓ Extracción de sangre
- ✓ Plasma pobre en plaquetas (PPP)
- ✓ Sustancias que interfieren
- ✓ Almacenamiento
- ✓ Descongelación

Antes de la extracción de sangre, hay algunos factores que deben tenerse en cuenta. No se requiere ayuno antes de la extracción de sangre para la mayoría de las investigaciones de los trastornos de la coagulación y trombóticos. Sin embargo, una excepción es la prueba de homocisteína que sí requiere ayuno. El ejercicio (Venema et al, 2017) y el estrés (Austin et al, 2012) pueden causar aumentos temporales en el FVIII y el FVW. El ejercicio también puede afectar a la prueba del dímero D (Huskens D et al, 2016). La inflamación puede afectar a los factores de coagulación y otros parámetros hemostáticos (Hardy et al, 2024). El embarazo afecta a una variedad de parámetros, incluidos el FVIII (Castaman, 2013), el FVW (Delbruck et al, 2019) y el dímero D (Blomback et al, 2007). Numerosos productos farmacéuticos y anticoagulantes pueden interferir en las pruebas de hemostasia, por lo que la información sobre los tratamientos que reciben los pacientes es esencial para el laboratorio (Gosselin et al, 2019).

Extracción de sangre: Existen varias guías que describen las mejores prácticas para la recolección y el procesamiento de muestras para pruebas hemostáticas (CLSI, 2024; CLSI, 2017). La extracción de sangre debe utilizar un sistema de recolección por vacío o una jeringa de plástico con una aguja de calibre 19 a 21 (adultos) o una aguja de calibre 22 a 23 (niños) (Srivastava et al, 2021). Los tipos de tubos no son todos iguales, por lo tanto, los centros deben utilizar un solo tipo de tubo y generar intervalos de referencia basados en estos tubos (Bowen et al, 2016). Incluso dentro de un tipo de tubo de recolección, la constitución es importante; los tubos de plástico y vidrio no son intercambiables (Fiebig et al, 2005). Los tubos de extracción de sangre deben contener de 0,105 a 0,109 M (3,2%) de citrato trisódico (CLSI, 2024). La secuencia de extracción es importante para prevenir la contaminación cruzada con EDTA (Lima-Oliveira et al, 2015) o heparina (Keppel et al, 2019); por lo tanto, se deben seguir las mejores prácticas en la extracción de muestras (OMS, 2010; Simundic et al, 2018). Las muestras requieren anticoagulación inmediata después de la venopunción, con un llenado de un volumen objetivo mínimo del 80% (Kitchen et al, 2021) para lograr una relación sangre:anticoagulante de 9:1. La inversión suave (de 3 a 5 veces) de los tubos con sangre después de la flebotomía permite una mezcla adecuada de las muestras. Se producen cambios hemostáticos no deseados en los tubos con llenado insuficiente (Lippi et al, 2012). Las muestras con niveles de hematocrito >55% requieren una solución de citrato ajustada para compensar el alto volumen de células aglomeradas y obtener la proporción correcta de 9:1. Si no se mantiene esta relación, se pueden observar cambios significativos en el TP, el TTPA y la monitorización de anticoagulantes (INR) (Marlar et al, 2006). A continuación, se muestra la fórmula recomendada para reajustar los niveles de citrato (Kitchen et al, 2021). Las muestras deben etiquetarse adecuadamente inmediatamente antes o después de la flebotomía, siguiendo las políticas regulatorias o institucionales locales.

$$C = (1,85 \times 10^{-3})(100 - \text{HCT})(V)$$

C = volumen de citrato en mililitros (ml) que debe añadirse a un volumen de sangre (V)

HCT = es el hematocrito del paciente

V = es el volumen de sangre añadido en ml

Y $1,85 \times 10^{-3}$ es constante

Un ejemplo en el que se utiliza HCT del 70% y 4,5 ml de sangre recolectada antes de la adición del anti-coagulante, da el siguiente cálculo, es decir, se mezclan 0,25 ml de citrato con 4,5 ml de sangre.

$$(1.85 \times 10^{-3})(100 - \text{HCT})(V) = C$$

$$(1,85 \times 0,001)(100 - 70)(4,5 \text{ ml}) = 0,25 \text{ ml de citrato}$$

Plasma pobre en plaquetas (PPP): La mayoría de las pruebas de coagulación se pueden realizar con PPP después de la centrifugación a $> 1700 \text{ g}$ durante 10 minutos (CLSI, 2024; Kitchen et al, 2021). Deben evitarse las centrifugas refrigeradas, ya que la activación en frío del factor plaquetario 4 puede afectar el control de la heparina, las pruebas de función plaquetaria, las pruebas de FVIII y las pruebas del FVW (Favaloro, 2004). Algunas pruebas, como la heparina no fraccionada (HNF) y el anticoagulante lúpico, requieren plasma libre de plaquetas de doble centrifugado ($<10 \times 10^9$) si las pruebas se realizan en muestras previamente congeladas. En este caso, el plasma se extrae del tubo de sangre centrifugado a un recipiente secundario adecuado y se vuelve a centrifugar con las subalícuotas extraídas para la congelación. Las pruebas de función plaquetaria requieren de plasma rico en plaquetas (PRP), preparado después de la centrifugación a 170 g durante 15 minutos o 250 g durante 10 minutos (Gomes et al, 2021).

Sustancias que interfieren: Las muestras hemolizadas no deben analizarse, ya que se pueden observar cambios significativos, particularmente en el TTPA (Woolley et al, 2016; Lippi et al, 2013), excepto cuando la hemólisis es intravascular (Arachchillage et al, 2014). Los ensayos de rutina generalmente no se ven afectados por la ictericia (Woolley et al, 2016) y la lipemia puede solucionarse mediante ultracentrifugación (Lippi et al, 2013, Dimeski y Jones, 2011).

Almacenamiento: Las pruebas de muestras son sensibles al tiempo. El procesamiento y las pruebas de la muestra deben realizarse dentro de la ventana de estabilidad del ensayo después de la venopunción, y las muestras deben almacenarse a temperatura ambiente en el tiempo intermedio. Las Guías recomiendan realizar pruebas en un plazo de 4 horas (CLSI, 2024) para todas las muestras, a menos que los datos locales confirmen una estabilidad prolongada para una combinación específica de tubo/ensayo (Kitchen et al, 2021; Linskens et al, 2018). El almacenamiento a una temperatura más alta puede conducir a la pérdida de factores de coagulación, como el FVIII (Omidkhoda et al, 2011). La liberación del factor plaquetario 4 puede provocar la neutralización de la heparina no fraccionada en las muestras, por lo que estos tubos deben centrifugarse dentro de 1 hora y analizarse en 4 horas (Baker et al, 2020). Si el plasma se almacena para pruebas posteriores, las condiciones de almacenamiento pueden afectar a algunos ensayos. El plasma puede almacenarse aceptablemente a $-24 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 3 meses. Sin embargo, para un almacenamiento a largo plazo (aproximadamente 6 meses), las muestras deben almacenarse a $-70 \text{ }^\circ\text{C}$ (Woodhams et al, 2001; Fenclova et al, 2023).

Descongelación: Las muestras congeladas para el análisis deben descongelarse en un baño maría a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 3 a 5 minutos e invertirse varias veces antes del ensayo para homogeneizar la muestra (Jo et al, 2020). Debe evitarse volver a congelar el plasma una vez descongelado para realizar más pruebas.

Referencias

Arachchilage DJ, Flatten S, Hickey K, Chu J, Pickering M, Sommerville P, MacCallum P, Breen K. Guías sobre la investigación y el tratamiento del síndrome antifosfolípido. *BrJ Haematol* 2024; 205(3): 855-880.

Austin AW, Wirtz PH, Patterson SM, Stutz M, von Kanel R. Alteraciones inducidas por el estrés en la coagulación: evaluación de una nueva técnica de corrección de la hemoconcentración. *Psychosom Med* 2012; 74(3): 288-295.

Baker P, Platton S, Gibson C, Gray E, Jennings I, Murphy P, Laffan M. Guías sobre los aspectos de laboratorio de los ensayos utilizados en la hemostasia y la trombosis. *BrJ Haematol* 2020; 191(3): 347-362.

Blomback M, Konkle BA, Manco-Johnson MJ, Bremme K, Hellgren M, Kaaja R. Condiciones preanalíticas que afectan las pruebas de coagulación, incluido el estado hormonal y la terapia. *J Thromb Haemost* 2007; 5(4): 855-858.

Bowen RA, Adcock DM. Tubos de recolección de sangre como dispositivos médicos: el potencial para afectar los ensayos y los procesos de verificación y validación propuestos para el laboratorio clínico. *Clin Biochem* 2016; 49(18): 1321-1330.

Castaman G. Cambios en el factor de von Willebrand durante el embarazo en mujeres con y sin enfermedad de von Willebrand. *Mediterr J Hematol Infect Dis* 2013; 5(1): e2013052.

Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio. Recolección, transporte y procesamiento de muestras de sangre para ensayos de coagulación basados en plasma, 6ª edición. Norma CLSI H21.2024. https://clsi.org/media/bp2jr13r/h21ed6e_sample.pdf.

Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio. Colección de muestras diagnósticas de sangre venosa, 7ª edición. Norma CLSI GP41.2017. https://clsi.org/media/1372/gp41ed7_sample.pdf.

Delbrück C, Miesbach W. Evolución de la actividad del factor de von Willebrand y del factor viii en pacientes con enfermedad de von Willebrand durante el embarazo. *Acta Haematol* 2019; 142(2): 71-78.

Dimeski G, Jones BW. Muestras lipémicas: Proceso eficaz para la reducción de lípidos mediante centrifugación de alta velocidad en comparación con la ultracentrifugación. *Biochem Med (Zagreb)* 2011; 21(1): 86-92.

Favaloro EJ, Soltani S, McDonald J. Posible diagnóstico erróneo de laboratorio de hemofilia y trastorno de von Willebrand debido a la activación en frío de muestras de sangre para pruebas. *Am J Clin Pathol* 2004; 122(5): 686-692.

Fenclova T, Marecek F, Hrachovinova I. Efectos de las condiciones de almacenamiento congelado y la tasa de congelación en la estabilidad de las proteínas de coagulación en el plasma humano. *Fibrinólisis de coágulos sanguíneos* 2023; 34(6): 377-384.

Fiebig EW, Ezzell JE, Ng VL. Diferencias clínicamente relevantes en el tiempo de protrombina y los valores de INR relacionados con la recolección de muestras de sangre en tubos de plástico frente a tubos de vidrio. *Am J Clin Pathol* 2005; 124(6): 902-909.

Gomez K, Anderson J, Baker P, Biss T, Jennings I, Lowe G, Platton S. Diagnóstico clínico y de laboratorio de los trastornos plaquetarios hereditarios en adultos y niños: una guía de la Sociedad Británica de Hematología. *BrJ Haematol* 2021; 195(1): 46-72.

Gosselin RC, Marlar RA. Variables preanalíticas en las pruebas de coagulación: Preparando el escenario para obtener resultados precisos. *Semin Thromb Hemost* 2019; 45(5): 433-448.

Hardy M, Catry E, Pouplard M, Lecompte T, Mullier F. ¿Son fiables las pruebas de anticoagulación lúpica con veneno de víbora de Russell diluido en presencia de inflamación? *Res Pract Thromb Haemost* 2024; 8(6): 102536.

Huskens D, Roest M, Remijn JA, Konings J, Kremers RM, Bloemen S, Schurgers E, Selmececi A, Kelchtermans H, van Meel R, Meex SJ, Kleinegris MC, de Groot PG, Urbanus RT, Ninivaggi M, de Laat B. El ejercicio extenuante induce un estado hemostático hiperreactivo y reequilibrado que es más pronunciado en los hombres. *Thromb Haemost* 2016 Jun 2; 115(6): 1109-19.

Keppel MH, Auer S, Lippi G, von Meyer A, Comes M, Felder TK, Oberkofler H, Mrazek C, Haschke-Becher E, Cadamuro J. Arrastre de heparina y aditivo de citrato durante la extracción de sangre. *Clin Chem Lab Med* 2019; 57(12): 1888-1896.

- Kitchen S, Adcock DM, Dauer R, Kristoffersen AH, Lippi G, Mackie I, Marlar RA, Nair S. Recomendaciones del Consejo Internacional de Normalización en Hematología (ICHS) para la recolección de muestras de sangre para pruebas de coagulación. *Int J Lab Hematol* 2021; 43(4): 571-580.
- Kitchen S, Adcock DM, Dauer R, Kristoffersen AH, Lippi G, Mackie I, Marlar RA, Nair S. Recomendaciones del Consejo Internacional de Normalización en Hematología (ICHS) para el procesamiento de muestras de sangre para pruebas de coagulación. *Int J Lab Hematol* 2021; 43(6): 1272-1283.
- Lima-Oliveira G, Salvagno GL, Danese E, Favalaro EJ, Guidi GC, Lippi G. Contaminación sanguínea por citrato de sodio por ácido K2-etilendiaminotetraacético (EDTA): Impacto en las pruebas de coagulación rutinarias. *Int J Lab Hematol* 2015; 37(3): 403-409.
- Linskens EA, Devreese KMJ. Estabilidad preanalítica de los parámetros de coagulación en plasma almacenado a temperatura ambiente. *Int J Lab Hematol* 2018; 40(3): 292-303.
- Lippi G, Plebani M, Favalaro EJ. Interferencia en las pruebas de coagulación: concéntrese en la hemólisis espuria, la ictericia y la lipemia. *Semin Thromb Hemost* 2013; 39(3): 258-266.
- Lippi G, Salvagno GL, Montagnana M, Lima-Oliveira G, Guidi GC, Favalaro EJ. Estándares de calidad para la recogida de muestras en pruebas de coagulación. *Semin Thromb Hemost* 2012; 38(6): 565-575.
- Marlar RA, Potts RM, Marlar AA. Efecto sobre los valores de las pruebas de coagulación rutinarias y especiales del ajuste del anticoagulante citratado en pacientes con valores altos de hematocrito. *Am J Clin Pathol* 2006; 126(3): 400-405.
- Omidkhoda A, Tabatabaei MR, Atarodi K, Karim! K, Froushani AR, Pourfathollah AA. Un estudio comparativo de los efectos de la temperatura, el tiempo y el tipo de ensayo del factor VIII sobre la actividad del factor VIII en el crioprecipitado en Irán. *Transfus de sangre* 2011; 9(4): 394-399.
- Simundic AM, Bolenius K, Cadamuro J, Church S, Comes MP, van Dongen-Lases EC et al. Recomendación conjunta EFLM-COLABIOCLI para la toma de muestras de sangre venosa. *Clin Chem Lab Med* 2018; 56(12): 2015-2038.
- Srivastava A, Santagostino E, Dougall A, Kitchen S, Sutherland M, Pipe SW et al. Guías de la FMH para el tratamiento de la hemofilia, 3.ª edición. *Hemofilia* 2020; 26 Supl 6: 1-158.
- Venema CL, Schutgens REG, Fischer K. Mecanismos fisiopatológicos de la liberación endógena de FVIII después de un ejercicio extenuante en la hemofilia no grave: una revisión. *Thromb Haemost* 2017; 117(12): 2237-2242.
- Woodhams B, Girardot O, Blanco MJ, Collesse G, Gourmelin Y. Estabilidad de las proteínas de coagulación en plasma congelado. *Fibrinólisis de coágulos sanguíneos* 2001; 12(4): 229-236.
- Woolley A, Golmard JL, Kitchen S. Efectos de la hemólisis, la ictericia y la lipemia en las pruebas de coagulación realizadas en el analizador Stago STA-Compact-Max. *Int J Lab Hematol* 2016; 38(4): 375-388.
- Organización Mundial de la Salud. Guías de la OMS sobre la extracción de sangre: Mejores prácticas en flebotomía. 2010. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK138650/>.

TEMAS TRATADOS

- ✓ Cuándo utilizar la técnica manual de tubo basculante
 - ✓ Cómo realizar la técnica manual de tubo basculante
 - ✓ TP por la técnica manual de tubo basculante
 - ✓ TTPA por la técnica manual de tubo basculante
 - ✓ Tiempo de trombina y fibrinógeno por la técnica manual de tubo basculante
 - ✓ Prueba de fibrinógeno derivado de TP
-

El uso de coagulómetros para las pruebas de coagulación tiene sus ventajas, como la velocidad de análisis/rendimiento y la consistencia del análisis, que ofrecen resultados precisos y exactos de manera oportuna. Aunque hay muchos instrumentos diferentes para las pruebas de coagulación disponibles y en uso en todo el mundo, la técnica manual del tubo basculante todavía se puede emplear con éxito para determinar el tiempo de coagulación. Esto se puede hacer para todas las muestras si no se dispone de un método automatizado adecuado, o para un subgrupo de muestras, ya sea porque el análisis automatizado no genera resultados en muestras con características específicas, lo que provoca la incompatibilidad de la muestra con el instrumento en uso, o porque el método del coagulómetro no está disponible temporalmente. Los métodos de tubo basculante son adecuados como alternativas a los métodos basados en coágulos e incluso los laboratorios integrales de los centros de hemofilia deben tener disponible el método manual de tubo basculante para aquellas pocas muestras en las que el análisis automatizado falla, pero donde los resultados son realmente necesarios para el manejo seguro del paciente. Este puede ser el caso en presencia de concentraciones de lípidos plasmáticos muy elevadas, o cuando el patrón de formación de coágulos en la muestra difiere marcadamente de las muestras normales, particularmente cuando la polimerización de fibrinógeno a fibrina es marcadamente anormal. Debido a las muchas variables y posibles fuentes de contaminación asociadas con las técnicas manuales, estas pueden requerir pruebas duplicadas. Si el CV entre días de los resultados de CCI es del >5%, entonces se debe considerar la duplicación de pruebas. Cuando las pruebas se realizan por duplicado, los dos resultados deben estar dentro de +/- 5% de la media con la práctica.

Cuándo usar la técnica manual de tubo basculante: Luego, el método manual de tubo basculante se puede usar con éxito para la determinación de TP, TTPA, tiempo de trombina y fibrinógeno, así como ensayos de factores de coagulación basados en TP y TTPA.

Cómo realizar la técnica manual de tubo basculante: El método de realizar la técnica de tubo basculante para las pruebas de coagulación se ha armonizado recientemente en relación con las pruebas de TP como parte de la calibración de tromboplastinas de referencia para el sistema internacional de proporción normalizada (INR) utilizado para monitorear los medicamentos antagonistas de la vitamina K (Van den Besselaar et al, 2020). Este método armonizado ha mejorado la concordancia entre los resultados de TP de tubo basculante cuando las pruebas son realizadas por diferentes operadores y en diferentes centros. Este método se puede utilizar para la prueba de tubo basculante para TTPA, tiempo de trombina y análisis de fibrinógeno, además de la prueba de TP.

Materiales necesarios:

- 1) Baño maría para mantener los tubos de ensayo a una temperatura constante de 37 °C. Las dimensiones cercanas a 40 x 30 x 20 cm son convenientes. El agua del baño maría debe circular continuamente por una bomba si es posible. La temperatura debe ser de 37 °C (límites de tolerancia: $37 \pm 0,5$ °C). La temperatura debe controlarse con un termómetro calibrado.
- 2) Se puede utilizar una fuente de luz, como una lámpara articulada, montada a 20 cm por encima del nivel del agua para iluminar el tubo de ensayo durante la inclinación, lo que facilita la detección de coágulos en el punto final por parte del operador. Se prefiere el LED como fuente de luz a las bombillas que generan calor, ya que puede elevar la temperatura de los tubos de ensayo que se mantienen cerca de la fuente de luz.
- 3) Los tubos de ensayo deben ser tubos de vidrio no siliconados, sin haber sido previamente usados. En el trabajo se utilizaron tubos de cultivo desechables (número de catálogo 73500-1275, Kimble Chase Life Science and Research Products LLC, Vineland, Nueva Jersey) con dimensiones de 75 x 12 mm y espesor de pared de 0,8 mm para armonizar las pruebas de tubos basculantes TP (van den Besselaar et al, 2020), pero también se pueden utilizar tubos de 75 x 10 mm. Los tubos de ensayo deben estar hechos de vidrio de borosilicato. Los tubos de ensayo deben desecharse después de su uso y no lavarse para volver a utilizarlos. Se pueden utilizar con éxito diferentes fuentes de tubos de ensayo de vidrio, pero pueden influir en los tiempos de coagulación obtenidos, especialmente en pruebas de cribado como el TTPA. Si se cambia la fuente (fabricante o composición) de los tubos de ensayo, se debe considerar la posibilidad de que los resultados se vean afectados. Esto podría evaluarse comparando un pequeño número de pruebas, como el TTAP, con los dos tipos de tubo. Si existen diferencias sistemáticas, se debe establecer un nuevo rango normal.

Técnica:

- La temperatura de la habitación en la que se instala el equipo y donde se va a realizar la técnica debe mantenerse a 20–22°C.
- Antes de comenzar las pruebas manuales de TP, TTPA, TT o fibrinógeno en el baño maría, se debe verificar la temperatura y posteriormente registrarla.
- Los tubos de ensayo vacíos deben mantenerse en posición vertical en una gradilla en el baño maría a 37 °C durante al menos 4 minutos a una profundidad de 3,5 cm antes de añadir los reactivos y el plasma.

TP por la técnica manual de tubo basculante:

- Para la prueba de TP, añadir 200 µl del reactivo de tromboplastina/calcio e incubar durante 2 min.
- A continuación, pipetee 100 µl de plasma no precalentado, dispensando desde una altura de 1 cm por encima del nivel de tromboplastina, con la punta apoyada en la pared del tubo de ensayo, e inmediatamente ponga en marcha el cronómetro con la otra mano.
- Agite el tubo suavemente para mezclar el contenido, con el tubo sumergido en el agua.
- Coloque el tubo en la rejilla en el baño maría.
- Coloque la pipeta.
- El tubo de ensayo debe mantenerse manualmente en el agua, con el agua cubriendo los 5 cm inferiores del tubo (Figura 1).
- La titulación manual del tubo debe comenzar 7 segundos después de poner en marcha el cronómetro.
- El tubo debe inclinarse en un ángulo de casi 90° sacando el tubo del agua durante 2 segundos y volviéndolo a meter en el agua durante 1 segundo (Figura 1). Tenga en cuenta que inclinar el tubo 90° o más generalmente hará que la mezcla de reacción se derrame fuera del tubo.
- El tubo no debe estar inmóvil durante este ciclo, sino inclinado continuamente con la mano del operador apoyada en el costado del baño maría.

- Este ciclo se repite hasta que se forma el coágulo.
- En posición horizontal, el tubo se mantiene a no más de 10 cm y no menos de 2 cm por encima del nivel del agua (Figura 1).
- Antes de que la mezcla se coagule, el operador observa que la mezcla fluye desde el fondo hasta tres cuartas partes de la longitud del tubo en posición casi horizontal y de vuelta al fondo.
- Cuando comienza la coagulación, la velocidad del flujo se reduce.
- Cuando se detiene el flujo, el operador detiene el temporizador y registra el tiempo de coagulación en segundos con un decimal.

El operador que realiza la técnica manual de tubo basculante levanta el tubo de ensayo regularmente fuera del agua. Sacar el tubo de ensayo del agua provocará una caída de temperatura de la mezcla de reacción. Sumergir el tubo de nuevo en el agua dará como resultado un aumento de temperatura. La caída media de temperatura observada en la técnica manual de tubo basculante utilizando el método descrito anteriormente se limita a 0,4 °C (van den Besselaar et al, 2020).

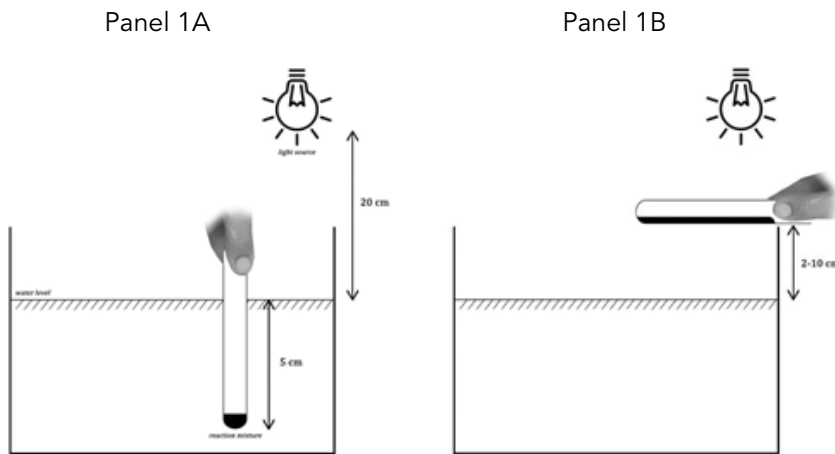


Figura 1. Representación esquemática de la técnica manual de tubo basculante. Panel 1A: el tubo de ensayo está en posición vertical en el baño maría. Panel 1B: el tubo de ensayo está en posición horizontal fuera del baño maría. La mano del operador descansa en el borde del baño maría. Debido a la variación en el tamaño de las manos de los operadores, la distancia del tubo en posición horizontal a la superficie del agua varía entre 2 y 10 cm. Las dimensiones de la imagen no están a escala. (Reproducido con el amable permiso de Elsevier Publishing, Ámsterdam, Países Bajos, de: Van den Besselaar et al. *J Thromb Haemost.* 2020; 18:1986-1994.)

El método armonizado anterior se desarrolló en dos talleres húmedos que evaluaron las pruebas de TP por hasta siete operadores de tres centros, que identificaron una serie de variables en la técnica (van den Besselaar et al, 2020). En particular, los talleres confirmaron que la dispensación del componente final de la mezcla de reacción para iniciar la coagulación en la parte superior del tubo de ensayo se asociaba con tiempos de coagulación más largos que la dispensación cerca de la superficie de la mezcla de reacción más abajo en el tubo. Utilizando el método armonizado descrito, el CV entre operadores de Ts en los mismos plasmas de prueba fue del 3% para un TP normal y del 1,4% para un TP prolongado.

TTPA por la técnica manual de tubo basculante:

- Añadir 100 µl de reactivo TTPA al tubo e incubar durante 2 min.
- A continuación, pipetee 100 µl de plasma no precalentado, dispensando desde una altura de 1 cm por encima del nivel del reactivo TTPA, con la punta apoyada en la pared del tubo de ensayo e inmediatamente ponga en marcha un cronómetro con la otra mano.
- Agite el tubo suavemente para mezclar el contenido, con el tubo sumergido en el agua.
- Coloque el tubo en la rejilla en el baño maría.

- Después del tiempo de activación recomendado por el fabricante del reactivo TTPA (normalmente es de 3 minutos, pero puede ser de 5 minutos para otros), añadir 100 µl de cloruro de calcio precalentado a 37 °C en un tubo separado en el baño maría, dispensando desde una altura de 1 cm por encima del nivel de la mezcla de reacción, con la punta apoyada contra la pared del tubo de ensayo, e inmediatamente inicie un nuevo cronómetro con la otra mano.
- Agite el tubo suavemente para mezclar el contenido, con el tubo sumergido en el agua.
- Coloque el tubo en la rejilla en el baño maría.
- Coloque la pipeta.
- El tubo de ensayo debe mantenerse manualmente en el agua, con el agua cubriendo los 5 cm inferiores del tubo (Figura 1).
- La titulación manual del tubo debe comenzar 15 segundos después de poner en marcha el cronómetro.
- El tubo debe inclinarse en un ángulo de casi 90°, sacando el tubo del agua durante 2 segundos y volviéndolo a meter en el agua durante 1 segundo (Figura 1). Tenga en cuenta que inclinar a 90° o más generalmente hará que la mezcla de reacción se derrame fuera del tubo.
- El tubo no debe estar inmóvil durante este ciclo, sino inclinado continuamente con la mano del operador apoyada en el costado del baño maría.
- Este ciclo se repite hasta que se forma el coágulo.
- En posición horizontal, el tubo se mantiene a no más de 10 cm y no menos de 2 cm por encima del nivel del agua (Figura 1).
- Antes de que la mezcla se coagule, el operador observa que la mezcla fluye desde el fondo hasta tres cuartas partes de la longitud del tubo en posición casi horizontal y de regreso al fondo.
- Cuando comienza la coagulación, la velocidad del flujo se reduce.
- Cuando se detiene el flujo, el operador detiene el temporizador y registra el tiempo de coagulación en segundos con un decimal.

Tiempo de trombina y fibrinógeno por la técnica manual de tubo basculante: Los métodos manuales de tubo basculante deben utilizar las proporciones de reactivos y plasma o diluciones plasmáticas recomendadas por el fabricante del reactivo y seguir los principios de los métodos descritos anteriormente para TP/TTPA.

Muestras con lipidemia: Muchos coagulómetros en uso actual que utilizan puntos finales fotoópticos para el análisis, son muy tolerantes a los niveles altos de lípidos en las muestras. Sin embargo, ocasionalmente las muestras pueden tener un nivel tan alto de lípidos que el analizador no puede detectar la formación de coágulos. Dichas muestras se pueden analizar manualmente y, por lo general, producen un coágulo sólido que se puede observar visualmente para el tiempo de TP, TTPA y trombina. Puede ser difícil observar la formación de coágulos durante el análisis de Clauss de fibrinógeno de dichas muestras. Si ese es el caso, otra opción es someter las muestras a centrifugación a 10.000 g durante 10 minutos a temperatura ambiente, si está disponible (orientación del ICSH; Kitchen et al, 2021). Después de esta ultracentrifugación, el lípido se sedimenta y la muestra se puede analizar en un coagulómetro automatizado si está disponible, o mediante la técnica manual de tubo basculante para TP, TTPA, tiempo de trombina o fibrinógeno.

Muestras con anomalías del fibrinógeno: La formación de coágulos puede alterarse en presencia de algunas anomalías del fibrinógeno. Por ejemplo, el fibrinógeno Longmont se asocia con un coágulo débil y translúcido durante el ensayo de fibrinógeno de Clauss. Es posible que los sistemas fotoópticos que monitorean la luz dispersa a medida que se forma el coágulo (a diferencia del monitoreo de luz transmitida) no puedan detectar el punto final. Dichas muestras se pueden analizar utilizando el método de tubo inclinable, pero el operador debe ser consciente de que la formación de coágulos puede ser difícil de discernir visualmente. Para algunas muestras de disfibrinogenemia en las que falla el análisis automatizado, la técnica manual debe realizarse con un escrutinio muy cuidadoso del proceso de coagulación, ya que

los coágulos pueden ser frágiles y fácilmente interrumpidos por la mezcla/inclinación adicional después de que se haya formado el coágulo inicial.

Control de calidad: El material de control de calidad, como se describe en otra parte de este manual para TP, TTPA, tiempo de trombina y fibrinógeno, es adecuado para su uso con métodos de prueba manuales. Es aceptable probar un solo nivel de CCI, donde la técnica manual se reserva para muestras ocasionales que fallan el análisis automatizado. Se debe disponer de dos niveles y probarlos de acuerdo con los criterios descritos en otras partes de este manual, donde las pruebas manuales son el procedimiento analítico principal en el laboratorio.

El rango de resultados de CCI obtenidos por un pequeño grupo de diferentes operadores experimentados en la técnica de tubo basculante manual debe ser típicamente el siguiente:

Media de +/-1 segundo para un control de calidad con un TP medio en el rango de 10 a 12 segundos.

Media de +/- 2,5 segundos para un control de calidad con un TTPA medio en el rango de 25 a 30 segundos.

Media de +/- 2,5 segundos para un control de calidad con un tiempo medio de trombina en el rango de 12 a 20 segundos.

Media de +/- 0,5 g/l para un control de calidad con una media de fibrinógeno de 2,5 a 3 g/l

Rangos normales: Los resultados de las pruebas manuales suelen ser diferentes de los generados por los coagulómetros. Por lo general, los tiempos de coagulación para TP y TTPA son más cortos para los analizadores que utilizan fotópica para monitorear la coagulación en comparación con los resultados que se obtienen manualmente. El grado de diferencia no es consistente entre los diferentes analizadores que pueden utilizar luz transmitida o dispersa. Los analizadores monitorean el cambio en la dispersión/transmisión de luz a lo largo del tiempo después de que se inicia la coagulación y registran el tiempo de coagulación como el tiempo que se tarda en exceder un umbral particular de cambio. Puede ser un umbral de cambio tan bajo como el 3% con respecto a la línea de base o un cambio máximo como el 50%. Cuanto menor sea el cambio porcentual utilizado en el análisis de la curva de coagulación, menor será el tiempo de coagulación reportado. Esto significa que los resultados de las pruebas manuales no deben notificarse junto con un rango de referencia establecido para una técnica automatizada, incluso cuando se utilizan los mismos reactivos. Hay dos opciones para tratar este problema. Una es establecer un rango de referencia para la técnica manual utilizando el proceso descrito en otra parte de este manual. Esto debe hacerse si todas las pruebas en el laboratorio se llevan a cabo utilizando técnicas manuales. Más a menudo, las pruebas manuales se restringen a un pequeño subgrupo de muestras en las que el análisis automatizado ha fallado. En este caso, la mayoría de los resultados publicados por el laboratorio se emitirán con el rango de referencia automatizado correspondiente. No es útil para los usuarios del servicio ver resultados ocasionales de TP o TTPA emitidos con un rango de referencia diferente. En este caso, el laboratorio puede adoptar un enfoque pragmático y utilizar una tabla de conversión como se describe a continuación, de modo que la prueba se realice mediante técnica manual, pero el resultado de la prueba se convierta en el resultado que se habría obtenido si la muestra se hubiera analizado mediante el método automatizado.

Conversión de los resultados manuales de TP, TTPA y tiempo de trombina en números equivalentes automatizados: Una serie de 20 a 30 muestras que cubran un rango de resultados normales y anormales debe analizarse utilizando métodos manuales y automatizados. Los datos deben analizarse mediante análisis de regresión para establecer la relación entre los resultados obtenidos con los dos métodos. Debe haber una correlación significativa entre los resultados, con un coeficiente de correlación >0,8. Si es así, la relación de regresión se puede utilizar para crear una tabla que muestre el resultado manual y el resultado equivalente que se habría obtenido en el sistema automatizado. Cuando se realiza una prueba manual, el resultado manual se convierte en el resultado automatizado, que luego se reporta junto con el rango de referencia del método automatizado habitual. Esto significa que los usuarios del servicio solo

verán un único rango de referencia para el tiempo de TP, TTPA o trombina. Esto es importante, ya que es probable que estos rangos de referencia se incorporen a los protocolos clínicos utilizados para el manejo de los pacientes. En la Tabla 5 se muestran los resultados manuales y automatizados obtenidos al analizar las mismas 21 muestras utilizando ambos métodos.

Tabla 5. TTPA manuales y automatizados en las mismas muestras

Número de muestra	TTPA manual (seg)	TTPA Automatizado (seg)	Número de muestra	TTPA manual (seg)	TTPA automatizado (seg)
1	31.7	27.0	12	31.7	30.1
2	51.1	46.9	13	31.9	28.9
3	27.2	26.5	14	36.2	33.2
4	42.2	39.4	15	33.1	28.5
5	34.5	30.4	16	40.0	36.4
6	44.2	43.2	17	37.1	30.7
7	33.0	30.5	18	29.2	25.6
8	31.9	30.0	19	35.2	28.1
9	22.2	19.6	20	37.1	34.7
10	34.0	27.8	21	36.5	31.4
11	32.5	31.3			

La relación de regresión lineal entre los dos conjuntos de datos se calcula utilizando un paquete de estadísticas. En este ejemplo, el coeficiente de correlación (r) es 0,96 y la relación de regresión se calcula de la siguiente manera:

$$y = 0,9551x - 1,887$$

Dónde

y es el TTPA automatizado,

x es el TTPA manual

0,9551 es la pendiente de la recta de regresión lineal

- 1.887 es la intersección en el eje de la y.

Esta ecuación se utiliza para derivar el TTPA automatizado a partir del TTPA determinado manualmente de cualquier muestra de prueba. Es conveniente preparar una tabla que relacione el TTPA manual con el resultado equivalente automatizado. La Tabla 6 se obtuvo utilizando la ecuación de regresión anterior.

Tabla 6. Tabla de conversión: TTPA manual a TTPA equivalente automatizado

TTPA manual (seg)	TTPA automatizado (seg)	TTPA manual (seg)	TTPA automatizado (seg)	TTPA manual (seg)	TTPA automatizado (seg)
19	16.3	40	36.3	61	56.4
20	17.2	41	37.3	62	57.3
21	18.2	42	38.2	63	58.3
22	19.1	43	39.2	64	29.2
23	20.1	44	40.1	65	60.2
24	21.0	45	41.1	66	61.2
25	22.0	46	42.0	67	52.1
26	22.9	47	43.0	68	63.1
27	23.9	48	44.0	69	64.0
28	24.9	49	44.9	70	65.0
29	25.8	50	45.9	71	65.9
30	26.8	51	46.8	72	66.9
31	27.8	52	47.8	73	67.8
32	28.7	53	48.7	74	68.8
33	29.6	54	49.7	75	69.8
34	30.6	55	50.7	76	70.7
35	31.5	56	51.6	77	81.7
36	32.5	57	52.6	78	82.6
37	33.4	58	53.5	79	73.6
38	34.4	59	54.5	80	74.5
39	35.4	60	55.4		

Ensayo manual de fibrinógeno de Clauss: Los requisitos y métodos utilizados para el ensayo manual de fibrinógeno de Clauss son los mismos que para la versión automatizada (es decir, la misma solución amortiguadora, trombina y dilución de la muestra de ensayo). El tiempo de coagulación de las pruebas manuales se convierte en concentración de fibrinógeno mediante una curva de calibración. La curva de calibración debe construirse utilizando el mismo calibrador y las mismas diluciones del calibrador que se utilizarían para las pruebas automatizadas (consulte la sección de ensayos de Clauss en otra parte de este manual); sin embargo, los tiempos de coagulación de cada dilución del calibrador utilizada para construir la curva de calibración se determinan manualmente. De este modo, los resultados se convierten en concentración de fibrinógeno y el resultado se presenta en el mismo formato que la versión automatizada (g/l o mg/dl) utilizando el mismo rango de referencia que para el método de Clauss automatizado en el mismo centro.

Referencias

Kitchen S, Adcock DM, Dauer R, Kristoffersen AH, Lippi G, Mackie I, Marlar RA, Nair S. Recomendaciones del Consejo Internacional de Normalización en Hematología (ICSH) para el procesamiento de muestras de sangre para pruebas de coagulación. *Int J Lab Hematol* 2021; 43(6): 1272-1283.

van den Besselaar A, van Rijn CJJ, Abdoel CF, Chantarangkul V, Scalabrino E, Kitchen S, Tripod! A, Woolley AM, Radovan L, Cobbaert CM. Allnando el camino para establecer un sistema de medición de referencia para la estandarización del tiempo de protrombina plasmática: Armonizando el método de tubo basculante manual. *J Thromb Haemost* 2020; 18(8): 1986-1994.

TEMAS TRATADOS

- ✓ Prueba de tiempo de sangrado
 - ✓ Tiempo de protrombina (TP)
 - ✓ Tiempo de Tromboplastina Parcial Activada (TTPA)
 - ✓ Pruebas de mezcla para la investigación adicional de TP y TTPA anormales
 - ✓ Tiempo de coagulación de la trombina
 - ✓ Tiempo de trombina en presencia de sulfato de protamina para detectar la presencia de heparina
 - ✓ Tiempo de reptilasa
 - ✓ Fibrinógeno (ensayo de Clauss modificado)
 - ✓ Eliminación de la heparina del plasma
-

Prueba de tiempo de sangrado: La prueba de tiempo de sangrado se desarrolló históricamente para evaluar preoperatoriamente la capacidad de los pacientes para mantener un patrón de sangrado normal mientras se someten a procedimientos quirúrgicos importantes, o pacientes que se sospecha que tienen un trastorno hemorrágico debido a la disfunción plaquetaria. Desafortunadamente, se ha confirmado que la prueba es irreproducible e insensible, por lo que, si se debe usar, debe combinarse con una historia clínica y familiar completa, con pruebas de detección de coagulación complementarias, que incluyan recuento de plaquetas y morfología. El PFA 100/200 ha sustituido en gran medida a la prueba del tiempo de sangrado en la evaluación de la función plaquetaria a pesar de sus insuficiencias observadas en pacientes trombocitopénicos (Rodgers y Levin, 2023; Undas, 2023).

El tiempo de sangrado es el tiempo que tarda un corte de piel estandarizado de profundidad y longitud fijas en detener el sangrado. La prolongación del tiempo de sangrado se produce en pacientes con trombocitopenia, enfermedad de von Willebrand (EVW) tipo 3 y tipo 2B, trombastenia de Glanzmann, síndrome de Bernard-Soulier, enfermedad por plasma acumulado almacenado, otros trastornos plaquetarios, sepsis (Williams et al, 2024), enfermedades autoinmunes, deficiencia de vitaminas, anemia grave, neoplasias hematológicas malignas (por ejemplo, trastornos mieloproliferativos que dan lugar a una deficiencia de factor V) y reacción a fármacos (Vinholt et al, 2019). El fibrinógeno es necesario para detener el sangrado, y se ha sugerido un papel para FV. Por lo tanto, el tiempo de sangrado puede prolongarse en pacientes con deficiencia de fibrinógeno o FV. La prolongación del tiempo de sangrado también ocurre en algunos pacientes con enfermedad renal, disproteinemias y trastornos vasculares (Russeau et al, 2023; Bourguignon et al, 2022).

Materiales y equipos:

- ✓ Esfigmomanómetro
- ✓ Hisopos para limpiar
- ✓ Dispositivo de plantilla de tiempo de sangrado
- ✓ Papel de filtro de 1 mm de grosor
- ✓ Cronómetro

Método:

- ✓ El manguito del esfigmomanómetro se coloca alrededor de la parte superior del brazo, se coloca a la altura del corazón y se insufla a 40 mm de mercurio. Esta presión se mantiene durante toda la prueba.
- ✓ Se limpia la superficie dorsal del antebrazo y se coloca firmemente el dispositivo de tiempo de sangrado contra la piel sin presionar. El gatillo se está presionando y el cronómetro se ha puesto en marcha.
- ✓ Deben evitarse las venas superficiales, las cicatrices y los hematomas.

- ✓ A intervalos de 30 segundos, seque el flujo de sangre con papel de filtro. Acerque el papel de filtro a las incisiones sin tocar el borde de la herida.
- ✓ Registre el tiempo desde la punción hasta el cese de la hemorragia.



Figura 2. Diagrama de flujo que demuestra la prueba de tiempo de sangrado. (Tomado de la plantilla de Sally Kim para “Medición de la presión arterial: el método auscultatorio” en biorender.com).

Interpretación: El rango normal en adultos es de 2 a 7 minutos (hasta 8 minutos), pero puede variar según el método utilizado.

Notas: Se debe establecer un rango normal localmente, independientemente del dispositivo utilizado. La incisión debe hacerse en una dirección paralela a la longitud del brazo. Los cortes hechos perpendicularmente sangran por más tiempo. Debe repetirse si se obtiene un resultado anormal. No es necesario registrar los puntos finales si el sangrado continúa más allá de los 20 minutos. Se debe considerar el efecto de los fármacos que interfieren con la función plaquetaria. Por ejemplo, los medicamentos que contienen aspirina pueden causar prolongación en la coagulación. Por lo tanto, siempre que sea posible, no deben tomarse durante los siete días anteriores a la prueba. Existe la posibilidad de cicatrices y, a veces, formación de hematomas en el sitio de las incisiones en el tiempo de sangrado. Esto debe ser puesto en conocimiento de los pacientes antes de realizar la incisión. El tiempo de sangrado en las mujeres embarazadas puede ser engañoso debido a los niveles fisiológicamente elevados de FVIII y FVW. El manguito del esfigmomanómetro en uso debe calibrarse regularmente según las guías de estándares de calidad vigentes. El método de Duke para el tiempo de sangrado tiene una mayor tasa de imprecisión con un mayor riesgo de desarrollo de hematomas (Russeau et al, 2023). Dado que el tiempo de sangrado se realiza a pie de cama, se deben aplicar todos los procedimientos estándar relativos a los requisitos de calidad de POCT para promover la seguridad del paciente (ISO 15189:2022). En caso de que se sospeche que un paciente tiene la enfermedad de Von Willebrand y su laboratorio tenga la capacidad, se deben realizar las siguientes pruebas/ensayos además de obtener un historial completo de sangrado: antígeno de FVW, actividad de FVW, ensayo de FVIII, hemograma completo (incluidos los recuentos de plaquetas y morfología) y pruebas básicas de detección de coagulación (TP, TTPA, TT, fibrinógeno). Estas pruebas/ensayos darían una mejor comprensión de cuál podría ser el diagnóstico clínico en ausencia de tiempo de sangrado o de un laboratorio de coagulación especial capaz de hacer un diagnóstico definitivo de la EVW.

Tiempo de protrombina (TP): El TP evalúa la integridad del sistema extrínseco. Es muy útil en la detección de deficiencias de factores de coagulación que pueden ser cualitativas o cuantitativas de las vías extrínsecas y comunes. También es útil para monitorizar anticoagulantes antagonistas de la vitamina K (AVK) como la warfarina, y detectar enfermedad hepática, deficiencia de vitamina K, deficiencia de FX por amiloidosis, coagulación intravascular diseminada (CID), presencia de anticoagulantes orales directos (ACOD) de forma dosis-dependiente o anticuerpos contra factores de la vía extrínseca. Estas condiciones

pueden prolongar los resultados de la prueba de TP (Dorgalaleh et al, 2021). La TP es sensible a los cambios en los factores V, VII y X, y menos al FII (protrombina). No es adecuado para detectar cambios menores en el nivel de fibrinógeno, ya que los resultados pueden ser anormales si el nivel de fibrinógeno es muy bajo o si hay un inhibidor presente. La sensibilidad de la prueba está influenciada por los reactivos y la técnica utilizada, y es importante establecer un rango de referencia localmente. La vía medida por TP se muestra en la Figura 3. El reactivo TP, a menudo denominado tromboplastina, contiene factor tisular y fosfolípidos. Hay muchos reactivos adecuados disponibles en el mercado.

Reactivos:

- ✓ Tromboplastina (puede contener cloruro de calcio)
- ✓ Cloruro de calcio 25 mM (necesario solo si el reactivo de tromboplastina no contiene calcio)

Método: La técnica manual del tubo basculante se describe en la Parte 4 de este manual. Se deben seguir las recomendaciones del fabricante del reactivo. Cuando se utiliza un nuevo reactivo de tromboplastina que tiene un número de lote diferente al anterior, se debe trazar una nueva curva de calibración.

Interpretación: Los tiempos de coagulación normalmente se ven influenciados por el uso de diferentes coagulómetros, dependiendo de cómo y cuándo se detecta el punto final. Esto enfatiza aún más la importancia de establecer rangos normales para el método actualmente en uso en el laboratorio y basados en la población local. En presencia de deficiencias leves de factor II, V, VII o X, el grado de prolongación puede ser mínimo. En el caso de deficiencia de FII, el TP puede estar dentro del rango normal. Algunos reactivos de TP pueden verse afectados por la presencia de anticoagulantes lúpicos/anticuerpos antifosfolípidos, y algunos tipos raros de anticuerpos pueden prolongar el TP sin ninguna prolongación del TTPA. Los reactivos con concentraciones más bajas de fosfolípidos tienen más probabilidades de verse afectados, incluidos algunos reactivos que se construyen mediante la lipidación del factor tisular recombinante. La presencia de FVII activado, ya sea después de la terapia con FVIIa recombinante o cuando se ha activado el FVII nativo, puede acortar el TP. El efecto depende del reactivo de factor tisular utilizado. Los reactivos que contienen factor de tejido bovino son particularmente susceptibles a este efecto (Kitchen et al, 1992). La sangre entera para la determinación de la TP puede ser estable durante al menos 24 horas, dependiendo del reactivo utilizado (Baglin y Luddington, 1997). Los TP determinados con reactivos que contienen factor tisular humano pueden ser diferentes de los obtenidos con reactivos que contienen factor tisular de otras especies, como el conejo. En tales casos, el resultado obtenido con los reactivos de factor tisular humano puede ser más indicativo de riesgo de sangrado. Para obtener una discusión completa de los problemas relacionados con la determinación de TP, lea las guías actuales del CLSI sobre TP y TTPA de una etapa (2023).

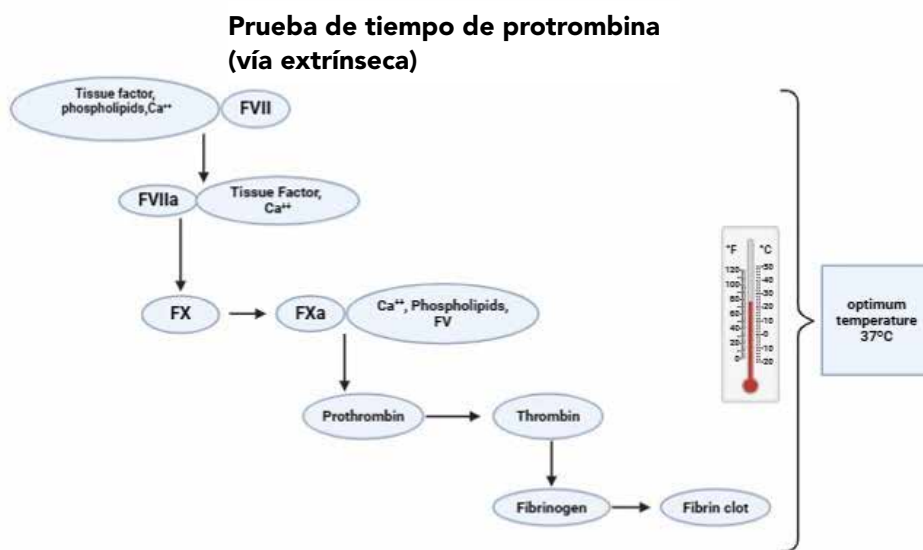


Figura 3. Vía medida por la prueba TP

Tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPA): se trata de un ensayo basado en la formación de coágulos que ayuda a identificar deficiencias de factores de coagulación o inhibidores de las vías intrínsecas y comunes. Tomada junto con un tiempo normal de protrombina, es la prueba de cribado más útil para detectar deficiencias de los factores VIII, IX, XI y XII. El TTPA también se prolongará en cualquier deficiencia que involucre las vías comunes (deficiencias de los factores V, X y II, y fibrinógeno) y en presencia de inhibidores. La presencia de algunos inhibidores terapéuticos de la coagulación, como la heparina, también prolongará el TTPA. Es importante excluir la posibilidad de que dichos tratamientos se hayan empleado en la investigación inicial de los TTPA prolongados. El TTPA se prolonga en presencia de deficiencia de PK o HMWK, a menos que la prueba se realice utilizando un reactivo que contenga ácido elálgico como activador (Turi, 1986). En ese caso, el TTPA será normal, incluso en ausencia total de estos factores. Es aconsejable tener en cuenta que cada laboratorio debe determinar sus rangos normales de TTPA en función de la población local, el tipo de reactivo de TTPA y el coagulómetro en uso. El reactivo TTPA contiene fosfolípidos diluidos y activadores de contacto como sílice, ácido elálgico y caolín. Esto se añade al plasma citratado pobre en plaquetas a 37 °C. Esta mezcla se incuba a 37 °C durante un tiempo específico para permitir que se produzcan los factores de contacto, luego la adición de cloruro de calcio conduce a la formación del coágulo de fibrina. El tiempo que se tarda en formar un coágulo se registra en segundos. La vía medida por el TTPA se muestra en la Figura 4.

Reactivos:

- ✓ Reactivo TTPA
- ✓ Cloruro de calcio 25mM

Método: La técnica manual del tubo basculante se describe en la Parte 4 de este manual. Se deben seguir las recomendaciones del fabricante del reactivo.

Interpretación: Un rango normal siempre debe establecerse localmente. Un TTAP prolongado con un TP normal indica una posible deficiencia de los factores VIII, IX, XI, XII, HMWK, PK o la presencia de un inhibidor. En los casos de un TTPA prolongado, se debe analizar una mezcla igual de plasma normal y de prueba (es decir, una mezcla de 1 parte de plasma de prueba por 1 parte de plasma normal, llamada mezcla 50:50, como se indica abajo). Si el TTPA corrige en más del 50% la diferencia entre los tiempos de coagulación del plasma normal y el del plasma de prueba, se indica una deficiencia del factor (los detalles se describen en el tema específico a continuación). Una mala corrección sugiere un inhibidor, posiblemente de uno de los factores de coagulación del sistema o de tipo inespecífico, como el anticoagulante lúpico.

Tabla 7. Un ejemplo de interpretación de la TTAP prolongad

Muestra	Resultado
Control TTPA	35 segundos
Prueba	60 segundos
Si la mezcla 50:50	42 segundos (esta es una buena corrección, por lo que probablemente haya una deficiencia de factores)
Si la mezcla 50:50	52 segundos (esta es una mala corrección, por lo que es probable que haya un inhibidor presente)

Investigación del TTPA prolongado aislado: Para los pacientes con un TP normal y un TTPA prolongado, la secuencia normal de investigación a seguir es:

- ✓ Determinar el tiempo de trombina. Si es normal, proceda a seguir los pasos. Si el tiempo de trombina es prolongado, repetir en presencia de sulfato de protamina. Si el tiempo de trombina se corrige a la normalidad, esto sugiere que hay heparina presente, y no se requieren pruebas adicionales a continuación. Si no se sabe que el paciente está recibiendo heparina de ningún tipo, se debe solicitar una muestra repetida.

- ✓ Determinar el TTPA en mezclas de plasma normal y de paciente utilizando una mezcla 1:1 (50%) de normal:paciente. El hecho de que la mezcla al 50% no corrija el TTPA a la normalidad puede indicar la presencia de un inhibidor (los detalles se describen más abajo).
- ✓ Determinar el TTPA con un segundo reactivo que contenga fosfolípidos de alta concentración, como la actina FS (Dade Behring). Si el TTPA inicial se prolonga claramente (al menos tres segundos por encima del límite superior de uso normal) y la actina FS es normal, entonces el anticoagulante lúpico es la causa probable. Esto puede confirmarse posteriormente mediante pruebas específicas como el tiempo de envenenamiento de la víbora de Russell diluido, aunque normalmente no es necesario en ausencia de cualquier requisito para investigar un posible anticoagulante lúpico como factor de riesgo para la trombosis. En muy raras ocasiones, la deficiencia de PK es la otra causa posible de TTPA normal con actina FS y prolongación marcada de la TTPA con un reactivo que utiliza sílice o caolín como activador. Como la mayoría de los casos de anticoagulante lúpico, este no se asocia con ningún riesgo de sangrado. Por lo tanto, nuevamente, es posible que no se requiera confirmación. Cuando el TTPA inicial es claramente prolongado (tres o más segundos) y el TTPA de actina FS es normal, no es necesario realizar ensayos factoriales.
- ✓ Si ambos TTPA se prolongan, realice ensayos con FVIII:C, FIX y FXI. Se puede realizar un ensayo FXII si es necesario, ya que la deficiencia es relativamente común y la detección de esta puede explicar la prolongación del TTPA. Esto no es necesario para excluir la presencia de un trastorno hemorrágico, ya que la deficiencia de FXII no se asocia con un mayor riesgo de sangrado.
- ✓ Los reactivos como la actina FS, que emplean ácido elágico como activador de contacto, se asocian con resultados normales en presencia de una deficiencia incluso grave de PK.

Notas: Hay muchos reactivos adecuados disponibles en el mercado. Estos incluyen materiales con diferentes sensibilidades. En cuanto a la TP, los tiempos de coagulación pueden verse influenciados por el uso de un coagulómetro. Históricamente, la investigación ha demostrado que hay mucha variabilidad en las pruebas de TTPA, como se observa en la variación de los resultados de diferentes reactivos, las variaciones de los resultados de diferentes coagulómetros y la variación de los resultados de las pruebas de muestras similares en diferentes laboratorios. Esta evidencia lleva a la necesidad de adherirse al establecimiento de rangos normales locales para coagulómetros específicos y reactivos TTPA. Dentro de los plasmas de prueba, los niveles altos de un factor de coagulación pueden compensar los niveles más bajos de otros factores. Por ejemplo, un FVIII marcadamente elevado durante la reacción de fase aguda puede conducir a un TTPA normal en presencia de reducciones de FIX o FXI, lo que podría ser clínicamente importante. Si un paciente tiene los antecedentes personales o familiares apropiados que sugieren un trastorno hemorrágico, puede estar justificado realizar investigaciones adicionales, incluidas pruebas de factores específicos, en presencia de un TTPA normal, particularmente si el resultado se encuentra en la parte superior del rango de referencia. La concentración de fosfolípidos varía notablemente entre los reactivos. Esta es una de las razones por las que los reactivos varían considerablemente en su sensibilidad a la presencia de anticoagulantes lúpicos. Si se utiliza un reactivo sensible al lupus para el TTPA inicial, es útil realizar un segundo TTPA utilizando un reactivo como Actin FS (Dade Behring, Marburgo, Alemania), que tiene una concentración de fosfolípidos muy alta (Kitchen et al, 1999). Si la prolongación con el primer reactivo es causada por un anticoagulante lúpico, entonces el segundo TTPA es casi siempre normal, ya que muy pocos anticoagulantes lúpicos prolongan el TTPA cuando se usa Actina FS.

Un TTAP normal con FS de actina, combinado con un TTAP inicial prolongado, normalmente excluye la presencia de deficiencia de FVIII, FIX o FXI, y en este caso, no hay necesidad de ensayos factoriales. En raras ocasiones, puede producirse un TTPA normal con cualquier reactivo cuando FIX o FXI se reducen ligeramente (30 a 50 U/dl) y el FVIII está marcadamente elevado. El TTPA con actina FS suele ser normal cuando el FXII se reduce en el rango de 20 a 50 U/dl y el TTPA con activación a base de caolín o sílice está ligeramente elevado. Este defecto no tiene relevancia clínica. Unos pocos anticoagulantes potentes contra el lupus prolongan el TTPA con actina FS. Los anticuerpos específicos contra FVIII, FIX o FXI prolongan el TTPA, independientemente del reactivo. Para un análisis completo de las cuestiones relacionadas con la determinación de la TTPA, véase CLSI (2023).

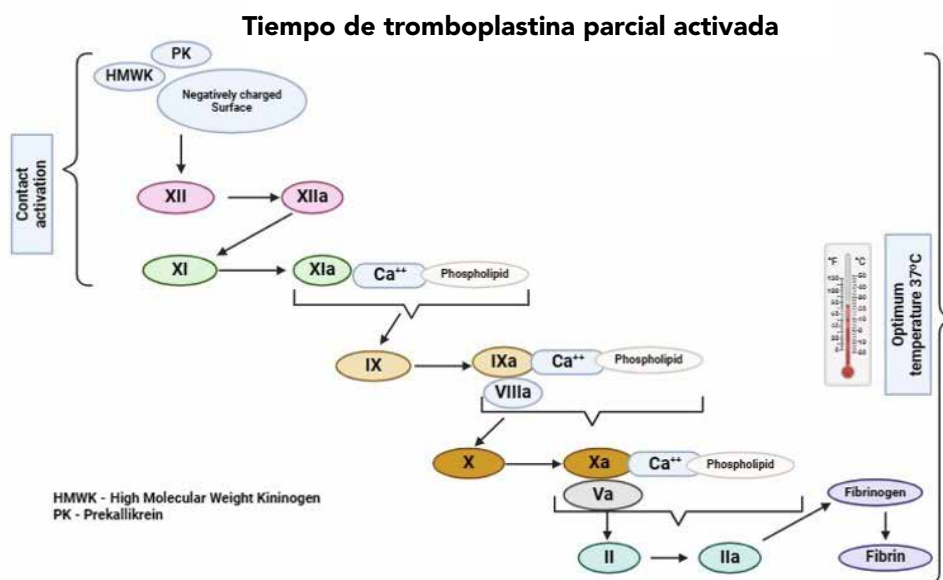


Figura 4. La vía medida por TTPA

Pruebas de mezcla para una investigación adicional de TP y TTPA anormales: Las pruebas de mezcla se realizan en gran medida cuando el TP o TTPA basal es prolongado, y es necesario identificar la causa de la prolongación para que se puedan realizar pruebas adicionales para llegar a un diagnóstico. Se ha identificado mucha variabilidad en la forma en que se realizan e interpretan las pruebas de mezcla. El conocimiento sobre el comportamiento de las deficiencias de factores e inhibidores en los estudios de mezcla es primordial, además de los factores que pueden influir en el rendimiento e interpretación de las pruebas de mezcla (Figura 5) (Favaloro, 2020; Adcock et al, 2023). El plasma del paciente y la PNP se mezclan en porciones iguales (es decir, 50:50) y la prueba previamente prolongada se realiza en esta mezcla. Se deben utilizar los controles apropiados (PNP mezclado con plasma que contiene inhibidor y PNP mezclado con plasma que contiene una deficiencia de factor). Existen varios métodos de interpretación y cada laboratorio debe establecer sus rangos de corte. Además, cada laboratorio debe establecer los intervalos de referencia normales para la TP y la TTPA en función de la población local para guiar la interpretación precisa de los resultados (Adcock et al, 2023).

Procedimiento:

- ✓ Mezclar porciones iguales de PNP y plasma del paciente (50:50) y preparar para la prueba previamente prolongada (en este caso se aplicará TTPA).

Si se corrige el resultado de TTPA obtenido de la mezcla normal de control y plasma del paciente en comparación con el resultado original de TTPA prolongado, se pueden realizar pruebas de mezcla adicionales para identificar el factor que es deficiente en el paciente. Se puede realizar un segundo lote de pruebas de mezcla utilizando un tubo que contiene una mezcla de plasma del paciente y plasma deficiente en FVIII en porciones iguales, y un segundo tubo que contiene una mezcla igual de plasma deficiente en FIX con el plasma del paciente. Se realiza una prueba TTPA en ambas mezclas. El resultado de TTPA que muestra una corrección indica una deficiencia de FVIII o FIX (Tabla 8).

Estas dos mezclas solo se realizan si la historia clínica del paciente es sugestiva de una deficiencia intrínseca del factor de la vía en laboratorios que no tienen la capacidad de realizar ensayos factoriales.

Interpretación de las pruebas de mezcla: Si el TTPA corrige en más del 50% la diferencia entre los tiempos de coagulación del plasma normal y el de prueba, se indica una deficiencia del factor, como se ha comentado anteriormente. Una mala corrección sugiere un inhibidor, posiblemente de uno de los factores de

coagulación del sistema o de tipo inespecífico, como el anticoagulante lúpico. También podemos utilizar el porcentaje de cálculo (%) de corrección para la interpretación de la prueba de mezcla, como se muestra a continuación.

$$(\%) \text{ Corrección} = \frac{(\text{TTPA del paciente} - \text{TTPA de la mezcla})}{(\text{TTPA del paciente} - \text{TTPA NPP})} \times 100$$

Corrección = % el valor está por encima o igual al punto de corte establecido localmente

Sin corrección = % el valor está por debajo del valor de corte establecido localmente

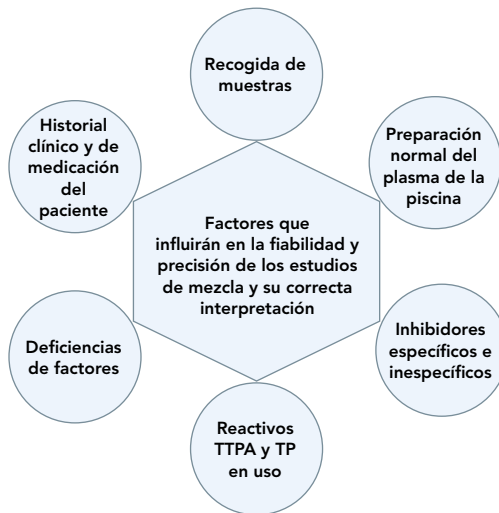


Figura 5. Diagrama desarrollado en biorender.com utilizando información obtenida de Adcock et al. (2023).

Como se destaca en Adcock et al (2023), hay varios factores que influyen en la precisión de las pruebas de mezcla. Un factor importante es conocer el historial clínico y de medicación del paciente. Otros factores importantes incluyen si la recolección de la muestra se llevó a cabo según los estándares aceptados, si el paciente tiene antecedentes de una deficiencia de factor, el tipo de reactivos utilizados y su sensibilidad (especialmente a las deficiencias leves de factor e inhibidores), el establecimiento de intervalos de referencia normales para las pruebas de detección con muestras normales de la población local, la preparación del plasma normal del grupo y los niveles de concentración de factores de coagulación (al menos 80%). y si los inhibidores específicos o inespecíficos son de naturaleza endógena o exógena. Una mejor comprensión de estos factores mejorará la capacidad de los laboratorios para interpretar correctamente los resultados de las pruebas de mezcla.

Plasma deficiente en FVIII/FIX para estudio de mezcla: El plasma de pacientes con deficiencia severa aislada (<1 UI/dl) de FVIII o FIX es muy útil para estudios de mezcla. El plasma seleccionado para este propósito debe tener un TP normal, lo que confirma que es probable que los otros factores de coagulación sintetizados en el hígado estén en niveles normales. Dichos plasmas pueden liofilizarse para su almacenamiento a largo plazo o almacenarse como plasma a -35 °C (o menos) durante al menos tres meses. Mediante el uso de mezclas 50:50 de aditivo y plasma del paciente, se puede caracterizar una anomalía. En situaciones en las que hay una prolongación aislada del TTPA, es preferible el plasma deficiente en FVIII al plasma envejecido. Del mismo modo, el plasma deficiente en FIX es preferible al plasma adsorbido.

Es ético obtener el consentimiento informado del paciente antes de obtener una muestra para su uso en pruebas de mezcla. Se debe establecer un estado negativo del inhibidor antes de recolectar muestras para las pruebas de mezcla.

Tabla 8. Patrón de mezcla de los resultados de las pruebas en presencia de deficiencias de factores individuales

Defecto en el plasma de prueba	TTPA	FVIII- deficiente	Deficiente en FIX	Plasma normal
FVIII	Anormal	No corregido	Corregido	Corregido
FIX	Anormal	Corregido	No corregido	Corregido
FXI/FXII	Anormal	Corregido	Corregido	Corregido
Inhibidor	Anormal	No corregido	No corregido	No corregido

Defecto en el plasma de prueba	TP	TTPA	Plasma normal
FII	Anormal	Anormal	Corregido
FV	Anormal	Anormal	Corregido
FVII	Anormal	norma	Corregido
FX	Anormal	Anormal	Corregido

Notas: La muestra de coagulación debe contener un recuento de plaquetas de $<10 \times 10^9/l$ para proporcionar un contenido mínimo de fosfolípidos y permitir la detección de anticoagulantes lúpicos débiles (Toulon et al, 2016). Los estudios de mezcla solo deben realizarse en el mismo plasma del que se ha obtenido un resultado prolongado. Si por alguna razón se extrajo una nueva muestra del paciente, se debe repetir la prueba de referencia anormal antes de realizar la prueba de mezcla. La validación y verificación de nuevos reactivos con nuevos números de lote siempre debe realizarse para garantizar que la sensibilidad del reactivo a los inhibidores y las deficiencias de factores siga estando en el rango aceptable (Toulon et al, 2016). Todas las muestras de coagulación deben recogerse como se describe en la Parte 3 de este manual. Los inhibidores inespecíficos que afectan al TTAP (p. ej., anticoagulante lúpico) generalmente no muestran corrección, aunque los plasmas que contienen inhibidores más débiles o de título bajo pueden corregirse parcialmente con plasma normal.

Inhibidores específicos contra el FVIII: Los inhibidores específicos contra el FVIII pueden estar asociados con la falta de corrección inmediata de la TTPA tras la adición de plasma normal. En otros casos, se produce una corrección inmediata por plasma normal, seguida de un alargamiento de la TTPA en la mezcla con el tiempo. Después de una hora a 37 °C, se debe analizar una mezcla de plasma de prueba y normal, junto con determinaciones de TTPA en plasmas normales y de prueba que se hayan incubado por separado al mismo tiempo. Los inhibidores específicos contra otros factores de coagulación son particularmente raros, pero pueden ocurrir. No es posible generalizar su comportamiento en experimentos de mezcla, excepto que los inhibidores de FIX suelen ser de acción rápida. La Figura 6 muestra cómo cambia el TTPA cuando se agrega un 20% y un 50% de PNP a muestras de sujetos con hemofilia A adquirida con anticuerpos anti-FVIII. El límite superior del rango normal para este método TTPA fue de 37 segundos. Este ejemplo ilustra que, en presencia de anticuerpos anti-FVIII, puede haber una corrección completa en una combinación 50:50 de paciente y PNP en algunos casos. Si estas mezclas se incuban a 37°C, se produce un aumento progresivo del TTPA, ya que los anticuerpos anti-FVIII inhiben el FVIII. El ensayo Nijmegen Bethesda es la prueba "estándar de oro" en la cuantificación de inhibidores presentes en una muestra de plasma después de un cribado positivo. El ensayo cromogénico de Bethesda es la prueba de elección para evaluar los inhibidores en pacientes tratados con emicizumab, ya que se sabe que los resultados del cribado de inhibidores basados en TTPA se acortan en los pacientes tratados con emicizumab (Lowe et al, 2020). Otros inhibidores de los factores de coagulación, como los inhibidores de FXa, se pueden detectar mediante un ensayo de actividad anti-FXa.

Tabla 9. Estudios mixtos en hemofilia A adquirida

Título de Bethesda (U/ml)	TTPA (segundos)	TTPA + 20% plasma normal (segundos)	TTPA + 50% plasma normal (segundos)
1.0	210	137	77
1.1	83	52	38
2.0	82	43	34
6.6	107	51	37
8.4	150	55	39
21	145	62	48
23	123	127	55
120	69	50	38

Tiempo de coagulación de la trombina: El tiempo de coagulación de la trombina (también conocido como tiempo de trombina) es útil para identificar anomalías hereditarias del fibrinógeno, así como anomalías cuantitativas o cualitativas adquiridas. Se sabe que el tiempo de trombina es muy sensible a la presencia de heparina o fármacos como los inhibidores directos de la trombina (IDT) (Bonar et al, 2017). El tiempo de trombina refleja la reacción entre la trombina y el fibrinógeno. Se prolonga cuando el nivel de fibrinógeno es muy bajo (menos de 1,0 g/l); en presencia de heparina, sustancias similares a la heparina, IDT u otros inhibidores (por ejemplo, fibrina/productos de degradación de fibrinógeno [FDP por su sigla en inglés]); y cuando el fibrinógeno es cualitativamente anormal (disfibrinogenemia), incluyendo defectos congénitos y adquiridos secundarios a enfermedad hepática (Mackie et al, 2024).

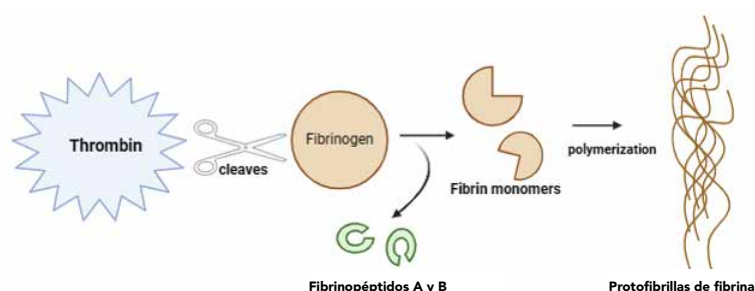


Figura 6. Diagrama de flujo que representa la conversión de fibrinógeno en fibrina en presencia de trombina. Desarrollado con Biorender.

Reactivos:

- ✓ Solución de trombina, que induce la coagulación del plasma normal en unos 15 segundos.
- ✓ Las soluciones más fuertes producen tiempos de coagulación más cortos y pueden ser normales en presencia de defectos leves.

Hay varios reactivos de trombina que están disponibles comercialmente. Algunos tienen dos niveles de diluciones de detección del reactivo de trombina con la solución amortiguadora, y una tercera concentración de reactivo de trombina para muestras con un alto contenido de heparina que sugiere que el paciente está en tratamiento con heparina. Como de costumbre, se recomienda seguir las instrucciones del fabricante y el laboratorio debe establecer rangos de referencia normales locales.

Método: El método manual del tubo basculante se describe en la Parte 4 de este manual. Se deben seguir las recomendaciones del fabricante del reactivo.

Notas: La concentración de trombina utilizada debe ser la que dé un tiempo de coagulación de alrededor de 15 segundos con PNP (control). Si se utiliza trombina concentrada, debe diluirse a alrededor de 10 a 15 U/ml en solución salina y se diluye según sea necesario, hasta obtener el tiempo de control adecuado.

Para todos los reactivos de trombina adquiridos comercialmente, se deben seguir las instrucciones del fabricante sobre la reconstitución, el uso y el almacenamiento. La trombina reconstituida puede almacenarse a $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$ o menos y diluirse antes de su uso. La trombina diluida mantenida a temperatura ambiente se deteriorará. Se debe incluir un control PNP con cada grupo de pruebas. Las muestras de plasma para determinar el tiempo de trombina deben analizarse dentro de las 4 horas posteriores a la recolección de la muestra y dentro de las 2 horas si se sospecha la presencia de heparina. Los niveles altos de heparina en una muestra de paciente que se está analizando para determinar el tiempo de trombina conducirán a la falta de formación de coágulos. Esto también es posible con algunos DTI (Inhibidor Directo de la Trombina por su sigla en inglés), como el dabigatrán. Utilice la prueba de tiempo de reptilasa para confirmar la presencia de DTI o contaminación/presencia de heparina en la muestra del paciente. Ha habido variación en los resultados de los métodos de tiempo de trombina en función del tipo de reactivos y el instrumento de coagulación utilizado, por lo que se recomienda que el resultado de cada paciente se reporte junto con un rango de referencia específico para ese reactivo e instrumento.

Tiempo de trombina en presencia de sulfato de protamina para detectar la presencia de heparina:

La presencia de HNF puede causar una prolongación del tiempo de trombina. Las formas más grandes de heparina, que prolongan el tiempo de trombina, pueden neutralizarse mediante la adición de sulfato de protamina. El sulfato de protamina está disponible en muchas farmacias hospitalarias, donde se utiliza como agente terapéutico para revertir el efecto de la heparina. La concentración de fármaco en las preparaciones terapéuticas es normalmente mucho más alta de lo que es útil para las pruebas de laboratorio. Por lo tanto, si es necesario, el medicamento debe diluirse en solución salina a una concentración de 40 mg% como solución de trabajo. Se prepara una solución de trabajo de trombina con sulfato de protamina mezclando nueve partes de reactivo de trombina con una parte de 40 mg de sulfato de protamina. A continuación, se utiliza en lugar de la solución de trombina. Se debe analizar el control normal. Si el tiempo de trombina se prolonga, pero se corrige dentro de los dos segundos posteriores al resultado del control, se confirma la presencia de heparina.

Reactivos (Hogwood et al, 2017):

- ✓ Solución amortiguadora de barbitona pH 7,4 (Fritsma, 2019)
- ✓ Solución madre de sulfato de protamina: use 5 ml de 10 mg/ml de sulfato de protamina para hacer una dilución de 1/20 con solución amortiguadora de barbitona. A partir de esta solución se pueden preparar diluciones en serie de varias concentraciones de sulfato de protamina. Permanecen estables cuando se almacenan a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- ✓ PPP del paciente
- ✓ Trombina

Método:

- ✓ Diluir en serie el sulfato de protamina en solución amortiguadora de barbitona.
- ✓ Prepare la trombina diluida con solución amortiguadora de barbitona. Cuando se añaden 100 μl de la trombina diluida a 200 μl de plasma del paciente en solución amortiguadora a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, debería permitir la formación de coágulos a 10 segundos.

Interpretación: Si el coágulo se forma en 10 segundos, no hay HNF presente en el plasma del paciente. Si el tiempo es prolongado, hay HNF en el plasma del paciente. El plasma del paciente se mezcla con sulfato de protamina diluido y se vuelve a realizar la prueba. El objetivo es medir el tiempo de trombina en diferentes diluciones de plasma de pacientes y sulfato de protamina que permiten la formación de coágulos dentro de un rango normal.

Tiempo de reptilasa: La reptilasa es un veneno de serpiente obtenido de *Bothrops atrox*. Es una enzima similar a la trombina conocida como batroxobina que actúa escindiendo el fibrinógeno para formar fibrinopéptido A, lo que lleva a la formación de un monómero de fibrina y a la formación de coágulos por polimerización. No es inhibida por la antitrombina, por lo que no se ve afectada por la presencia

de heparina o DTIs. Por lo tanto, se puede utilizar para evaluar la tasa de conversión de fibrinógeno en fibrina en presencia de heparina y DTI (Mackie et al, 2024). Es útil comprobar si un tiempo prolongado de trombina está causado por la presencia de heparina o DTI en la muestra. Si el tiempo de trombina es prolongado y la reptilasa es normal, la causa más probable es la presencia de heparina o un DTI. En presencia de disfibrinogemia, el tiempo de reptilasa puede ser más sensible (es decir, más prolongado) que el tiempo de trombina. La reptilasa añadida al plasma del paciente (PPP) produce batroxobina que escinde el fibrinógeno liberando fibrinopéptido A para formar un monómero de fibrina con formación de coágulos después de la polimerización (Karapetian, 2013).

Reactivos: Reptilasa (Sigma Aldrich, código V5375) disuelta a una concentración de 25 mg en 15 ml de solución amortiguadora de Owren. Este veneno crudo es peligroso y se debe tener cuidado para evitar inhalar el polvo. El operador debe usar guantes y una mascarilla mientras manipula el veneno crudo. La solución madre debe almacenarse ultracongelada a -70 °C en alícuotas de 0,5 ml. Es estable durante al menos dos años en estas condiciones. Para preparar un reactivo listo para usar, descongele y diluya el reactivo madre 1/10 en la solución amortiguadora de Owren, se prepara la alícuota y se vuelve a congelar a -70 °C para su uso posterior. Este reactivo listo para usar es estable en estas condiciones durante al menos tres meses. Las alícuotas congeladas listas para usar deben descongelarse en un baño maría a 37 °C durante al menos tres minutos. Esto es estable para su uso durante al menos 12 horas a temperaturas ambiente de 20 a 25 °C. Hay varias preparaciones de batroxobina disponibles comercialmente.

Método:

- ✓ Realice todas las pruebas por duplicado.
- ✓ Coloque suficientes tubos de coagulación de vidrio de 75 x 10 mm en un baño maría a 37 °C (dos por paciente, más dos para el control).
- ✓ Pipetear 0,3 ml de plasma (control o paciente) en tubos de coagulación calientes.
- ✓ Calentar durante uno o dos minutos.
- ✓ Añadir 0,1 ml de dilución de reptilasa y poner en marcha el cronómetro.
- ✓ Inclinar tres veces para mezclar, luego tres veces cada cinco segundos hasta que se forme un coágulo.
- ✓ Registrar el tiempo de coagulación.
- ✓ El tiempo de control debe ser de 15 a 18 segundos. (Si es más corto, ajústelo diluyendo aún más el reactivo de reptilasa con la solución amortiguadora de Owren).
- ✓ Si no se produce ningún coágulo, reporte como >90 segundos.

Rango normal: El tiempo del paciente debe estar dentro de los tres segundos del tiempo de control. El tiempo de control debe reportarse con el tiempo del paciente.

Interpretación: La interpretación del tiempo prolongado de trombina y el tiempo de reptilasa se muestra en la Tabla 10.

Tabla 10. Interpretación del tiempo prolongado de trombina

Tiempo de trombina	Tiempo de reptilasa	Causa	Observaciones
Prolongado	Igualmente prolongado	Hipo o afibrinogenemia	Medir el fibrinógeno
Prolongado	Fuertemente prolongado	Disfibrinogenemia	Congénita o adquirida
Prolongado	Normal	Heparina	
Prolongado	Ligeramente prolongado	Heparina con alguna hipo o disfibrinogenemia	Un caso raro de disfibrinogenemia puede dar este patrón
Prolongado	Igualmente prolongado	Coagulación intravascular diseminada (CID)	Medición de dímeros D
Prolongado	Normal	Inhibidores directos de la trombina	

Nota: Los reactivos de reptilasa están disponibles en una concentración lista para usar en varios fabricantes comerciales. La ventaja de esto es que no hay necesidad de manipular el veneno crudo, evitando así sus problemas de salud y seguridad. Si usa uno de estos, siga las instrucciones de uso del fabricante. Cuando la reptilasa es un reactivo caro, puede utilizarse el método de neutralización de protamina/tiempo de trombina para confirmar la presencia de heparina en la muestra de ensayo.

Fibrinógeno (ensayo de Clauss modificado): las diluciones de plasma normal estándar con contenido conocido de fibrinógeno se preparan en solución amortiguadora de glioxalina. Se mide el tiempo de coagulación después de la adición de trombina y se construye un gráfico. El tiempo de coagulación es proporcional a la concentración de fibrinógeno, y la dilución 1/10 se toma para representar el valor en la preparación estándar. El plasma de prueba se diluye 1/10 y el resultado se lee de la línea estándar.

Reactivos:

- ✓ Plasma patrón o de referencia con concentración conocida de fibrinógeno
- ✓ Trombina alta concentración de 100 - 200 U/ml (la concentración puede variar según la fuente).
- ✓ Solución amortiguadora de imidazol (glioxalina) o solución amortiguadora de Owren, pH 7,35

Método: La técnica manual del tubo basculante se describe en la Parte 4 de este manual. Se deben seguir las recomendaciones del fabricante del reactivo.

Esta prueba no se ve afectada por la heparina en los niveles utilizados para el tratamiento de la tromboembolia venosa. Se supone que el uso de una mayor concentración de trombina supera el efecto de las altas concentraciones de HNF sobre la trombina, como las que se aplican en el bypass cardiopulmonar que permite la formación de coágulos. Sin embargo, se debe tener precaución al interpretar los resultados de estos pacientes, ya que se pueden observar tiempos de coagulación prolongados, lo que lleva a una subestimación del fibrinógeno, a menos que el reactivo contenga neutralizadores de heparina para contrarrestarlo. El efecto de los DTI dependerá en gran medida de la concentración de DTI en el plasma del paciente y del tipo de reactivos utilizados. Los DTI en el rango terapéutico no afectan a la trombina de alta concentración utilizada en el ensayo de fibrinógeno de Clauss (Mackie et al, 2024).

Datos de calibración típicos: (Nota: se debe establecer una curva de calibración con los reactivos en uso local).

Plasma estándar: 2,1 g/l de fibrinógeno

Tabla 11. Ejemplo de calibración de fibrinógeno

Dilución del patrón	Concentración de fibrinógeno (g/l)	Tiempo de coagulación (segundos)
1/5	4.2	8.5
1/10	2.1	14
1/15	1.4	19.5
1/20	1.05	24.5

Ejemplos:

Plasma de prueba 1: diluido 1 en 10, tiempo de coagulación 15 segundos.

fibrinógeno = 1,9 g/l (del gráfico de calibración)

Plasma de prueba 2: diluido 1 en 5, tiempo de coagulación 16 segundos.

fibrinógeno = 1,8 g/l del gráfico de calibración x 5/10 (desde 1/5 de dilución en lugar de 1/10)
= 0,9 g/l

Notas sobre el ensayo de fibrinógeno de Clauss: El nivel de fibrinógeno puede subestimarse en presencia de altas concentraciones de productos de degradación de fibrina/fibrinógeno, por lo que se recomienda una interpretación cuidadosa de los resultados cuando se sospecha de ello. Debe evitarse la recolección de muestras de sangre para la coagulación de dispositivos venosos o arteriales contaminados con heparina para excluir la posibilidad de interferencia oscura de heparina en los resultados obtenidos. Deben evitarse las muestras de pacientes con dosis altas de HNF al cuantificar los niveles de fibrinógeno para evitar la obtención de resultados falsos bajos.

Prueba de fibrinógeno derivada de TP: Varios analizadores de coagulación pueden estimar el nivel de fibrinógeno durante la determinación del tiempo de protrombina. Esto es posible porque el cambio en la dispersión o transmisión de la luz debido a la formación de coágulos es proporcional a la concentración inicial de fibrinógeno. Estos métodos se conocen comúnmente como fibrinógeno derivado de TP. Existen limitaciones para la mayoría de los métodos derivados de TP. En particular, los resultados obtenidos suelen ser mucho más altos que los obtenidos por el ensayo de Clauss cuando hay niveles muy bajos (<1,5 g/l) o niveles elevados (por encima de 5 g/l) de fibrinógeno. Los resultados suelen estar por encima de lo normal en presencia de disfibrinogenemia (Mackie et al, 2024; Miesbach et al, 2010). Existen métodos de fibrinógeno de Clauss que son adecuados para analizar plasma de prueba sin diluir, pero los resultados pueden no ser intercambiables con los resultados de los ensayos de Clauss ampliamente utilizados que emplean plasma de prueba diluido (Jennings et al. 2009).

Factores que afectan el uso de fibrinógeno derivado de TP: Para los pacientes en tratamiento anticoagulante, es aconsejable no utilizar la estimación de fibrinógeno derivado de TP para cuantificar sus niveles de fibrinógeno. Ciertos anticoagulantes orales afectan a la generación de trombina, reduciendo finalmente la producción de trombina y causando la formación de fibrillas gruesas que son detectadas como turbidez en la muestra por los sensores ópticos y transmitidas como aumento de fibrinógeno (Chitolie et al, 1994). Ha habido casos de pacientes con hipodisfibrinogenemia que han sido identificados con fibrinógeno normal derivado de TP, mientras que estos niveles eran realmente bajos cuando se midieron por el método de Clauss (Chitolie et al, 1994). La turbidez plasmática de referencia conduce a estimaciones más altas de los niveles de fibrinógeno. Además, el plasma del paciente que es lipémico y turbio puede ocasionar una estimación alta errónea de fibrinógeno. Estos niveles inexactos de fibrinógeno se pueden observar en pacientes crónicas y graves. Sobre la base de las Guías internacionales actuales sobre cuantificación de fibrinógeno, se recomienda el método de fibrinógeno de Clauss y, debido a las imprecisiones asociadas con el fibrinógeno derivado de TP, no debe usarse para detectar deficiencias de fibrinógeno, no debe usarse en pacientes que se sabe que están en tratamiento anticoagulante y los resultados deben interpretarse con cuidado.

Eliminación de la heparina del plasma: La heparinasa 1 (el componente activo de la Hepzyme®) es específica para la heparina, que escinde en múltiples sitios por molécula, produciendo oligosacáridos que han perdido su actividad antitrombótica. La Hepzyme® es una heparinasa bacteriana purificada 1 producida en *Flavobacterium heparinum*. Puede eliminar hasta 2 UI de heparina por ml en plasma. La Hepzyme® se puede utilizar para neutralizar el efecto de la heparina en una muestra, de modo que se pueda evaluar el estado de coagulación subyacente. Se utiliza especialmente en casos de contaminación por heparina (Forte y Abshire, 2000).

Reactivos:

- ✓ Hepzyme®, un vial que contiene una preparación seca de heparinasa 1 con estabilizantes
- ✓ Fabricante: Dade Behring
- ✓ Almacenamiento: 4°C
- ✓ Estabilidad: según la fecha de caducidad del fabricante. Cada vial se utiliza para realizar la prueba en un solo paciente

Método:

- ✓ Añadir 1,0 ml de plasma citrado pobre en plaquetas a un vial de Hepzyme®.
- ✓ Vuelva a detener e invierta suavemente de 5 a 10 veces.
- ✓ Dejar a temperatura ambiente durante 15 minutos.
- ✓ Transfiera a un vaso de muestra de plástico de 2 ml y espere unos momentos para que desaparezcan las burbujas.
- ✓ Colóquelo en CA 1500 y realice la prueba requerida.

Se debe incluir el tiempo de trombina para comprobar que toda la heparina se ha eliminado con éxito. Las pruebas deben realizarse lo antes posible (es decir, dentro de las pautas de prueba para ese procedimiento).

Interpretación: Esta enzima no elimina ningún factor de coagulación (a diferencia de algunas de las técnicas alternativas para eliminar la heparina), por lo que el acortamiento sustancial de los tiempos de coagulación en el TTPA, el tiempo de trombina o el TP después del tratamiento con hepzima indica que la heparina estaba presente. Tanto la HNF como las formas de bajo peso molecular son degradadas por esta enzima.

Referencias

Adcock DM, Gosselin RC. El peligro de depender del TTPA y el TP en pacientes con terapia con ACOD, un posible problema de seguridad del paciente. *Int J Lab Hematol* 2017; 39 Supl 1: 37-40.

Adcock DM, Moore GW, Montalvo SL, Kershaw G, Gosselin RC. Estudios de mezcla de tiempo de tromboplastina parcial activada y tiempo de protrombina: estado actual del arte. *Semin Thromb Hemost* 2023; 49(6): 571-579.

Baglin T, Luddington R. Fiabilidad de la determinación diferida del INR: implicaciones para la atención anticoagulante descentralizada con muestras de sangre fuera del centro. *Br J Haematol* 1997; 96(3): 431-434.

Bonar RA, Lippi G, Favalaro EJ. Descripción general de la hemostasia y la trombosis y contribución de las pruebas de laboratorio al diagnóstico y tratamiento de los trastornos de la hemostasia y la trombosis. En: Favalaro EJ, Lippi G, eds. *Hemostasia y Trombosis: Métodos y Protocolos*. Nueva York, NY: Springer Nueva York; 2017: 3-27.

Bourguignon A, Tasneem S, Hayward CP. Detección y diagnóstico de trastornos plaquetarios hereditarios. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2022; 59(6): 405-444.

Chitolie A, Mackie IJ, Grant D, Hamilton JL, Machin SM. Inexactitud de la medición de fibrinógeno 'derivada'. *Fibrinólisis de coágulos sanguíneos* 1994; 5(6): 955-957.

Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio. Prueba de tiempo de protrombina (TP) en una etapa y prueba de tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPA), 3ª edición. Norma CLSI H47. 2023. <https://clsi.org/standards/products/hematology/documents/h47>.

Dorgalaleh A, Favalaro EJ, ¡Bahréin! M, Rad F. Estandarización del tiempo de protrombina/relación normalizada internacional (TP/INR). *Int J Lab Hematol* 2021; 43(1): 21-28.

Favalaro EJ. Estudios de mezcla de coagulación: Utilidad, estrategias algorítmicas y limitaciones para las pruebas de anticoagulación lúpica o el seguimiento de pruebas de coagulación anormales. *Am J Hematol* 2020; 95(1): 117-128.

Favalaro EJ. Optimización de la verificación del tiempo medio normal de protrombina (MNTP) y el índice de sensibilidad internacional (ISI) para una conversión precisa del tiempo de protrombina (TP) a la relación internacional normalizada (INR). *Métodos Mol Biol* 2017; 1646: 59-74.

Forte K, Abshire T. El uso de la hepzima para eliminar la heparina de muestras de sangre extraídas de dispositivos de acceso venoso central. *J Pediatr Oncol Nurs* 2000; 17(3): 179-181.

Fritsma GA. Terapias antitrombóticas y su evaluación de laboratorio. En: *Hematología de Rodak: Principios Clínicos y Aplicaciones*. 2019: 746-764.

Hogwood J, Mulloy B, Gray E. Precipitación y neutralización de heparina de diferentes fuentes por sulfato de protamina. *Productos farmacéuticos (Basilea)* 2017; 10(3): 59.

Organización Internacional de Normalización (ISO). ISO 15189:2022(en) Laboratorios médicos — Requisitos de calidad y competencia. <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:15189:ed-4:v1:en>. Consultado el 23 de marzo de 2025.

Diferencias entre los ensayos de multifibrina U y los ensayos convencionales de fibrinógeno Clauss: datos de encuestas del Plan Nacional de Evaluación de Calidad Externa del Reino Unido. *Fibrinólisis de coágulos sanguíneos* 2009; 20(5): 388-390.

Karapetian H. Tiempo de reptilasa (RT). *Métodos Mol Biol* 2013; 992: 273-277.

Kitchen S, Adcock DM, Dauer R, Kristoffersen AH, Lippi G, Mackie I, Marlar RA, Nair S. Recomendaciones del Consejo Internacional de Normalización en Hematología (ICSH) para la recolección de muestras de sangre para pruebas de coagulación. *Int J Lab Hematol* 2021; 43(4): 571-580.

Kitchen S, Cartwright I, Woods TA, Jennings I, Preston FE. Composición lipídica de siete reactivos de TTPA en relación con la sensibilidad a la heparina. *Br J Haematol* 1999; 106(3): 801-808.

Kitchen S, Malia RG, Preston FE. Comparación de métodos para la medición del factor VII activado. *Thromb Haemost* 1992; 68(3): 301-305.

Lowe A, Kitchen S, Jennings I, Kitchen DP, Woods TAL, Walker ID. Efectos de emicizumab en TTPA, ensayos de FVIII y ensayos de inhibidores de FVIII utilizando diferentes reactivos: resultados de un ejercicio de prueba de competencia NAECS del Reino Unido. *Hemofilia* 2020; 26(6): 1087-1091.

Mackie I, Casini A, Pieters M, Pruthi R, Reilly-Stitt C, Suzuki A. Recomendaciones del Consejo Internacional de Normalización en Hematología sobre los ensayos de fibrinógeno, el tiempo de coagulación de la trombina y las pruebas relacionadas en la investigación de los trastornos hemorrágicos. *Int J Lab Hematol* 2024; 46(1): 20-32.

Mackie IJ, Kitchen S, Machin SJ, Lowe GD. Guías sobre ensayos de fibrinógeno. *Br J Haematol* 2003; 121(3): 396-404.

Maier CL, Sniecinski RM. Monitorización de la anticoagulación para médicos perioperatorios. *Anestesiología* 2021; 135(4): 738-748.

Mielke CH. Medición del tiempo de sangrado. *Thromb Haemost* 1984; 52(2): 210-211.

Miesbach W, Schenk J, Alesci S, Lindhoff-Last E. Comparación del ensayo Clauss de fibrinógeno y el método derivado del fibrinógeno TP en pacientes con disfibrinogenemia. *Thromb Res* 2010; 126(6): e428-433.

Miller CH. Pruebas de laboratorio para inhibidores del factor VIII y IX en la hemofilia: una revisión. *Hemofilia* 2018; 24(2): 186-197.

Funciones del dominio del factor VIII b. *Hemofilia* 2009; 15(6): 1187-1196.

Practical-Haemostasis.com. Prueba de neutralización de sulfato de protamina, <https://practical-haemostasis.com/>. Consultado el 23 de marzo de 2025.

Rodgers RPC, Levin J. Una reevaluación crítica del tiempo de sangrado. *Semin Thromb Hemost* 2024; 50(3): 499-516.

Russeau AP, Vail H, Manna B. Tiempo de sangrado. [Actualizado el 8 de agosto de 2023]. En: *StatPearls [Internet]*. Treasure Island, FL: StatPearls Publishing: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/books/NBK537233/>. Accessed 23 de marzo de 2025.

Toulon P, Eloit Y, Smahi M, Sigaud C, Jambou D, Fischer F, Appert-Flory A. Sensibilidad in vitro de diferentes reactivos de tiempo de tromboplastina parcial activados a deficiencias leves de factores de coagulación. *Int J Lab Hematol* 2016; 38(4): 389-396.

Undas A. La prueba del tiempo de sangrado en 2024: un pasado glorioso y desafíos actuales. *Semin Thromb Hemost* 2024; 50(3): 517-519.

Vandiver JW, Vondracek TG. Niveles de antifactor Xa frente a tiempo de tromboplastina parcial activada para la monitorización de la heparina no fraccionada. *Farmacoterapia* 2012; 32(6): 546-558.

Vinholt PJ. El papel de las plaquetas en la hemorragia en pacientes con trombocitopenia y enfermedad hematológica. *Clin Chem Lab Med* 2019; 57(12): 1808-1817.

Williams B, Lin Z, Pittet JF, Chao W. Coagulopatía inducida por sepsis: una revisión narrativa exhaustiva de la fisiopatología, la presentación clínica, el diagnóstico y las estrategias de tratamiento. *Anesth Analg* 2024; 138(4): 696-711.

TEMAS TRATADOS

- ✓ Realización de ensayos factoriales en analizadores para los que el software utiliza una sola dilución
 - ✓ Anticuerpos biespecíficos
 - ✓ Monitorización de infusión post-FVIII y FIX
 - ✓ Terapia génica
 - ✓ Aspectos de laboratorio para el tratamiento de la terapia de reequilibrio hemostático
-

Ensayo de factores VIII y IX: métodos cromogénicos y de una etapa: El diagnóstico de laboratorio de hemofilia A o B se realiza mediante la medición de la actividad del factor (Srivastava et al, 2020). La metodología más utilizada es el ensayo de coagulación en una etapa basado en el TTPA. En esta sección se describe el ensayo de una etapa para la actividad del FVIII. El ensayo se basa en una comparación de la capacidad de las diluciones de plasmas patrón y de prueba para corregir el TTPA de un plasma que se sabe que es totalmente deficiente en FVIII pero que contiene todos los demás factores necesarios para la coagulación normal. Para los factores IX, XI y XII, el ensayo es esencialmente el mismo y se realiza sustituyendo el plasma deficiente relevante por plasma deficiente en FVIII, y después de seleccionar el plasma de referencia apropiado (Baker et al, 2020). No se puede realizar un ensayo FVIII o FIX en una etapa en presencia de anticuerpos biespecíficos como el emicizumab (Jenkins et al, 2020).

Reactivos:

- ✓ Plasma de prueba citrato pobre en plaquetas
- ✓ Plasma patrón (referencia/calibrador)

El plasma estándar (de referencia) utilizado debe ser un grupo de plasma preparado localmente que se mantenga a -70 °C o menos, o un plasma estándar comercial. En cualquier caso, este plasma de referencia debe calibrarse para el ensayo de coagulación según el estándar internacional actual para FVIII o FIX en plasma. No es aceptable suponer que un plasma normal combinado tiene 100 UI/dl.

- ✓ Plasma de control de calidad interno (CLSI, 2016)
- ✓ Plasma deficiente en FVIII

Está disponible comercialmente o se puede recolectar de un donante de hemofilia bajo las siguientes condiciones:

- ✓ El nivel es inferior a 1 UI/dl
- ✓ Sin antecedentes de anticuerpos contra el FVIII
- ✓ No recibió tratamiento durante dos semanas, incluida la vida media extendida o la terapia con anticuerpos biespecíficos
- ✓ Pruebas de función hepática normales

La función hepática anormal podría ocasionar una reducción de otros factores de coagulación, que afectan la especificidad del ensayo. Este plasma puede almacenarse en alícuotas a -20 °C o menos durante aproximadamente 1 mes (Woodhams et al, 2001; Zhao et al, 2018). Es preferible utilizar plasma deficiente en FVIII/FIX producido por inmunodepleción del FVIII o FIX a partir de plasma normal utilizando un anticuerpo monoclonal. Este tipo de material está disponible comercialmente y tiene la ventaja de una

mayor seguridad viral en comparación con el plasma procedente de pacientes con hemofilia que han sido tratados con productos derivados del plasma. Sin embargo, no todos los plasmas inmunodepletados tienen <1 UI/dl, y se debe tener cuidado de comprobarlo antes de su uso. Algunos expertos opinan que la presencia de concentraciones normales de FVW en plasma deficiente en FVIII/FIX puede ser una ventaja, y hay pruebas que lo respaldan en relación con los ensayos realizados como parte de las determinaciones de inhibidores (Verbruggen et al, 2001).

- ✓ Reactivo TTPA sensible a las deficiencias de factores (CLSI, 2016)
- ✓ Solución salina tamponada de Owren (OBS o solución amortiguadora de glicoxalina; ver sesión de reactivos)
- ✓ CaCl_2 25 mM de (nótese que el CaCl_2 de Werfen suministrado con SynthASil es de 20 mM)

Método:

- ✓ Realice 1/10 diluciones de estándar, control de calidad y plasma de prueba en solución salina tamponada en tubos de plástico. (Si se espera que el plasma de prueba tenga un nivel muy bajo de FVIII, comience con una dilución de 1/5).
- ✓ Utilizando volúmenes de 0,2 ml, realice diluciones duplicadas en OBS de estándar, control de calidad y plasma de prueba de 1/10 a 1/40 en tubos de plástico. (Mezcle bien cada dilución antes de pasar al siguiente tubo). Las diluciones plasmáticas deben analizarse inmediatamente después de la preparación. Si la temperatura ambiente supera los 25 °C, puede ser necesario mantener las diluciones en hielo húmedo antes de la prueba.
- ✓ Pipetear 0,1 ml de cada dilución patrón en un tubo de vidrio de 75 x 10 mm.
- ✓ Añadir 0,1 ml de plasma con deficiencia de FVIII y transferir a un baño maría a 37°C.
- ✓ Añadir 0,1 ml de reactivo TTPA e incubar durante 5 minutos.
- ✓ A los 5 minutos, añadir 0,1 ml de CaCl_2 y registrar el tiempo de coagulación.
- ✓ También se debe establecer un "blanco" utilizando 0,1 ml de OBS en lugar de plasma de prueba.

El tiempo de coagulación del blanco debe ser más largo que el tiempo de actividad FVIII del 1% del estándar del gráfico de calibración. Si el tiempo es más corto, esto indica que el plasma de sustrato no es totalmente deficiente en FVIII y, por lo tanto, no es un plasma de sustrato adecuado

Resultados: El trazado de los resultados requiere papel cuadrulado de doble escala logarítmica o logarítmica/lineal. A la dilución 1/10 se le asigna arbitrariamente un valor del 100%, a la dilución 1/20 un valor del 50% y a la dilución 1/40 un valor del 25%. Si se utiliza, la dilución 1/5 tiene un valor del 200%. Se deben obtener líneas rectas, paralelas entre sí. Lea la concentración de la muestra de prueba como se muestra en la Figura 7. En este ejemplo, la concentración de FVIII en la muestra de prueba es el 7% de la del patrón. Si el patrón tiene una concentración de FVIII de 85 UI/dl, la muestra de ensayo tiene una concentración de $85 \text{ UI/dl} \times 7\% = 6 \text{ UI/dl}$. Si las líneas no son paralelas, se debe repetir el ensayo. Pueden producirse líneas no paralelas debido a errores técnicos. Si se ha eliminado el error técnico, puede deberse a la presencia de un inhibidor, que puede actuar específicamente contra el FVIII o puede ser del "tipo lupus", mostrando un patrón convergente. Las líneas divergentes son típicas de una muestra activada o de la presencia de un ACOD (Baker et al, 2020).

Notas: Si la concentración de FVIII (o FIX) en plasma de prueba es cercana a cero (es decir, los tiempos de coagulación de todas las diluciones son como el blanco), pueden producirse líneas no paralelas. La presencia de anticoagulante lúpico puede interferir con los fosfolípidos en los reactivos TTPA y producir ensayos de factores no paralelos (Ruinemans-Koerts et al, 2001). El rango normal debe establecerse localmente, pero a menudo tiene un límite inferior de 50 a 65 UI/dl tanto para FVIII como para FIX. El seguimiento preciso de algunos productos de vida media extendida mediante un ensayo de una etapa puede verse afectado por el reactivo TTPA utilizado (Gray et al, 2020). Véase la Parte 6 sobre vida media extendida. Los ensayos de FVIII o FIX de una etapa no se pueden realizar en presencia de anticuerpos biespecíficos como el emicizumab. Estos medicamentos acortan artificialmente el TTPA. Un corto tiempo

de coagulación en un ensayo de una etapa corresponde a una alta actividad factorial (Jenkins et al, 2020; Bowyer et al, 2020; Bowyer et al, 2023). Véase la Parte 6 sobre anticuerpos biespecíficos. Se ha descrito una discrepancia cromogénica en una etapa del FVIII en la hemofilia A leve en algunas áreas geográficas y raramente en la hemofilia B leve (Pouplard et al, 2009). Si es posible, un nuevo diagnóstico de hemofilia leve debe tener FVIII:C o FIX:C también medido por ensayo cromogénico (Bowyer et al, 2018). Los ensayos de FVIII en una etapa se pueden utilizar para medir la terapia con FVIII porcino recombinante (Bowyer et al, 2022). Existe una mutación en FIX, FIX Padua (p.R338L), que se ha reportado que tiene una actividad de FIX ocho veces mayor que el antígeno (Simioni et al, 2009).

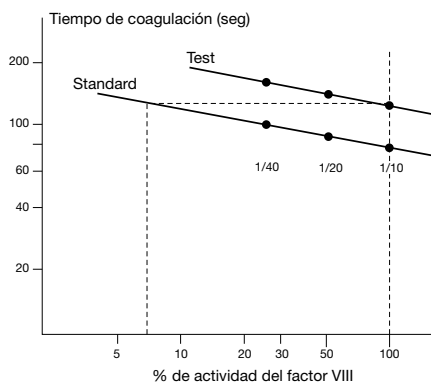


Figura 7. Gráfico del ensayo del FVIII

Las muestras de ensayo deben analizarse utilizando tres diluciones de muestra diferentes, como se ha descrito anteriormente. Esta es una recomendación constante en las Guías nacionales e internacionales publicadas, incluidas las de la FMH. Mejora tanto la exactitud como la precisión del ensayo en comparación con el uso de una sola dilución de muestra de prueba. Los ensayos factoriales a veces se realizan en analizadores con software diseñado para probar solo una dilución de muestra de prueba. En la siguiente sección se describe un método que se puede utilizar para incluir tres diluciones de muestras de prueba en dichos analizadores.

Realización de ensayos factoriales en analizadores para los que el software utiliza una sola dilución de la muestra de prueba: La FMH recomienda que los ensayos basados en TTPA de una etapa para FVIII y FIX se realicen utilizando tres diluciones diferentes de la muestra de prueba. Esto se describe en el siguiente documento:

Guías de la FMH para el tratamiento de la hemofilia, 3.^a edición. Srivastava A, Santagostino E, Dougall A, Kitchen S, Sutherland M, Pipe SW, Carcao M, Mahlangu J, Ragni MV, Windyga J, Elinas A, Goddard NJ, Mohan R, Poon noose PM, Feldman BM, Lewis SZ, van den Berg HM, Pierce GF ; Capítulo 3: Diagnóstico y seguimiento de laboratorio. Steve Kitchen, Francisco de Paula Careta, Silmara A de Lima Montalvao, Emna Gouider, Radoslaw Kaczmarek, Claude T. Tagny, Pierre Toulon, Glenn F. Pierce, Alok Srivastava. Hemofilia 2020; 26 (Supl. 1): 35-48.

El documento completo está disponible para su descarga gratuita en el sitio web de la FMH a través del siguiente enlace:

[Guías para el tratamiento de la hemofilia - Plataforma de aprendizaje en línea \(wfh.org\)](https://www.wfh.org/guidelines-for-the-treatment-of-hemophilia-online-learning-platform)

El siguiente texto se reproduce de la directriz de la FMH:

Recomendación: Para las investigaciones de laboratorio debidas a sospecha clínica de hemofilia mediante ensayos FVIII/FIX de una etapa, la FMH recomienda el análisis utilizando 3 diluciones diferentes de las muestras de plasma de referencia y de prueba.

OBSERVACIÓN: Los resultados de la prueba y las diluciones plasmáticas estándar deben compararse mediante análisis de líneas paralelas. Una forma de evaluar esto es calcular el coeficiente de variación (CV) de los 3 resultados utilizando la ecuación $CV = ([desviación\ estándar/mediana] \times 100)$. Si el CV de los 3 resultados es inferior al 15%, entonces se debe reportar el promedio de los 3 resultados. Si el CV es superior al 15%, los resultados deben ser examinados. La presencia de inhibidores patológicos contra factores de coagulación específicos o anticoagulantes lúpicos puede interferir con algunos ensayos de FVIII y FIX de una etapa. Algunos anticoagulantes terapéuticos también pueden mostrar este efecto de interferencia. En todos estos entornos, la actividad de los factores aumenta en el ensayo a medida que el plasma se diluye cada vez más. La actividad del factor se subestima cuando el plasma se diluye menos, y se obtiene un resultado de actividad más preciso cuando el plasma de prueba se diluye más.

Los principios anteriores también deben aplicarse a los ensayos de una etapa de otros factores de coagulación (es decir, FII, FV, FVII, FX, FXI y FXII). Algunos analizadores tienen software que permite más de una dilución de la muestra de prueba. Para estos analizadores, la muestra de prueba se presenta para su análisis y el analizador construye las diferentes diluciones, corre el ensayo y calcula la actividad del factor de coagulación que se está ensayando. Otros analizadores tienen software que permite una sola dilución de la muestra de prueba. El siguiente procedimiento se puede utilizar en dichos analizadores para que se puedan seguir las recomendaciones de la FMH con mayor exactitud y precisión del ensayo.

Los ejemplos que se dan son para ensayos de FVIII, pero se pueden utilizar para ensayos de una sola etapa de otros factores.

- ✓ Las muestras de ensayo se presentan al analizador sin diluir (es decir, sin ninguna dilución previa por parte del operador).
- ✓ La muestra de prueba es prediluida 1 en 2 por el operador utilizando la misma solución amortiguadora del ensayo que utiliza el analizador, que a menudo es la solución amortiguadora de Owren, pero puede ser una solución amortiguadora diferente.
- ✓ Esto se puede hacer en cualquier tubo o vial de plástico que se pueda presentar al analizador para su análisis y que no provoque la activación de la muestra de prueba.
- ✓ La muestra de ensayo se diluye previamente 1 en 4 utilizando la misma solución amortiguadora del ensayo que utiliza el analizador (véanse los puntos 2 y 3 anteriores).
- ✓ Esto significa que el analizador se presenta con tres materiales diferentes derivados de la misma muestra de prueba.
- ✓ A continuación, se solicita al analizador que realice un ensayo de FVIII en cada uno de estos tres materiales (es decir, muestra de prueba sin diluir, muestra de prueba prediluida 1 en 2 y muestra de prueba prediluida 1 en 4).
- ✓ Se obtiene un resultado de FVIII en la muestra de prueba sin diluir.
- ✓ Hay otro resultado obtenido en la muestra de prueba que fue prediluida 1 en 2. Esto debe multiplicarse por 2 para corregir la predilución.
- ✓ Hay otro resultado obtenido en la muestra de prueba que fue prediluida 1 de cada 4. Esto debe multiplicarse por 4 para corregir la predilución.
- ✓ A continuación, el operador compara los tres números.
- ✓ Por lo general, los tres números están muy cerca uno del otro. Si es así, el operador puede calcular y reportar la media de los tres números como la actividad FVIII de la muestra de prueba.
- ✓ A veces, los tres números no están juntos. Esto puede ocurrir si la muestra contiene sustancias interferentes o si se ha activado la coagulación en la muestra (es decir, quizás debido a dificultades durante la recolección de la muestra).
- ✓ El operador debe decidir si es seguro utilizar la media de las tres respuestas diferentes.
- ✓ La FMH recomienda utilizar una evaluación matemática simple para decidir.
- ✓ Esto se hace calculando el CV de los tres resultados diferentes.
- ✓ La media de los tres resultados diferentes se puede utilizar con seguridad si el CV es <15%.
- ✓ El uso de la media de esta manera mejora la precisión de la prueba.

- ✓ Si el CV es superior al 15%, el operador tiene más decisiones que considerar.
- ✓ Cuando el nivel del factor es de 10 a 15 UI/dl, el CV de las tres diluciones es mayor que cuando la actividad del factor está en niveles más altos. En estas muestras se puede aceptar un CV del 20%.
- ✓ Cuando el nivel del factor es inferior a 5 UI/dl, una predilución de 1 en 4 puede reducir la actividad del factor por debajo del límite inferior de cuantificación, dependiendo de los reactivos. En estas muestras, es aceptable analizar solo la muestra de prueba sin diluir y la muestra de prueba prediluida 1 en 2. En este caso, el laboratorio debe reportar de la media de los dos resultados (después de multiplicar el resultado del analizador de la dilución 1 en 2 por 2), sin cálculo de CV.
- ✓ En el caso de muestras con >15 UI/dl de FVIII, si el CV es del >15% y el resultado del plasma sin diluir es inferior al de la tercera dilución, esto indica que puede haber una sustancia interferente en la muestra de ensayo. En este caso, el resultado obtenido para la dilución 1 en 4 (después de multiplicar el resultado del analizador por 4 para corregir la predilución) será el más preciso (ver ejemplos a continuación).
- ✓ Ejemplos de sustancias interferentes que pueden causar este resultado falsamente bajo en las muestras de prueba sin diluir son los inhibidores como el anticoagulante lúpico, la HNF, los DTI o los inhibidores directos del FXa.
- ✓ El uso de una sola dilución puede dar lugar a resultados falsos bajos y ensayos extremadamente inexactos.

A continuación, se dan algunos ejemplos.

Tabla 12. Ejemplo de ensayo 1-FVIII con predilución manual

	Actividad FVIII registrada por el analizador	Actividad de FVIII después de corregir la predilución	Comentarios
Muestras de ensayo sin dilución previa	25 UI/dl (%)	25 UI/dl (%)	No hay dilución previa por parte del operador, por lo que el resultado no cambia
Muestras de prueba diluidas 1 en 2 antes del análisis	13,5 UI/dl (%)	27 UI/dl (%)	Resultado del analizador multiplicado por 2
Muestras de prueba diluidas 1 en 4 antes del análisis	6 UI/dl	24 UI/dl (%)	Resultado del analizador multiplicado por 4

- ✓ La media de tres resultados es de 25,3 UI/dl (%).
- ✓ La desviación estándar de los tres resultados es de 1,53.
- ✓ CV de los tres resultados es de 6.0%.
- ✓ CV es de <15%, por lo que el resultado reportado es de **25,3 UI/dl (%)**.

Tabla 13. Ejemplo de ensayo 2-FVIII con predilución manual

	Actividad FVIII registrada por el analizador	Actividad de FVIII después de corregir la predilución	Comentarios
Muestras de ensayo sin dilución previa	62 UI/dl (%)	62 UI/dl (%)	No hay dilución previa por parte del operador, por lo que el resultado no cambia
Muestras de prueba diluidas 1 en 2 antes del análisis	33 I U/dl (%)	66 UI/dl (%)	Resultado del analizador multiplicado por 2
Muestras de prueba diluidas 1 en 4 antes del análisis	13 I U/dl	52 UI/dl (%)	Resultado del analizador multiplicado por 4

- ✓ La media de tres resultados es de 60,0 UI/dl (%).
- ✓ La desviación estándar de los tres resultados es de 7,2.
- ✓ CV de los tres resultados es del 12,0%.
- ✓ CV es de <15%.
- ✓ El resultado reportado es **de 60,0 UI/dl (%)**.

Tabla 14. Ejemplo de ensayo 3-FVIII con predilución manual

	Actividad del FVIII registrada por el analizador	Actividad del FVIII después de corregir la predilución	Comentarios
Muestras de ensayo sin dilución previa	7,0 UI/dl (%)	7,0 UI/dl (%)	No hay dilución previa por parte del operador, por lo que el resultado no cambia
Muestras de prueba diluidas 1 en 2 antes del análisis	3.0 UI/dl (%)	6.0 UI/dl (%)	Resultado del analizador multiplicado por 2
Muestras de prueba diluidas 1 en 4 antes del análisis	2.1 UI/dl	8.4 UI/dl (%)	Resultado del analizador multiplicado por 4

- ✓ La media de tres resultados es de 7,1 UI/dl (%).
- ✓ La desviación estándar de los 3 resultados es de 7,1.
- ✓ El CV de los 3 resultados es del 16,9%.
- ✓ El CV es <20%.
- ✓ El resultado reportado es **de 7.1 UI/dl (%)**.

Tabla 15. Ejemplos con sustancias interferentes presentes, los resultados del ensayo FVIII están en III/dl (%)

Interferencia	Sin predilución	Prediluido 1 en 2		Prediluido 1 en 4		Resultados utilizados para calcular el CV	CV
		Resultados del analizador	Resultado corregido por el operador	Resultado del analizador	Resultado corregido por el operador		
Inhibidor directo de la trombina	46.5	34.0	68.0	18.5	74.0	46.5, 68.0, 74.0	23.0%
Rivaroxabán	64.0	45.2	90.4	29.1	116.4	64.0, 90.4, 116.4	29.0%
Anticoagulante para el lupus	25.3	19.3	38.6	16.2	64.8	25.3, 38.6, 64.8	46.8%

- ✓ Tenga en cuenta que se producen patrones similares en otros ensayos de una sola etapa, como FIX.
- ✓ Los tres tienen CV >15%.
- ✓ Los efectos de estas sustancias interferentes suelen ser menores en la muestra de dilución 1 en 4 que en la muestra sin diluir o en la muestra de predilución 1 en 2.
- ✓ El resultado de la muestra de 1 de cada 4 puede seguir siendo una subestimación, pero es el más cercano a un resultado preciso de las tres pruebas realizadas. También puede ser útil añadir una predilución de 1 en 8 como cuarta prueba en estos casos.
- ✓ Los resultados notificables de los ejemplos de la tabla podrían ser >74 UI/dl (%), >116,4 UI/dl (%) o >64,8 UI/dl (%).

Las tres muestras de prueba de este ejemplo tienen una actividad de FVIII que no se reduce por debajo del rango normal. Confirmar que la actividad no se reduce, a veces es suficiente para un manejo seguro del paciente.

Ensayos cromogénicos FVIII:C y FIX: El diagnóstico de laboratorio de la hemofilia A o B se realiza mediante la medición de la actividad del factor (Srivastava et al, 2020). La metodología más utilizada es el ensayo de coagulación en una etapa basado en el TTPA (OSA). Existen limitaciones para el ensayo de una etapa, incluida la interferencia si hay anticoagulantes lúpicos, anticoagulantes orales directos (ACOD) o terapias para la hemofilia de vida media prolongada, incluidos los anticuerpos biespecíficos (Gray et al, 2020; Jenkins et al, 2020; Bowyer et al, 2021; Moser et al, 2021; Ruinemans-Koerts et al, 2010). Más importante aún, la hemofilia A leve no se excluye por el hallazgo de un nivel normal de FVIII:C, y rara vez de FIX:C, por AOS (Pouplard et al, 2009). Varios grupos han reportado que un subgrupo de pacientes con hemofilia A leve tiene discrepancias entre la actividad del FVIII determinada mediante diferentes tipos de ensayos (Pavlova et al, 2014). Más del 20% de los pacientes con hemofilia A leve se asocian con discrepancias en las que la actividad cromogénica es dos veces mayor o menor que la AOS y el fenotipo de sangrado es proporcional al ensayo de sustrato cromogénico (ESC) (Bowyer et al, 2018). También puede ocurrir una forma inversa de discrepancia en el ensayo con dos o más veces menos FVIII:C por OSA que el ESC. Los informes de sangrado son mucho más bajos en estos pacientes (Bowyer et al, 2018; Bowyer et al, 2011). En la Tabla 16 se muestran ejemplos de resultados en estos pacientes.

Tabla 16. Ejemplos de pacientes con hemofilia A leve confirmada genéticamente y discrepancias en los ensayos

Caso	Ensayo de una etapa (UI/dl)	Ensayo cromogénico (UI/dl)
A	101	13
B	88	28
C	15	69
D	55	40
E	58	33
F	72	36
G	84	45

Con base en estos resultados, es ventajoso para todos los centros de hemofilia tener disponible una prueba de FVIII cromogénico. El ESC debe realizarse en sujetos con TTPA normal y actividad FVIII en una etapa en presencia de antecedentes personales o familiares compatibles con hemofilia leve. Los ESC de FVIII se introdujeron por primera vez a principios de la década de 1980 (Rosen et al, 1984) y varios fabricantes tienen kits comerciales para el ensayo cromogénico de FVIII. Muchos de ellos son adecuados para el diagnóstico de la hemofilia A en presencia de una actividad normal de FVIII en una etapa. Desde mediados de 201 se dispone de un pequeño número de ESC del FIX y se limitan principalmente a laboratorios de investigación o especializados en hemostasia (Kershaw et al, 2018). Se ha descrito una discrepancia cromogénica FIX en una etapa en la hemofilia B leve, pero la discrepancia parece comprometer la clasificación de la gravedad, con pacientes que cambian entre hemofilia B moderada y leve (Pouplard et al, 2009; Truedsson et al, 2020)

Principio de análisis para el ESC del FVIII: Muchos coagulómetros automatizados tienen la capacidad de realizar ESC, pero dado que estos ensayos se realizaron originalmente manualmente utilizando placas de microtitulación, todavía es posible utilizar un método manual. En algunos ensayos cromogénicos (pero no en todos), todo el FVIII de la muestra es activado por la trombina. El FVIII activado acelera la conversión del FX en FXa en presencia del FIX activado, fosfolípidos e iones de calcio. La actividad del FXa se evalúa mediante hidrólisis de un sustrato de p-nitroanilina específico del FXa. La tasa inicial de liberación de p-nitroanilina (color amarillo) medida a 405 nm es proporcional a la actividad del FXa y, por lo tanto, a la actividad del FVIII en la muestra. Los resultados del plasma del paciente y de la muestra

de control de calidad se comparan con el plasma estándar (referencia/calibrador) para cuantificar el ESC utilizando los mismos principios que con el AOS (Baker et al, 2020). Las proteínas utilizadas en los kits del ESC del FVIII pueden ser de origen humano o bovino. Para la medición del FVIII:C endógeno, o la terapia estándar o de FVIII de vida media extendida, la fuente de proteínas no afecta al ESC. La fuente de proteínas es importante cuando hay anticuerpos biespecíficos en el plasma (ver sección Parte 6 sobre anticuerpos biespecíficos).

Principio de análisis para el ESC del FIX: En algunos (pero no todos) los ensayos cromogénicos FIX, todo el FIX de la muestra es activado por FXIa. A continuación, FIX activado acelera la conversión de FX a FXa en presencia de FVIII activado, fosfolípidos e iones de calcio. La actividad del FXa se evalúa mediante hidrólisis de un sustrato p-nitroanalina específico de FXa. La tasa inicial de liberación de p-nitroanalina (color amarillo) medida a 405 nm es proporcional a la actividad FXa y, por lo tanto, a la actividad FIX en la muestra, como se ha descrito anteriormente.

Notas: Si la concentración de FVIII (o FIX) en plasma de prueba es cercana a cero (es decir, la densidad óptica de todas las diluciones es similar a la del blanco), pueden producirse líneas no paralelas. El rango normal debe establecerse localmente, pero a menudo tiene un límite inferior de 50-65 UI/dl tanto en el FVIII como en el FIX. Es posible que el ESC del FIX no mida con precisión la recuperación de algunos productos del FIX de vida media extendida Gray et al, 2020; Bowyer et al, 2022). Los ensayos cromogénicos pueden utilizarse para medir el efecto mimético en el plasma que contiene anticuerpos biespecíficos (Jenkins et al, 2020; Bowyer et al, 2020; Bowyer et al, 2023). El ESC bovino del FVIII que contiene FX se puede utilizar para medir la terapia con FVIII recombinante en plasma que también contiene anticuerpos biespecíficos. Si es posible, un nuevo diagnóstico de hemofilia leve A o B debe tener FVIII:C o FIX:C también medido mediante un ensayo cromogénico (Bowyer et al, 2018). Se debe tener cierta precaución al utilizar el ESC para medir el FVIII porcino recombinante, ya que puede producirse una subestimación (Bowyer et al, 2022). El ESC del FIX puede subestimar las terapias con FIX de vida media estándar recombinante (Nederlof et al, 2020).

Medición de las moléculas vida media extendida, FVIII y FIX: Se han realizado modificaciones en el FVIII recombinante o FIX para prolongar la vida media in vivo de la terapia mediante la alteración de la conformación de la molécula. La extensión puede realizarse mediante la adición de restos de polietilenglicol (PEG), la fijación covalente de las cadenas pesada y ligera del FVIII, la fusión con la albúmina o la fusión covalente a la porción fc (fragmento cristalizante) de la IgG 1 humana. El monitoreo posterior a la perfusión de concentrados recombinantes de vida media extendida, FVIII o FIX es necesario para el manejo clínico del paciente con hemofilia. Una respuesta inferior a la esperada o una vida media reducida pueden indicar la necesidad de un tratamiento adicional o un posible desarrollo de anticuerpos antifármaco. Los estudios de laboratorio realizados durante los ensayos farmacéuticos de cada vida media extendida, pusieron de manifiesto problemas con la medición precisa de laboratorio de algunas moléculas. Se informó de sobreestimación o subestimación con algunos vida media extendida, FVIII o FIX, pero esto dependió de la metodología o del TTPA utilizado en la AOS. El método de modificación de la molécula no es predictivo de la respuesta del ensayo factorial, por lo que es posible que no sea posible realizar un seguimiento preciso de las tres moléculas de FVIII pegilado con los mismos reactivos de TTPA. En el caso de las moléculas de FVIII de vida media extendida actualmente autorizadas, los ensayos de actividad cromogénica del FVIII se consideran adecuados para una monitorización precisa, pero en el caso de la AOS, esto puede depender del reactivo. En el caso de las moléculas vida media extendida del FIX, no existe una única metodología de ensayo o reactivo que mida con precisión los tres concentrados actualmente autorizados. Un concentrado de vida media ultralarga, rFVIII-FC- FVW-XTEN, efanesoctocog alfa (Altuviiio/Altuvoc), recibió la aprobación regulatoria en los EE. UU. en 2023 y en Europa en 2024. FVIII OSA recomienda la monitorización utilizando un reactivo TTPA particular, Siemens Actin FSL. Los reactivos de TTPA prevalentes, Siemens Actin FS y Werfen Synthasil sobreestimaron y subestimaron el efanesoctocog alfa, respectivamente. Los ensayos cromogénicos de FVIII sobreestiman 2-3 veces la actividad esperada (Pipe, 2009). Por lo tanto, es necesario evaluar cuidadosamente si los ensayos disponibles en

cada laboratorio de hemostasia son adecuados para el seguimiento preciso de cada vida media extendida utilizado como terapia sustitutiva en su centro. En las tablas 17 y 18 se dan ejemplos de concentrados de vida media extendida rFVIII y rFIX, cómo se asignó la potencia del producto y si la AOS o el ESC son aceptables para su uso en la monitorización de la actividad posterior a la perfusión

Tabla 17. Moléculas de vida media extendida del FVIII

Nombre	Compañía	Molécula	Etiqueta de potencia	OSA	ESC	Referencias
Adynovi/Ady novate Rurioctocog alfa pegol	Takeda	FVIII 2x10 kDa PEG	ESC	Resultados variados	Sí	Turecek et al, 2016 Bulla et al, 2017
Afstyla Ionoctocog alfa	CSL Behring	Cadena simple BDD FVIII	ESC	Los resultados son aproximadamente la mitad del ESC	ESC	Bowyer et al, 2017 St Ledger et al, 2018
Elocta/Eloctate efmoroctocog	Sobi	Fusión FVIII FC	ESC	Sí	Sí	Sommer et al, 2014 Powell et al, 2012 Pouplard et al, 2020
Esperoct Turoctocog alpha pegol	Novo Nordisk	BD truncado rFVIII 40 kDa PEG	ESC	Resultados variados	Sí	Pickering et al, 2016 Hillarp et al, 2017
Jivi Damoctocog alfa pegol	Bayer	BDD rFVIII 60 kDa PEG	ESC	No reactivos TTPA de sílice o caolín	Sí	Gu et al, 2014 Church et al, 2018
Altuvoct/Altuviio Efanesoctocog alfa	Sanofi	rFVIII FC-FVW-XTEN	OSA	Actina FSL recomendada	Sobreestima 2-3 veces	Pipi et al, 2024

Tabla 18. Moléculas vida media extendida (factores de vida media extendida) del FIX

Nombre	Compañía	Molécula	Etiqueta de potencia	OSA	ESC	Referencias
Alprolix etrenonacog	Sobi	Fusión rFIX FC	OSA	No algunos reactivos TTPA de sílice o caolín	Sí	Sommer et al, 2014 Bowyer et al, 2019 Persson et al, 2018
Idelvion albutrepenonacog	CSL Behring	Fusión de albúmina rFIX	OSA	Resultados variados	no	Persson et al, 2018 St Ledger et al, 2016 Kitchen et al, 2017 Horn et al, 2019 Pouplard et al, 2019
Refixia/Rebiny Nonacog beta pegol	Novo Nordisk	rFIX 40 kDa PEG	OSA	Solo validado por Cephascreen y Synthafax	Sí	Bowyer et al, 2016 Tiefenbacher et al, 2017 Young et al, 2016

Anticuerpos biespecíficos:

Medición de anticuerpos biespecíficos: Los anticuerpos biespecíficos son una clase de terapia no sustitutiva para la hemofilia A. Actúan para crear un puente entre el FIXa humano y el FX humana, en ausencia de FVIII, para promover la activación del FX. Los anticuerpos biespecíficos difieren del FVIII nativo en una serie de aspectos intrínsecos, incluida la falta de mecanismos reguladores, que afectan a los ensayos de hemostasia (Lenting et al, 2017). Las futuras generaciones de anticuerpos biespecíficos, más potentes, pueden tener un mayor impacto en las pruebas de hemostasia (Bowyer et al, 2023).

TTPA y anticuerpos biespecíficos: Los anticuerpos biespecíficos no requieren ser activados para participar en la activación del FX. En presencia de anticuerpos biespecíficos, el TTPA se acorta drásticamente, a menudo por debajo de la parte inferior del rango de referencia (Bowyer et al, 2020; Bowyer et al, 2023). El TTAP no es lo suficientemente sensible a los cambios en la concentración de anticuerpos biespecíficos para su uso en el seguimiento de estas terapias; sin embargo, una prolongación del TTAP en un paciente con un TTAP previamente corto puede indicar una pérdida de eficacia o desempeño (Druzgal et al, 2020; Valsecchi et al, 2021).

Anticuerpos AOS y biespecíficos: En presencia de anticuerpos biespecíficos, los ensayos estándar, calibrados con plasma y basados en TTPA, incluidos el FVIII, FIX, FXI, XII, proteína C, proteína S y tiempo de coágulo activado (ACT), sobreestiman la cantidad de factor de coagulación o inhibidor natural, por lo que no son adecuados para su uso (Bowyer et al, 2023; EMA, 2018).

Anticuerpos biespecíficos modificados de OSA y FVIII: Para la primera generación de anticuerpos biespecíficos se dispone de calibradores comerciales de productos específicos (estándar/referencia) y plasmas de control de calidad. El ensayo de FVIII en una etapa se puede modificar utilizando estos calibradores específicos del producto junto con una mayor dilución plasmática (diluciones de 1/40 o 1/80 en lugar de 1/10) para medir la concentración del fármaco del anticuerpo biespecífico en µg/ml. Este ensayo modificado también medirá cualquier FVIII endógeno o de reemplazo presente en el plasma (Bowyer et al, 2020).

FVIII cromogénico y anticuerpos biespecíficos: El ESC del FVIII que contienen FX y FIXa humanos son sensibles a la presencia de anticuerpos biespecíficos y miden cierta actividad "mimética o sustituta" similar al FVIII (Bowyer et al, 2020; Bowyer et al, 2023). El ESC humano se puede utilizar como marcador de la presencia de anticuerpos biespecíficos en pacientes que reciben profilaxis. Esto no es intercambiable con el nivel de concentración del fármaco detallado anteriormente. El ESC humano también medirá cualquier FVIII endógeno o de reemplazo presente en el plasma (Bowyer et al, 2020). El ESC del FVIII que contienen FX bovino y FIXa humano o bovino son insensibles a la presencia de anticuerpos biespecíficos de primera generación, pero pueden demostrar cierta sensibilidad a los anticuerpos biespecíficos de próxima generación (Bowyer et al, 2020; Bowyer et al, 2023). El ESC bovino del FX debe utilizarse para medir cualquier FVIII endógeno o tratamiento de reemplazo con FVIII y para medir el FVIII residual en el ensayo de inhibidores de Bethesda, como se detalla a continuación.

Ensayo de inhibidores de Bethesda y anticuerpos biespecíficos: La medición del FVIII residual tras la incubación en los ensayos de inhibidores de Bethesda suele ser mediante AOS (Verbruggen B, 1995) aunque se han validado las mediciones cromogénicas y fluorogénicas (Miller et al, 2021). En presencia de anticuerpos biespecíficos, no se puede utilizar la AOS, por lo que se debe utilizar el ESC. Es importante que el kit de ESC utilizado contenga FX bovino y FIXa humano o bovino para excluir el efecto del anticuerpo biespecífico, de lo contrario se subestimarán el título del inhibidor (Bowyer et al, 2021; Miller et al, 2021).

Monitorización posinfusión del FVIII y FIX: La monitorización posinfusión de concentrados de FVIII o FIX derivados del plasma o de vida media estándar recombinante es necesaria para el tratamiento clínico del paciente con hemofilia. Una respuesta inferior a la esperada o una vida media reducida pueden indicar la necesidad de un tratamiento adicional o un posible desarrollo de inhibidores. Lo ideal es que la medición de la terapia de reemplazo se realice utilizando el mismo método de ensayo y los mismos reactivos que

se utilizaron originalmente para asignar la potencia al producto. Si esto no es posible, se debe utilizar un ensayo alternativo validado. En Europa, el etiquetado de potencia para los concentrados de FVIII es de ESC (Barrowcliffe et al, 2002) y para los concentrados de FIX es de OSA (Kitchen et al, 2016). La Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA, 2020) recomienda el uso de OSA para los concentrados de FIX, sin embargo, algunos concentrados de FVIII tienen una potencia asignada por OSA y otros por ESC. La FMH recomienda el uso de un ensayo FVIII o FIX que haya sido validado para su uso con el concentrado específico utilizado para el tratamiento y que esté calibrado con un patrón de plasma trazable al estándar internacional actual de la OMS (Srivastava et al, 2020). Otras Guías recomiendan el uso de OSA o ESC calibrado con patrones de plasma para monitorear los concentrados de FVIII derivados del plasma, a menos que haya pruebas de lo contrario, y el uso de un OSA para los concentrados de FIX (Gray et al, 2020). En los cuadros 19 y 20 se dan ejemplos de concentrados de FVIII y FIX de vida media recombinante y derivados del plasma comúnmente disponibles, cómo se asignó la potencia del producto y si la AOS o el ESC son aceptables para su uso en la monitorización de la actividad posterior a la perfusión.

Tabla 19. Ejemplos de concentrados derivados del plasma

Concentrado	Factor	Asignación de potencia	ESC	OSA	Referencias
Factane	VIII	ESC	Sí	Sí	Adcock et al, 2018
Octanato	VIII	ESC	Sí	Sí	
FVIII 8 AÑOS	VIII	ESC	Sí	Sí	
Hemoctina	VIII	ESC	Sí	Sí	
Octaplex	VIII	ESC	Sí	Sí	
Recombinante	VIII	ESC	Sí	Sí	Jennings et al, 2007
Fanhdi	VIII	ESC	Sí	Sí	Peyvandi et al, 2016
Hemofil M	VIII	ESC	Sí	Sí	Peyvandi et al, 2016
Emoclot	VIII	ESC	Sí	Sí	Peyvandi et al, 2016
Replenine	IX	OSA		Sí	
Beta fact	IX	OSA Pathromtin SL (sílice)	Probablemente aceptable	Sí	Adcock et al, 2018
Mononina	IX	OSA Pathromtin SL (sílice)	Sí	Sí	Bowyer et al, 2016 Wilmot et al, 2014
Octafijo	IX	OSA Pathromtin (Caolín)	Sin datos	Sí	
Alanina	IX	OSA		Sí	Aznar et al, 2009

Tabla 20. Ejemplos de concentrados de vida media estándar recombinante

Concentrado	Factor	Asignación de potencia	ESC	OSA	Referencias
Advate	FVIII-longitud completa	ESC	Sí	Sí	Kitchen et al, 2016 Kitchen et al, 2019
Refacto AF	FVIII-BDD	ESC	Sí	Sí, con el estándar de laboratorio Refacto	Kitchen et al, 2016 Morfini et al, 2003 Ingerslev et al, 2004
Novo8	FVIII-BDD	ESC	Sí	Sí, pero algo de sobreestimación en los niveles mínimos	EMA, 2021 Viuff et al, 2011
Nuwiq	FVIII-BDD	ESC	Sí	Sí	Lissitchkov et al, 2016 EMA, 2022 Klukowska et al, 2016 Tiefenbacher et al, 2019
Xyntha	FVIII-BDD	OSA	Sin sobreestimación	Sí	FDA, 2020
Kovaltry	FVIII	ESC	Sí	Sí	Mahlangu et al, 2018 Kitchen et al, 2016
Benefix	IX	OSA	Insufficient data	Sí	Bowyer et al, 2016 Kershaw et al, 2018 Sommer et al, 2014
Rixubis	IX	Validado por OSA Pathromtin SL	Sí	Sí	Kershaw et al, 2018 Gritsch et al, 2014

Terapia génica: La hemofilia A y B son trastornos monogénicos y, por lo tanto, candidatos ideales para la manipulación génica. Desde principios de la década de 2000, se ha investigado una variada gama de estrategias de terapia génica, incluida la edición de genes, en humanos para ambos trastornos (De Wolf et al, 2023). A mediados de la década de 2020, en algunos países se concedió la aprobación regulatoria para el uso limitado de productos de terapia génica para el tratamiento de personas con hemofilia A o B. La medición de la expresión del transgén FVIII o FIX es esencial para determinar la duración de la respuesta y si se requieren terapias adicionales para lograr la hemostasia. A fin de reducir al mínimo la variabilidad entre laboratorios, es sensato restringir la vigilancia rutinaria a un número limitado de laboratorios especializados en hemostasia en cada país. En los ensayos clínicos de varias terapias génicas se ha reportado de la variabilidad de los ensayos, con actividades cromogénicas de FVIII y FIX de 1,5 a 3,0 veces más bajas que las actividades de una etapa. Se han reportado diferencias entre reactivos en el mismo método de ensayo. Debido a las limitaciones del volumen plasmático adecuado, es difícil realizar estudios multicéntricos comparativos entre laboratorios en muestras de pacientes que recibieron terapia génica. Sin embargo, hay datos limitados disponibles con respecto a la medición de las moléculas candidatas FVIII o FIX utilizando una variedad de métodos o reactivos. Siempre que sea posible, para minimizar la variabilidad, los laboratorios deben utilizar los reactivos y métodos utilizados en los ensayos clínicos farmacéuticos para monitorear la expresión posterior a la terapia génica (Tabla 21).

Tabla 21. Terapia génica para la hemofilia A y B

	Empresa farmacéutica	Nombre comercial	Método de ensayo	Reactivos
Hemofilia A				
Valoctocogene roxaparvovec	Biomarin	Roctavian	ESC	Coatest SP4
Hemofilia B				
Etranacogene dezaparvovec	CSL Behring	Hemgenix	OSA	Synthasil
Fidanacogene elaparvovec	Pfizer	Beqvez	OSA	Synthasil

Terapia génica para la hemofilia A: En todos los abordajes para la hemofilia A se han utilizado vectores AAV y FVIII recombinante con delección del dominio B (BDD). Los ensayos de fase 1-3 de Roctavio (AAV5-FVIII-SQ, Valoctocogene roxaparvovec, Biomarin) midieron el transgén FVIII:C con Coatest SP4 ESC y OSA utilizando el reactivo Siemens Actin FSL TTPA en el analizador Siemens BCS XP (Rangarajan et al, 2017). El FVIII:C del ESC fue aproximadamente la mitad del FVIII:C de la OSA (Mahlangu et al, 2023). Rosen et al reportaron resultados comparables entre Coatest SP4 y Hyphen Biomed ESC al medir AAV5-FVIII-SQ (4). Una comparación de dos centros de FVIII:C medido por AOS o ESC en plasma de pacientes después de la terapia con Roctavian reportó una diferencia aproximada de 1,65 veces entre AOS y el ESC. Se obtuvieron resultados similares de FVIII:C con el ESC de Hyphen Biomed y otros dos ESC (Platton et al, 2024). Los autores concluyeron que la AOS no era adecuada para medir el FVIII después de la terapia génica con Roctavio y que solo se debe utilizar el ESC.

Terapia génica para la hemofilia B: Los dos productos para la hemofilia B actualmente aprobados, Hemgenix (Etranacogene dezaparvovec, CSL Behring) y Beqvez (Fidanacogene elaparvovec, Pfizer), utilizan una variante natural y altamente activa de FIX, FIX-Padua (R338L) (Simioni et al, 2009). El programa farmacéutico solo ha reportado de la actividad de FIX por parte de la AOS en sus reportes del estudio. Se ha reportado de la variabilidad entre los reactivos y las metodologías al medir FIX-Padua siguiendo la expresión génica y en el plasma enriquecido con la molécula FIX-Padua. Un estudio de campo global de plasma enriquecido con una molécula recombinante R338L (FLT180a, verbrinacogene setparvovec, por Freeline Therapeutics, que actualmente está en pausa al final de las pruebas de fase 1/2) informó de una diferencia de 3 veces en la actividad de FIX entre 15 OSA y ESC diferentes. Se observó una variación de 1,8 veces entre 13 reactivos de TTPA en la AOS, mientras que los resultados de ambos ESC fueron aproximadamente la mitad de la actividad esperada medida por Synthasil OSA (Foley et al, 2023). La medición de la actividad del transgén Beqvez FIX-Padua puso de manifiesto las diferencias en los ensayos entre cinco reactivos de TTPA en la AOS y entre la AOS y el ESC (Robinson et al, 2021). En un estudio de campo global en el que se utilizó plasma de participantes en el ensayo de terapia génica de fase 1/2a, FIX:C fue mayor con el reactivo TTPA activado por sílice, Synthasil, en la AOS que con los reactivos TTPA activados con ácido elálgico, Actina FS y Actina FSL, o ESC (Pittman et al, 2024). Los datos de laboratorio disponibles son mínimos para la medición de la actividad de FIX después de la terapia génica con Hemgenix. En el Resumen de las Características del Producto se afirma que la actividad de FIX es inferior a la del ESC (EMA, 2024). En los ensayos clínicos de fase 1-3 del FIX se utilizó el reactivo Synthasil TTPA en la AOS y en una ESC no revelada; Las actividades de OSA del FIX fueron al menos dos veces más altas que con el ESC (Pipe et al, 2023; Miesbach et al, 2018).

Aspectos de laboratorio para el tratamiento de la terapia de reequilibrio hemostático: Las terapias de reemplazo sin factor para la hemofilia A o B tienen como objetivo promover la coagulación y reequilibrar la hemostasia al dirigirse a los anticoagulantes naturales o inhibidores de la coagulación, incluida la antitrombina, el inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI), la proteína C o la proteína S (Nogami y Shima, 2023). Algunas de estas terapias han sido aprobadas para su uso en ciertos grupos de pacientes, otras se encuentran actualmente en ensayos farmacéuticos.

Moléculas que se dirigen a la antitrombina: La antitrombina (AT) activada por heparina ejerce acciones inhibitorias sobre la trombina, FXa, FIXa, FXIa y FXIIa (Rezaie et al, 2020). Se ha desarrollado una pequeña molécula de ARN interferente, fitusiran, que se dirige a la síntesis de la AT en los hepatocitos, para mejorar la generación de trombina (Young et al, 2023). En los ensayos clínicos, una reducción del 82-87% de la AT se asoció con un aumento de la generación de trombina (Pasi et al, 2021). Los niveles de actividad objetivo de AT son de 15 a 35 UI/dl. Los ensayos de AT están bien establecidos como parte de las pruebas de trombofilia, pero es raro medir actividades de AT tan bajas. Un estudio de campo comparativo de laboratorio a nivel mundial que evaluó la medición de una serie de actividades de AT (9-100 UI/dl) concluyó que algunos ensayos de AT no deben utilizarse para monitorear la AT durante el tratamiento con fitusirán (Chhabra et al, 2024).

Moléculas que se dirigen a TFPI: Los anticuerpos anti-TFPI se dirigen al dominio Kunitz 2 de TFPI y evitan la fijación al FX activado, lo que permite que continúe la generación de FXa (Mast et al, 2022). El primer anticuerpo monoclonal anti-TFPI (concizumab, Novo Nordisk, Dinamarca) fue aprobado para su uso en 2023 en pacientes canadienses con hemofilia B con inhibidores. Un anticuerpo alternativo anti-TFPI, marstacimab (Pfizer, EE. UU.) está bajo consideración para su aprobación en EE. UU. y Europa para personas con hemofilia A o B sin inhibidores (Matino et al, 2023). Los ensayos TFPI están disponibles en algunos laboratorios de investigación o especializados, pero la utilidad clínica de la medición no está clara.

Moléculas que se dirigen a la proteína C activada (PCA): La PCA, junto con la proteína cofactor S, inactiva FVa y FVIIIa para evitar una mayor generación de trombina. FV Leiden es una mutación p.Arg506Gln (c.1691G>A) en el sitio primario de escisión de PCA en FV activado. La presencia de FV Leiden ralentiza la inactivación de FVa por PCA y es la causa más común de trombofilia en humanos (Van Cott et al, 2016). Se están llevando a cabo ensayos clínicos enfoques alternativos a la PCA objetivo. Se ha reportado de que un anticuerpo monoclonal humanizado que inhibe la proteína C activada restaura la hemostasia en ratones hemofílicos (Jiang et al, 2023) y se ha iniciado ensayos en humanos con un inhibidor de la serina proteasa (serpina) que solo se dirige a la PCA, no a la proteína C precursora (Baglin et al, 2023). Los ensayos para la proteína C y PCA están disponibles de forma rutinaria en muchos laboratorios de hemostasia terciaria en caso de que se requiera medición para el seguimiento del fármaco.

Moléculas que se dirigen a la proteína S: La proteína S es un cofactor de TFPI y PCA que funciona para restringir la generación de trombina. Se ha reportado que dirigirse a la proteína S utilizando un pequeño ARN interferente mejora la hemostasia en ratones con hemofilia (Prince et al, 2020) y se ha utilizado un anticuerpo de proteína S para mejorar la terapia de reemplazo de FIX en la generación de trombina de pacientes con hemofilia B (Wilson et al, 2024). La proteína S libre y la proteína S total, que también mide la proteína S combinada con el regulador del complemento, la proteína de fijación a C4b, están disponibles de forma rutinaria en muchos laboratorios de hemostasia terciaria en caso de que se requiera una medición para el seguimiento del fármaco.

Ensayos de generación de trombina: Los ensayos de generación de trombina (TG) son ensayos globales que pueden evaluar el potencial hemostático general y poner de manifiesto la hipercoagulabilidad o hipocoagulabilidad en el plasma (Ninivaggi et al, 2021). Existen varios ensayos de TG cromogénicos o fluorogénicos internos y comerciales disponibles que suelen desencadenar la TG mediante el uso de factor tisular, FXIa o FIXa. Debido a la falta de estandarización, existe una escasa correlación entre ellos (Devreese et al, 2007). A pesar de estos problemas, los ensayos de TG se utilizan a menudo en ensayos farmacéuticos para evaluar el efecto de nuevas moléculas en la hemostasia.

Referencias

- Adcock DM, Strandberg K, Shima M, Marlar RA. Ventajas, desventajas y optimización de los ensayos monoetápicos y de actividad factorial cromogénica en hemofilia A y B. *IntJ Lab Hematol* 2018; 40(6): 621-629.
- Aznar JA, Cabrera N, Matysiak M, Zawilska K, Gercheva L, Antonov A, Montanes M, Paez AM, Lissitchkov T. Estudio farmacocinético de un concentrado de factor IX de alta pureza (factor IX Grifols) con un seguimiento de 6 meses en pacientes previamente tratados con hemofilia grave b. *Hemofilia* 2009; 15(6): 1243-1248.
- Baglin T, Huntington JA, Koch A, Mocanu I, Makhaldiani L. Serpin-PC en personas con hemofilia grave (PwH): resultados actualizados de un estudio multicéntrico de varias partes, el primero en humanos. *Sangre* 2023; 142(Suplemento 1): 2619.
- Baker P, Platton S, Gibson C, Gray E, Jennings I, Murphy P, Laffan M. Guías sobre los aspectos de laboratorio de los ensayos utilizados en la hemostasia y la trombosis. *BrJ Haematol* 2020; 191(3): 347-362.
- Barrowcliffe TW, Raut S, Sands D, Hubbard AR. Coagulación y ensayos cromogénicos de la actividad del factor VIII: aspectos generales, estandarización y recomendaciones. *Semin Thromb Hemost* 2002; 28(3): 247-256.
- Bowyer A, Gray E, Lowe A, Murphy P, Platton S, Riddell A, Chowdary P, Lester W, Jenkins PV. Pruebas de coagulación de laboratorio y factor VIII porcino recombinante: una guía de la Organización de Médicos del Centro de Hemofilia del Reino Unido. *Hemofilia* 2022; 28(3): 515-519.
- Bowyer A, Kitchen S, Maclean R. Efectos de emicizumab en TTPA, ensayos cromogénicos y de una etapa del factor VIII en plasma con picos artificiales y en muestras de pacientes con hemofilia A con inhibidores. *Hemofilia* 2020; 26(3): 536-542.
- Bowyer A, Kitchen S, Maclean R. Medición del título de anticuerpos antifactor VIII en presencia de emicizumab; Uso de ensayos cromogénicos de Bethesda. *IntJ Lab Hematol* 2021; 43(4): 0204-0206.
- Bowyer AE, Duncan EM, Antovic JP. Papel de los ensayos cromogénicos en el diagnóstico de hemofilia A y B. *Hemofilia* 2018; 24(4): 578-583.
- Bowyer AE, Ezban M, Kitchen S. Medición de la actividad mimética EVI 11 del nuevo anticuerpo biespecífico, Mim8, en plasma de hemofilia A grave mediante ensayos TTPA y FVIII de una etapa. *Res Pract Thromb Haemost* 2021; 5: Resumen PB0680.
- Bowyer AE, Goodeve AC, Liesner R, Mumford AD, Kitchen S, Makris M. p.Tyr365Cys cambio en el factor VIII: hemofilia A, pero no como lo conocemos. *Br J Haem* 2011; 154(5): 618-625.
- Bowyer AE, Gosselin RC. Mediciones de la actividad del factor VIII y del factor IX para el diagnóstico de la hemofilia y los tratamientos relacionados. *Semin Thromb Hemost* 2022; 49(06): 609-620.
- Bowyer AE, Hillarp A, Ezban M, Persson P, Kitchen S. Medición de la actividad del factor IX de beta pegol no acog con kits de ensayo cromogénico y coagulación de una etapa disponibles comercialmente: un estudio de dos centros. *J Thromb Haemost* 2016; 14(7): 1428-1435.
- Bowyer AE, Kitchen S, Ezban M. Efecto de un anticuerpo biespecífico mimético del factor VIII de próxima generación (Mim8) en los ensayos de actividad del factor VIII y generación de trombina. *J Thromb Haemost* 2023; 21 (3): 480-487.
- Bowyer AE, Kitchen S, Maclean RM. Efectos de emicizumab en TTPA, ensayos cromogénicos y de una etapa del factor VIII en plasma con picos artificiales y en muestras de pacientes con hemofilia A con inhibidores. *Hemofilia* 2020; 26(3): 536-542.
- Chhabra ES, Sadeghi-Khomami A, Liu M, Young G, Pipe SW, Ozelo MG, Le-Camus C, Toh M, Lima-Montalvo SA, Demissie M. Estudio de campo comparativo global de la antitrombina (AT): Impacto de la variabilidad de los ensayos de laboratorio en la evaluación de la medición de la actividad de AT (resumen PP-072). *Hemofilia* 2024; 30: 3-223.
- Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio. Determinación de las actividades de los factores de coagulación mediante el ensayo de coagulación en una etapa, 2ª edición. Norma CLSI H48. 2016. <https://clsi.org/standards/products/hematology/documents/h48/>.
- De Wolf D, Singh K, Chuah MK, VandenDriessche T. Terapia génica para la hemofilia: ¿el fin del principio? *Hum Gene Ther* 2023; 34(17-18): 782-792.

Devreese K, Wijns W, Combes I, Van Kerckhoven S, Hoylaerts MF. Generación de trombina en plasma de adultos y niños sanos: análisis de trombograma cromogénico versus fluorogénico. *Thromb Haemost* 2007; 98(3): 600-613.

Druzgal CH, Kizilocak H, Brown J, Sen nett M, Young G. Anticuerpo neutralizante contra emicizumab en un paciente con hemofilia A grave con inhibidores: nuevo caso con evaluación de laboratorio detallada. *J Thromb Haemost* 2020; 18(9): 2205-2208.

Agencia Europea de Medicamentos (EMA). Hemlibra (emicizumab) Resumen de las características del producto. 2018. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/hemlibra-epar-product-information_en.pdf.

Agencia Europea de Medicamentos (EMA). NovoEight (turoctocog alfa) Resumen de las características del producto. 2021. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/novoeight-epar-product-information_en.pdf.

Agencia Europea de Medicamentos (EMA). Hemgenix (etranacogene dezaparvovec) Resumen de las características del producto. 2024. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/hemgenix-epar-product-information_en.pdf.

Agencia Europea de Medicamentos (EMA). Nuwiq (simoctocog alfa) Resumen de las características del producto. 2022. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/nuwiq-epar-product-information_en.pdf.

Foley JH, Shehu E, Riddell A, Gray E, Goodale A, Yu IM et al. Las diferencias en la formación del complejo de tenasa R338L y de tipo salvaje están en la raíz de las discrepancias en el ensayo de factor IX de R338L. *Sangre Adv* 2023; 7(3): 458-467.

Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, por sus siglas en inglés). Xyntha (factor antihemofílico [recombinante]) Información de prescripción. 2020. <https://www.fda.gov/media/70399/download>.

Gray E, Kitchen S, Bowyer AE, Chowclary P, Jenkins PV, Murphy P et al. Medición de laboratorio de terapias de reemplazo de factor en el tratamiento de la hemofilia congénita: una guía de la Organización de Médicos del Centro de Hemofilia del Reino Unido. *Hemofilia* 2020; 26(1): 6-16.

Gritsch H, Romeda-Finger S, Scheiflinger F, Turecek PL. Asignación de potencia y medición de la actividad FIX recombinante en plasma humano: impacto de los reactivos aTPT en el ensayo de coagulación de 1 etapa. *Hemofilia* 2014; 20(s3): 37 (resumen).

Ingerslev J, Jankowski MA, Weston SB, Charles LA. Estudio de campo colaborativo sobre la utilidad de un estándar de concentrado de factor VIII de BDD en la estimación de la actividad de BDDractorVIIkC en plasma hemofílico utilizando ensayos de coagulación en una etapa. *J Thromb Haemost* 2004; 2(4): 623-628.

Jenkins PV, Bowyer AE, Burgess C, Gray E, Kitchen S, Murphy P et al. Pruebas de coagulación de laboratorio y tratamiento con emicizumab: una guía de la Organización de Médicos del Centro de Hemofilia del Reino Unido. *Hemofilia* 2020; 26: 151-155.

Jennings I, Kitchen DP, Woods TA, Kitchen S, Walker ID. Tecnologías emergentes y aseguramiento de la calidad: la perspectiva del Plan Nacional de Evaluación de la Calidad Externa del Reino Unido. *Semin Thromb Hemost* 2007; 33(3): 243-249.

Jiang M, Yang F, Jiang Y, Cheng L, Han J, Yi J et al. Seguridad y eficacia de un anticuerpo anti-PCA humano para la profilaxis de deficiencias de factores congénitos en modelos preclínicos. *Sangre* 2023; 142(12): 1071-1081.

Kershaw GW, Dissanayake K, Chen VM, Khoo T. Evaluación de ensayos cromogénicos FIX mediante protocolos automatizados. *Hemofilia* 2018; 24(3): 492-501.

Kitchen S, Beckmann H, Katterle Y, Bruns S, Tseneklidou-Stoeter D, Maas Enriquez M. BAY 81-8973, un factor VIII recombinante de longitud completa: resultados de un estudio de campo de laboratorio comparativo internacional. *Hemofilia* 2016; 22(3): e192-e199.

Kitchen S, Jennings I, Makris M, Kitchen DP, Woods TAL, Walker ID. Variabilidad del ensayo de coagulación y factor cromogénico VIII en muestras post-infusión y enriquecidas que contienen FVIII recombinante de longitud completa o proteína de fusión Fc del factor VIII recombinante (rFVIII-Fc). *IntJ Lab Hematol* 2019; 41(2): 176-183.

Kitchen S, Jennings I, Makris M, Kitchen DP, Woods TAL, Walker ID. Variabilidad del ensayo del factor VIII en muestras posteriores a la infusión que contienen FVIII de longitud completa y con delección del dominio B. *Hemofilia* 2016; 22(5): 806-812.

Kitchen S, Katterle Y, Beckmann H, Maas Enriquez M. El ensayo cromogénico para la asignación de potencia BAY 81-8973 no tiene ningún impacto en el resultado clínico o el seguimiento en muestras de pacientes. *J Thromb Haemost* 2016; 14(6): 1192-1199.

Kitchen S, Kershaw GW, Tiefenbacher S. Factores VIII y IX recombinantes a modificados: problemas cromogénicos y de ensayo de una etapa. *Hemofilia* 2016; 22: 72-77.

Klukowska A, Szczepanski T, Vdovin V, Knaub S, Jansen M, Liesner R. Nuevo factor VIII recombinante derivado de líneas celulares humanas (Human-cl rhFVIII, Nuwiq(T)) en niños con hemofilia A grave: eficacia, seguridad y farmacocinética. *Hemofilia* 2016; 22(2): 232-239.

Lenting PJ, Denis CV, Christophe OD. Emicizumab, un anticuerpo biespecífico que reconoce los factores IX y X de la coagulación: ¿cómo se compara realmente con el factor VIII? *Sangre* 2017; 130: 2463-2468.

Lissitchkov T, Hampton K, von Depka M, Hay C, Rangarajan S, Tuddenham E et al. Novel human cell-line-derived recombinant factor VIII (human-cl rhFVIII; Nuwiq®) en adultos con hemofilia A grave: eficacia y seguridad. *Hemofilia* 2016; 22(2): 225-231.

Mahlangu J, Kaczmarek R, von Drygalski A, Shapiro S, Chou S, Ozelo MC et al. Resultados a dos años de la terapia con valoctocogén roxaparovec para la hemofilia A. *Nuevo Eng J Med* 2023; 388(8): 694-705.

Mahlangu JN, Ahuja SP, Windyga J, Church N, Shah A, Schwartz L. BAY 81-8973, un factor VIII recombinante de longitud completa para el tratamiento de la hemofilia A: revisión del producto. *TherAdv Hematol* 2018; 9(7): 191-205.

Mast AE, Ruf W. Regulación de la coagulación por el inhibidor de la vía del factor tisular: implicaciones para la terapia de la hemofilia. *J Thromb Haemost* 2022; 20(6): 1290-1300.

Matino D, Acharya S, Palladino A, Hwang E, McDonald R, Taylor CT et al. Eficacia y seguridad del inhibidor de la vía del factor tisular marstacimab en participantes con hemofilia grave sin inhibidores: resultados del ensayo de fase 3 Basis. *Sangre* 2023; 142(Suplemento 1): 285.

Miesbach W, Meijer K, Coppens M, Kampmann P, Klamroth R, Schutgens R et al. Terapia génica con vector de virus adenoasociado 5-factor IX humano en adultos con hemofilia B. *Sangre* 2018; 131 (9):1022-31.

Miller CH, Boylan B, Payne AB, Driggers J, Bean CJ. Validación del ensayo cromogénico de Bethesda para inhibidores del factor VIII en pacientes con hemofilia A que reciben emicizumab. *IntJ Lab Hematol* 2021; 43(2): e84-e86.

Miller CH, Rice AS, Boylan B, Shapiro AD, Lentz SR, Wicklund BM et al. Comparación de ensayos basados en coágulos, cromogénicos y de fluorescencia para la medición de inhibidores del factor VIII en el Estudio de investigación de inhibidores de hemofilia de EE. UU. *J Thromb Haemost* 2013; 11(7): 1300-1309.

¡Morfin! M, Cinotti S, Bellatreccia A, Paladino E, Gringer! A, Mannucci PM. Un estudio farmacocinético multicéntrico del concentrado de factor VIII recombinante con delección en el dominio B utilizando diferentes ensayos y estándares. *J Thromb Haemost* 2003; 1(11): 2283-2289.

Moser KA, Smock KJ. Interferencia directa de anticoagulantes orales (ACOD) en los ensayos de hemostasia. *Programa Hematología Am Soc Hematol Educ* 2021; 2021(1): 129-133.

Nederlof A, Kitchen S, Meijer P, Cnossen MH, Ali Pour N, Kershaw GW et al. Rendimiento de las mediciones de productos de vida media extendida del factor IX en programas de evaluación de control de calidad externos. *J Thromb Haemost* 2020; 18:1874-1883.

Ninivaggi M, de Laat-Kremers R, Tripodi A, Wahl D, Zuily S, Dargaud Y et al. Recomendaciones para la medición de la generación de trombina: Comunicación del Subcomité ISTH SSC sobre anticuerpos anticoagulantes/antifosfolípidos contra el lupus. *J Thromb Haemost* 2021; 19(5): 1372-1378.

Nogami K, Shima M. Terapias actuales y futuras para la hemofilia: más allá de las terapias de reemplazo de factor. *Br J Haematol* 2023; 200(1): 23-34.

¡Pas! KJ, Lissitchkov T, Mamonov V, Mant T, Timofeeva M, Bagot C et al. Orientación de la antitrombina en la hemofilia A o B con fitusirán terapéutico de siRNA en investigación: resultados de la cohorte de inhibidores de fase 1. *J Thromb Haemost* 2021; 19(6): 1436-1446.

- Pavlova A, Delev D, Pezeshkpoor B, Muller J, Oldenburg J. Mutaciones en hemofilia A en pacientes con fenotipo no grave asociadas con una discrepancia entre los ensayos de actividad del factor VIII en una etapa y en un solo estadio. *Thromb Haemost* 2014; 111 (5): 851 -861.
- Peyvandi F, Oldenburg J, Friedman KD. Una evaluación crítica de los ensayos cromogénicos y de una etapa de la actividad del factor VIII. *J Thromb Haemost* 2016; 14(2): 248-261.
- Pipe SW, Leebeek FW, Recht M, Key NS, Castaman G, Miesbach W et al. Terapia génica con etranacogene dezaparovec para la hemofilia B. *Nuevo Engl J Med* 2023; 388(8): 706-718.
- Pipe SW, Sadeghi-Khomami A, Konkle BA, Kitchen S, Negrier C, Liu M, et al. Un estudio de campo comparativo global para evaluar la actividad del factor VIII de efanesoctocog alfa mediante ensayos de coagulación en una etapa y sustrato cromogénico en laboratorios clínicos de hemostasia. *Hemofilia*. 2024; 30(1):214-23.
- Pittman DD, Transportista C, Soares H, McKay J, Tan CY, Liang JZ et al. Estudio de campo y estudios correlativos de la variante del factor IX FIX-R338L en participantes tratados con fidanacogene elaparovec. *Hemorragia del trombo* 2024; 124(10): 912-921.
- Platton S, Raheja P, Dale C, Guy S, Yartey N, Bowyer A. Evaluación de ensayos cromogénicos y de una etapa para la medición de laboratorio de la actividad del factor VIII después de la infusión de valoctocogén roxaparovec. *Hemofilia* 2024; 30(5): 1221-1224.
- Pouplard C, Trossaert M, A LEO, Delahousse B, Giraudeau B, Gruel Y. Influencia de la fuente de fosfolípidos en los ensayos de factor IX basados en TTPA y posibles consecuencias para el diagnóstico de hemofilia B leve. *Hemofilia* 2009; 15(1): 365-368.
- Prince RE, Schaeper U, Dames S, Calzavarini S, Quarroz C, Reina Caro MD et al. El objetivo de la proteína S mediante ARN interferente pequeño es bien tolerado y protege a los ratones con hemofilia A de la hemartrosis aguda. *Sangre* 2020; 136(Suplemento 1): 20-21.
- Rangarajan S, Walsh L, Lester W, Perry DJ, Madan B, Laffan M. Transferencia del gen AAV5-factor VIII en la hemofilia A grave. *N Engl J Med* 2017; 377(26): 2519-2530.
- Rezaie AR, Giri H. Funciones anticoagulantes y de señalización de la antitrombina. *J Thromb Haemost* 2020; 18(12): 3142-3153.
- Robinson M, George L, Carr ME, Samuelson-Jones BJ, Arruda VR, Murphy JE et al. Discrepancias en el ensayo del factor IX en el entorno de la terapia génica hepática utilizando una variante hiperfuncional del factor IX-Padua. *J Thromb Haemost* 2021; 19(5):1212-1218.
- Rosen S, Tiefenbacher S, Robinson M, Huang M, Srimani J, Mackenzie D et al. Actividad del factor VIII eliminado por dominio B producido por transgén en plasma humano después de la terapia génica AAV5. *Sangre* 2020; 136(22): 2524-2534.
- Rosen S. Ensayo del factor VIII:C con un sustrato cromogénico. *Scand J Haematol* 1984; 33(supl 40): 139-145.
- Ruinemans-Koerts J, Peterse-Stienissen I, Verbruggen B. El no paralelismo en el ensayo del factor de coagulación en una etapa es un fenómeno de los anticoagulantes lúpicos y no de los inhibidores de factores individuales. *Thromb Haemost* 2010; 104(5): 1080-1082
- Simioni P, Tormene D, Tognin G, Gavasso S, Bulato C, Iacobelli NP et al. Trombofilia ligada al cromosoma X con un factor IX mutante (factor IX Padua). *N Engl J Med* 2009; 361: 1671-1675.
- Sommer JM, Buyue Y, Bardan S, Peters RT, Jiang H, Kamphaus GD et al. Estudio de campo comparativo: impacto de la variabilidad de los ensayos de laboratorio en la evaluación de la actividad de la proteína de fusión Fc del factor IX recombinante (rFIXFc). *Thromb Haemost* 2014; 112(5): 932-940.
- Srivastava A, Santagostino E, Dougall A, Kitchen S, Sutherland M, Pipe SW et al. Guías de la FMH para el tratamiento de la hemofilia, 3.ª edición. *Hemofilia* 2020; 26 (flexible 6): 1-158.
- Tiefenbacher S, Clausen WHO, Hansen M, Lutzhoft R, Ezban M. Afield estudian la actividad de N8-GP en muestras de plasma enriquecidas en laboratorios clínicos de hemostasia. *Hemofilia* 2019; 25: 893-901.
- Truedsson A, Schmidt DE, Stralfors A, Soutari N, Norberg E, Letelier A et al. Actividad de una etapa frente a la actividad cromogénica del factor IX en la hemofilia B [resumen]. *Res Pract Thromb Haemost* 2020;4.

- Valsecchi C, Gobbi M, Beeg M, Adams T, Castaman G, Schiavone L et al. Caracterización del anticuerpo neutralizante anti-emi- cizumab en un paciente con hemofilia A e inhibidor. *J Thromb Haemost* 2021; 19(3): 711-718.
- Van Cott EM, Khor B, Zehnder JL. Factor V Leiden. *Am J Hematol* 2016; 91(1): 46-49.
- Verbruggen B, Giles AR, Samis J, Verbeek K, Mensink E, Novakova I. El tipo de plasma deficiente en factor VIII utilizado influye en el rendimiento de la modificación de Nijmegen del ensayo de Bethesda para los inhibidores del factor VIII. *Throm Haemost* 2001; 86: 1435-1439.
- Verbruggen B, Novakova I, Wessels H, Boezeman J, van den Berg M, Mauser-Bunschoten E. La modificación de Nijmegen del ensayo de Bethesda para los inhibidores del factor VI11:C: mejora de la especificidad y la fiabilidad. *Throm Haemost* 1995; 72(2): 247-251.
- Viuff D, Barrowcliffe TW, Saugstrup T, Ezban M, Lillicrap D. Viuff D, Barrowcliffe T, Saugstrup T, Ezban M, Lillicrap D. Estudio de campo comparativo internacional de N8 evaluando el rendimiento del ensayo del factor VIII. *Hemofilia* 2011; 17(4): 695-702.
- Wilmot HV, Hogwood J, Gray E. Factor IX recombinante: discrepancias entre la coagulación en una etapa y los ensayos cromogénicos. *Hemofilia* 2014; 20(6): 981-987.
- Wilson HP, Pierre A, Paysse AL, Kumar N, Cooley BC, Rudra P et al. Anticuerpo de proteína S como terapia complementaria para la hemofilia B. *Avances de Sangre* 2024; 8(2): 441-452.
- Woodhams B, Girardot O, Blanco MJ, Coles G, Gourmelin Y. Estabilidad de las proteínas de coagulación en plasma congelado. *Fibrinólisis de coágulos sanguíneos* 2001; 12(4): 229-236.
- Young G, Lenting PJ, Croteau SE, Nolan B, Srivastava A. Reducción de la antitrombina en la hemofilia: una mirada más cercana al fitusiran. *Res Pract Thromb Haemost* 2023; 7(4): 100179.
- Zhao Y, Feng G, Feng L. Efectos del tiempo de almacenamiento preanalítico, la temperatura y los tiempos de congelación-descongelación en las actividades de los factores de coagulación en plasma anticoagulado con citrato. *Ann Transl Med* 2018; 6(23): 456.

TEMAS TRATADOS

- ✓ Diferentes cinéticas de anticuerpos
- ✓ Muestras para la prueba de inhibidores de FVIII/ FIX: recolección, envío y preparación
- ✓ Plasma combinado normal para pruebas de inhibidores
- ✓ Protocolo para la prueba de inhibidores de FVIII y FIX
- ✓ Ensayos de inhibidores de factores de von Willebrand
- ✓ / Anticuerpo antifármaco (ADA) en el laboratorio de coagulación - emicizumab

Identificar el desarrollo de anticuerpos es vital para que el programa de tratamiento de la hemofilia pueda brindar una atención médica adecuada (Peyvandi et al, 2016; Srivastava et al, 2020). En el contexto de la hemofilia, los inhibidores son anticuerpos IgG policlonales contra el FVIII o FIX y en su mayoría de la subclase IgG4 de alta afinidad (Montalvão et al, 2015). Los inhibidores neutralizan el concentrado de factor administrado al paciente, lo que dificulta la prevención y el tratamiento de la hemorragia (Pratt et al, 2021). La aparición de los inhibidores es el resultado de un proceso de varias etapas en el que intervienen determinantes ambientales y genéticos. En la hemofilia A grave, los inhibidores del FVIII se forman en aproximadamente el 30% de los pacientes, generalmente durante los primeros 20 a 30 días de exposición. En la hemofilia B grave, la incidencia acumulada de desarrollo de inhibidores es menor que en la hemofilia A grave y alcanza el 4-5% entre 9 y 11 días después de la exposición (Ljung et al, 2019). El tratamiento de la hemorragia aguda en pacientes con inhibidores depende del título del inhibidor. Los pacientes con un título bajo de inhibidores (<5 UB/ml) pueden ser tratados con terapia sustitutiva estándar, factor concentrado, aunque requiere dosis más altas para superar los efectos neutralizantes del inhibidor. Para los pacientes con inhibidores de títulos altos (>5 UB/ml), las únicas terapias efectivas para tratar el sangrado son los agentes de derivación (Ljung et al, 2019). Los tres agentes de derivación disponibles que se utilizan en la hemofilia A y B son (1) concentrado de complejo de protrombina activado (aPCC), (2) dos formas de FVII activado recombinante (rFVIIa) y (3) FVIII porcino recombinante. En algunos países se dispone de fármacos hemostáticos recientemente desarrollados, como los anticuerpos biespecíficos humanizados (p. ej., emicizumab), el ARN de interferencia (p. ej., fitusiran) y los agentes inhibidores del factor tisular (anti-TFPI), entre otros, para prevenir la hemorragia. La inducción de tolerancia inmunológica (ITI) se utiliza para erradicar los inhibidores e implica inyecciones intravenosas frecuentes de concentrado de factor durante varios meses. En la hemofilia A, la ITI es eficaz en alrededor del 65 al 70% de los pacientes. El seguimiento de la titulación de inhibidores de estos pacientes es esencial para evaluar y manejar el protocolo. La investigación de laboratorio del inhibidor debe llevarse a cabo utilizando el método de Bethesda modificado. Aunque esta prueba tiene un CV (coeficiente de varianza) alto, es la prueba de referencia utilizada para valorar los anticuerpos inhibidores. En algunos casos, el cribado de inhibidores mediante la prueba de TTAP se puede llevar a cabo antes de ajustar la dosis de los anticuerpos. Sin embargo, debido a las limitaciones de la prueba, los resultados negativos no deben utilizarse para excluir la posible presencia de un inhibidor. Se puede encontrar más información en el capítulo 6 de este manual. Una alternativa al cribado de anticuerpos contra el FVIII o FIX es el uso de una prueba inmunológica. Se han estudiado diversos ensayos inmunológicos y, aunque estas pruebas son más sensibles que las pruebas funcionales, no discriminan entre anticuerpos inhibidores y no inhibidores y, por lo tanto, aún no son útiles

en la práctica clínica para detectar o monitorizar inhibidores funcionales. Sin embargo, los estudios han demostrado que los anticuerpos de la subclase IgG4 se correlacionan con los inhibidores funcionales de FVIII y FIX (Awasthi et al, 2022; Montalvão et al, 2015; Moorehead et al, 2015).

Diferentes cinéticas de los anticuerpos: Las diferentes cinéticas de los anticuerpos pueden afectar el análisis de los datos y, en consecuencia, dar lugar a interpretaciones erróneas. Cuando los inhibidores del FVIII o FIX actúan en una prueba de inhibición de manera dependiente de la dosis, como inactivando completamente el FVIII o FIX, estos inhibidores se denominan inhibidores de "Tipo I". Los inhibidores que demuestran un comportamiento cinético más complejo suelen denominarse inhibidores de "tipo II", que inactivan el FVIII de forma incompleta. Los inhibidores de tipo I generalmente se desarrollan en pacientes con hemofilia congénita A o B en respuesta al FVIII o concentrado del FIX, mientras que los inhibidores de tipo II generalmente se presentan en pacientes con hemofilia adquirida o hemofilia A leve. Los inhibidores de FVIII de tipo I dependen del tiempo y la temperatura porque su diana, el FVIII, forma un complejo con su proteína transportadora, el FVW. Los inhibidores de FIX no dependen del tiempo y la temperatura.

Muestras para la prueba del inhibidor de FVIII/FIX: recolección, envío y preparación:

Recogida y envío de muestras: Las muestras para los ensayos de inhibidores de FVIII y FIX se recogen en citrato trisódico al 3,2% (0,105-0,109 M), el mismo tipo de muestra que se utiliza para la mayoría de las pruebas de coagulación. La sangre entera citratada debe centrifugarse dentro de las 4 horas posteriores a la recolección de sangre, y la centrifugación debe ser de 1500 g durante 15 minutos. Las muestras de plasma positivas para inhibidores del FVIII y FIX, no sangre entera, pueden almacenarse a temperatura ambiente durante 1 semana, o congelarse a -70 °C y almacenarse hasta 15 años. Es importante recordar que, a diferencia de los procedimientos tradicionales de análisis de la coagulación, en este tipo de muestras es el anticuerpo el que se debe conservar. Esta información es muy útil para los laboratorios que necesitan enviar muestras a otro laboratorio para su análisis, ya que el transporte no depende del hielo seco.

Calentamiento de las muestras: Las muestras de pacientes utilizadas para la detección de inhibidores pueden contener FVIII exógeno o FIX debido a infusiones recientes de concentrado de factor, tales como: (1) profilaxis, (2) tratamiento de hemorragia, (3) terapia ITI o (4) FVIII endógeno o FIX si la prueba se realiza en hemofilia leve o moderada. La presencia de FVIII exógeno o FIX puede afectar significativamente la detección de inhibidores, con subestimación del título del inhibidor y resultados falsos negativos (Batty et al, 2014; De Lima Montalvão et al, 2015). El calentamiento de las muestras durante 30 minutos a 56 °C disocia el complejo antígeno-anticuerpo y desnaturaliza el factor. Para estandarizar la prueba, se recomienda que todas las muestras de prueba estén siempre precalentadas, incluso si no se espera FVIII o FIX exógeno. El procedimiento de calentamiento debe ir seguido de una etapa de centrifugación, de 2 minutos a 4000 g, para eliminar los residuos en el plasma causados por el calentamiento. Este paso de calentar las muestras para la prueba del inhibidor no se ha evaluado para todos los productos disponibles para el tratamiento del paciente. Por lo tanto, para cada producto de FVIII o FIX modificado molecularmente, debe demostrarse que el FVIII o FIX residual se deteriora debido al procedimiento de calentamiento. El emicizumab no se destruye por la etapa de precalentamiento; sin embargo, los inhibidores del FVIII se pueden medir en presencia de emicizumab utilizando un método del FVIII cromogénico bovino. Vale la pena recordar que algunos pacientes usan concentrado de factor y emicizumab concomitantemente, por lo que es necesario un tratamiento térmico.

Dilución de la muestra: Para valorar el inhibidor, la prueba debe realizarse con múltiples diluciones del plasma de prueba. La forma en que se selecciona el factor de dilución no se limita a un número específico, ya que depende de si se conoce el título del inhibidor anterior.

Plasma combinado normal para la prueba de inhibidores: Para evaluar la actividad del inhibidor en la muestra de prueba, es necesario presentar una fuente "externa" de FVIII o FIX para este inhibidor. Esta fuente externa se basa en el "pool" o combinación de plasma normal, por lo que es importante tener en

cuenta que cualquier error en esta etapa puede generar resultados falsos positivos y negativos. Al preparar un grupo para las pruebas de inhibidores, se debe medir la actividad del FVIII o FIX y la desviación de este valor debe controlarse durante el tiempo de almacenamiento o cuando se produce un nuevo lote. Se debe utilizar una combinación de plasma normal para garantizar que el nivel de FVIII o FIX esté cerca de 1 UI/ml (100 %). Un nivel más bajo de factor en el grupo plasmático normal puede resultar en una sobreestimación del título del inhibidor, mientras que un nivel más alto del factor puede resultar en una subestimación del título del inhibidor. Es aceptable una desviación máxima del 5% de 1 UI/ml de FVIII o FIX en la combinación de plasma normal. La fuente externa de FVIII o FIX se puede producir mediante la preparación de la combinación de plasma normal o a partir de una fuente comercial y se puede congelar o liofilizar. Se sugiere un mínimo de 20 donantes para obtener plasma con un nivel de FVIII o FIX cercano a 1 UI/ml. El FVIII es un factor de coagulación termolábil, lo que significa que, durante una incubación de 2 horas a 37 °C, habrá una pérdida significativa de la actividad del FVIII debido a un cambio en el pH. Para estabilizar el pH durante la incubación, el plasma normal utilizado debe amortiguarse. Esto se puede hacer usando solución amortiguadora de imidazol o solución amortiguadora HEPES.

Protocolo para la prueba de inhibidores de FVIII y FIX: En 1975, Kasper et al describieron un método para determinar los inhibidores de FVIII y FIX, y hasta la fecha, esta sigue siendo la prueba más estandarizada, conocida como la prueba de Bethesda. En 1995, se describió el método de Nijmegen, una modificación del ensayo de Bethesda, con algunas diferencias: (1) la introducción de un grupo tamponado para mejorar la estabilidad del FVIII durante la incubación, y (2) plasma deficiente en FVIII para usar en la mezcla de control. Este método modificado de Bethesda fue recomendado por la Sociedad Internacional de Trombosis y Hemostasia (ISTH) como método de referencia para la prueba de inhibidores del FVIII (Verbruggen et al, 1995). La prueba del inhibidor es un método indirecto y se basa en el principio de la inactivación del factor de coagulación de una fuente externa conocida por el inhibidor en la muestra de prueba durante un período de incubación. Una unidad Bethesda se define como la cantidad de inhibidor que neutralizará el 50% de una unidad de FVIII añadida en 2 horas a 37 °C.

Reactivos y equipos:

- Solución amortiguadora para dilución (parte 1)
- Solución amortiguadora de imidazol o HEPES (abajo)
- Plasma normal combinado (parte 2)
- Plasma deficiente en FVIII
- Cefalina (reactivo TTPA)
- Tubos de plástico

Tabla 22. Solución amortiguadora de imidazol o HEPES

Solución amortiguadora	
Imidazol	Mezcle 1 parte de solución amortiguadora de imidazol 4M con 39 partes de plasma normal combinado. Después de mezclar, el pH debe ajustarse entre 7,3 y 7,5.
HEPES	Mezcle 1 parte de solución amortiguadora HEPES 1M con 9 partes de plasma normal combinado. Después de mezclar, el pH debe ajustarse entre 7,3 y 7,5.

Método: Preparar diluciones del plasma de prueba en tubos de plástico hasta un volumen final de 0,2 ml utilizando la solución amortiguadora para dilución. Las diluciones requeridas para cada paciente pueden cambiar. Un punto de partida sugerido sería comenzar con una muestra sin diluir y luego realizar diluciones de 1/2, 1/4, 1/8, etc.

Nota: Si el paciente se ha sometido previamente a un ensayo de inhibidores, el nivel puede proporcionar una guía aproximada sobre qué diluciones se deben utilizar. Pipetear 0,2 ml de plasma deficiente en FVIII en otro tubo de plástico. Esto servirá como un tubo de control.

Nota: En el ensayo original de Bethesda, se utilizó solución amortiguadora de imidazol para preparar una mezcla de control con el grupo de plasma normal. En el ensayo de Nijmegen, la solución amortiguadora de imidazol se sustituye por plasma deficiente en FVIII. Se han observado algunas diferencias entre el uso de plasma inmunodepletado con deficiencia de factor, plasma químicamente empobrecido y plasma congénitamente deficiente. Estas diferencias pueden deberse a la ausencia o presencia de FVW en el plasma, a la presencia de anticuerpos o a la presencia de fragmentos de FVIII. Dado que el FVW está presente en el grupo de plasma normal, no es necesario que el diluyente de la mezcla de control también contenga FVW y, para reducir los costes, el plasma con deficiencia de factor puede sustituirse por albúmina sérica bovina (BSA) al 4%. El BSA tamponado al cuatro por ciento es un sustituto fiable y económico del plasma FVIII o FIX y favorece la estandarización del método.

- ✓ Añadir 0,2 ml de plasma normal combinado tamponado al tubo de control y a las diluciones de plasma de prueba. El nivel de FVIII de todos los tubos será de aproximadamente 0,5 UI/ml. Se considera que esto significa que el grupo de plasma normal tamponado tiene 1 UI/ml de FVIII.
- ✓ Tapar, mezclar e incubar todos los tubos a 37°C durante 2 horas.
- ✓ Después de 2 horas, transfiera todos los tubos a un baño de hielo, a menos que el ensayo de FVIII deba realizarse inmediatamente.
- ✓ Realizar la prueba de FVIII en todas las mezclas de incubación utilizando el método habitual de ensayo de FVIII, método de una etapa o cromogénico (Parte 6).
- ✓ Lea el FVIII residual de cada mezcla de ensayo, utilizando el control al 100% (0,5 UI/ml).

Ensayo de inhibidor de factor

Parte 1



Parte 2

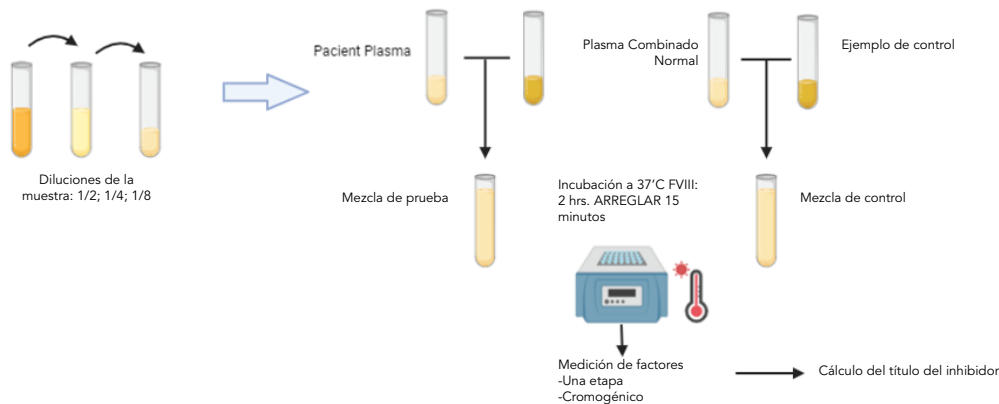


Figura 8. Procedimientos de ensayo de inhibidores

Resultados e interpretación: Para el cálculo del inhibidor se elige la dilución que dé un FVIII residual más cercano al 50%, pero dentro del rango del 25% al 75%. Cualquier FVIII residual de <25% o >75% no debe utilizarse para los cálculos del nivel de inhibidor. Se puede hacer un gráfico del % de FVIII residual frente a las unidades inhibitoras en papel log-log a partir de la definición de la unidad inhibitoria. Lea el nivel de inhibidor correspondiente al FVIII residual para cada mezcla de ensayo y corrija la dilución. Por ejemplo, si el valor más cercano al 50% del factor residual se encontró en la dilución 1/4 (es decir, en la mezcla 1/4 + pool normal), el resultado, que será cercano a 1 unidad Bethesda (BU), debe multiplicarse por 4.

- ✓ 1/4 de dilución + pool normal
- ✓ FVIII residual = 50%
- ✓ Unidad inhibidora (del gráfico) = 1 BU
- ✓ Multiplicar por el factor de dilución (1/4) = 4 BU

Nota: El ensayo del inhibidor se basa en la determinación del FVIII o FIX residual de la mezcla de plasma de prueba y control previamente incubado. Los ensayos de Bethesda y Nijmegen se desarrollaron utilizando un ensayo de factor de coagulación de una etapa. Sin embargo, las pruebas de inhibidores con este ensayo tienen limitaciones. La formación de coágulos en esta prueba puede verse afectada, por ejemplo, por el anticoagulante lúpico (inhibidores de la coagulación inespecíficos) y fármacos como el emicizumab. Una alternativa para evitar estos problemas es el uso de un método cromogénico. Otra ventaja de utilizar un método cromogénico en lugar de un ensayo de coagulación es la mayor precisión de los resultados. Una muestra de paciente sin diluir con actividad residual >75% puede reportarse como <0,4 BU/ml. En el caso de los inhibidores del FVIII, el Comité Científico y de Normalización (CSE) de la ISTH recomienda considerar positivo un resultado >0,6 BU/ml. Además de la curva de calibración, el título del inhibidor se puede calcular utilizando la fórmula: $(2 - \log \%RA) / 0,301$. En el caso de un inhibidor de tipo I, una curva del plasma de prueba de un paciente mostrará paralelismo con la curva de calibración. La falta de paralelismo con la curva de calibración indica un estándar de inhibidor cinético tipo II diferente. En el caso de los inhibidores con cinética de tipo II, utilice la dilución más baja que se acerque al 50% de la actividad residual para el cálculo final del título del inhibidor.

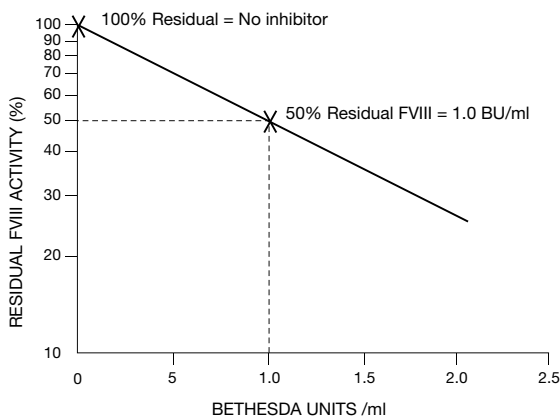


Figura 9. Cálculo de la actividad de los factores residuales

Notas: Los inhibidores funcionales de la hemostasia más frecuentemente encontrados son los anticoagulantes lúpicos, que no están dirigidos contra factores de coagulación específicos y cuya presencia debe excluirse antes de realizar pruebas para inhibidores de factores específicos. La cuantificación del título del inhibidor se lleva a cabo en el laboratorio, preferiblemente utilizando el ensayo de Bethesda modificado por Nijmegen Bethesda, ya que esta modificación ofrece una mayor especificidad y sensibilidad en comparación con el ensayo original de Bethesda. Los resultados positivos del inhibidor del FVIII por debajo de 2,0 BU pueden confirmarse con el método cromogénico, ya que tiene menos interferencia analítica y mayor precisión en comparación con el método de una etapa. El método cromogénico también es la mejor opción si se sospecha la presencia de anticoagulantes lúpicos en la muestra de prueba o si contiene anticoagulantes terapéuticos como heparina o inhibidores directos del FXa o FIIa. Todos los anticuerpos anti-FVII que no se detectan en el ensayo de Nijmegen-Bethesda pueden ser clínicamente relevantes porque pueden aumentar el aclaramiento del FVIII y pueden medirse mediante ELISA.

Ensayos de inhibidores del factor de von Willebrand: La EVW se considera el trastorno hemorrágico hereditario más común conocido en los seres humanos, con una prevalencia poblacional del 1% y una prevalencia sintomática de 1 en 1000 (Bowman et al, 2010). Las opciones de tratamiento incluyen la infusión

de concentrados de FVW, que generalmente también contienen FVIII, administrados para prevenir o tratar los episodios hemorrágicos. Los aloanticuerpos frente al FVW tienen una prevalencia de entre el 7 y el 9,5% (James et al, 2013; Pagliari et al, 2023). En estos casos, el tratamiento con concentrados de FVW es ineficaz, y se han notificado episodios de anafilaxia con exposición posterior al FVW (James et al, 2013). Como ya sabemos, la deficiencia de FVW puede explicarse por diferentes mecanismos derivados de los tipos de defectos genéticos identificados. Esta variabilidad de los defectos genéticos contribuye a una heterogeneidad de inhibidores dirigidos a diferentes epítomos de la molécula del FVW. Por esta razón, la detección en laboratorio de estos anticuerpos es un desafío (Connell et al, 2021; Miller, 2021; Sarji et al, 1974). En 1974, Sarji et al (1974) reportaron por primera vez de un caso de aloanticuerpos contra el FVW en un paciente con múltiples transfusiones. El inhibidor del FVW se midió utilizando un método análogo al método de Bethesda para los inhibidores del FVIII (Sarji et al, 1974). Aunque no existe una estandarización para la identificación de los inhibidores del FVW, el método de Bethesda ha sido utilizado por la mayoría de los laboratorios (Favaloro et al, 2022), con la diferencia de utilizar métodos que evalúan la actividad del FVW en lugar de la prueba del FVIII o FIX. Actualmente existen diferentes tipos de métodos disponibles para detectar la actividad del FVW, con diferentes sensibilidades y especificidades, por lo que es importante considerar que esta variabilidad de métodos influye en la sensibilidad y especificidad de la detección de estos inhibidores (Favaloro et al, 2022). Los anticuerpos contra el FVW no tienen las características de depender del tiempo y la temperatura, por lo que pueden evaluarse inmediatamente después de la prueba de mezcla (Sarji et al, 1974). El método clásico del cofactor de ristocetina, que evalúa la interacción del FVW con las plaquetas fijadas en presencia de ristocetina, así como el método de evaluación del colágeno y el método de ganancia de función, son opciones que ya han sido evaluadas y que han demostrado ser métodos con buena sensibilidad y estabilidad, a pesar de presentar resultados diferentes como se ha comentado anteriormente. Todavía no se han evaluado otros métodos disponibles para este tipo de investigación. También se han descrito métodos inmunológicos que detectan anticuerpos neutralizantes y no neutralizantes. En relación con el desarrollo de autoanticuerpos que caracterizan la EVW adquirida, los pacientes con neoplasias mieloproliferativas (NMP) son un subgrupo que presenta complicaciones hemorrágicas relacionadas con la actividad del FVW. Se observan resultados falsos en muestras de pacientes con NMP, dependiendo de la tecnología aplicada. La investigación de laboratorio de los inhibidores del FVW caracterizados por aloanticuerpos y autoanticuerpos debe realizarse con cautela en vista de las diferentes posibilidades metodológicas. El rendimiento de todos los métodos modernos disponibles actualmente aún no está claro (Noye et al, 2024; Favaloro et al, 2022).

Anticuerpo antifármaco (ADA) en el laboratorio de coagulación - Emicizumab: El emicizumab es un anticuerpo biespecífico que se une a FIX/FIXa y FX/FXa humanos y actúa como un mimético de la función del FVIII. Sin embargo, no está regulado por los mecanismos que regulan el FVIII (Mahlangu et al, 2018, Mahlangu et al, 2022). La prueba de cribado de TTPA se reduce considerablemente con emicizumab (es decir, por debajo del rango de referencia, independientemente de los reactivos utilizados). El emicizumab afecta a todas las pruebas y ensayos de laboratorio basados en TTPA. El emicizumab también interfiere con los ensayos cromogénicos para medir el FVIII utilizando FIXa y FX humanos, pero no con los que utilizan FIXa y FX de origen bovino (Bowyer et al, 2021; Jenkins et al, 2020). El emicizumab puede medirse e reportarse en $\mu\text{g/ml}$ utilizando un ensayo modificado de una etapa con mayor dilución de la muestra y calibrado con calibradores específicos para emicizumab. Los anticuerpos antifármacos (ADA) pueden desarrollarse después de una dosis única o la administración repetida de una proteína terapéutica, y pueden afectar la farmacocinética, la farmacodinamia, la eficacia y/o la seguridad de esta proteína terapéutica. Los estudios que evalúan las características de la ADA en pacientes tratados con emicizumab muestran que la prueba de TTAP puede prolongarse junto con episodios hemorrágicos en presencia de anticuerpos con acción neutralizante (Novembrino et al, 2023; Valsecchi et al, 2021). En este caso, cuando se midió el nivel de emicizumab, mostró una reducción significativa. La actividad neutralizante de estos anticuerpos no se identificó claramente en los métodos funcionales, ni siquiera para el ensayo Bethesda modificado (Kaneda et al, 2021). El nivel de la unidad de Bethesda identificada parece ser más bajo de lo esperado en comparación con la prueba que mide el nivel de emicizumab. Todavía no se ha establecido el papel de las pruebas funcionales para el ADA, pero pueden ser complementarias a la medición del nivel plasmático

del fármaco en estos casos. La FMH recomienda medir los niveles de emicizumab utilizando un ensayo modificado de un solo paso con mayor dilución de la muestra y calibrado con calibradores específicos para emicizumab (Srivastava et al, 2020).

Referencias

- Awasthi NP, Tiwari V, Riaz K, Arshad S, Husain N. Análisis revelador y IgG4 del factor VIII en pacientes con hemofilia-A con y sin inhibidores. *Transfus Apher Sci* 2022; 61(3): 103343.
- Batty P, Platton S, Bowles L, Pasi KJ, Hart DP. El tratamiento térmico preanalítico y un ELISA FVIII mejoran la detección de anticuerpos contra el factor VIII en la hemofilia A adquirida. *BrJ Haematol* 2014; 166(6): 953-956.
- Bowman M, Hopman WM, Rapson D, Lillicrap D, James P. Prevalencia de la enfermedad de von Willebrand sintomática en la práctica de atención primaria. *J Thromb Haemost* 2010; 8(1): 213-216.
- Bowyer AE, Lowe AE, Tiefenbacher S. Problemas de laboratorio en terapia génica y emicizumab. *Hemofilia* 2021; 27 Supl 3: 142-147.
- Connell NT, Flood VH, Brignardello-Petersen R, Abdul-Kadir R, Arapshian A, Couper S et al. ASH I STH NHF FMH 2021 Guías sobre el tratamiento de la enfermedad de von Willebrand. *Sangre Adv* 2021; 5(1): 301-325.
- de Lima Montalvão SA, Tucunduva AC, de Almeida Sambo AL, De Paula EV, de Souza Medina S, Ozelo MC. El tratamiento térmico de las muestras mejora el rendimiento del ensayo Nijmegen-Bethesda en pacientes con hemofilia A sometidos a inducción de tolerancia inmune. *Thromb Res* 2015; 136(6): 1280-1284.
- Favaloro EJ, Dean E, Arunachalam S, Vong R, Mohammed S. Evaluación de errores en la identificación de laboratorio de la enfermedad de von Willebrand utilizando ensayos contemporáneos de factores de von Willebrand. *Patología* 2022; 54(3): 308-317.
- James PD, Lillicrap D, Mannucci PM. Aloanticuerpos en la enfermedad de von Willebrand. *Sangre* 2013; 122(5): 636-640.
- Jenkins PV, Bowyer A, Burgess C, Gray E, Kitchen S, Murphy P, Platton S, Riddell A, Chowdary P, Lester W. Pruebas de coagulación de laboratorio y tratamiento con emicizumab: una guía de la Organización de Médicos del Centro de Hemofilia del Reino Unido. *Hemofilia* 2020; 26(1): 151-155.
- Kaneda M, Kawasaki R, Matsumoto N, Abe H, Tashiro Y, Inokuchi Y et al. Análisis detallado de la eficacia del fármaco que disminuye la eficacia del fármaco contra el anti-emicizumab, utilizando muestras de plasma de un paciente con hemofilia A. *J Thromb Haemost* 2021; 19(12): 2938-2946.
- Ljung R, Auerswald G, Benson G, Dolan G, Duffy A, Hermans C et al. Inhibidores en la hemofilia A y B: tratamiento de las hemorragias, erradicación de inhibidores y estrategias para pacientes difíciles de tratar. *EurJ Haematol* 2019; 102(2): 111-122.
- Mahlangu J, Iorio A, Kenet G. Actualización del estado del arte de emicizumab. *Hemofilia* 2022; 28 Supl 4(Supl 4): 103-110.
- Mahlangu J, Oldenburg J, Paz-Priel I, Negrier C, Niggli M, Mancuso ME et al. Profilaxis con emicizumab en pacientes que tienen hemofilia A sin inhibidores. *N Engl J Med* 2018; 379(9): 811 -822.
- Molinero GH. Monitorización de los inhibidores del factor de von Willebrand en pacientes con enfermedad de von Willebrand tipo 3 mediante un ensayo cuantitativo. *Hemofilia* 2021; 27(5): 823-829.
- Montalvão S.A., Tucunduva AC, Siqueira LH, Sambo AL, Medina SS, Ozelo M.C. Una evaluación longitudinal de los anticuerpos anti-FVIII demostró que la subclase IgG4 se correlaciona principalmente con el inhibidor de alto título en pacientes con hemofilia A. *Hemofilia* 2015; 21(5): 686-692.
- Moorehead PC, Thibeault L, Tuttle A, Grabel J, Dwyre L, Silva M, James P, Lillicrap D. Adquisición rápida de tolerancia inmunológica al factor VIII y desaparición del antifactor VIII IgG4 después de la terapia profiláctica en un paciente con hemofilia A con inhibidor del factor VIII de título alto. *J Pediatr Hematol Oncol* 2015; 37(4): e220-222.
- Novembrino C, Boscolo-Anzoletti M, Galbiati E, Shinohara S, Peyvandi F. Efecto de los anticuerpos neutralizantes de emicizumab en los resultados de la prueba de tiempo de coagulación basada en el tiempo de tromboplastina parcial activada en pacientes tratados con emicizumab. *Res Pract Thromb Haemost* 2023; 7(8): 102260.

Noye J, Beggs J, Mason J. Los resultados discrepantes de la baja actividad del factor de von Willebrand en el analizador ACL TOP son frecuentes en pacientes no seleccionados con neoplasias mieloproliferativas y no muestran correlación con la pérdida de multímero de alto peso molecular o el fenotipo de sangrado. *J Thromb Haemost* 2024; 22(4): 965-974.

Pagliari MT, Budde U, Baronciani L, Eshghi P, Ahmadinejad M, Badiie Z et al. Aloanticuerpos neutralizantes y no neutralizantes del factor de Von Willebrand en 213 sujetos con enfermedad de von Willebrand tipo 3 inscritos en 3WINTERS-IPS. *J Thromb Haemost* 2023; 21(4): 787-799.

Peyvandi F, Garagiola I, Young G. Pasado y futuro de la hemofilia: diagnóstico, tratamientos y sus complicaciones. *Lancet* 2016; 388(10040): 187-197.

Pratt KP, Arruda VR, Lacroix-Desmazes S. Inhibidores-Perspectivas recientes. *Hemofilia* 2021; 27 Supl 3: 28-36.

Sarji KE, Stratton RD, Wagner RH, Brinkhous KM. Naturaleza del factor von Willebrand: un nuevo ensayo y un inhibidor específico. *Proc Natl Acad Sci US A* 1974; 71(8): 2937-2941.

Srivastava A, Santagostino E, Dougall A, Kitchen S, Sutherland M, Pipe SW et al. Guías de la FMH para el tratamiento de la hemofilia, 3.^a edición. *Hemofilia* 2020; 26 Supl 6: 1-158.

Valsecchi C, Gobbi M, Beeg M, Adams T, Castaman G, Schiavone L, Huntington JA, Peyvandi F. Caracterización del anticuerpo neutralizante anti-emicizumab en un paciente con hemofilia A e inhibidor. *J Thromb Haemost* 2021; 19(3): 711-718.

Verbruggen B, Novakova I, Wessels H, Boezeman J, van den Berg M, Mauser-Bunschoten E. La modificación de Nijmegen del ensayo de Bethesda para los inhibidores del factor VI11:C: especificidad y fiabilidad mejoradas. *Thromb Haemost* 1995; 73(2): 247-251.

TEMAS TRATADOS

- ✓ Ensayos de la actividad de fijación plaquetaria de FVW- Nitty S. Mathews
- ✓ Von Willebrand Antígeno - Tulasi Geevar
- ✓ Ensayo de fijación al colágeno del factor von Willebrand
- ✓ Tulasi Geevar
- ✓ Ensayo de fijación al factor VIII - Tulasi Geevar
- ✓ Von Willebrand Factor Multimers - Annette Bowyer
- ✓ Interpretación de las pruebas de von Willebrand - Tulasi Geevar
- ✓ Variables preanalíticas en el diagnóstico de la EVW - Tulasi Geevar
- ✓ Pruebas en el repertorio para el diagnóstico de la EVW - Tulasi Geevar
- ✓ Diagnóstico de la enfermedad de von Willebrand en un entorno de escasos recursos - Tulasi Geevar

Ensayos de la actividad de fijación plaquetaria del FVW (ensayos de actividad del FVW): Con todas las Guías que utilizan la relación FVW:RCo/antígeno del FVW para determinar si el paciente tiene una EVW de tipo 1 (cuantitativa) o de tipo 2 (cualitativa), el papel de la actividad de fijación al FVW:glicoproteína Ib (GPIb) es de suma importancia en la clasificación de la EVW. Un panel multidisciplinario de guías establecido por la Sociedad Americana de Hematología (ASH, por sus siglas en inglés), la Fundación Nacional de Hemofilia (NHF, ahora la Fundación Nacional de Trastornos Hemorrágicos, NBDF, por sus siglas en inglés) y la FMH, sugiere realizar ensayos más nuevos que midan la actividad de fijación plaquetaria del FVW (por ejemplo, FVW:GP1bM y FVW:GP1bR) en comparación con el ensayo convencional de cofactor de ristocetina del FVW (FVW:RCo) [Recomendación 4] (James et al, 2021). El panel consideró que había beneficios moderados de los ensayos más nuevos, lo que refleja el menor CV y la mayor reproducibilidad en comparación con el FVW:RCo. El ensayo FVW:GP1bR requiere que se añada ristocetina y, por lo tanto, puede estar sujeto a los mismos problemas que el ensayo FVW:RCo con respecto a los polimorfismos de fijación a ristocetina. Sin embargo, utiliza un fragmento recombinante de GP1b en lugar de plaquetas. Por el contrario, el ensayo FVW:GPIbM utiliza una molécula GPIba recombinante que contiene varias mutaciones de ganancia de función; en consecuencia, esta variante GP1b se une al dominio A1 del FVW incluso en ausencia de ristocetina (Laffan et al, 2014). En un estudio de EEC (evaluación externa de la calidad) de 2022 del programa de pruebas de aptitud del FVW del Colegio Americano de Patólogos (Salazar et al, 2022), el CV general para el FVW:RCo osciló entre el 14,6 % y el 23,5 % para los resultados en muestras normales y entre el 24,3 % y el 44,8 % para los resultados en muestras con baja actividad. Los CV fueron menores para el FVW:GP1bM y el FVW:Ab, oscilando entre el 8,0% y el 34,8%, incluyendo muestras normales y anormales. Un estudio en el que se compararon diferentes ensayos de actividad de fijación al FVW:GP1b reportó de que la sensibilidad y la especificidad para diferenciar la EVW de tipo 1 y de tipo 2, en función de las proporciones actividad/antígeno utilizando un punto de corte de 0,7, fueron del 92 % y del 72,4 % para el FVW:RCo, del 84 % y del 89,7 % para la GP1bR, y del 92 % y 85,1 % para la GP1 bM (Vangenechten et al, 2018).

Tabla 23. Resumen de los ensayos de actividad de FVW automatizados disponibles en el mercado

Actividad FVW- Nomenclatura ISTH	Principio	Ensayos	Método de detección
FVW:RCo	Agregación de plaquetas liofilizadas inducida por ristocetina	1 . Reactivo Siemens BC von Willebrand (Siemens, Marburgo, Alemania) 2. STA-FVW:Rco (Diagnostica Stago, Francia)	Aglutinación de plaquetas liofilizadas
FVW:GP1bR	Fijación de FVW inducida por ristocetina a un fragmento de GPIb recombinante	Actividad del cofactor de ristocetina HemosIL FVW Actividad del cofactor de ristocetina HemosIL AcuStar FVW (Laboratorio de Instrumentación, Bedford, MA, EE. UU.)	Aglutinación de perlas de látex 2. Quimioluminiscencia
FVW:GP1bM	Fijación de FVW a un fragmento de GPIb mutante de ganancia de función sin ristocetina	Siemens Innovance FVW Ac (Siemens, Marburgo, Alemania)	Aglutinación de perlas de látex
FVW:Ab	Fijación de un anticuerpo monoclonal a un epítipo de dominio A1 del FVW (sitio de fijación de plaquetas)	Actividad del FVW con HemosIL (Laboratorio de Instrumentación, Bedford, MA, EE. UU.)	Aglutinación de perlas de látex

Descargo de responsabilidad general: Los kits/protocolos de reactivos que se enumeran a continuación han sido validados en uno o más analizadores de coagulación por el fabricante para optimizar el rendimiento del producto y cumplir con sus especificaciones. Es posible que no se admitan las modificaciones definidas por el usuario, ya que pueden afectar el rendimiento del sistema y los resultados del ensayo. Es responsabilidad del usuario validar las modificaciones de estas instrucciones o el uso de los reactivos en analizadores distintos de los incluidos en las Hojas de Aplicación o las Instrucciones de Uso del fabricante específico.

Ensayos de actividad automatizados del FVW:

Ensayo de cofactor de ristocetina del FVW (FVW:RCo): Se realizan diluciones de un patrón (cuyo valor de cofactor de ristocetina se conoce) y se mezclan con plaquetas liofilizadas, por lo que se agrega una cantidad conocida de cofactor a las plaquetas. A continuación, se mide la agregación inducida por ristocetina y se dibuja una curva estándar. Las muestras de prueba se tratan de manera similar y el valor del cofactor de ristocetina se calcula a partir del gráfico estándar. Muestra primaria: plasma citrado.

Reactivos:

- ✓ Plaquetas fijas liofilizadas (BC von Willebrand Reagent⁵, Siemens Healthcare Diagnostics, Marburgo, Alemania)
- ✓ Solución salina normal
- ✓ Plasma de calibración
- ✓ Plasma del paciente y plasmas de control (control normal [p. ej., plasma de control N] y un control anormal de bajo nivel [p. ej., plasma de control P])
- ✓ Reactivo de ristocetina (p. ej., Revohem, 25 mg/ml; reconstituir con 0,625 ml de agua destilada y mezclar bien)
- ✓ Agua destilada

Preparación de reactivos:

- ✓ Reconstituya el reactivo de Von Willebrand con 4 ml de agua destilada primero y diluya con 7 ml de solución salina. Verifique el recuento de plaquetas, debe ser de $2,000,000$ a $2,050,000$ / cumm. Añadir $50,0 \mu\text{l}$ de reactivo de ristocetina por $950 \mu\text{l}$ de plaquetas.
- ✓ Reconstituya el plasma del calibrador con exactamente 1 ml de agua destilada. Deje reposar el material reconstituido a temperatura ambiente ($18-25^\circ\text{C}$) durante 30 minutos. Luego, agite el vial suavemente antes de usarlo. El material es estable durante 8 horas a $15-25^\circ\text{C}$. Se puede congelar y almacenar a -80°C o menos.
- ✓ Plasma de control anormal (plasma de control P). Reconstituya el plasma de control P con exactamente 1 ml de agua destilada o desionizada. Agitar con cuidado para que se disuelva sin formación de espuma y dejar reposar a temperatura ambiente ($18-25^\circ\text{C}$) durante 15 minutos. Antes de usar, agitar de nuevo con cuidado.
- ✓ Control normal (plasma de control N). Reconstituya el plasma de control N con exactamente 1 ml de agua destilada o desionizada. Agitar con cuidado para que se disuelva sin que se forme espuma y dejar reposar a temperatura ambiente ($18-25^\circ\text{C}$) durante 30 minutos. Antes de usar, agitar de nuevo con cuidado.

Procedimiento:

- ✓ Los reactivos necesarios (plaquetas liofilizadas con ristocetina), solución salina normal y calibrador, se cargan en el analizador de coagulación.
- ✓ Se corre la curva estándar.
- ✓ Una vez completada la calibración, se debe revisar y validar la curva de calibración. La curva validada es la curva de calibración utilizada para la determinación del resultado.
- ✓ Corra la muestra de prueba.

Protocolo de control de calidad:

Corra el control normal (control de plasma N) y el control anormal de bajo nivel (control de plasma P).

Nota: Los controles y el plasma del calibrador deben comprarse por separado.

Posibles interferencias:

- ✓ Las plaquetas no se diluyen correctamente.
- ✓ Cambio en la concentración de ristocetina.

Interpretación de los resultados:

Los resultados se reportan en %.

Valores esperados (evaluados en el sistema BCS; Siemens, Marburgo, Alemania):

Grupo sanguíneo	% de normalidad
Todos (n = 185)	58–172
O	49–142
A+B+AB	66–183

Ensayo FVW:GPIbR (HemosIL® AcuStar, FVW Ristocetina Cofactor Activity⁶; Laboratorio de Instrumentación, MA, EE. UU.): Este ensayo es un inmunoensayo de dos pasos que cuantifica la actividad de FVW:RCo en plasma humano citratado utilizando partículas magnéticas como fase sólida y un sistema de detección quimioluminiscente. En el primer paso, la muestra se mezcla con la solución amortiguadora del ensayo

que contiene ristocetina y partículas magnéticas recubiertas con un fragmento recombinante de receptor plaquetario de glicoproteína de FVW (rGPIba) por medio de un anticuerpo monoclonal específico que orienta el fragmento de GPIba de la manera adecuada para interactuar con el FVW de la muestra del paciente en presencia de ristocetina. El FVW presente en la muestra se une a las partículas magnéticas proporcionalmente a su actividad como cofactor de ristocetina. Después de la separación magnética y el lavado, se añade un anticuerpo monoclonal anti-FVW marcado con isoluminol y se incuba en un segundo paso. Después de una nueva separación magnética y lavado, se agregan dos inductores y la reacción quimioluminiscente resultante se mide como unidades de luz relativa (RLU) mediante el sistema óptico ACL AcuStar. Esto es proporcional a la concentración de actividad de FVW:RCo en la muestra.

Muestra primaria: Plasma citrado.

Reactivos (composición del kit):

- ✓ Cartucho FVW:RCo para 25 determinaciones

Cada cartucho contiene 1 vial de suspensión de partículas magnéticas recubierta con un rGPIba por medio de un anticuerpo monoclonal de ratón específico, 1 vial de solución amortiguadora del ensayo que contiene sulfato de ristocetina, 1 vial de un trazador que contiene un anticuerpo monoclonal de ratón anti-FVW marcado con isoluminol y 1 vial de diluyente de muestra. Los reactivos se encuentran en una solución amortiguadora de citrato o HEPES que contiene BSA, IgG de ratón, estabilizantes y conservantes.

- ✓ Calibrador del FVW: RCo 1: Solución salina HEPES que contiene BSA, IgG de ratón, estabilizantes y conservantes.
- ✓ Calibrador del FVW:RCo 2: Plasma humano liofilizado que contiene solución amortiguadora, estabilizantes y conservantes.

Preparación/procedimiento:

- ✓ Invierta suavemente el cartucho 30 veces evitando la formación de espuma.
- ✓ Después de la resuspensión completa de las micropartículas, coloque el cartucho sobre una superficie sólida y retire suavemente la lengüeta de envío del cartucho.
- ✓ Presione las dos lengüetas en los lados de la tapa perforadora (color gris) y aplique presión en la parte superior del cartucho hasta que se bloquee.
- ✓ Una vez que el cartucho esté firme, cárguelo en el instrumento.
- ✓ Los viales diluidos del calibrador se transfieren a los respectivos tubos de plástico con código de barras y se cargan en el analizador (ACL AcuStar).
- ✓ Se corre la curva estándar.
- ✓ Una vez completada la calibración, se debe revisar y validar la curva de calibración. La curva validada es la curva de calibración utilizada para la determinación del resultado.
- ✓ Corra la muestra de prueba.

Control de calidad:

- ✓ Se recomiendan dos controles de nivel (se compran por separado).
- ✓ Cada laboratorio debe establecer su propia media y desviación estándar.

Trazabilidad de calibradores y controles:

Los valores reportados se determinaron en múltiples corridas en el sistema ACL AcuStar utilizando lotes específicos de reactivos y contra un estándar interno de la casa, que se ha asignado al valor contra el material de referencia internacional actual para FVW y FVIII.

Resultados:

Los resultados de FVW:RCo se reportan en %, lo que equivale a UI/dl.

Tabla 24. Valores esperados según FVW:RCo

Tipo ABO en sangre	Número de muestras analizadas	HemosIL AcuStar FVW:RCo (FVW:GP1bR)
Todos	287	45.6 – 176.3 %
O	163	43.8 – 161.5 %
A+B+AB	124	53.8 – 210.8 %

Nota: Se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios rangos normales de FVW:RCo en función de la población atendida y de la técnica, el método y el equipo utilizados. Linealidad: 0.5-200.0%. Límite de detección: 0,17%.

Ensayo FVW:GP1bM (Innovance® FVW Ac; Siemens Healthcare Diagnostics, Marburgo, Alemania): El principio de ensayo hace uso de la fijación del FVW a su receptor GP1b. Las partículas de poliestireno están recubiertas con un anticuerpo contra GP1b. Se añade GP1b recombinante (se incluyen dos mutaciones de ganancia de función) y se une al anticuerpo, así como al FVW de la muestra. Debido a las mutaciones de ganancia de función, la fijación del FVW a GP1b no requiere ristocetina. Esta fijación de FVW induce la aglutinación de partículas, que puede medirse como un aumento de la extinción mediante mediciones turbidimétricas.

Muestra primaria: plasma citrado.

Tabla 25. Reactivos (composición del kit) Innovance® FVW Ac

Innovación® FVW Ac	Ingredientes	Concentración	Fuente
REACTIVO I	Solución amortiguadora, sacarosa, partículas de poliestireno recubiertas con anticuerpos monoclonales anti-GP1b, anfotericina B, gentamicina	2.2 g/l	Ratón
REACTIVO II	Solución salina tamponada, reactivo bloqueante heterofílico, detergente, polivinilpirrolidona, azida sódica	<1 g/l	
REACTIVO III	Solución salina tamponada, GP1b recombinante, anfotericina B, gentamicina	≤80 mg/l	

Preparación/procedimiento:

- ✓ Los reactivos (RI, RII y RIII), la solución amortiguadora de imidazol y el calibrador se cargan en el analizador.
- ✓ Se corre la curva estándar.
- ✓ Una vez completada la calibración, se debe revisar y validar la curva de calibración. La curva validada es la curva de calibración utilizada para la determinación del resultado.
- ✓ Corra la muestra de prueba.

Calibración: Se genera una curva estándar mediante la determinación automática de diferentes diluciones de plasma humano estándar y solución amortiguadora Veronal de Owren. La curva estándar debe regenerarse si hay un cambio en el instrumento o en el lote de Innovance® FVW Ac utilizado, o si los resultados del control están fuera del rango aceptable. La calibración del ensayo se realiza con plasma humano estándar que se calibra con respecto al valor FVW:RCo del estándar internacional para la coagulación sanguínea FVIII y FVW en plasma.

Las muestras inicialmente por encima del rango de calibración son diluidas por el instrumento, lo que da como resultado un rango de medición de hasta el 600% de lo normal.

Control de calidad:

- ✓ Los controles (dos niveles) deben compararse por separado
- ✓ Rango normal: Plasma de control N
- ✓ Rango patológico: P plasmático de control

Resultados:

- ✓ Los resultados se reportan como % de normalidad
- ✓ 100% = 1 IU/ml

Valores esperados: Las muestras de plasma fresco obtenidas de donantes aparentemente sanos se analizaron utilizando el ensayo Innovance® del FVW Ac en el sistema BCS/® BCS® XP con resultados (percentil 2,5 a 97,5) como se muestra en la Tabla 26.

Tabla 26. Valores esperados para el ensayo Innovance® FVW Ac

Grupo sanguíneo	Número de muestras analizadas	% de normalidad
All	263	47.8–173.2
O	129	46.3–145.6
A+B+AB	134	61.4–179.1

Nota: Se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios rangos normales de FVW:RCo en función de la población atendida y de la técnica, el método y el equipo utilizados.

Linealidad: 4 a 150%

Límite de detección: 2,2%

FVW:Ensayo Ab (HemosIL®FVW Activity, Instrumentation Laboratory, Bedford, MA, EE. UU.): El kit de actividad FVW es un ensayo inmunturbidimétrico mejorado con partículas de látex para cuantificar la actividad de FVW en plasma. La actividad del FVW se determina midiendo el aumento de la turbidez producida por la aglutinación del reactivo de látex. Un anticuerpo monoclonal anti-FVW específico adsorbido en el reactivo de látex, dirigido contra el sitio de fijación plaquetaria del FVW (receptor GPIIb), reacciona con el FVW del plasma del paciente. El grado de aglutinación es directamente proporcional a la actividad del FVW en la muestra y se determina midiendo la disminución de la luz transmitida causada por los agregados.

Muestra primaria: plasma citrado.

Reactivos (composición del kit):

- ✓ Reactivo de Látex: Suspensión liofilizada de partículas de látex de poliestireno recubiertas con anticuerpo anti-FVW monoclonal de ratón purificado dirigido contra un epítipo funcional del FVW, que contiene albúmina sérica bovina, estabilizantes y conservantes.
- ✓ Solución amortiguadora: solución amortiguadora de Tris que contiene albúmina sérica bovina, estabilizantes y conservantes.

Preparación:

- ✓ Solución amortiguadora: Lista para usar
- ✓ Reactivo de látex: Disuelva el contenido de cada vial vertiendo todo el contenido de un vial de solución amortiguadora en un vial de reactivo de látex. Vuelva a colocar el tapón y revuelva suavemente durante un mínimo de 20 segundos para disolver completamente el látex liofilizado. Asegúrese de que el producto se reconstruya completamente. Debe aparecer como

una suspensión homogénea y ligeramente lechosa. Mantenga el reactivo a 15-25 °C durante 30 minutos e inviértalo para mezclar antes de usarlo. No agitar. Nota: Evite la formación de espuma al homogeneizar los reactivos reconstituidos. Las burbujas en la parte superior de los líquidos pueden interferir con los sensores de líquidos del instrumento.

Control de calidad: Se recomienda la calibración de controles de plasma, normales y anormales (que se compran por separado) para un programa de control de calidad completo. El Control Normal y el Control de Prueba Especial Nivel 1 están diseñados para este programa. Cada laboratorio debe establecer su propia media y desviación estándar.

Resultados: Los resultados de la actividad del FVW se reportan en % de normalidad.

Tabla 27. Valores esperados para Ensayo FVW: Ab HemosL®Actividad FVW

Grupo sanguíneo	Número de muestras analizadas	% de actividad de FVW
O	132	40.3–125.9
A+B+AB	134	48.8–163.4

Nota: Debido a muchas variables, que pueden afectar los resultados, cada laboratorio debe establecer su propio rango normal para la actividad de FVW.

- ✓ Linealidad: 19-130%
- ✓ Límite de detección: 3,2%

Antígeno de Von Willebrand (FVW:Ag): El ensayo antígeno del FVW es un ensayo cuantitativo que mide la cantidad total de proteína FVW presente en la muestra, que incluye formas funcionales y disfuncionales. Los niveles de antígeno del FVW se pueden cuantificar mediante métodos inmunológicos que incluyen ELISA, inmunoensayo de látex automatizado (LIA) y, más recientemente, inmunoensayo quimioluminiscente (CLIA). Los ensayos del antígeno del FVW suelen ser muy fiables y reproducibles. El límite inferior de detección varía entre ensayos, con el LIA tendiendo a tener un poco más alto y los ensayos CLIA tienen el límite más bajo de detección. El antígeno del FVW es una prueba esencial en el diagnóstico de la EVW, pero es limitada, ya que solo evalúa la presencia de FVW y no su función. Usado solo, el antígeno del FVW solo puede identificar el tipo 3 de EVW donde hay niveles indetectables del antígeno del FVW, generalmente menos de 3 UI/dl. De acuerdo con las Guías de la Sociedad Británica de Hematología (BSH) y de la Organización de Médicos del Centro de Hemofilia del Reino Unido (UKHCDO), el diagnóstico de la EVW tipo 3 requiere un ensayo de antígeno del FVW capaz de medir niveles de hasta <1 UI/dl. Se requieren ensayos funcionales o de actividad adicionales del FVW con el cálculo de las proporciones entre la actividad del FVW y los ensayos de antígeno para el diagnóstico y la diferenciación de la EVW de tipo 1 y tipo 2. El rango normal del valor de antígeno del FVW varía con cada laboratorio, pero generalmente se acepta que está entre 50 y 200 UI/dl. Los niveles inferiores a 50 UI/dl se consideran bajos, aunque esto debe correlacionarse con los antecedentes hemorrágicos y otras pruebas de actividad del FVW para el diagnóstico de la EVW. Es bien sabido que las personas con el tipo de sangre O exhiben una disminución del 25% en los niveles de FVW en comparación con las personas sin grupo sanguíneo O y, por lo tanto, tienen más probabilidades de ser diagnosticadas con EVW tipo 1. Sin embargo, el fenotipo hemorrágico de las personas con EVW es similar independientemente del grupo sanguíneo. Por lo tanto, no se requieren rangos de referencia específicos de ABO. A continuación, se enumera el protocolo para el ensayo ELISA antígeno del FVW mediante ELISA, LIA y CLIA.

Antígeno de Von Willebrand (FVW:Ag) por ELISA: Ensayo ELISA para la determinación cuantitativa del antígeno FVW (FVW:Ag) en plasma humano citratado. Un pocillo de microtitulación está recubierto con un anticuerpo (anticuerpo de captura) específico para el FVW. Se añaden e incuban diluciones de plasma estándar y de prueba, tiempo durante el cual el FVW se une al anticuerpo de captura en la placa. Después del lavado, se añade un segundo anticuerpo anti-FVW marcado con enzima (anticuerpo de detección) que se une al FVW unido a la placa. La cantidad de anticuerpo unido y, por lo tanto, de FVW presente

en la muestra, se cuantifica mediante la adición de sustrato enzimático seguido del desarrollo del color. Muestra primaria: 3,2% de sangre citratada.

Materiales y reactivos:

- ✓ Placa de microtitulación
- ✓ Anticuerpo de captura/recubrimiento: conejo policlonal anti-FVW humano (Dako, código n.º 0082)
- ✓ Detección/anticuerpo marcado: conejo policlonal anti-FVW/HRP (Dako, código n.º 0226)
- ✓ Solución amortiguadora de recubrimiento de bicarbonato
- ✓ Solución amortiguadora para dilución
- ✓ Solución amortiguadora para lavado
- ✓ Solución amortiguadora de sustrato
- ✓ Sustrato: Dihidrocloruro de O-fenilendiamina (OPD) (Sigma P8287)
- ✓ 1,5 M H₂SO₄
- ✓ Calibrador: PNP o plasma comercial estándar
- ✓ PPP citrado del paciente
- ✓ Plasma de control normal y anormal
- ✓ 30% de peróxido de hidrógeno
- ✓ Lavadora y lector de placas ELISA
- ✓ Pipetas y puntas
- ✓ Baño maría a 37°C
- ✓ Selladores de placas
- ✓ Mezclador de vórtice

Preparación de reactivos:

Solución amortiguadora de recubrimiento de bicarbonato:

- a. Carbonato de sodio (Na₂CO₃): 0,16 g
- b. Bicarbonato de sodio (NaHCO₃): 0,294 g
- c. Disolver en agua destilada y hacer hasta 100 ml. Ajuste el pH a 9.6.
- d. Añadir aproximadamente 100 µl de tinte rojo. La vida útil es de 2-3 semanas.

Solución amortiguadora madre concentrada:

- a. Ortofosfato de dihidrógeno sódico (NaH₂PO₄·2H₂O): 0,975 g
- b. Ortofosfato de hidrógeno disódico (Na₂HPO₄·12H₂O): 6,7 g
- c. Cloruro de sodio (NaCl): 70,55 g

Disolver en agua destilada, mezclar bien usando un agitador magnético en un matraz cónico de fondo plano y finalmente llenar hasta alcanzar 250 ml.

Solución amortiguadora para lavado: Diluir la solución amortiguadora de material concentrado 1:10 (es decir, 100 ml de solución amortiguadora de material concentrado por 900 ml de agua destilada). Añadir 2 ml de Tween 20. Mezclar bien y almacenar a 4°C. La vida útil es de 2 semanas.

Solución amortiguadora etiquetada y dilución: Disuelva 3 gramos de PEG en 100 ml de solución amortiguadora para lavado con alto contenido de sal. Agrega 100 µl de tinte verde. La vida útil es de 2 semanas.

Solución amortiguadora de sustrato: Disuelva 0,73 g de ácido cítrico y 2,4 g de ortofosfato de hidrógeno disódico en agua destilada y componga el volumen hasta 100 ml. Ajuste el pH a 5,0. La vida útil es de 2 meses.

Ácido sulfúrico 1,5 M: Añadir 16,5 ml de ácido sulfúrico concentrado a 180 ml de agua. Siempre agregue ácido al agua.

Procedimiento:

Recubrimiento de placas: Las placas deben recubrirse el día antes de que se requieran. Las placas se pueden recubrir durante 16-96 horas antes de su uso. Diluir el anticuerpo de recubrimiento 1:1000 en solución amortiguadora COAT, es decir, 12 µl en 12 ml de solución amortiguadora COAT. Mezclar suavemente y añadir 100 µl a cada pocillo. Selle con una tapa de plástico e incube a 40 ° C durante la noche.

Procedimientos de ensayo: Prepare las diluciones para la curva estándar como se muestra a continuación:

- ✓ Para hacer la solución madre: Diluir 50 µl del plasma normal combinado en 3,95 ml de solución amortiguadora para dilución (1,80). Prepare una serie de estándares a partir de esta solución madre como se muestra a continuación:
 - a. Solución madre 125% (S1)
 - b. 0,8 ml de solución madre + 0,2 ml de solución amortiguadora 100% (S2)
 - c. 0,6 ml de solución madre + 0,4 ml de solución amortiguadora 75% (S3)
 - d. 0,4 ml de solución madre + 0,6 ml de solución amortiguadora 50% (S4)
 - e. 0,2 ml de solución madre + 0,8 ml de solución amortiguadora 25% (S5)
 - f. 0,1 ml de solución madre + 0,9 ml de solución amortiguadora 12,5% (S6)
 - g. 0,05% de solución madre + 0,95 ml de solución amortiguadora 6,25% (S7)
 - h. 1,00 ml de Solución amortiguadora blanco
- ✓ Diluir las muestras de paciente y control en 2 diluciones, 1:100 y 1:200, en solución amortiguadora para dilución (es decir, 10 µl en 990 µl y 500 µl de 1:100 diluido + 500 µl de solución amortiguadora).
- ✓ Lavar tres veces con una solución amortiguadora para lavado utilizando el lavador de placas, dejando remojar por tres minutos entre cada lavado. Después de la aspiración final, elimine el exceso de líquido y verifique que no haya burbujas.
- ✓ Agregue 100 µl de los estándares, pruebas y blancos, por duplicado, a los pocillos de la placa recubierta utilizando el siguiente formato:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S1	S1	T1	T1	T5	T5	T9	T9	T13	T13	T17	T17
B	S2	S2	T1	T1	T5	T5	T9	T9	T13	T13	T17	T17
C	S3	S3	T2	T2	T6	T6	T10	T10	T14	T14	T18	T18
D	S4	S4	T2	T2	T6	T6	T10	T10	T14	T14	T18	T18
E	S5	S5	T3	T3	T7	T7	T11	T11	T15	T15	Q1	Q1
F	S6	S6	T3	T3	T7	T7	T11	T11	T15	T15	Q1	Q1
G	S7	S7	T4	T4	T8	T8	T12	T12	T16	T16	Q2	Q2
H	BK	BK	T4	T4	T8	T8	T12	T12	T16	T16	Q2	Q2

S1-S7-Diluciones del patrón; T -Plasma de prueba; BK - Blanco

- ✓ Cubra con sellador de placas. Incube durante 1 hora en un baño maría a 37°C.
- ✓ Lave tres veces con solución amortiguadora para lavado usando el lavador de placas, dejando en remojo tres minutos entre cada lavado. Después de la aspiración final, retire el exceso de líquido y verifique que no haya burbujas.
- ✓ Detección de FVW diluido/anticuerpo etiquetado 1:4000 (es decir, 5 µl en 20 ml de solución amortiguadora etiquetada).

- ✓ Mezclar suavemente y añadir 100 µl de anticuerpo tag diluido a cada pocillo. Cubra con sellador de placas. Incubar durante 1 hora en un baño maría a 37°C.
- ✓ Lavar tres veces con la solución amortiguadora para lavado con el lavador de placas, dejando un remojo de tres minutos entre cada lavado. Después de la aspiración final, retire el exceso de líquido y verifique que no haya burbujas.
- ✓ Durante el lavado, prepare la solución de sustrato de la siguiente manera: Disuelva un comprimido de OPD de 10 mg en 15 ml de solución amortiguadora de sustrato. Lleve la solución preparada a temperatura ambiente. Justo antes de usar, agregue 7 µl de peróxido de hidrógeno al 30%.
- ✓ Usando un cronómetro, agregue 100 µl de solución de sustrato a cada pocillo. Incubar durante 8-10 minutos en el banco.
- ✓ Detenga la reacción añadiendo 100 µl de H₂SO₄ 1,5 M a cada pocillo EXACTAMENTE en el mismo intervalo de tiempo en que se añadió el sustrato. Agite el plato para mezclar.
- ✓ Seleccione el programa apropiado (492 nm) en el lector de placas de Lab Systems y trace la curva de calibración utilizando papel cuadrulado lineal. Las placas deben leerse dentro de los 30 minutos posteriores a su finalización. Si hay un retraso, guarde los platos en un armario oscuro hasta por 4 horas.
- ✓ Para calcular los resultados: lea la dilución 1:100 directamente de la calibración, multiplique 1:200 por dos y promedie los resultados. Incluya solo los resultados que se encuentren dentro de la curva estándar.

Protocolo de control de calidad: Corra el control normal y el control anormal (nivel bajo) junto con cada lote. Si está disponible, incluya una muestra de EVW tipo 3 como control.

Interpretación de los resultados: Los resultados se reportan como % o UI/dl.

Antígeno de Von Willebrand por LIA: El LIA automatizado se utiliza para la determinación cuantitativa del antígeno del FVW en plasma humano citrato. Este es el método más utilizado para estimar los niveles del antígeno del FVW. El kit automatizado antígeno del FVW es un ensayo inmunturbidométrico mejorado con partículas de látex para cuantificar el antígeno del FVW en plasma. Cuando un plasma que contiene antígeno del FVW se mezcla con el reactivo de látex y la solución amortiguadora de reacción incluidos en el kit, las partículas de látex recubiertas se aglutinan. El grado de aglutinación es directamente proporcional a la concentración de antígeno del FVW en la muestra y se determina midiendo la disminución de la luz transmitida causada por los agregados. Hay varios kits de ensayo antígeno del FVW basados en LIA disponibles en el mercado. El protocolo a continuación es para el kit HemosIL antígeno del FVW de *Instrumentation Laboratories*, pero también se pueden usar otros ensayos. La inclusión de este método no es una aprobación del producto de una empresa en particular. Si utiliza una fuente comercial diferente, es importante seguir las instrucciones del fabricante.

Reactivos y materiales:

- ✓ Reactivo de látex: 2 viales x 3 ml de una suspensión de partículas de látex de poliestireno recubiertas con un anticuerpo policlonal de conejo dirigido contra el FVW que contiene albúmina sérica bovina, solución amortiguadora, estabilizador y conservante
- ✓ Solución amortiguadora de reacción: 2 viales x 4 ml de solución amortiguadora HEPES que contiene albúmina sérica bovina, estabilizantes y conservante
- ✓ Diluyente de factor (solución amortiguadora de imidazol)
- ✓ Calibrador de plasma (11 calibradores de plasma)
- ✓ PPP citrado del paciente
- ✓ Plasma de control normal y anormal (nivel bajo)
- ✓ Agua destilada para la reconstitución de reactivos

Preparación de los reactivos, almacenamiento y estabilidad de los mismos:

- ✓ Reconstituya el plasma del calibrador con exactamente 1 ml de agua destilada. Deje reposar el material reconstituido a temperatura ambiente (18-25 °C) durante 30 minutos. Luego, agite el vial suavemente antes de usarlo. La preparación es estable durante 8 horas a 15-25°C. Se puede congelar y almacenar a -80 °C o menos.
- ✓ Plasma de control anormal (Dade P): Reconstituya el control P con exactamente 1 ml de agua destilada o desionizada. Agitar con cuidado para que se disuelva sin formación de espuma y dejar reposar a temperatura ambiente (18-25°C) durante 15 minutos. Antes de usar, agitar de nuevo con cuidado.
- ✓ Control normal/plasma normal combinado: Mantenga el PNP a 37 °C en baño maría durante 5 minutos, mezcle suavemente antes de usar.
- ✓ Reactivo de látex: Añadir 2 ml de solución amortiguadora de reacción y mezclar bien sin burbujas de aire. Una vez abierto, es estable durante 3 meses a 2-8°C en el vial original o 1 semana a 15°C en la ACL Family Top. No congelar.
- ✓ Solución amortiguadora de reacción: Una vez abierto, es estable durante 3 meses a 2-8°C en el vial original o 1 semana a 15°C en la ACL Family Top. No congelar.

Detalles de calibración: Cargue los reactivos adecuados (látex FWW:Ag, solución amortiguadora FWW:Ag, calibrador y diluyente de factor) en el analizador automatizado. Seleccione el programa de calibración y córralo. Una vez completada la calibración, revise los resultados. Si no hay errores/fallos y la calibración es aceptable, valide la curva de calibración. La calibración se realiza cuando hay un cambio en los números de lote de los reactivos o en los componentes principales del instrumento, según los requisitos reglamentarios locales o a discreción del laboratorio.

Protocolo de control de calidad: Corra al menos dos niveles de control (control normal y control anormal) junto con cada corrida. Cada laboratorio debe establecer su propia media y desviación estándar y establecer un programa de control de calidad.

Procedimiento: Seleccione el programa apropiado en el instrumento y conserve los reactivos necesarios (látex FWW:Ag, solución amortiguadora antígeno del FWW y diluyente de factor). Cargue las muestras y córralas según las instrucciones del fabricante.

Resultados: Los resultados se reportan en % o UI/dl.

Rango normal:

- ✓ Grupo sanguíneo O: 42,0-140,8 UI/dl
- ✓ Grupos sanguíneos A, B y AB: 66,1-176,3 UI/dl

Límite de detección:

- ✓ ACL Family: 3.5 UI/dl
- ✓ ACL Top Family/ACL Top Family 5 series: 2,2 UI/dl

Linealidad:

- ✓ ACL Family: 10-150 UI/dl
- ✓ ACL Top Family/ACL Top Family 5 series: 8,5-250 UI/dl
- ✓ Si se excede el rango lineal, las muestras deben diluirse 1:4 con diluyente de factor (100 µl de muestra + 300 µl de diluyente). Si es necesario, se puede realizar una dilución adicional de hasta 1:16. Multiplique los resultados por el factor de dilución respectivo.

Antígeno de Von Willebrand automatizado por CLIA: El CLIA automatizado se utiliza para la determinación cuantitativa de antígeno del FVW en plasma humano citratado. El ensayo antígeno del FVWCLIA es un inmunoensayo de dos pasos para cuantificar antígeno del FVW en plasma citrato humano utilizando perlas magnéticas como fase sólida y un sistema de detección quimioluminiscente. En el primer paso, la muestra se mezcla con partículas magnéticas recubiertas de anticuerpos policlonales anti-FVW y solución amortiguadora del ensayo. El FVW presente en la muestra se une a las partículas magnéticas recubiertas anti-FVW. En el segundo paso, después de la separación magnética y el lavado, se añade un anticuerpo policlonal anti-FVW marcado con isoluminol. La reacción quimioluminiscente se mide como unidades de luz reactiva, que son directamente proporcionales a la concentración de antígeno del FVW en la muestra. Los estudios a partir de datos de AEC han demostrado que el método antígeno del FVW CLIA tiene el CV más bajo y el límite de detección más bajo. Actualmente, el antígeno del FVW por el método CLIA solo es ofrecido por HemosIL Acustar antígeno del FVW y solo se puede correr en el instrumento ACL Acustar.

Composición de los reactivos:

El kit antígeno del FVW se compone de:

- a. Cartucho antígeno del FVW para 25 determinaciones: Cada cartucho contiene 1 vial de suspensión de partículas magnéticas liofilizadas recubierta con un anticuerpo policlonal anti-FVW de conejo, 1 vial de solución amortiguadora del ensayo, 1 vial de trazador compuesto por un anticuerpo policlonal anti-FVW de conejo marcado con isoluminol y 1 vial de diluyente de muestra. Los reactivos se encuentran en una solución amortiguadora de fosfato que contiene albúmina sérica bovina, IgG policlonal de conejo, estabilizantes y conservantes.
- b. Calibrador del antígeno del FVW1: Contiene solución salina con conservantes.
- c. Calibrador del antígeno del FVW2: 2 viales de plasma humano liofilizado que contiene solución amortiguadora, estabilizantes y conservante

Preparación y procedimiento:

FVW: Cartucho del Ag: La primera vez que se use el cartucho, invierta suavemente el cartucho 30 veces evitando la formación de espuma y verifique la resuspensión completa del vial de micropartículas. Si las micropartículas no están totalmente suspendidas, continúe invirtiendo el cartucho hasta que se vuelva a suspender por completo. Siga las instrucciones suministradas para abrir el cartucho y cargarlo en el sistema ACL AcuStar.

Calibrador del antígeno del FVW1: Es líquido y debe mezclarse mediante una inversión suave varias veces antes de su uso para asegurar la homogeneidad del calibrador.

Calibrador del antígeno del FVW2: Disuelva el contenido del vial con 1 ml de agua tipo reactivo de laboratorio clínico (CLR) o equivalente. Vuelva a colocar el tapón y gírelo suavemente. Asegúrese de la reconstitución completa del producto. Mantenga el calibrador a 15-25 °C durante 30 minutos e inviértalo suavemente para mezclar antes de usarlo. No agitar. Una vez reconstituido, vierta todo el contenido del vial del calibrador en el tubo de plástico vacío con código de barras debidamente etiquetado para su uso en el sistema ACL AcuStar.

Almacenamiento y estabilidad de reactivos:

Los reactivos y calibradores sin abrir son estables hasta la fecha de caducidad que se muestra en las etiquetas de los cartuchos y viales cuando se almacenan a 2-8 °C.

Cartucho del antígeno del FVW: La estabilidad después de la apertura a 2-8 °C a bordo del ACL AcuStar es de 8 semanas. Los cartuchos abiertos deben permanecer a bordo del ACL Acustar.

Calibrador del antígeno del FVW1 & 2: La estabilidad después de la apertura y/o reconstitución a bordo del ACL AcuStar es de 4 horas. Para una estabilidad óptima, retire los calibradores del sistema y guárdelos a 2-8 °C en tubos de plástico con código de barras tapados.

Protocolo de control de calidad: Corra al menos dos niveles de control (control normal y control anormal) junto con cada corrida. Cada laboratorio debe establecer su propia media y desviación estándar y establecer un programa de control de calidad.

Procedimiento: Seleccione el programa apropiado en el instrumento y conserve los reactivos requeridos. Cargue las muestras y córralas según las instrucciones del fabricante.

Resultados: Los resultados se reportan en % o UI/dl.

Rango normal:

Todos los grupos sanguíneos: 52,2-177,9 UI/dl

Grupo sanguíneo O: 48,2-157,2 UI/dl

Grupos sanguíneos A, B y AB: 59,6-210,5 UI/dl

Límite de detección:

ACL AcuStar: 0,13 UI/dl

Linealidad:

ACL Family: 0,3-400 UI/dl

Cuando se activa la capacidad de repetición del instrumento, el instrumento realiza una dilución automática y corrige el resultado final del factor de dilución (20x), ampliando así el rango de 8000 UI/dl. El ensayo no se ve afectado por el efecto de la prozona.

Ensayo de fijación al colágeno del factor de von Willebrand (FVW:CB): El FVW es una proteína plasmática con múltiples funciones y actividades. El FVW actúa como un puente adhesivo entre las plaquetas y la pared de los vasos. Se une a las plaquetas, principalmente a través del receptor GPIIb que utiliza su dominio AI, y al colágeno subendotelial, principalmente a través del dominio A3, lo que provoca la adhesión plaquetaria. La capacidad de fijación plaquetaria del FVW puede evaluarse mediante el ensayo de cofactor de ristocetina (FVW:RCo) u otros ensayos de fijación al GPIIb más recientes, y es el ensayo de actividad del FVW más utilizado. Sin embargo, FVW:RCo y FVW:CB evalúan diferentes funciones de FVW. FVW:CB se basa en la capacidad de FVW para adherirse al colágeno y depende de la presencia de multímeros de alto peso molecular (HMW) y un sitio de fijación al colágeno intacto. El colágeno tiene baja afinidad por los dominios de fijación de FVW individuales y requiere un FVW multimérico grande para una asociación estrecha con el colágeno. Esta propiedad de FVW:CB se utiliza para detectar la pérdida de multímeros HMW, que puede diferenciar entre el tipo 2A/2B (pérdida de multímero HMW) y el tipo 2M (distribución normal de multímeros). Las recientes Guías sobre la EVW de 2021 sugieren el uso del análisis de multímeros o del FVW:CB para diferenciar el tipo 2M del tipo 2A/2B de la EVW. FVW:CB se realiza más comúnmente utilizando un método basado en ELISA. En el mercado existen varios ensayos ELISA comerciales. Se debe tener cuidado al elegir el ensayo optimizado para detectar preferentemente HMW FVW. Más recientemente, también se puede realizar en el analizador automatizado, Acustar, que utiliza un CLIA. El ensayo Acustar FVW:CB es un inmunoensayo de dos pasos, en el que las partículas magnéticas actúan como fase sólida y están recubiertas con péptido helicoidal triple de colágeno tipo III. El FVW presente en la muestra se une a las partículas magnéticas en proporción a su capacidad de fijación al colágeno, que se mide mediante un sistema de detección quimioluminiscente.

A continuación, describimos un método interno basado en ELISA para FVW:CB: Este ensayo prueba la capacidad del FVW derivado del plasma del paciente para unirse al colágeno que ha sido previamente recubierto en placas de microtitulación de 96 pocillos. El FVW adsorbido al colágeno inmovilizado se detecta mediante un anticuerpo policlonal marcado con enzima y la posterior reacción del sustrato, que se monitoriza fotométricamente con un lector ELISA. Lo mejor es utilizar una mezcla de -95% de colágeno tipo I (mala fijación al FVW) y -5% de colágeno tipo III (buena fijación al FVW) para obtener una buena selectividad para el FVW de alto peso molecular (HMW). Alternativamente, también se puede utilizar una concentración más baja de colágeno tipo III (1-5 ug/ml). FVW reducido: Los niveles de CBA estarán presentes en individuos con defectos cuantitativos o cualitativos. Dado que este ensayo por sí solo no permitirá la clasificación de la EVW, es importante que este ensayo funcional se realice junto con el ensayo del antígeno del FVW y el FVW:RCo.

Muestra primaria: Sangre citratada.

Materiales y reactivos:

- ✓ Colágeno con una mezcla de -95% de colágeno tipo I/~5% de colágeno tipo III (Horm Collagen, ICN collagen)
- ✓ Solución amortiguadora para dilución y solución amortiguadora para lavado (PBS con Tween 20)
- ✓ Solución amortiguadora de sustrato: 0,1 M de acetato de sodio/solución amortiguadora de ácido cítrico
- ✓ 30% peróxido de hidrógeno H₂O₂
- ✓ Antígeno policlonal conjugado con HRP de conejo anti-FVW humano (Dako)
- ✓ Placas de microtitulación EIA de 96 pocillos
- ✓ PPP citado por paciente, PNP y plasmas de control anormales
- ✓ 2 M H₂SO₄
- ✓ Sustrato: diclorhidrato de O-fenilendiamina (OPD)

Preparación de reactivos:

PBS (pH 7,4) con Tween 20:

- a. Cloruro de sodio (NaCl): 8,0 g
- b. Cloruro de potasio (KCl): 0,20 g
- c. Ortofosfato de hidrógeno disódico (Na₂HPO₄·12H₂O): 2,90 g
- d. Dihidrógeno fosfato de potasio (KH₂PO₄·H₂O): 0,20 g
- e. Haga hasta 1.0 l y ajuste el pH a 7.4. Añadir 500 µl de Tween 20.

Solución amortiguadora del sustrato:

0,1 M de acetato de sodio/solución amortiguadora de ácido cítrico

Disolver 13,6 g de acetato de sodio en 100 ml de agua destilada, ajustar el PH a 6,0 utilizando ácido cítrico 1 M (52,14 g por 250 ml de agua destilada).

2 M H₂SO₄:

Añadir 10,65 ml de H₂SO₄ concentrado a 89,35 ml de agua destilada.

Procedimiento:

- ✓ Recubrir las placas de ELISA con colágeno. Mezcle suavemente el colágeno por inversión antes de usar. Diluir 200 µl de colágeno en 20 ml de PBS, mezclar bien y luego añadir 200 µl a cada pocillo. Séllelo y guárdelo en una caja húmeda durante 24-48 horas.

- ✓ Lave la placa con PBS tres veces. (Intervalo de tres minutos para cada lavado). Retire el exceso de solución amortiguadora y compruebe que no haya burbujas de aire.
- ✓ Realice una predilución 1:10 de cada muestra de ensayo (es decir, añada 20 µl de muestra a 180 µl de PBS en los tubos de ensayo). Incluya también controles en la corrida.
- ✓ La curva de calibración va del 400% al 0%. Etiquete los tubos de la A a la H. Tome 180 µl de solución amortiguadora en un tubo de ensayo y agregue 120 µl de PNP (este es el tubo A). Agregue 150 µl de solución amortiguadora de los tubos B a G. Diluya en serie los tubos tomando 150 µl del tubo A al B y hasta el tubo G.
- ✓ El tubo H sirve como pieza en bruto. Agregue solo 200 µl de solución amortiguadora.
- ✓ Añadir 180 µl de solución amortiguadora en todos los pocillos después de lavar las placas recubiertas de colágeno tres veces (como se describe en el paso 2).
- ✓ Añadir 20 µl de patrón diluido en serie de la A a la G.
- ✓ Añadir 20 µl de muestra prediluida y controles por triplicado.
- ✓ Sellar e incubar a 22 °C (temperatura ambiente en una caja húmeda) durante 2 horas.
- ✓ Lavar la placa tres veces con PBS y añadir anticuerpo conjugado peroxidasa prediluido (dilución 1:1000, es decir, 22 µl de anticuerpo FVW HRP-TAG por 22 ml de PBS). Agregue 200 µl a cada pozo.
- ✓ Incubar durante 2 horas a temperatura ambiente.
- ✓ Lave el plato tres veces con PBS.
- ✓ Añadir 200 µl de sustrato. Para ello, disuelva un comprimido de OPD de 10 mg en 22,5 ml de agua destilada y 2,5 ml de solución amortiguadora de la solución madre. Añadir 15,0 µl de H₂O₂ al 30% justo antes de usar al sustrato.
- ✓ Espere 15-20 minutos para el desarrollo del color y agregue 50 µl de 2M H₂SO₄ para detener la reacción. Lectura mediante un lector ELISA con filtro de longitud de onda de 492 nm.

Protocolo de control de calidad: Corra el control normal (PNP) y el control anormal de bajo nivel (Dade P) con cada corrida. Si está disponible, también se puede incluir una muestra de paciente conocido con EVW. Límite de detección: 0-400%.

Interpretación de los resultados: El FVW:CB permite un diagnóstico más preciso de la EVW y reduce los errores de clasificación errónea y la posible falta de diagnóstico. Los estudios han demostrado que las tasas de error de diagnóstico de la EVW se reducen en un 50% mediante la adición de FVW:CB en un panel de cuatro pruebas (es decir, ensayos basados en FVIII, FVW:RCo o GPIb, antígeno del FVW y FVW:CB) en comparación con el panel de tres pruebas más utilizado (ensayos basados en FVIII, FVW:RCo o GPIb, y el antígeno del FVW).

- ✓ Enfermedad de Von Willebrand tipo 1 versus EVW tipo 2: La enfermedad de Von Willebrand tipo 1 muestra niveles reducidos de antígeno del FVW sin discrepancias entre los ensayos de actividad y antígeno. Por lo tanto, la relación FVW:CB a antígeno del FVW y la relación FVW:RCo a antígeno del FVW son normales. Se puede utilizar una relación de 0,6 o 0,7 para determinar la discrepancia entre los distintos ensayos de actividad y antígeno del FVW. Los estudios han demostrado que el FVW:CB puede diferenciar el tipo 1 frente al tipo 2A/2B mejor que el ensayo FVW:RCo.
- ✓ Tipo 2A/2B frente a 2M EVW: FVW:CB puede utilizarse como sustituto del análisis de multímeros para diferenciar entre el tipo 2A/2B frente a 2M EVW según las últimas Guías de EVW de 2021. La reducción de la relación FVW:CB a antígeno del FVW sugiere una pérdida de multímeros de HMW que se puede observar en los tipos 2A y 2B de EVW. Estos pacientes también tendrán una relación reducida entre FVW:RCo y FVW:Ag. El tipo 2M EVW mostrará una relación normal de FVW:CB a FVW:Ag, pero tendrá una relación reducida de FVW:RCo a FVW:Ag. Un subconjunto de tipo 2M con un defecto en el sitio de fijación del colágeno puede tener una proporción normal de FVW:CB a FVW:Ag. Aunque el FVW:CB basado en GLIA puede discriminar con precisión el tipo 1 frente al tipo 2 de EVW, tiene menos utilidad para discriminar el tipo 2M de la EVW tipo

2A según estudios preliminares. Se necesitan más estudios para confirmar estos hallazgos. Para ello, se debe utilizar un FVW:CB optimizado basado en ELISA.

- ✓ Tipo 3 frente a EVW tipo 1 grave: FVW:CB tiene un límite inferior de detección mejor que FVW:RCo. FVW:CB puede detectar mejor la ausencia de FVW en la EVW tipo 3 y la presencia de niveles muy bajos de FVW en la EVW tipo 1 grave.
- ✓ FVW: La CB es una herramienta importante en el diagnóstico de la EVW. Sin embargo, se debe utilizar un Ensayo de fijación al colágeno adecuado y optimizado. La fuente y concentración de colágeno pueden afectar los resultados. Cuando se utilizan ensayos internos, es mejor utilizar una mezcla de tipo I/III (~95%/~5%), o bien un colágeno de tipo III a bajas concentraciones. Rentabilidad: FVW:CB se puede realizar mediante ensayos internos basados en ELISA, lo que lo convierte en un ensayo de actividad FVW rentable. En combinación con un ensayo ELISA propio del laboratorio del antígeno del FVW, resulta ser un método barato y eficiente para identificar subtipos de EVW (excepto el tipo 2M y el tipo 2NEVW) en un entorno de recursos limitados.

Ensayo de fijación al factor VIII para el diagnóstico de la enfermedad de von Willebrand Normandía:

La variante Normandía (tipo 2N) de la EVW es un trastorno autosómico recesivo poco frecuente, identificado por primera vez en 1989. La enfermedad se caracteriza por un defecto en el FVW que da lugar a una reducción de la capacidad para unirse al FVIII, lo que conduce a un aumento del aclaramiento del FVIII no fijado de la circulación. Las manifestaciones clínicas y de laboratorio de los pacientes con tipo 2N pueden parecerse a las de los pacientes con hemofilia A leve/moderada o a las de los portadores de hemofilia A. Es probable que algunos de los pacientes con tipo 2N sean diagnosticados erróneamente a menos que se lleve a cabo un ensayo de fijación al FVIII (FVW:FVIII) para su confirmación. La distinción es importante, ya que la terapia de reemplazo con FVW purificado será mucho más efectiva que el reemplazo de FVIII en estos pacientes. Los patrones de herencia de las dos enfermedades también son bastante diferentes: autosómica recesiva en la EVW tipo 2N y recesiva ligada al cromosoma X de la hemofilia A. Los pacientes tipo 2N son homocigotos (mutaciones del mismo tipo 2N) o heterocigotos compuestos (dos mutaciones diferentes del tipo 2N o una combinación de 2N y otras mutaciones de la EVW). Las mutaciones se observan comúnmente en el dominio D'D3 de FVW. Los niveles de FVIII están levemente a moderadamente reducidos, generalmente en el rango de 5 a 40 UI/dl. Los niveles de FVIII a antígeno del FVW se reducen, generalmente $<0,7$. Los parámetros de FVW (FVW:Ag, FVW:RCo, FVW:CB y análisis de multímeros) suelen ser normales, a menos que sean heterocigotos compuestos para otras mutaciones de la EVW. Estos últimos pacientes suelen ser más sintomáticos. Los heterocigotos para el tipo 2N son generalmente asintomáticos y tienen niveles normales o solo ligeramente reducidos de FVIII. Se han descrito dos ensayos internos para FVW:FVIII (Nesbitt et al, 1996; y Casonato et al, 1998). Ambos ensayos muestran una buena concordancia y difieren en función de la detección del punto final del FVIII residual. En ambos ensayos, la placa de microtitulación está recubierta con anticuerpos contra el FVW. El complejo FVW-FVIII en la muestra del paciente se inmoviliza en la placa y el FVIII endógeno se elimina con cloruro de calcio. Se añade un preparado recombinante de FVIII puro (rFVIII) a una concentración de 100 UI/dl. La cantidad de rFVIII unida al FVW inmovilizado se mide mediante un ensayo cromogénico (Nesbitt et al, 1996) o utilizando un anticuerpo policlonal anti-FVIII conjugado (Casonato et al, 1998). Solo se dispone de un ensayo comercial de fijación al FVIII (Asserachrom:FVIII, Diagnostica Stago). Aquí describimos el método desarrollado internamente basado en ELISA similar al descrito por Casonato et al (1998).

Muestra primaria: Sangre citratada.

Materiales y reactivos:

- ✓ Anticuerpo de recubrimiento: anticuerpo policlonal anti-humano de conejo contra el factor de von Willebrand (FVW) (Dako)
- ✓ Anticuerpo primario: IgG purificada anti-humano de oveja contra el FVIII, 10 mg/ml
- ✓ Tag anticuerpo: AffiniPure peroxidasa conjugada de burro con IgG anti-ovejas (Jackson ImmunoResearch)

Alternativamente, si está disponible, el anticuerpo anti-FVIII conjugado con HRP se puede usar directamente en reemplazo del anticuerpo primario y de marcado.

- ✓ Cloruro de calcio 0,4 M
- ✓ Solución amortiguadora de recubrimiento de bicarbonato
- ✓ Solución amortiguadora TBS y solución amortiguadora para dilución
- ✓ Solución amortiguadora para lavado
- ✓ Solución amortiguadora de sustrato
- ✓ Sustrato: diclorhidrato de O-fenilendiamina (OPD)
- ✓ Ácido sulfúrico 2 M (H_2SO_4)
- ✓ Ácido clorhídrico
- ✓ Concentrado de FVIII (recombinante)
- ✓ Plasma de prueba de plaquetas deficientes en citrato
- ✓ Plasma normal combinado, controles

Preparación de reactivos:

Solución amortiguadora de recubrimiento de bicarbonato:

- a. Carbonato de sodio (Na_2CO_3): 0,16 g
- b. Bicarbonato de sodio ($NaHCO_3$): 0,294 g
- c. Envasar hasta 100 ml. Ajuste el pH a 9.6. La vida útil es de 2-3 semanas.
- d. Añadir aproximadamente 200 μ l de tinte rojo.

Constituya una solución amortiguadora TBS de 150 mM como se muestra:

- a. Cloruro de sodio, NaCl: 11,68 g
- b. TRIZMA-base: 12,12 g
- c. Disolver en 1800 ml de agua. Hacer hasta 2000 ml. Ajuste el pH a 7.4 con ácido clorhídrico.

Solución amortiguadora para dilución: Disolver 1 g de albúmina sérica bovina (BSA) en 100 ml del Solución amortiguadora TBS y Tween 20 a 0,2%. Se necesitan unos 100 ml por plato.

Solución amortiguadora para lavado: Añadir Tween 20 a 0,2% a TBS. Añadir 2 ml de Tween 20 a 1000 ml TBS.

Cloruro cálcico 0,4 M: Disolver 0,588 g de $CaCl_2$ en 10 ml de solución amortiguadora para dilución.

Solución amortiguadora de sustrato:

- a. Ácido cítrico. H_2O : 0,73 g
- b. Ortofosfato de hidrógeno disódico ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$): 2,4 g
- c. Preparar hasta 100 ml con agua destilada. Ajusta el pH a 5.0. La vida útil es de 2 meses.

Sustrato: Disolver un comprimido de OPD de 10 mg en 15 ml de solución amortiguadora de sustrato.

Ácido sulfúrico 2 M: Añadir 10,65 ml de H_2SO_4 concentrado a 89,35 ml de agua destilada.

Concentrado de FVIII diluido (recombinado): Reconstituya el recombinante en 1 ml de agua desionizada y coloque alícuotas de 500 μ l en viales y almacene congelado a $-80^\circ C$.

Procedimiento:

Recubrimiento de placas:

- ✓ Diluir el anticuerpo de recubrimiento 1:1000

- ✓ Añadir 100 ml/pocillo. Incubar a 4°C durante la noche. Las placas se pueden recubrir de 16 a 96 horas antes de su uso.

Dilución de estándares:

- ✓ Para hacer la solución madre, diluir 50 µl de PNP en 3,95 ml de solución amortiguadora para dilución (1:80).
- ✓ Prepare una serie de estándares a partir de esta solución madre

a.	Solución madre	125 % (S1)
b.	0,8 ml de solución madre + 0,2 ml de solución amortiguadora	100 % (S2)
c.	0,6 ml de solución madre + 0,4 ml de solución amortiguadora	75 % (S3)
d.	0,4 ml de solución madre + 0,6 ml de solución amortiguadora	50 % (S4)
e.	0,2 ml de solución madre + 0,8 ml de solución amortiguadora	25 % (S5)
f.	0,1 ml de solución madre + 0,9 ml de solución amortiguadora	12.5 % (S6)
g.	0,05 ml de solución madre + 0,95 ml de Solución amortiguadora	0.25 % (S7)
h.	1,00 ml de solución amortiguadora	Blanco

Dilución de muestras de pacientes y controles: Diluir muestras de pacientes y controles 1:100 en solución amortiguadora para dilución (10 µl de muestra + 990 µl de solución amortiguadora).

Procedimiento de ensayo:

- ✓ Lave la placa tres veces con la solución amortiguadora para lavado. Retire el exceso de solución amortiguadora y compruebe que no haya burbujas de aire.
- ✓ Añadir 100 µl de los patrones y blancos por duplicado y ensayos por triplicado, a los pocillos de las placas, utilizando el siguiente formato.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S1	S1	T1	T1	T1	T9	T9	T9	T17	T17	T17	-
B	S2	S2	T2	T2	T2	T10	T10	T10	T18	T18	T18	-
C	S3	S3	T3	T3	T3	T11	T11	T11	T19	T19	T19	-
D	S4	S4	T4	T4	T4	T12	T12	T12	T20	T20	T20	-
E	S5	S5	T5	T5	T5	T13	T13	T13	T21	T21	T21	-
F	S6	S6	T6	T6	T6	T14	T14	T14	T22	T22	T22	-
G	S7	S7	T7	T7	T7	T15	T15	T15	T23	T23	T23	-
H	BK	BK	T8	T8	T8	T16	T16	T16	T24	T24	T24	-

S1-S7-Diluciones del patrón; T -Plasma de prueba; BK - Blanco

- ✓ Selle la placa. Incubar durante 1 hora en un baño maría a exactamente 37 °C.
- ✓ Lave la placa tres veces con la solución amortiguadora para lavado. Retire el exceso de solución amortiguadora y compruebe que no haya burbujas de aire.
- ✓ Para eliminar el FVIII endógeno, incube con 100pl/pocillo de CaCl₂ 0,4M durante 1 hora a 37°C en baño maría. No es necesario agitar.
- ✓ Vuelva a lavar la placa con solución amortiguadora para lavado tres veces. Elimina el exceso de solución amortiguadora.
- ✓ Descongelar uno de los viales congelados de concentrado de FVIII (recombinado). Añadir 400 µl de concentrado de FVIII a 9,6 ml de solución amortiguadora para dilución (concentración de -100 UI/dl).
- ✓ Añadir 100 µl de FVIII diluido a cada pocillo. Incubar durante 1 hora a 37°C.
- ✓ Lave la placa con solución amortiguadora para lavado tres veces. Elimina el exceso de solución amortiguadora.

- ✓ El anticuerpo primario se alícuota en cantidades de 25 µl y se almacena a -80 °C. Hacer una dilución 1:2000 del anticuerpo primario en solución amortiguadora para dilución (5 µl en 10 ml). Reemplace la alícuota de anticuerpos inmediatamente en el congelador para su uso futuro.
- ✓ Añadir 100 µl de anticuerpo primario diluido a cada pocillo. Incubar durante 1 hora a 37°C.
- ✓ Lave la placa con solución amortiguadora para lavado tres veces. Elimina el exceso de solución amortiguadora.
- ✓ El anticuerpo Tag se alícuota en cantidades de 10 µl y se almacena a -80 °C. Hacer una dilución 1:5000 del anticuerpo tag en solución amortiguadora para dilución (2 µl en 10 ml). Reemplace la alícuota de anticuerpos inmediatamente en el congelador para su uso futuro.
- ✓ Añadir 100 µl de anticuerpo tag diluido a cada pocillo. Incubar durante 1 hora a 37°C.
- ✓ Lave la placa con solución amortiguadora para lavado tres veces. Elimine el exceso de solución amortiguadora.
- ✓ La solución de sustrato se prepara solo durante el último paso de lavado. Justo antes de usar, agregue 7 µl de 30% de H₂O₂ a esta solución.
- ✓ Agregue 100 µl de la solución anterior a cada pocillo. Inicie el cronómetro. Incube durante 8-10 minutos.
- ✓ Detener la reacción acidificando 50 µl de 2M H₂SO₄ en cada pocillo exactamente en el mismo intervalo de tiempo en que se agregó el sustrato.
- ✓ Seleccione el programa adecuado (492 nm) en el lector de placas ELISA. Tome las lecturas de OD.

Protocolo de calidad: Corra el control normal (PNP) y el control anormal de bajo nivel (Dade P). Si se dispone de controles conocidos de EVW Normandía, añada una muestra como control con cada lote.

Interpretación de los resultados: Los resultados se expresan en términos de inglés y de teclado. Límites de detección: de menos del 6,25% a más del 175%.

- ✓ Homocigotos o heterocigotos compuestos para el tipo 2N: FVW:FVIII B ausente o marcadamente reducido (<15%) y proporciones muy bajas de FVW:FVIII B a relación antígeno del FVW (<0,3). Los niveles de FVIII C son leves a moderadamente reducidos, por lo general oscilando entre 5 y 40 UI/dl. Las proporciones de FVIII C a antígeno del FVW también se reducen, generalmente <0,7. Esta proporción puede ser normal, especialmente en heterocigotos compuestos con tipo 2N y mutaciones cuantitativas/nulas en el FVW. Por lo tanto, puede ser necesario un ensayo FVW:FVIII B o una prueba genética si la sospecha clínica es alta.
- ✓ Heterocigotos para el tipo 2N: FVW:FVIII B está moderadamente reducido o incluso normal, pero la relación FVW:FVIII B a antígeno del FVW está reducida (<0,7). Los niveles de FVIII:C suelen ser normales o ligeramente reducidos.
- ✓ Hemofilia leve A o mujeres portadoras de hemofilia: niveles de FVIII:C reducidos o normales. Ensayo normal de FVW:FVIII B y relación normal de FVW:FVIII B a antígeno del FVW(>0,7).

Multímeros del factor de von Willebrand: El FVW es una glicoproteína multimérica de gran tamaño que circula en el plasma como una serie de subunidades poliméricas idénticas llamadas multímeros. Los multímeros pueden ser liberados constantemente de las células endoteliales o almacenados en cuerpos de Weibel-Palade en las plaquetas. Los multímeros comprenden un número variable de subunidades (de 500 kDa a más de 10.000 kDa de peso molecular) unidas por enlaces de disulfuro. Los multímeros se clasifican según su tamaño en multímeros de bajo peso molecular (1-5 multímeros), intermedios (6-10 multímeros), altos (11-20 multímeros) y ultragrandes (>20 multímeros) (LMWM, IMWM, HMWM y ULMWM por sus siglas en inglés) (Stockschlaeder et al, 2014; James et al, 2021). Los multímeros de alto peso molecular o HMWM son importantes para unirse a los receptores de colágeno y plaquetas durante la hemostasia primaria para facilitar la agregación plaquetaria. Las anomalías en el ensamblaje o el número de multímeros pueden provocar problemas hemostáticos. El análisis de multímeros es útil para la clasificación de la EVW que, a su vez, puede usarse para guiar el tratamiento del paciente. La EVW tipo 1 es un trastorno cuantitativo parcial que presenta una reducción cuantitativa de los multímeros normales. El

subtipo 1C tiene reducida la supervivencia del FVW o aumentado su aclaramiento, lo que provoca una hemorragia prolongada (Flatton et al, 2024).

La EVW de tipo 2 es causada por deficiencias cualitativas del FVW, y la EVW de tipo 3 es una ausencia total de FVW. La EVW tipo 2 se subdivide en 4 subtipos:

- Tipo 2A en el que hay un ensamblaje de multímero defectuoso, una mayor sensibilidad a la escisión de ADAMTS13 o una disminución de la síntesis que conduce a una HMWM reducida o ausente
- El tipo 2B es causado por una mutación de ganancia de función que aumenta la fijación del FVW a las plaquetas. En la mayoría de los casos, pero no en todos, se reporta una pérdida de HMWM.
- El tipo 2M tiene una disminución de la adhesión de plaquetas o colágeno dependiente del FVW con un patrón de multímero del FVW normal.
- El tipo 2N es causado por una afinidad de fijación reducida al FVIII debido a mutaciones en el sitio de fijación al FVIII del FWF; se reporta un patrón normal de multímero FVW.

Hay algunas excepciones; Se han descrito patrones normales de multímero en algunos casos de tipo 2B y, por el contrario, se ha reportado de cierta pérdida de HMWM en algunos casos de variante de tipo 2M. Se pueden observar multímeros de FVW ultragrandes en la EVW de tipo IL, en la TPT y, ocasionalmente, en casos de EVW de tipo 2M.

Los métodos tradicionales de visualización de multímeros son complejos, laboriosos y requieren mucho tiempo, ya que implican electroforesis en gel de agarosa con dodecil sulfato de sodio (DES) seguida de visualización usando Western blot, inmunodetección colorimétrica, autorradiografía, quimioluminiscencia o fluorescencia. La evaluación de los multímeros puede realizarse mediante inspección visual o mediante cuantificación mediante densitometría (Flatton et al, 2024).

En el momento de escribir este artículo, la técnica más utilizada basada en la participación en programas externos de evaluación de la calidad es un ensayo semiautomático disponible en el mercado que es sustancialmente más rápido que los métodos manuales de gel de agarosa DES. A continuación, se describe este método para la detección y análisis de la distribución de multímeros de FVW en plasma humano mediante electroforesis e inmunofijación en gel de agarosa con el instrumento semiautomático Sebia Hydrasys 2 (Bowyer et al, 2018).

Análisis de multímeros Sebia Hydrasys FVW: H5VWM y H11VWM son ensayos basados en gel de agarosa usados para la separación de proteínas plasmáticas según su peso molecular. La separación electroforética de los multímeros FVW se lleva a cabo después del tratamiento de la muestra con un detergente aniónico. En un exceso de este detergente aniónico, las proteínas se convierten en complejos de proteínas y detergente aniónicos. En estos complejos, la conformación nativa de las proteínas se interrumpe, y todas asumen la misma conformación y la misma carga negativa por unidad de masa. Cuando estas proteínas detergentes aniónicas se electroforizan en un medio con propiedades de tamizado adecuadas, como los geles H5VWM o H11VWM, se separan según su peso molecular. En los geles H5VWM o H11VWM, los multímeros del FVW se separan y se inmunoprecipitan con un antisuero anti-FVW específico. A continuación, las diferentes bandas se visualizan en el gel con un anticuerpo marcado con peroxidasa y un sustrato específico. El ensayo se lleva a cabo en dos etapas: 1) electroforesis en un gel de agarosa para separar las proteínas contenidas en las muestras de plasma, y 2) inmunofijación con un antisuero anti-FVW para visualizar los diferentes multímeros.

Equipo necesario:

- Pipetas y puntas de 10 ml, 100 µl, 10 µl
- Tubos Eppendorf
- Baño maría
- Temporizador

- Mezclador de vórtice
- Pañuelos de papel
- Toallitas con alcohol
- Analizador Hydrasys (Sebia, Lisses, Francia)

Tabla 28. Reactivos para el análisis de multímeros FVW de Sebia Hydrasys

Reactivo	Nº de catálogo.	Estabilidad
Sebia Hydragel 5 or 11 VW multimers kit	4359	Hasta la fecha de caducidad indicada
Sebia Hydragel VW multimers Visualization kit	4747	Hasta la fecha de caducidad indicada
Hydrogen Peroxide 30%	Sigma-Aldrich 216763 100ml	Hasta la fecha de caducidad indicada
Destaining solution Dilute 5ml in 5L water	4540 (10 viales de 100 ml)	Solución de trabajo: 1 semana a temperatura ambiente
Solución de lavado Hydrasys Diluir 1 vial en 5L de agua (8mls en 500ml)	4541 (10 viales de 80 ml)	La solución de trabajo es estable hasta la fecha de caducidad indicada
Control de calidad normal		

El método para Hydragel 5 y Hydragel 11 varía solo en los volúmenes de reactivo y el tamaño de las mascarillas/papel de transferencia

Preparación de la muestra:

- ✓ Calentar el baño maría a 45°C.
- ✓ Descongele el plasma de la prueba y el control de calidad a 37 °C. El Hydragel 5 tendrá capacidad para 4 pacientes y 1 control de calidad. El Hydragel 11 tendrá capacidad para 9 pacientes y 2 controles de calidad (pero solo se requiere 1 vial de control de calidad).
- ✓ Asegúrese de que se conozca el resultado de antígeno del FVW antes de comenzar.
- ✓ Etiquete los tubos Eppendorf para pacientes y control de calidad.
- ✓ Muestras de prueba de vórtice antes de su uso. Diluir las muestras con el diluyente de muestra del kit de multímero en los tubos Eppendorf de acuerdo con el antígeno del FVW de la muestra. El límite de detección de multímeros FVW es de 0,05 UI/ml, el límite de interpretación es de 0,11 UI/ml).

antígeno del FVW (UI/ml)	Dilución	Diluyente de muestra (µl)	Plasma (µl)
<0.20	1/4	30	10
0.20–1.50	1/6	50	10
1.50–3.00	1/10	90	10
>3.00	1/20	95	5

- ✓ Agitar con vórtice durante 5 segundos.
- ✓ Incube durante exactamente 20 minutos a 45°C en el baño maría.
- ✓ Retire los tubos Eppendorf del baño maría, **agite con vórtice**, y déjelos a temperatura ambiente durante 10 minutos. Durante estos 10 minutos, configure la migración.

Configuración de la migración

- 1) Encienda el Hydrasys 2 y el VDU. Seleccione el programa de foresis: u/n adm p/w sebia.
- 2) Complete una hoja de trabajo. Registre los números de lote de los kits, las mechas y el gel.
- 3) Seleccione "5 FVW" (programa de migración #57) o 11 FVW (programa #58) en el menú de instrumentos (pantalla LHS).

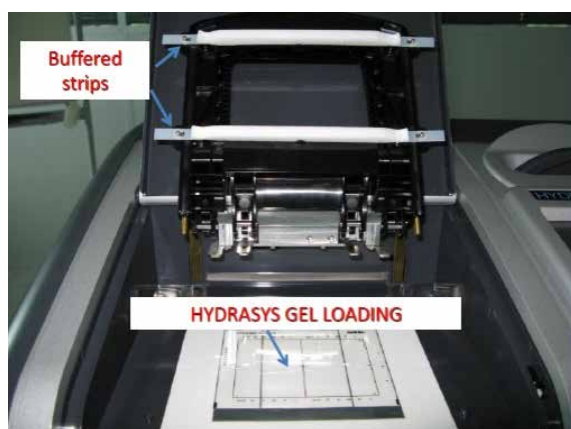


Figura 10. Analizador Hydrasys

- 4) Abra la tapa del módulo de migración, retire el soporte del aplicador y levante el portador de electrodos. *****Nunca cierre la tapa cuando el transportador esté levantado***.**
- 5) Con los extremos de plástico, retire las tiras de mecha tamponadas de su paquete (verifique si hay exceso de agua). Fíjelo a través de los orificios al portador, con un respaldo de plástico tocando el soporte (Figura 11).

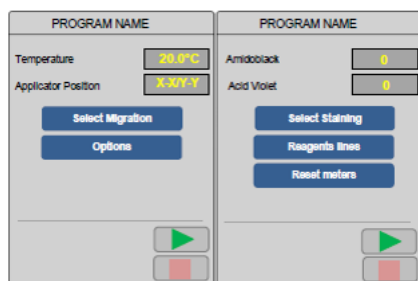


Figura 11. Analizador Hydrasys

- 6) Hydragel 5: Añadir 100 µl de agua destilada al tercio inferior del fotograma impreso en el módulo de migración.
- 7) Hydragel 11: Añadir 200 µl de agua destilada al tercio inferior del fotograma impreso en el módulo de migración.
- 8) Abra el gel y limpie el soporte de gel de plástico con un pañuelo de papel para eliminar el exceso de agua.
- 9) Coloque el gel con el lado hacia arriba en el marco impreso (Figura 12) con los pocillos en el borde más cercano.
- 10) Enrolle una mascarilla de plástico sobre el gel (diferentes tamaños para Hydragel 5 y 11), alineada con los marcadores del gel (Figura 12). Evite las burbujas de aire, retírelas y vuelva a aplicarlas inmediatamente si las hay.

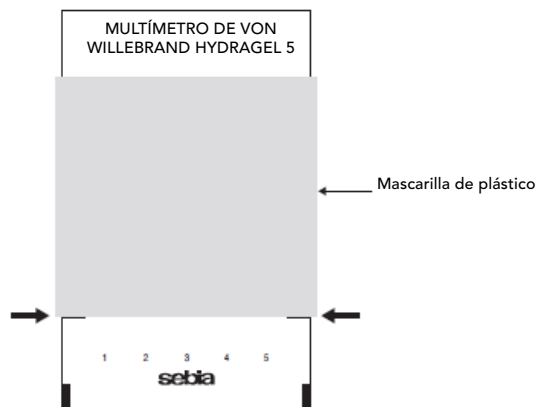


Figura 12. Analizador Hydrasys

- 11) Baje suavemente el portaelectrodos sobre el gel y cierre el módulo de migración.
- 12) Pulse inicio (▶) en la pantalla y, a continuación, confirme. Esto tarda 5 minutos.
- 13) El pitido señala el final. Abra el módulo de migración, levante el portador.
- 14) Usando una pipeta de 10 μ l con puntas finas, sin tocar el costado o el fondo del pocillo, retroplique la muestra de 5 μ l a cada pocillo. Hydragel 5: agregue el control de calidad normal al pozo 5. Hydragel 11: agregue el control de control de calidad normal a los pozos 1 y 11.
****Evite la formación de burbujas**.** Esto debería completarse en 2 minutos.
- 15) Baje suavemente el portaelectrodos y cierre el módulo de migración.
- 16) Presione inicio (▶) en la pantalla. Esto tarda aproximadamente 100 minutos.
- 17) Retire el TTF1 y TTF2 de la nevera y déjalos a temperatura ambiente para que se licúen.

Inmunofijación 1 (60 minutos)

- 18) En el pitido, se muestra el siguiente mensaje J.ANTISERUM FVW.
- 19) Abra el módulo y levante, luego retire el portador de electrodos. Deseche las mechas y limpie los electrodos con un pañuelo suave y húmedo.
- 20) Hydragel 5: En un Z5, mezclar 2,5 ml de diluyente antisuero con 60 μ l de antisuero anti-FVW.
- 21) Hydragel 11: En un Z5, mezclar 5 ml de diluyente antisueros con 135 μ l de anti-FVW antiserum.
- 22) Quítese la mascarilla y deséchela. Coloque la mascarilla amarilla AS FVW sobre el gel.
- 23) Sujete la pipeta verticalmente. Aplicar gradual y cuidadosamente la mezcla antisérum en un solo disparo ****evitar burbujas****.
- 24) Cierre el módulo de migración y presione iniciar (60 minutos).
- 25) Con el pitido, abra la tapa y retire el antisuero.
- 26) Sostenga la pipeta verticalmente, presione ligeramente y retire el antisuero y luego deséchelo.
- 27) Retire la mascarilla y limpie con agua, se recomienda un cepillo pequeño. Deje secar.

Transferencia en gel 1 (10 minutos)

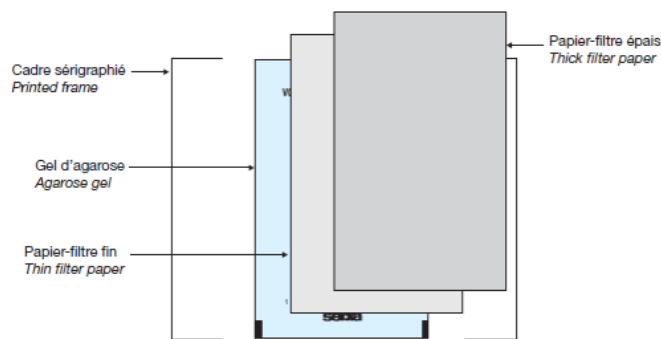


Figura 13. Analizador Hydrasys

- 28) Aplique un papel de filtro fino y otro grueso (con el lado liso hacia abajo) sobre el gel (Figura 13). Agregue el vaso y luego el peso.
- 29) Cierre la tapa y presione inicio.

Lavado en gel 1 (20 minutos)

- 30) Retire los papeles de filtro y añada la mascarilla de lavado/rehidratación naranja.
- 31) Hydrigel 5: Añada 4,5 ml de solución de lavado **roja** a la mascarilla. ****Evite la formación de burbujas****.
- 32) Hydrigel 11: Añada 9,0 ml de solución de lavado **roja** a la mascarilla. ****Evite la formación de burbujas****.
- 33) Cierre la tapa y presione inicio

Transferencia en gel 2 (10 minutos)

- 34) Retire la solución de lavado **roja**, luego la mascarilla y agregue papeles de filtro gruesos y delgados, vidrio y peso.
- 35) Cierre la tapa y presione inicio.
- 36) Lave la mascarilla.

Lavado de gel intermedio Q y luego seca de papel fino (10 minutos + 5 segundos)

- 37) Abra la tapa. Retira los papeles de filtro y añada una mascarilla de lavado/rehidratación de color naranja.
- 38) Hydrigel 5: Añada 4,5 ml de solución de lavado intermedia **verde**.
- 39) Hydrigel 11: Añada 4,5 ml de solución de lavado intermedia **verde**.
- 40) Cierre la tapa y presione inicio.
- 41) Abra la tapa y retire el lavado intermedio verde. Aplique solo un papel de **filtro fino**. Presione inicio. Después de 5 segundos, retire el papel fino.

Inmunofijación 2 (30 minutos)

- 42) Hydrigel 5: Mezcle 4 ml de diluyente antisuero con 2 µl de anti-IgG-PER en un z5.
- 43) Hydrigel 11: Mezcle 8 ml de diluyente antisuero con 4 µl de anti-IgG-PER en un z5.
- 44) Aplique la mascarilla IgG-PER naranja y luego agregue la mezcla anti-IgG-PER.
- 45) Cierre la tapa y presione inicio.

Transferencia en gel 3 (10 minutos)

- 46) Abra la tapa, retire el anti-IgG-PER y deséchelo. Quítese y lave la mascarilla. Agregue papeles de filtro finos y gruesos, vidrio y peso.
- 47) Cierre la tapa y presione inicio.

Lavado en gel 2 (20 minutos)

- 48) Retire los papeles de filtro y añada la mascarilla de lavado naranja.
- 49) Hydragel 5: Añada 4,5 ml de solución de lavado rojo a la mascarilla. ****Evite la formación de burbujas****.
- 50) Hydragel 11: Añada 9,0 ml de solución de lavado rojo a la mascarilla. ****Evite la formación de burbujas****.
- 51) Cierre la tapa y presione inicio.

Papel de transferencia en gel 4 (10 minutos)

- 52) Retire la solución de rehidratación, luego la mascarilla y agregue papeles de filtro gruesos y delgados, vidrio y peso.
- 53) Cierre la tapa y presione inicio.
- 54) Lavar la mascarilla.

Gel de rehidratación 1 (10 minutos)

- 55) Retira los papeles de filtro y añada la mascarilla de lavado/rehidratación naranja.
- 56) Hydragel 5: Añadir 4,5 ml de solución **rehidratante** a la mascarilla. ****Evite la formación de burbujas****.
- 57) Hydragel 11: Añadir 9,0 ml de solución **rehidratante** a la mascarilla. ****Evite la formación de burbujas****.
- 58) Cierre la tapa y presione inicio.

Transferencia en gel 5 (10 minutos)

- 59) Retire la solución de rehidratación, luego la mascarilla y agregue papeles de filtro gruesos y delgados, vidrio y peso.
- 60) Cierre la tapa y presione inicio.
- 61) Lave la mascarilla.

Gel de rehidratación 2 (10 minutos)

- 62) Retire los papeles de filtro y añada la mascarilla de lavado/rehidratación naranja.
- 63) Hydragel 5: Añada 4,5 ml de solución **rehidratante** a la mascarilla. ****Evite la formación de burbujas****.
- 64) Hydragel 11: Añada 9,0 ml de solución **rehidratante** a la mascarilla. ****Evite la formación de burbujas****.
- 65) Cierre la tapa y presione inicio.
- 66) Vórtice TTF 1 y TTF2.
- 67) Hydragel 5: Añada 75 µl de TTF1 a 3,0 ml de disolvente TTF en un z5. Invertir para mezclar. Añadir 75 µl de TTF2, invertir para mezclar. Agregue 3 µl de peróxido de hidrógeno (30%), invertir para mezclar.
- 68) Hydragel 11: Añada 150 µl de TTF1 a 6,0 ml de disolvente de visualización TTF en un z5. Invertir para mezclar. Añada 150 µl de TTF2, invertir para mezclar. Agregue 6 µl de peróxido de hidrógeno (30%), invierta para mezclar.

Visualización (10 minutos)

- 69) Retire la solución rehidratante de la mascarilla. Coloque la mascarilla naranja TTF1/TTF2 sobre el gel.
- 70) Hydragel 5: Aplique 2,5 ml de mezcla TTF. ****Evite la formación de burbujas****.
- 71) Hydragel 11: Aplique 5 ml de mezcla TTF. ****Evite la formación de burbujas****.
- 72) Cierre la tapa y presione inicio.

Transferencia en gel 6 (5 minutos)

- 73) Retire la solución TTF, luego la mascarilla y agregue papeles de filtro gruesos y delgados, vidrio y peso.
- 74) Cierre la tapa y presione inicio.
- 75) Lave la mascarilla con agua y una toallita con alcohol.

Gel de rehidratación 3 (5 minutos)

- 76) Retire los papeles de filtro y añada la mascarilla de lavado/rehidratación naranja.
- 77) Hydragel 5: Añada 4,5 ml de solución **rehidratante** a la mascarilla. ****Evite la formación de burbujas****.
- 78) Hydragel 11: Añada 9,0 ml de solución **rehidratante** a la mascarilla. ****Evite la formación de burbujas****.
- 79) Cierre la tapa y presione inicio.

Transferencia en gel 7 (5 minutos)

- 80) Retire la solución de rehidratación, luego la mascarilla y agregue papeles de filtro gruesos y delgados, vidrio y peso.
- 81) Cierre la tapa y presione inicio.
- 82) Lave la mascarilla.

Secado en gel (10 minutos)

- 83) Abra la tapa y retire los papeles de filtro.
- 84) Cierre la tapa y presione inicio.

Lavado y procesamiento final (25 minutos)

- 85) Abra la tapa y retire el gel.
- 86) El gel debe lavarse inmediatamente en el compartimento de tinción.
- 87) Abra el soporte de gel y coloque el gel como se muestra en la Figura 14.

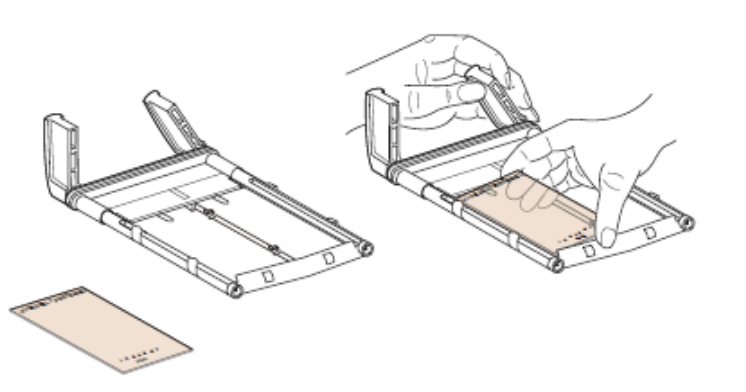


Figura 14. Analizador Hydrasys

- 88) Cierre el soporte y colóquelo en el módulo de procesamiento de gel / tinción.
- 89) Asegúrese de que haya al menos 400 ml de solución eliminadora y que el contenedor de residuos esté vacío.
- 90) Seleccione el programa de lavado del FWW en el menú del instrumento (pantalla RHS) y pulse "start" (inicio).

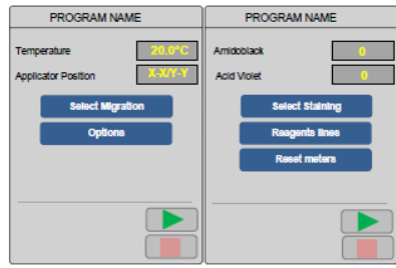


Figura 15. Analizador Hydrasys

Escaneo en gel

- 91) Retire el gel y el soporte del módulo de procesamiento/tinción de gel y colóquelos en el módulo de escaneo.
- 92) En el programa Phoresis, cree una lista de trabajo usando el icono de la tabla . Comience en el número 1 y agregue los detalles del paciente, incluido el SID, el nombre, la fecha de nacimiento, la fecha de la muestra, el número de hospital y el hospital solicitante (para RH agregue al consultor).
- 93) Hidrogel 5: La muestra 5 es el control normal (CC).
- 94) Hidrogel 11: las muestras 1 y 11 son el control normal (CC).
- 95) Haga clic en para abrir la ventana de escaneo de geles y muestras.
- 96) Se abrirá la siguiente ventana:

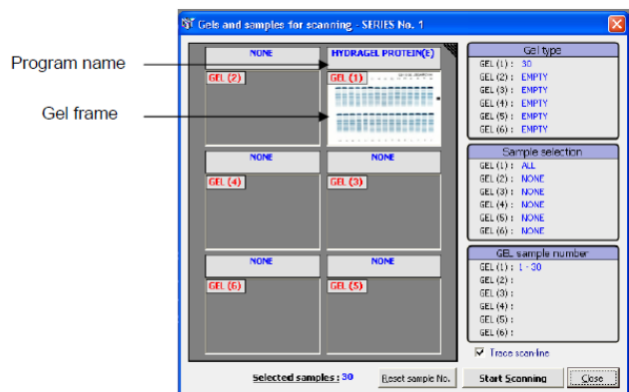


Figura 16. Analizador Hydrasys

- 97) Seleccione el programa del primer gel escaneado en la posición 1. Presione el cuadro de imagen RHS superior una vez para Hydrigel 5 y dos veces para Hydrigel 11 (con una tercera pulsación se restablece a 5).
- 98) Presione iniciar escaneo.
- 99) Compruebe que el escáner ha identificado correctamente todas las bandas. En algunas ocasiones, se pierde la primera banda LMWM. En este caso, elija "modo de localización de gel conservador para volver a escanear la imagen" y, a continuación, vuelva a escanear.
- 100) Cuando aparezcan las imágenes, haga clic en escaneo de vista, luego en mosaico de curvas para acceder a la densitometría.

101) Los gráficos de densitometría individuales aparecerán en cuadros:

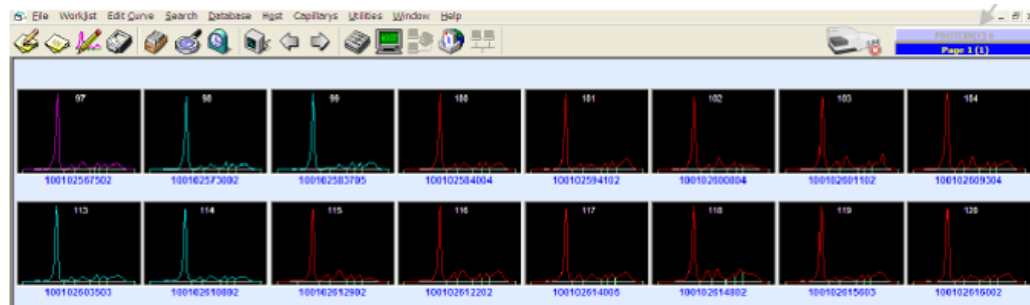


Figura 17. Analizador Hydrasys

Haga clic en el primero para abrir. **Comience con** el pocillo de CC 5 para Hydrigel 5 o 1/11 para Hydrigel 11. Aparecen los resultados del control de calidad:

Nota: Si los resultados no se pueden evaluar el día de la prueba, los resultados aún se pueden obtener retrospectivamente. Abra el programa Phoresis y seleccione la fecha de la prueba donde está la flecha negra en la Figura 18, luego siga los pasos como se muestra a continuación.

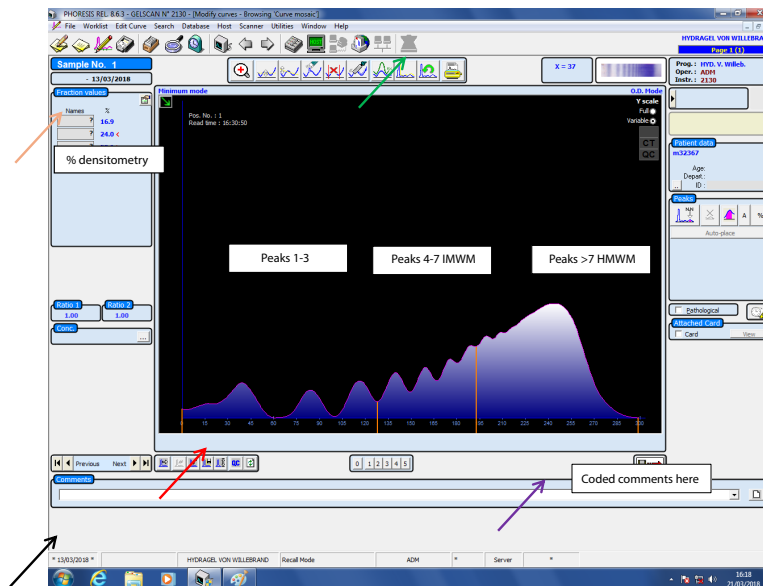


Figura 18. Analizador Hydrasys

Establezca el patrón de referencia haciendo clic en el 4° icono debajo de la flecha **roja** de densitometría. Establezca la curva actual como patrón de referencia. Nota: solo elija uno de los resultados de control de calidad para Hydrigel 11.

- 102) Haga clic en la curva de densitometría para establecer LMWM (picos 1-3), IMWM (picos 4-7) y HMWM (picos >7).
- 103) El porcentaje de los picos aparecerá y requerirá etiquetado: flecha **naranja**.
- 104) Compruebe si los resultados de control de calidad están dentro de los rangos esperados. De lo contrario, no reporte los resultados del paciente y hable con un experto en ensayos. Guarde los resultados (icono de disquete) y muévalos a la carpeta de pacientes.
- 105) Repita 111 + 112 con cada paciente y para ver los resultados del paciente, haga clic para superponer la flecha verde del patrón de control de calidad de referencia.

- 106) Usando los rangos de referencia para adultos, decida si la densitometría es normal o anormal, y elija los comentarios apropiados en el cuadro desplegable de comentarios (flecha morada).
Nota: Solo se puede agregar 1 comentario a cada resultado. El nivel de HMWM es el más relevante desde el punto de vista clínico.

Tabla 29. Nivel de HMWM y comentario que se puede agregar a los resultados

Comentario	Valor
SRHMWM (multímeros de alto peso molecular de ligera reducción)	HMWM 30%-por debajo del rango normal
RHMWM (multímeros de alto peso molecular de reducción)	HMWM 15-30%
GRHMW (multímeros de alto peso molecular de reducción bruta)	HMWM <15%
SIHMWM (multímeros de alto peso molecular con ligero aumento)	HMWM > parte superior del rango normal
SILMWM (multímeros de bajo peso molecular con ligero aumento)	LMWM por encima del rango normal al 26%
ILMWM (aumentar multímeros de bajo peso molecular)	LMWM >26%
QNORM/QNORM con cantidades reducidas	LMWM y HMWM están dentro de los rangos normales

- 107) Es posible que sea necesario repetir la prueba para muestras con multímeros muy altos o bajos. Hable con un BMS sénior capacitado en este ensayo.
108) Cuando todos los pacientes estén completos, haga clic en la pestaña editar curva y, a continuación, imprima los reportes en un archivo PDF a través del creador de PDF.
109) Esto exportará todos los resultados a una carpeta en el escritorio (acceso directo a PDF). Busque la fecha actual y cópiela (o envíela) a la memoria USB.
110) También se guarda una copia JPEG del gel en las imágenes. Copie (o envíe) a una memoria USB.
111) Asegúrese de que el gel esté etiquetado con la fecha de la prueba, se adjunte a la hoja de trabajo y archive en la carpeta de resultados.
112) Asegúrese de que los resultados normales de control de calidad se encuentren dentro de los límites aceptables,
113) Realice y registre la limpieza mensual según sea necesario.

Tabla 30. Rango de referencia para adultos según LMWM, IMWM y HMWM

	N	Media (%)	Rango en % (95% CI)
LMWM	51	17.3	11.8–23.6
IMWM	51	33.0	24.6–42.0
HMWM	51	49.9	35.0–58.5

Interpretación de las pruebas de Von Willebrand: La EVW es el trastorno hemorrágico hereditario más común, con una prevalencia estimada de hasta el 1%. Solo el 10% de estos individuos son sintomáticos, y el 10% de los individuos sintomáticos acuden al hospital. Una estimación conservadora de la prevalencia es de 100 por millón de personas, y alrededor del 80% de ellas se encuentran en países en vías de desarrollo. La EVW es causada por una deficiencia cuantitativa y/o cualitativa de la proteína plasmática FWW. A diferencia de la mayoría de los otros factores de coagulación, el FWW funciona en la hemostasia como una proteína adhesiva que se une a varios ligandos que son componentes críticos del proceso hemostático. Se une al receptor GPIb de las plaquetas y al colágeno subendotelial, provocando la adhesión plaquetaria. También agrega plaquetas uniéndose al receptor GPIIb/IIIa. La otra función importante del FWW es actuar como proteína transportadora del FVIII y prevenir la degradación proteolítica del FVIII. En

ausencia de FVW, la vida media del FVIII se reduce de 8-12 horas a 2 horas. La EVW se puede clasificar en tres subtipos principales, según los defectos cuantitativos (EVW tipo 1 y 3) y cualitativos (EVW tipo 2). La EVW de tipo 2 se subdivide a su vez en 4 subtipos: 2A, 2B, 2M y 2N. Los fenotipos de laboratorio de los diferentes subtipos se resumen en la Tabla 31.

- 1) EVW tipo 1: Deficiencia cuantitativa parcial de FVW.
- 2) EVW Tipo 2: Defecto cualitativo. Una o más funciones del FVW son anormales según lo evaluado por el ensayo de actividad del FVW (descrito a continuación).
 - c. EVW Tipo 2A: Pérdida selectiva o deficiencia de HMW. Los multímeros más grandes son las formas funcionalmente más activas. La pérdida selectiva de estos multímeros conduce a una disminución de la adhesión plaquetaria dependiente del FVW y de la capacidad de fijación al colágeno.
 - d. EVW tipo 2B: aumento de la afinidad del FVW a la GPIb plaquetaria que conduce a la fijación espontánea del FVW a las plaquetas que se eliminan de la circulación, lo que conduce a la pérdida de HMW y trombocitopenia. El frotis periférico también puede mostrar plaquetas grandes y grupos de plaquetas. La EVW por tipo de plaquetas (pseudoev) también puede mostrar un fenotipo similar.
 - e. EVW Tipo 2M: Disminución de la adhesión plaquetaria dependiente de FVW sin pérdida de HMW. Distribución normal del multímero.
 - f. EVW tipo 2N: disminución de la afinidad de fijación del FVW para el FVIII.
- 3) EVW tipo 3: Ausencia total/niveles indetectables de FVW, generalmente el antígeno del FVW < 3 UI/dl.

Variables preanalíticas en el diagnóstico de la EVW: Los problemas preanalíticos pueden influir significativamente en el diagnóstico de la EVW. El FVW y el FVIII son reactantes de fase aguda que pueden aumentar después de la inflamación, el traumatismo, el estrés, el embarazo y el ejercicio, lo que podría enmascarar un diagnóstico de EVW. Se debe evitar la recolección de muestras en esos momentos, o se deben repetir las pruebas en un momento diferente, antes de descartar un diagnóstico de EVW. La recolección, el transporte y el procesamiento inadecuados de las muestras (p. ej., tubos con llenado insuficiente, muestras o suero coagulados, demora en el transporte de las muestras, transporte de muestras de sangre completa refrigeradas o en hielo, y descongelación ineficaz o ciclos repetidos de congelación y descongelación) pueden comprometer el diagnóstico de la EVW. Lo ideal es que las muestras de FVW se recojan y procesen en el mismo lugar para evitar este tipo de errores.

Pruebas en el repertorio para el diagnóstico de VW:

Pruebas de cribado

Historial hemorrágico y herramienta de evaluación de hemorragias (BAT): Los antecedentes hemorrágicos pueden considerarse como la primera prueba de cribado en la evaluación de un paciente con síntomas hemorrágicos. Una anamnesis cuidadosa relacionada con la naturaleza y la frecuencia de las hemorragias, combinada con los antecedentes familiares, puede dar pistas importantes para el diagnóstico. Las hemorragias mucocutáneas (p. ej., hemorragias cutáneas, sangrado de encías, epistaxis, sangrado de heridas menores, hemorragias gastrointestinales y menorragia) son el patrón típico de sangrado que se observa en la EVW. La hemartrosis es poco frecuente y, por lo general, solo se observa en la EVW tipo 3 cuando el FVIII se reduce significativamente. Las nuevas Guías enfatizan la importancia de los antecedentes hemorrágicos y el uso de las herramientas para la evaluación de hemorragias o BATs. Hay muchas BATs disponibles, como Vicenza, MCMDM-1, gráfico pictórico de evaluación de sangrado (PBAC) y el cuestionario de sangrado pediátrico. En 2010, la ISTH propuso un nuevo BAT que incluía 14 síntomas hemorrágicos, cada uno clasificado de 0 a 4. El rango de referencia para el BAT del ISTH, derivado de 1040 adultos sanos y 330 niños, fue de <3 para los niños, <4 para los hombres adultos y <6 para las mujeres adultas. El principal valor clínico del BAT es excluir un trastorno hemorrágico. En un entorno de baja prevalencia, Tosetto et al encontraron que una puntuación de <3 tenía un valor predictivo negativo del 99,2%, lo que

esencialmente descarta un trastorno hemorrágico. La ISTH recomienda el uso de un BAT validado para el cribado de pacientes con una baja probabilidad de EVW (por ejemplo, en el ámbito de la atención primaria). Sin embargo, no es fiable utilizar un BAT cuando la probabilidad de EVW es intermedia (p. ej., derivada a un hematólogo) o alta (p. ej., en primer grado relativa con la EVW).

Tiempo de sangrado cutáneo (SBT): La SBT es una prueba in vivo para la hemostasia primaria que fue descrita por primera vez por el médico francés Milian en 1901 y luego modificada por Duke en 1910. La sensibilidad general de la SBT para el diagnóstico de la EVW es de alrededor del 60% (oscilando entre el 21% y el 72%), pero tiene muy buena sensibilidad para la EVW grave (100% para la EVW tipo 3). Por lo tanto, sigue siendo una prueba útil en un entorno de recursos limitados para diferenciar la hemofilia A de la EVW grave.

Analizador de función plaquetaria 200: El analizador de función plaquetaria (PFA100/200, Siemens, Dade Behring, Alemania) es un dispositivo diseñado para medir la hemostasia primaria en condiciones de alto cizallamiento. Registra el tiempo que tarda la sangre entera de un paciente en formar un tapón plaquetario estable en la apertura del dispositivo, ocluyéndolo, y lo registra como el "tiempo de cierre (TC)". El PFA100/200 mostró una sensibilidad general de alrededor del 85-90%, con una sensibilidad de casi el 100% a la EVW tipo 3 y tipo 2. La sensibilidad de la EVW tipo 1 varió en función de los niveles de FVW. El PFA 100/200 es un instrumento caro, que no está disponible en la mayoría de los países de renta baja y media.

TTPA: El TTPA se prolonga solo en casos graves de EVW cuando el FVIII también está reducido, generalmente en la EVW tipo 3, la EVW tipo 2N y algunos subtipos de las tipo 1 y 2, dependiendo de los niveles del antígeno del FVW.

Ensayos específicos de FVW para el diagnóstico de la EVW: La clasificación de la EVW requiere pruebas para cuantificar la proteína del FVW y pruebas para evaluar la función del FVW. El FVW se une a 1) las plaquetas y el colágeno subendotelial para promover la adhesión plaquetaria, 2) las plaquetas activadas para promover la agregación plaquetaria y 3) el FVIII para prevenir su degradación prematura. Los ensayos funcionales para la EVW evalúan una o más de estas funciones del FVW. Una discrepancia entre el ensayo funcional y el ensayo de antígenos sugiere un defecto cualitativo determinado mediante el cálculo de la relación entre el ensayo de actividad de FVW y el antígeno. Se puede utilizar una relación $<0,6$ o $<0,7$ dependiendo de la preferencia del laboratorio.

Antígeno de Von Willebrand (FVW:Ag): El ensayo mide la cantidad total de proteína del FVW presente en la muestra, tanto funcional como no funcional. La metodología más utilizada es la LIA automatizada. También se pueden utilizar métodos basados en ELISA y, más recientemente, CLIA en el instrumento HemosIL Acustar.

Ensayos de actividad del FVW dependiente de plaquetas o GP1b: estos ensayos miden específicamente la capacidad del FVW para unirse a las plaquetas y, por lo tanto, se utilizan para diferenciar entre la EVW de tipo 1 y la EVW de tipo 2A/2B/2M.

- 1) *Ensayo de cofactor de ristocetina (FVW:RCo):* En ausencia de cualquier esfuerzo de cizallamiento, la ristocetina actúa como sustituto para inducir alteraciones en el FVW y causar aglutinación entre las plaquetas y el FVW. El grado de aglutinación es proporcional a la cantidad de FVW funcional presente en el plasma, que puede medirse mediante el uso de un agregador o el aumento de la turbidez mediante métodos automatizados. El ensayo automatizado FVW:RCo ha demostrado una mayor precisión y un mejor límite de detección en comparación con los métodos basados en agregometría.

El ensayo FVW:RCo tiene limitaciones significativas. El ensayo tiene un CV alto inter e intralaboratorio, con el potencial de obtener resultados falsamente altos o falsamente bajos. Además, el límite inferior de detección es alto, generalmente 8-20 UI/dl, lo que plantea un problema

- en la identificación de variantes de tipo 2 cuando los niveles de antígeno del FVW son bajos. Ciertos polimorfismos comúnmente observados en la población africana pueden conducir a niveles falsamente bajos de FVW:RCo incluso en ausencia de EVW.
- 2) **FVW:GP1R:** Este ensayo es similar al FVW:RCo, en el que las plaquetas se sustituyen por micropartículas (perlas de látex en LIA [HemosIL] y partículas magnéticas en CLIA [AcuStar]), recubiertas con fragmentos recombinantes de GP1b de tipo silvestre o no mutado. El ensayo tiene un CV reducido y límites de detección más bajos que el ensayo FVW:RCo original. Su utilidad clínica en la EVW ha sido demostrada en diversos estudios.
 - 3) **FVW:GP1M:** A diferencia de los otros ensayos de FVW dependientes de plaquetas, este ensayo no utiliza ristocetina. Las plaquetas son reemplazadas por fragmentos recombinantes de GP1b con mutaciones de ganancia de función a los que el FVW se unirá “espontáneamente”. FVW:GP1bM puede medirse mediante LIA (ensayo FVW Ac de Siemens Innovance) o incluso mediante algunos métodos no comerciales basados en ELISA. La prueba tiene buena reproducibilidad, un límite de detección bajo y da información comparable a los ensayos FVW:RCo y FVW:GP1bR para el diagnóstico de la EVW tipo 2.
 - 4) **FVW:Ab:** Este ensayo se basa en anticuerpos monoclonales dirigidos contra el sitio de fijación de las plaquetas (es decir, GP1b) del FVW. Aunque no es un verdadero ensayo funcional, puede considerarse como un sustituto de la actividad de fijación plaquetaria. Varios estudios han demostrado la utilidad del ensayo automatizado FVW:Ab (HemosIL FVW Activity, IL, Bedford, Massachusetts) en la evaluación inicial y la subclasificación de la EVW.

Las nuevas Guías recomiendan el uso de ensayos más nuevos de la actividad del FVW dependiente de plaquetas, como el FVW:GP1bR y el FVW:GP1bM en lugar del FVW:RCo (automatizado o no automatizado).

Ensayo de fijación al colágeno (FVW:CB): El FVW:CB evalúa la capacidad del FVW para unirse al colágeno y depende de la presencia de HMW y de un sitio de fijación al colágeno intacto. Se puede utilizar como sustituto del análisis de multímeros para diferenciar el tipo 2A del tipo 2M. La relación entre el FVW:CB y el antígeno es normal en el tipo 2M y reducida en el tipo 2A/2B. Se ha demostrado que el ensayo FVW:CB es más eficaz para distinguir el EVW tipo 1 del tipo 2 (excepto 2M) que el ensayo FVW:RCo. Se puede utilizar para distinguir la EVW grave de tipo 1 de la tipo 3 debido a su mejor límite de detección. El FVW:CB puede medirse mediante varios ensayos ELISA comerciales y no comerciales y, más recientemente, mediante el método CLIA.

Aglutinación plaquetaria inducida por ristocetina (RIPA): La respuesta de aglutinación a la ristocetina en dosis normales (>1 mg/ml) y bajas (<1 mg/ml) es una de las pruebas utilizadas en el diagnóstico de la EVW. Si bien se puede observar una respuesta ausente en los subtipos de EVW tipo 3 y grave, su principal utilidad radica en la identificación de la EVW tipo 2B y tipo plaqueta, donde la respuesta se observa incluso a dosis bajas de ristocetina. La diferenciación de la EVW de tipo 2B y de tipo plaquetario puede lograrse mediante estudios de provocación con crioprecipitado o de mezcla con plasma normal y/o plaquetas de control. Si están disponibles, se deben utilizar pruebas genéticas.

Ensayo de fijación a FVIII: Esta prueba evalúa la capacidad del FVW para unirse al FVIII. El ensayo reducido de FVW:FVIII B y la relación reducida de FVW:FVIII B a antígeno del FVW sugiere EVW tipo 2 N.

Análisis de multímeros: La evaluación de multímeros FVW es una prueba establecida en la evaluación de la EVW, principalmente para diferenciar entre el tipo 2A y el tipo 2M. Sin embargo, la prueba es muy laboriosa, técnicamente exigente y está desapareciendo rápidamente de la mayoría de los laboratorios.

Ensayo de desmopresina: El Vicensa tipo 1C es un subtipo de EVW tipo 1 asociado con un aumento del aclaramiento de FVW. Estos pacientes muestran una respuesta exagerada a la desmopresina, pero con una esperanza de vida más corta. En estos pacientes también se observa una relación más alta de lo normal entre la propéptido del FVW al antígeno del FVW.

Tabla 31. Fenotipo de laboratorio de diferentes subtipos de EVW

Tipo de EVW	FVIII	Antígeno de Von Willebrand (FVW:Ag)	Ensayos de actividad del FVW dependiente de plaquetas*	Ensayo de fijación al colágeno (FVW:CB)	Ensayo de fijación al factor VIII (FVW:FVIII B)	Ensayo de FVW plaquetario/relación Ag*	Relación FVW:CB/Ag*	Análisis de multímeros	Aglutinación plaquetaria inducida por ristocetina (RIPA)	Comentarios
Tipo 1 EVW	Reducido o normal	reducido	reducido	reducido	Normal	Normal	Normal	Normal	Reducido o normal	Los niveles de FVW <30 UI/dl o los niveles de FVW 30-50 IUZ dl con sangrado anormal son EVW tipo 1 según las nuevas Guías. Alternativamente, los niveles de FVW de 30 a 50 UI/dl pueden clasificarse como FVW bajo con riesgo leve de sangrado.
Tipo 2A EVW	Reducido o normal	Reducido o normal	reducido	reducido	Normal	Reducido	Reducido	High to intermediate multimers lost	Por lo general, reducido	Los tipos 2A y 2B se pueden distinguir mediante RIPA.
Tipo 2B EVW	Reducido o normal	Reducido o normal	reducido	Reducido	Normal	Reducido	Reducido	Pérdida de multímeros HMW	Respuesta observada a dosis bajas de ristocetina	Tipo 2B vs plaquetas distinguidas por estudios de mezcla RIPA o pruebas genéticas
Tipo 2M EVW	Reducido o normal	Reducido o normal	reducido	reducido	Normal	Reducido	Usually normal	Normal	Reducido o normal	La EVW de tipo 2M con defecto en la fijación del colágeno puede tener una relación FVW:-CBA/ag reducida
Tipo 2N EVW	reducida (relación FVIII/antígeno del FVW generalmente <0,7)	Por lo general, normal*	Por lo general, normal*	Por lo general, normal*	Reducido FVW: Se reduce la relación de AG FVIII BZ «0.7)	Normal	Normal	Normal	Normal	La EVW de tipo 2M con defecto en la fijación del colágeno puede tener una relación FVW:-CBA/ag reducida
Tipo 3 EVW	Reducido, generalmente 1-10 UI/dl	Notablemente reducido <2 UI/dl	Notablemente reducido	Notablemente reducido	NA	NA	NA	Ausente	Ausencia de respuesta que se corrija con la adición de crioprecipitado	No se deben calcular las proporciones de actividad de FVW a antígeno

*Los ensayos de FVW dependientes de plaquetas incluyen FVW:RCo, FVW:GP1 M, FVW:GP1 R o FVW:Ab.

#FVW: Los ensayos de Ag o de actividad pueden reducirse en la EVW de tipo 2N, cuando se observa en un estado heterocigoto compuesto con mutaciones nulas/cuantitativas asociadas en el FVW

Para determinar un defecto cualitativo, se calcula la relación entre el ensayo de actividad de FVW y el ensayo de antígenos. Se puede utilizar una proporción inferior a 0,6 o 0,7 (dependiendo de la preferencia del laboratorio) para clasificar la EVW tipo 2.

Diagnóstico de la enfermedad de von Willebrand en un entorno de escasos recursos: La EVW es el trastorno hemorrágico hereditario más común, con una prevalencia estimada del 1%. Una estimación conservadora de la prevalencia es de 100 por millón de personas, y alrededor del 80% de ellas se encuentran en el mundo en desarrollo. Solo el 2,6% del total de casos de EVW notificados proceden de Asia meridional y África subsahariana, aunque contribuyen con ~40% de la población total del mundo. La enfermedad de Von Willebrand se divide en tres subtipos principales. La EVW de tipo 3 se debe a una deficiencia cuantitativa grave de FVW debido a niveles indetectables de FVW. La EVW tipo 1 se debe a una deficiencia cuantitativa parcial. La EVW tipo 2 es una deficiencia cualitativa y se subdivide a su vez en cuatro tipos: 2A, 2B, 2M y 2N. Existe una gran disparidad en la distribución de los subtipos de EVW en diferentes partes del mundo. En la mayoría de los países de renta alto y media alta (PRA y PRMA), el tipo 1 es el subtipo más común (60-80%), seguido del tipo 2. La enfermedad de Von Willebrand tipo 3 es poco frecuente y suele constituir menos del 5% de los casos. Por el contrario, la frecuencia de la EVW tipo 3 es mayor en muchos países de renta bajos y media baja (PRB y PRMB), llegando al 64% en algunas partes, lo que se resume muy bien en un artículo de revisión de Favalaro et al. Esta sorprendente diferencia en el patrón de distribución puede atribuirse al hecho de que la mayoría de los datos de los países de renta baja y media proceden de registros hospitalarios, en los que sólo los pacientes más graves pueden presentarse y los más leves no se detectan. Otro factor que contribuye es el aumento de la consanguinidad y los matrimonios dentro de comunidades pequeñas, lo que aumenta la incidencia de la EVW tipo 3, una enfermedad hereditaria autosómica recesiva. Hay un considerable subregistro de la EVW, en particular en los países de renta baja y media. Stonebraker et al reportaron que la prevalencia media de la EVW en HIC, UMIC, LMIC y LIC fue de 60,3, 12,6, 2,5 y 1,1 por millón, respectivamente, lo que fue significativamente diferente en relación con la clasificación de ingresos, a menudo <1 por millón en muchos países de LIC. Sin embargo, la variabilidad en la prevalencia de la EVW tipo 3 es menos marcada, lo que sugiere que los pacientes con EVW tipo 3 fueron diagnosticados con más frecuencia que otros subtipos en estos países.

Obstáculos en el diagnóstico de la enfermedad de Von Willebrand en entornos de escasos recursos

Baja prioridad para la atención de la salud y los trastornos de la coagulación: A la atención de la salud se le asigna una prioridad baja, social y políticamente, en la mayoría de los países en desarrollo, donde solo se asigna del 1 al 2% del producto interno bruto a la atención médica. De este presupuesto limitado, las cuestiones más apremiantes de importancia para la salud pública, como las enfermedades infecciosas, la mortalidad infantil y materna y la malnutrición, tienen prioridad sobre afecciones relativamente más raras, como los trastornos hemorrágicos hereditarios, incluida la EVW.

Escaso acceso a los servicios de salud y altos costos de la atención de salud: En muchos países en desarrollo, la infraestructura de atención de salud está poco desarrollada, con menos hospitales que no son fácilmente accesibles para todos. Esta podría ser la razón de la mayor incidencia de EVW grave en los países en desarrollo, donde solo las hemorragias más graves acuden al hospital. El alto costo de las investigaciones, la imposibilidad de pagar las distancias de viaje involucradas, la necesidad de dejar de trabajar para las investigaciones y la cobertura mínima del seguro médico contribuyen al diagnóstico insuficiente de los casos leves de EVW.

Falta de disponibilidad de reactivos para la FVW y falta de infraestructura de laboratorio: Las nuevas Guías sobre la EVW de 2021 sugieren el uso de nuevos ensayos de actividad dependiente de plaquetas, como FVW:GP1 R y FVW:GP1 M, para el diagnóstico de la EVW. Sin embargo, estos kits de ensayo no están disponibles ni se utilizan en la mayoría de los países de renta media baja y baja. Otros problemas, como el retraso en el suministro de reactivos, el mantenimiento inadecuado de las condiciones de transporte, la baja remisión de muestras, la baja vida útil de los reactivos y el menor número de centros de referencia, también contribuyen a la escasez de instalaciones de prueba de FVW.

Superar los obstáculos en el diagnóstico de la enfermedad de Von Willebrand en entornos de escasos recursos

Mejorar la identificación de los casos de EVW mediante un BAT y el uso de pruebas de detección baratas y de fácil acceso: Las pruebas de detección de la EVW incluyen el tiempo de sangrado cutáneo (SBT) y el tiempo de cierre en el analizador de función plaquetaria (PFA-200). En nuestro centro, analizamos una gran cohorte de pacientes (n = 444) con FVW reducido <50 UI/dl entre los pacientes evaluados por sospecha de trastorno hemorrágico durante un período de 7 años, desde enero de 2012 hasta marzo de 2019. La mayoría de los pacientes pertenecían al fenotipo tipo 3 (48,3%) de acuerdo con otros estudios publicados en la India. Los pacientes también fueron subclasificados según la gravedad en función de los niveles de FVW:RCO como severos (<10%), moderados (10-30%) y leves (>30%), según la clasificación propuesta por Federici et al (2014). La sensibilidad general del SBT y el PFA-200 fue del 72% y del 95%, como se muestra en la Figura 19. Es importante destacar que el SBT tuvo una sensibilidad del 100% en la identificación de la EVW tipo 3 y una sensibilidad muy alta del 92% en la EVW grave, que incluyó casos graves de tipo 1 y tipo 2. El SBT fue comparable al PFA-200 en ambas categorías. En general, se observó una puntuación ISTH BAT anormal en el 75% de los casos de EVW.

Desde la llegada del PFA-200 en 1995, numerosas publicaciones apoyan su uso para el diagnóstico y seguimiento de la EVW, y ha reemplazado al tiempo de sangrado como prueba de detección de la EVW en la mayoría de los países desarrollados. Todas las Guías también desaconsejan el uso del SBT en el diagnóstico de la EVW. La sensibilidad de SBT y PFA-100/200 es similar para los trastornos de la función plaquetaria y para la EVW grave. Aunque el PFA-100/200 tiene una buena sensibilidad a la EVW, es un instrumento caro que la mayoría de los laboratorios de los países en desarrollo no pueden utilizar y, por lo tanto, no puede ser un sustituto del SBT en este contexto. La mayoría de los casos de EVW en los países de renta baja y media baja presentan una enfermedad de Von Willebrand grave, en la que a menudo se pasa por alto el diagnóstico o las personas son diagnosticadas erróneamente como hemofilia A. En entornos con recursos limitados, donde la infraestructura de laboratorio, las instalaciones y la disponibilidad de reactivos son limitados, el tiempo de sangrado es una prueba de detección rentable para identificar la EVW grave en pacientes con antecedentes hemorrágicos o familiares significativos. Los casos potenciales deben identificarse preferiblemente utilizando un BAT, como el ISTH BAT. Es importante tener en cuenta que la SBT solo debe usarse en pacientes con sospecha de un trastorno hemorrágico y no como prueba de detección preoperatoria o para evaluar la respuesta a los fármacos antiplaquetarios. Además, los casos más leves de EVW pueden tener un SBT normal y pueden pasarse por alto.

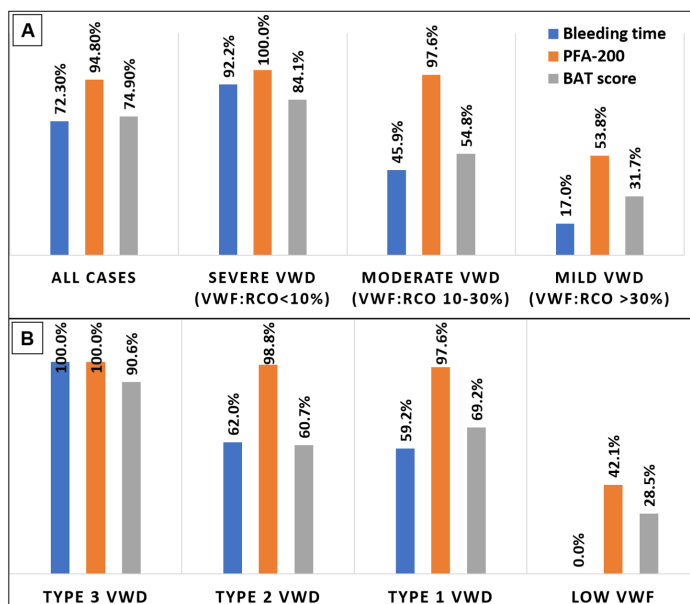


Figura 19. La sensibilidad general del SBT y el PFA-200

Enfoque rentable para realizar ensayos de FVW: Uno de los principales contratiempos en la realización de pruebas de EVW es que la mayoría de los kits comerciales son caros y no son accesibles para la mayoría de los laboratorios de los países de renta baja y media. Sin embargo, muchas de las pruebas para la EVW, como el antígeno FVW, el Ensayo de fijación al colágeno y los ensayos de fijación al FVIII, también se pueden realizar mediante métodos manuales internos basados en ELISA que disminuyen considerablemente el costo. El uso de un panel minimalista que comprende SBT, TTPA, FVIII, antígeno del FVW y FVW:CBA, puede identificar la mayoría de los subtipos de EVW (excepto el tipo 2M de EVW) y se puede hacer un diagnóstico provisional de la EVW con una confianza razonable. El diagnóstico del tipo 2M requiere un ensayo de actividad dependiente de plaquetas, como el ensayo del cofactor de la ristocetina, y es posible que se pase por alto si se utiliza este panel solo.

El ensayo manual de cofactor de ristocetina por agregometría es una prueba muy laboriosa y que requiere mucho tiempo, con un alto CV y un límite de detección muy alto. La automatización de FVW:RCo ha mejorado notablemente su CV y su límite inferior de detección. Otra ventaja de la automatización es el uso de volúmenes más bajos de muestras y reactivos (la ristocetina es un reactivo caro), lo que reduce el costo por prueba. Sin embargo, el uso continuado de esta prueba requiere suficientes derivaciones de pacientes y solicitudes de pruebas. Se han publicado pocos estudios sobre el uso de métodos no comerciales basados en ELISA para FVW:GP1 bR y FVW:GP1 bM, que también son opciones que se pueden explorar. Sin embargo, esto requiere experiencia técnica, disponibilidad de reactivos y personal motivado.

Dado que las pruebas manuales pueden estar asociadas con errores, es necesario seguir estrictas medidas de control de calidad, como la corrida de pruebas duplicadas o triplicadas en las corridas de ELISA, la corrida de muestras normales (PNP) y anormales en paralelo con cada corrida, y la participación en el programa EGAS para garantizar la precisión de los resultados.

Recientemente, el Consejo Indio de Investigación Médica (ICMR)-Instituto Nacional de Inmunohematología (NIIH) de Mumbai ha desarrollado un dispositivo basado en tarjeta de punto de atención para el diagnóstico de EVW grave y hemofilia grave/moderada con niveles de FVIII y FVW inferiores a 5 UI/dl. Esta es una prueba rápida y rentable que se puede utilizar en áreas de divulgación para un diagnóstico provisional de hemofilia A grave/moderada y EVW tipo 3. Actualmente, el dispositivo está a la espera de estudios de validación antes de su uso en el mercado.

Conclusión: Se estima que el 80% de los casos de EVW provienen de países en desarrollo. En muchos países de renta baja y media baja, más del 99% de los casos de EVW no se identifican ni se notifican. Es posible que las Guías aplicables para el resto del mundo no sean apropiadas en este entorno debido a la falta de reactivos, centros de capacitación e infraestructura de laboratorio. El primer paso para mejorar la notificación de casos es aumentar la concienciación sobre el uso de herramientas sencillas, desde el uso de BATs para identificar a los pacientes con posibles trastornos hemorrágicos, hasta el cribado de pacientes sospechosos mediante pruebas fácilmente disponibles como la SBT y la TTPA. Se pueden realizar pruebas adicionales utilizando pruebas de antígenos FVW y/o CBA basadas en ELISA, o derivarlas a un centro terciario para pruebas más especializadas siempre que sea posible.

Referencias

- Appel IM, Grimminck B, Geerts J, Stigter R, Cnossen MH, Beishuizen A. Dependencia de la edad de los parámetros de coagulación durante la infancia y la pubertad. *J Thromb Haemost* 2012; 10(11): 2254-2263.
- Attard C, van derStraaten T, Karlaftis V, Monagle P, Ignjatovic V. Hemostasia del desarrollo: diferencias específicas de la edad en los niveles de proteínas hemostáticas. *J Thromb Haemost* 2013; 11(10): 1850-1854.
- Baker P, Platton S, Gibson C, Gray E, Jennings I, Murphy P, Laffan M. Guías sobre los aspectos de laboratorio de los ensayos utilizados en la hemostasia y la trombosis. *BrJ Haematol* 2020; 191(3): 347-362.
- Balluet R, Bourguignon A, Geay-Baillat MO, Le Quellec S. [Discrepancias en los niveles de FVII:C en función de la tromboplastina: sobre un caso]. *Ann Biol Clin (Paris)* 2020; 78(2): 198-200.

Bowyer AE, Goodfellow KJ, Seidel H, Westhofen P, Stufano F, Goodeve A, Kitchen S, Makris M. Evaluación de un ensayo semiautomatizado de multímero factorial de von Willebrand, el multímero Hydragel 5 von Willebrand, por dos centros europeos. *Res Pract Thromb Haemost* 2018; 2(4): 790-799.

Casonato A, Galletta E, Sarolo L, Daidone V. Enfermedad de von Willebrand tipo 2N: caracterización y dificultades diagnósticas. *Hemofilia* 2018; 24(1): 134-140.

Casonato A, Pontara E, Zerbinati P, Zucchetto A, Girolami A. La evaluación de la actividad de fijación al factor VIII del factor de von Willebrand mediante un método ELISA: Significación e implicaciones prácticas. *Am J Clin Pathol* 1998; 109(3): 347-352.

Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio. Determinación de las actividades de los factores de coagulación mediante el ensayo de coagulación en una etapa, 2ª edición. Norma CLSI H48. 2016. <https://clsi.org/standards/products/hematology/documents/h48/>.

Di Felice G, Vidali M, Parisi G, Pezzi S, Di Pede A, Deidda G, D'Agostini M, Carletti M, Ceccarelli S, Porzio O. Intervalos de referencia para los parámetros de coagulación en la hemostasia del desarrollo desde la infancia hasta la adolescencia. *Diagnóstico (Basilea)* 2022; 12(10): 2552.

Durda MA, Wo l berg AS, Kerlin BA. Estado del arte en la evaluación de laboratorio del factor XIII. *Transfus Apher Sci* 2018; 57(6): 700-704.

Favaloro EJ. Ensayo de fijación al colágeno para el factor de von Willebrand (FVW:CBA): La detección de la enfermedad de von Willebrands (EVW) y la discriminación de los subtipos de EVW dependen de la fuente de colágeno. *Thromb Haemost* 2000; 83(1): 127-135.

Favaloro EJ. Utilidad clínica del PFA-100. *Semin Thromb Hemost* 2008; 34(8): 709-733.

Favaloro EJ. Enfermedad de Von Willebrand: diagnóstico local y tratamiento de un trastorno hemorrágico distribuido globalmente. *Semin Thromb Hemost* 2011; 37(5): 440-455.

Favaloro EJ. Utilidad del Ensayo de fijación al colágeno del factor de von Willebrand en el diagnóstico de la enfermedad de von Willebrand. *Am J Hematol* 2017; 92(1): 114-118.

Favaloro EJ. El papel del Ensayo de fijación al colágeno del factor de von Willebrand (FVW:CB) en el diagnóstico y tratamiento de la enfermedad de von Willebrand (EVW) y mucho más: una historia completa de 36 años. *Semin Thromb Hemost* 2024; 50(1): 43-80.

Favaloro EJ, Dean E, Arunachalam S. Evaluación del rendimiento de los ensayos contemporáneos e históricos del factor de von Willebrand (FVW) en la identificación de laboratorio de la enfermedad de von Willebrand (EVW): la experiencia de Australasia. *Semin Thromb Hemost* 2022; 48(6): 711 -731.

Favaloro EJ, Pasalic L. Diagnóstico de laboratorio de la enfermedad de von Willebrand en la era de las nuevas Guías: Consideraciones basadas en la geografía y los recursos. *Res Pract Thromb Haemost* 2023; 7(5): 102143.

Federici AB, Bucciarelli P, Castaman G, Mazzucconi MG, Morfini M, Rocino A, Schiavoni M, Peyvandi F, Rodeghiero F, Mannucci PM. La puntuación de sangrado predice los resultados clínicos y la terapia de reemplazo en adultos con enfermedad de von Willebrand. *Sangre* 2014; 123(26): 4037-4044.

Flood VH, Gill JC, Friedman KD, Christopherson PA, Jacobi PM, Hoffmann RG, Montgomery RR, Haberichter SL. La fijación del colágeno proporciona una detección sensible para la variante de la enfermedad de von Willebrand. *Clin Chem* 2013; 59(4): 684-691.

Fogarty H, Doherty D, O'Donnell JS. Nuevos avances en la enfermedad de von Willebrand. *BrJ Haematol* 2020; 191(3): 329-339.

Fu M, Liu J, Xing J, Dai Y, Ding Y, Dong K, Zhang X, Yuan E. Intervalos de referencia para los parámetros de coagulación en mujeres embarazadas y no embarazadas. *Sci Rep* 2022; 12(1): 1519.

James PD, Connell NT, Ameer B, Di Paola J, Eikenboom J, Giraud N et al. ASH I STH NHF WFH 2021 Guías sobre el diagnóstico de la enfermedad de von Willebrand. *Sangre Adv* 2021; 5(1): 280-300.

Karimi M, Peyvandi F, Naderi M, Shapiro A. Diagnóstico de la deficiencia del factor XIII: desafíos y herramientas. *IntJ Lab Hematol* 2018; 40(1): 3-11.

Kohler HP, Ichinose A, Seitz R, Ariens RA, Muszbek L. Diagnóstico y clasificación de las deficiencias del factor XIII. *J Thromb Haemost* 2011; 9(7): 1404-1406.

Kujovich JL. Coagulopatía en la enfermedad hepática: un acto de equilibrio. *Hematología Am Soc Hematol Educ Program* 2015; 2015: 243-249.

Laffan MA, Lester W, O'Donnell JS, Will A, Tait RC, Goodeve A, Millar CM, Keeling DM. El diagnóstico y el tratamiento de la enfermedad de von Willebrand: una guía de la Organización de Médicos del Centro de Hemofilia del Reino Unido aprobada por el Comité Británico de Estándares en Hematología. *British J Haematol* 2014; 167(4): 453-465.

Maas C, Renne T. Factor XII de coagulación en trombosis e inflamación. *Sangre* 2018; 131(17): 1903-1909.

Mumford AD, Ackroyd S, Alikhan R, Bowles L, Chowdary P, Grainger J, Mainwaring J, Mathias M, O'Connell N. Guía para el diagnóstico y tratamiento de los trastornos raros de la coagulación: una guía de la Organización de Médicos del Centro de Hemofilia del Reino Unido en nombre del Comité Británico de Estándares en Hematología. *Br J Haematol* 2014; 167(3): 304-326.

Nair SC, Viswabandya A, Srivastava A. Diagnóstico y tratamiento de la enfermedad de von Willebrand: una perspectiva de país en desarrollo. *Semin Thromb Hemost* 2011; 37(5): 587-594.

Nesbitt IM, Goodeve AC, Guilliatt AM, Makris M, Preston FE, Peake IR. Caracterización de la enfermedad de von Willebrand tipo 2N mediante técnicas fenotípicas y moleculares. *Thromb Haemost* 1996; 75(6): 959-964.

Palla R, Peyvandi F, Shapiro AD. Trastornos hemorrágicos raros: diagnóstico y tratamiento. *Sangre* 2015; 125(13): 2052-2061.

Platton S, Baker P, Bowyer A, Keenan C, Lawrence C, Lester W, Riddell A, Sutherland M. Guía para el diagnóstico de laboratorio y el seguimiento de la enfermedad de von Willebrand: una guía conjunta de la Organización de Médicos del Centro de Hemofilia del Reino Unido y la Sociedad Británica de Hematología. *Br J Haematol* 2024; 204(5): 1714-1731.

Rodgers SE, Lerda NV, Favaloro EJ, Duncan EM, Casey GJ, Quinn DM, Hertzberg M, Lloyd JV. Identificación de la enfermedad de von Willebrand tipo 2N (Normandía) en Australia: una investigación interlaboratorios utilizando diferentes métodos. *Am J Clin Pathol* 2002; 118(2): 269-276.

Sadler JE, Mannucci PM, Berntorp E, Bochkov N, Boulyjenkov V, Ginsburg D, Meyer D, Peake I, Rodeghiero F, Srivastava A. Impacto, diagnóstico y tratamiento de la enfermedad de von Willebrand. *Thromb Haemost* 2000; 84(2): 160-174.

Salazar E, Long TA, Smock KJ, Wool GD, Rollins-Raval M, Chen D et al. Análisis del Programa de Pruebas de Aptitud Factorial del Colegio de Patólogos Americanos von Willebrand. *Semin Thromb Hemost* 2022; 48(6): 690-699.

Seidzadeh O, Peyvandi F, Mannucci PM. Enfermedad de Von Willebrand tipo 2N: una actualización. *J Thromb Haemost* 2021; 19(4): 909-916.

Sevenet PO, Kaczor DA, Depasse F. Deficiencia del factor VII: desde lo básico hasta el diagnóstico de laboratorio clínico y el manejo del paciente. *Clin Appl Thromb Hemost* 2017; 23(7): 703-710.

Srivastava A, Rodeghiero F. Epidemiología de la enfermedad de von Willebrand en los países en desarrollo. *Semin Thromb Hemost* 2005; 31(5): 569-576.

Stonebraker JS, Iorio A, Lavin M, Rezende SM, Srivastava A, Pierce GF, Coffin D, Tootoonchian E, Makris M. Prevalencia reportada de la enfermedad de von Willebrand en todo el mundo en relación con la clasificación de ingresos. *Hemofilia* 2023; 29(4): 975-986.

Toulon P, Berruyer M, Brionne-François M, Grand F, Lasne D, Telion C, Arcizet J, Giacomello R, De Footer N. Dependencia de la edad para los parámetros de coagulación en poblaciones pediátricas. Resultados de un estudio multicéntrico destinado a definir los rangos de referencia específicos por edad. *Thromb Haemost* 2016; 116(1): 9-16.

Vangenechten I, Mayger K, Smejkal P, Zapletal O, Michiels JJ, Moore GW, Gadisseur A. Un análisis comparativo de diferentes ensayos automatizados de actividad de fijación al factor Ib del factor de von Willebrand en pacientes con enfermedad de von Willebrand bien tipificados. *J Thromb Haemost* 2018; 16(7): 1268-1277.

Wakeman L, Munro R, Dorward N, Benton A, Gibb A, Al-Ismail S. Nuevos rangos de referencia de ensayos de coagulación para adultos sanos utilizando el moderno coagulómetro Sysmex CA-1500. *Sangre* 2005; 106(11): 4025.

Woodhams B, Girardot O, Blanco MJ, Coles G, Gourmelin Y. Estabilidad de las proteínas de coagulación en plasma congelado. *Fibrinólisis de coágulos sanguíneos* 2001; 12(4): 229-236.

Zheng C, Zhang B. Deficiencia combinada de los factores de coagulación V y VIII: una actualización. *Semin Thromb Hemost* 2013; 39(6): 613-620.

Zhao Y, Feng G, Feng L. Efectos del tiempo de almacenamiento preanalítico, la temperatura y los tiempos de congelación-descongelación en las actividades de los factores de coagulación en plasma anticoagulado con citrato. *Ann Transl Med* 2018; 6(23): 456.

TEMAS TRATADOS

- ✓ Ensayos basados en TP (ensayo en una etapa de FII V, VII y X),
- ✓ Ensayos basados en TTPA (ensayo en una etapa de FXI, FXII, PK o HMWK)
- ✓ Factor XIII: Cribado, actividad y antígeno

Ensayos basados en TP (Ensayos de una fase de FII, V, VII y X): Las deficiencias de los factores de coagulación II, V, VII o X son trastornos hemorrágicos poco frecuentes (Mumford et al, 2014). Los ensayos para la actividad del factor II, V, VII o X se pueden realizar mediante un ensayo de una etapa basado en TP. El ensayo compara la capacidad de las diluciones de un plasma patrón o de referencia y el plasma de prueba para corregir el TP de un plasma que se sabe que es totalmente deficiente en el factor de coagulación que se está midiendo. En el ensayo de FV, por ejemplo (descrito a continuación), el plasma es deficiente en FV pero contiene cantidades normales de todos los demás factores de coagulación, incluidos II, VII, X y fibrinógeno. Los factores de coagulación II, VII y X pueden analizarse de forma similar, sustituyendo el plasma deficiente en FV en el ejemplo que se muestra a continuación por el plasma deficiente correspondiente, y utilizando un plasma de referencia (estándar) con una concentración conocida del factor que se está ensayando (Baker et al, 2020).

Reactivos:

- ✓ Plasma deficiente en FV. Esto puede ser congénitamente deficiente o artificialmente deficiente en FV (plasma envejecido).
- ✓ Solución amortiguadora Veronal de Owren (OVB).
- ✓ Plasma de prueba citratado pobre en plaquetas.
- ✓ Para el estándar, se prefiere un plasma de referencia comercial (estándar) o, si no está disponible, use un grupo de plasma normal pobre en plaquetas de 20 donantes (mantenido a -70 °C o menos).
- ✓ Control de calidad interno del plasma, ya sea comercial o de origen local (CLSI, 2016).
- ✓ Reactivo de tromboplastina que debe contener cloruro de calcio. Es una buena práctica utilizar la misma tromboplastina que se utiliza en la prueba de TP, pero se puede utilizar una tromboplastina alternativa para el diagnóstico de pacientes inusuales.

Método: Decantar suficiente reactivo de tromboplastina en un tubo de vidrio de 75 x 12 mm. Deje calentar a 37 ° C durante 5 minutos. Si el reactivo de tromboplastina no contiene calcio, este debe agregarse por separado. Decanta suficiente M/40 CaCl₂ en un tubo de vidrio de 75 x 12 mm. Deje calentar a 37 ° C durante 5 minutos. Para ambas pruebas, control de calidad y plasmas estándar, prepare diluciones en tubos de plástico, como se muestra en la Tabla 32.

Tabla 32. Preparación de diluciones de plasma estándar, de control de calidad y de prueba para ensayos de una etapa de FII, FV, FVII y FX

Dilución	Plasma (ml)	OVB (ml)
1/5	0.1	0.4
1/10	0.1	0.9
1/20	0,5 (dilución 1/10)	0.5
1/40	0,5 (dilución 1/20)	0.5

Nota: Mezcle bien la dilución 1/10 antes de usarla para preparar la dilución 1/20. Mezcle bien la dilución 1/20 antes de usarla para preparar la dilución 1/40. Las diluciones plasmáticas deben analizarse inmediatamente después de la preparación. Si la temperatura ambiente supera los 25 °C, puede ser necesario mantener las diluciones en hielo derretido antes del análisis.

Pruebe cada dilución de plasma de referencia (patrón/calibrador) de la siguiente manera:

- ✓ Pipetear 0,1 ml de dilución 1/10 en un tubo de vidrio de 75 x 10 mm.
- ✓ Añadir 0,1 ml de plasma deficiente en FV.
- ✓ Calentar a 37°C durante 2 minutos.
- ✓ Añadir 0,2 ml de reactivo de tromboplastina precalentado.
- ✓ Poner en marcha el cronómetro y mezclar.

Nota: Si el reactivo de tromboplastina no contiene calcio, se añaden 0,1 ml de tromboplastina a la mezcla de dilución y plasma deficiente. Después de un retraso de 1 a 2 minutos para calentarse a 37 °C, la mezcla se coagula con 0,1 ml de calcio precalentado (a 37 °C).

Registre el tiempo de coagulación:

- Repita la dilución 1/10 y luego pruebe las diluciones 1/20 y 1/40 por duplicado.
- Repita el procedimiento para las diluciones de plasma de prueba y control de calidad. Prueba por duplicado.
- Para los plasmas de prueba que se espera que sean normales, pruebe diluciones de 1/10, 1/20 y 1/40. Para los plasmas de prueba que se espera que tengan niveles reducidos, pruebe diluciones de 1/5, 1/10 y 1/20.
- Un "blanco" también debe probarse de la siguiente manera:
 - 0,1 ml OVB
 - 0,1 ml de plasma deficiente en FV
 - 0,2 ml de reactivo de tromboplastina/calcio
- El tiempo de coagulación del "blanco" refleja la calidad del plasma deficiente y debe ser equivalente a menos de 1 UI/dl (<0,01 UI/ml).

Resultados: Tome un promedio de cada resultado duplicado. Los tiempos duplicados deben estar dentro del 10% entre sí para que sean aceptables. En papel logarítmico de 3 ciclos x 2 ciclos, trace los tiempos de coagulación de los plasmas de referencia, prueba y control de calidad frente a la concentración porcentual de FV. A la dilución 1/10 se le asigna arbitrariamente un valor del 100%, por lo que la 1/20 equivale al 50%, la 1/40 al 25% y la dilución 1/5 al 200%. Alternativamente, grafique la concentración en una escala logarítmica y el tiempo de coagulación en una escala lineal. La cantidad relativa de FV en el plasma de prueba en comparación con el plasma de referencia se extrapola de los gráficos. Un ejemplo de esto se muestra en la sección sobre ensayos basados en TTPA. El tiempo de coagulación equivalente a la prueba del 100% (el lugar donde la línea de prueba pasa a través de la actividad del 100%) se lee de la línea estándar (por lo tanto, la concentración de estándar que podría dar ese tiempo de coagulación en particular). Esto da la concentración de la prueba en porcentaje del estándar. Este porcentaje se multiplica por el valor de la concentración del factor de coagulación en el plasma patrón (en UI/dl) para obtener la concentración en la prueba (en UI/dl).

Notas: Los niveles bajos de actividad de FII, FV, FVII o FX se pueden medir en pacientes con enfermedad hepática (Kujovich et al, 2015). El rango de referencia en adultos para cada uno de estos factores de coagulación debe determinarse localmente, pero a menudo tiene un límite inferior de 50-70 UI/dl para FV, FVII y FX. El límite inferior de referencia para FII es mayor (Appel et al, 2012; Wakeman et al, 2005). La actividad del FVII puede aumentar durante el embarazo (Fu et al, 2022). Los individuos con un nivel reducido de FV también deben someterse a un ensayo de actividad de FVIII para excluir la deficiencia combinada de FV y FVIII (Zheng et al, 2013). Los factores II, VII y X dependientes de la vitamina K pueden

reducirse naturalmente al nacer, aumentando a lo largo de la infancia hasta alcanzar los niveles adultos. Los rangos de referencia pediátricos pueden establecerse localmente o tomarse de la literatura teniendo en cuenta la variación de los reactivos (Toulon et al, 2016; Atta rd et al, 2013; Di Felice et al, 2022). En algunos casos de deficiencia de FVII (FVII Padua, FVII Nagoya, FVII Tondabayashi/Shinjo), puede haber una discrepancia entre los niveles de FVII:C obtenidos, dependiendo de la fuente de tromboplastina. Por lo tanto, se recomienda el uso de tromboplastina humana sobre la base de que es más probable que los resultados reflejen la actividad in vivo. En algunos casos raros, el resultado puede ser muy bajo si se usa tromboplastina de conejo, pero más alto o normal si el ensayo utiliza tromboplastina de cerebro humano o de buey. Esta puede ser una razón por la que algunos casos de aparente deficiencia grave de FVII no presentan síntomas hemorrágicos (Balluet et al, 2020; Sevenet et al, 2017).

Ensayos basados en TTPA (Ensayo de una fase de FXI, FXII, PK o HMWK): La deficiencia de FXI es un trastorno hemorrágico poco frecuente (Mumford et al, 2014), mientras que las deficiencias de los factores de contacto FXII, PK y HMWK no se asocian con hemorragia (Maas et al, 2018), pero sí causan un TTAP significativamente prolongado. En esta sección se describe el ensayo de coagulación en una etapa basado en TTPA para FXI. El ensayo se basa en una comparación de la capacidad de las diluciones de plasmas estándar y de prueba para corregir el TTPA de un plasma que se sabe que es totalmente deficiente en FXI pero que contiene todos los demás factores necesarios para la coagulación normal. En el caso de los factores FXII, PK y HMWK, el ensayo es esencialmente el mismo que el del FXI de una etapa, pero se realiza sustituyendo el plasma deficiente pertinente por el plasma deficiente en FXI y seleccionando el plasma de referencia adecuado. El reactivo TTPA utilizado para el ensayo de PK no puede utilizar ácido elárgico como activador.

Reactivos:

- ✓ Plasma citratado de prueba pobre en plaquetas.
- ✓ Plasma estándar (de referencia).
- ✓ El plasma patrón (referencia/calibrador) utilizado debe ser un grupo de plasma preparado localmente que se mantenga a $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ o menos, o un plasma estándar comercial. En cualquier caso, este plasma de referencia debe calibrarse para el ensayo de coagulación FXI en comparación con el estándar internacional actual para FXI en plasma. No es aceptable suponer que un plasma normal combinado tiene una actividad FXI de 100 UI/dl.

Plasma de control de calidad interno (Baker et al, 2020):

- ✓ Plasma deficiente en FXI.
- ✓ Está disponible comercialmente o puede obtenerse de un donante con deficiencias graves en las siguientes condiciones.
- ✓ El nivel de FXI es inferior a 1UI/dl, no hay antecedentes de anticuerpos anti-FXI, no recibió tratamiento durante 2 semanas, incluidas pruebas de función hepática normal en plasma.
- ✓ La función hepática anormal podría conducir a una reducción de otros factores de coagulación, que afectan a la especificidad del ensayo. Este plasma puede almacenarse en alícuotas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ o menos durante aproximadamente 3 meses (Zhao et al, 2018; Woodhams et al, 2001).
- ✓ Es preferible utilizar plasma deficiente en FXI producido por inmunodepleción de FXI a partir de plasma normal utilizando un anticuerpo monoclonal. Este tipo de material está disponible comercialmente y tiene la ventaja de una mayor seguridad viral en comparación con el plasma procedente de pacientes que han sido tratados con productos derivados del plasma.
- ✓ Sin embargo, no todos los plasmas inmunodepletados tienen $<1\text{ UI/dl}$, por lo que se debe tener cuidado de comprobarlo antes de su uso.
- ✓ Reactivo TTPA sensible a las deficiencias de factores (CLSI, 2016). Tenga en cuenta que los reactivos de TTPA que son activados por el ácido elárgico son insensibles a la deficiencia de PK.
- ✓ Solución salina tamponada de Owren (OBS o solución amortiguadora de glioxalina).
- ✓ 25mM CaCl_2 (tenga en cuenta que Werfen CaCl_2 suministrado con SynthASil es de 20mM).

Método:

- ✓ **Para FXI, FXII y HMWK:** Realice diluciones de 1/10 de estándar, control de calidad y pruebe el plasma en solución salina tamponada en tubos de plástico. (Si se espera que el plasma de prueba tenga un nivel muy bajo de factor, comience con una dilución de 1/5). Utilizando volúmenes de 0,2 ml, realice diluciones dobles en OBS de estándar, control de calidad, y pruebe el plasma de 1/10 a 1/40 en tubos de plástico. (Mezcle bien cada dilución antes de transferirla al siguiente tubo). Las diluciones plasmáticas deben analizarse inmediatamente después de la preparación. Si la temperatura ambiente supera los 25 °C, puede ser necesario mantener las diluciones en hielo húmedo antes de la prueba.
- ✓ **Solo para PK,** generalmente se requieren diluciones más altas de 1/100, 1/200 y 1/400. Pruebe primero el plasma estándar. Pipetear 0,1 ml de cada dilución de patrón en un tubo de vidrio de 75 x 10 mm. Añadir 0,1 ml de plasma deficiente en FXI, mezclar y transferir al baño maría a 37°C. Añadir 0,1 ml de reactivo TTPA, mezclar e incubar durante 2-5 minutos dependiendo del tiempo de incubación recomendado del reactivo TTPA. Al final del tiempo de incubación, agregue 0,1 ml de CaCl₂, mezcle el tubo de inclinación hasta que se vea un coágulo. Registre el tiempo de coagulación. Repita los pasos 4 a 7 con control de calidad y, a continuación, analice el plasma. También se debe establecer un "blanco" utilizando 0,1 ml de OBS en lugar de plasma de prueba. El tiempo de coagulación de la pieza en bruto debe ser más largo que el tiempo de actividad FXI del 1% de la lectura estándar del gráfico de calibración. Si el tiempo es más corto, esto indica que el plasma deficiente no es totalmente deficiente en FXI y, por lo tanto, no es un plasma de sustrato adecuado.

Resultados: El trazado de los resultados es el mismo que para los ensayos basados en TP (descritos anteriormente), requiriendo papel cuadriculado de doble escala logarítmica o logarítmica/lineal. Para FXI, FXII y HMWK, a la dilución 1/10 se le asigna arbitrariamente un valor del 100%, a la dilución 1/20 un valor del 50% y a la dilución 1/40 un valor del 25%. Si se utiliza, un 1/5 tiene un valor de 200%. Para PK, a la dilución 1/100 se le asigna arbitrariamente un valor de 100%, a la dilución 1/200 un valor del 50% y a la dilución 1/400 un valor del 25%. Si se utiliza, un 1/50 tiene un valor del 200%. Se deben obtener líneas rectas, paralelas entre sí. Lea la concentración de control de calidad y la muestra de prueba como para los ensayos basados en TP (descritos anteriormente). En este ejemplo, la concentración de FXI en la muestra de prueba es el 7% de la del estándar. Si el patrón tiene una concentración de 85 UI/dl, el cálculo es $85 \text{ UI/dl} \times 7\% =$ la muestra de ensayo tiene una concentración de 6 UI/dl. Si las líneas no son paralelas, se debe repetir el ensayo. Compruebe los tiempos de coagulación de la muestra de ensayo. Si es muy largo, pruebe una dilución de 1/5 (o 1/50 para PK). Pueden producirse líneas no paralelas debido a un error técnico. Si se ha eliminado el error técnico, puede deberse a la presencia de un inhibidor, que puede actuar específicamente contra el FXI o puede ser del "tipo lupus", mostrando un patrón convergente. Las líneas divergentes son típicas de una muestra activada (Baker et al, 2020).

Notas: Las deficiencias de FXII, PK o HMWK no se asocian con un mayor riesgo de sangrado. Los reactivos TTPA activados con ácido elálgico son insensibles a la deficiencia de PK. Si la concentración plasmática de FXI, FXII, PK o HMWK en plasma es cercana a cero (es decir, los tiempos de coagulación de todas las diluciones son similares a los del blanco), pueden producirse líneas no paralelas. El rango de referencia normal debe establecerse localmente, pero a menudo tiene un límite inferior de 50-70 UI/dl para cada uno de estos factores. Ya se han establecido unidades internacionales para FXI y FXII en plasma, pero no hay planes para establecer unidades internacionales para PK o HMWK.

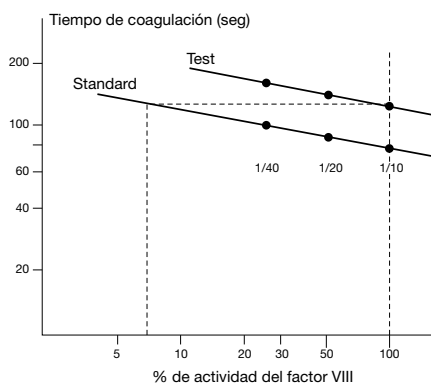


Figura 20. Gráfico del ensayo FXI

Factor XIII (FXIII): exámenes de cribado, actividad y antígeno

FXIII Screen (pruebas de solubilidad en coágulos): FXIII media la reticulación de las cadenas a e y de fibrina. La deficiencia de FXIII se clasifica como un trastorno hemorrágico raro y puede estar causada por mutaciones en las subunidades catalíticas del FXIII-A o en las subunidades portadoras del FXIII-B (Karimi et al, 2018). Actualmente no se recomienda el uso de pruebas cualitativas de solubilidad en coágulos de fibrina debido a la falta de estandarización y la poca sensibilidad. Se recomienda que la deficiencia de FXIII se diagnostique mediante un ensayo de actividad funcional de FXIII en lugar de solubilidad en coágulos (Mumford et al, 2014; Pal la et al, 2015; Kohler et al, 2011), pero en algunas zonas del mundo solo se dispone de ensayos de solubilidad en coágulos. Las pruebas de solubilidad en coágulos que contienen urea 5M son más específicas que las que contienen ácido acético, sin embargo, la hipofibrinogenemia y la disfibrinogenemia pueden causar resultados falsos positivos en la prueba basada en urea (Dorgalaleh et al, 2016). Las pruebas de solubilidad en coágulos que contienen ácido monocloroacético (MCA) al 1% son más sensibles y rápidas que las pruebas basadas en urea (Dorgalaleh et al, 2016). Se ha sugerido que tanto las pruebas basadas en urea como en ácido acético deben realizarse en paralelo para optimizar el diagnóstico (Dorgalaleh et al, 2016). Solo se observará un resultado positivo en la deficiencia grave de FXIII, con una actividad de FXIII de <5-10 UI/dl, dependiendo del método utilizado.

Método: La trombina y el calcio son necesarios para activar el FXIII de modo que se entrecruza con la fibrina en una forma estable. En este método, a pesar de utilizar plasma citrato, todavía hay suficientes iones de calcio disponibles para la activación de FXIII. Se utiliza un plasma anticoagulado normal con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) para el control. En este plasma, el EDTA da lugar a una quelación completa de los iones de calcio, lo que significa que el FXIII no es capaz de reticularmente la fibrina. La adición de ácido acético al 2% o urea 5M da como resultado la lisis de coágulos no reticulados, mientras que el plasma citratado con >10 U/dl de actividad FXIII tiene un coágulo insoluble. La prueba es generalmente más sensible si se emplea ácido acético (en lugar de urea), ya que el coágulo se disolverá a niveles más altos de FXIII en presencia de ácido acético (Jennings et al, 2003).

Materiales/reactivos:

- ✓ Tubos de vidrio de 75 x 10 mm
- ✓ 0,9% solución salina
- ✓ 30 U/ml de trombina
- ✓ Plasma de EDTA normal
- ✓ 2% Ácido acético

Método: Añada 0,2 ml de plasma citrato a 0,2 ml de solución salina al 0,9% en un tubo de vidrio. Para un control positivo, repita con 0,2 ml de plasma EDTA. Para un control negativo, repita con 0,2 ml de plasma citrato normal. Añada 0,1 ml de 30 U/ml de trombina, mezclar. Dejar actuar durante 30 minutos a

37°C. Golpee los tubos para aflojar los coágulos de los lados. Añada 5 ml de ácido acético al 2% y tapar el tubo. Deje a temperatura ambiente durante 12 horas.

Resultados: El plasma con EDTA no debe tener ningún coágulo visible. El plasma citratado normal debe tener un coágulo intacto y visible. Si el coágulo no es visible, el sujeto tiene deficiencia de FXIII.

Rango normal: Los sujetos normales tienen un coágulo visible después de 12 horas en ácido acético al 2%.

Notas: Se puede utilizar urea 5M en lugar de ácido acético al 2%. El tiempo de incubación para la disolución del coágulo es de 18 horas. Este método es menos sensible pero más específico que el ácido acético (descrito anteriormente). La coagulación con calcio y la lisis con urea producen resultados anormales solo cuando los niveles de FXIII están por debajo de 5 U/dl. En comparación, la coagulación con 30 U/ml de trombina seguida de lisis con ácido acético al 2% produce resultados anormales a niveles inferiores a 10 U/dl (Jennings et al, 2003). Ocasionalmente, los pacientes con niveles de FXIII por encima de 5 U/dl pueden sangrar (ver Bolton-Maggs et al, 2004 para una revisión). Los pacientes con hipofibrinogenemia o afibrinogenemia deben ser excluidos de las pruebas mediante estas pruebas.

Ensayo de actividad FXIII: FXIII media la reticulación de las cadenas a e y de fibrina. La deficiencia de FXIII se clasifica como un trastorno hemorrágico raro y puede estar causada por mutaciones en las subunidades catalíticas del FXIII-A o en las subunidades portadoras del FXIII-B (Karimi et al, 2018; Mumford et al, 2014). Los métodos disponibles actualmente para el diagnóstico de laboratorio clínico de la deficiencia de FXIII incluyen ensayos de solubilidad en coágulos, ensayos cuantitativos de actividad del FXIIIa, ensayos de antígenos del FXIII específicos para el complejo FXIII-A_{2B2}, ¿FXIII-A?, o FXIII-B?, y pruebas genéticas (Palla et al, 2015). Se recomienda que la deficiencia de FXIII se diagnostique mediante un ensayo de actividad funcional de FXIII en lugar de solubilidad en coágulos (Mumford et al, 2014; Kohler et al, 2011; Dorgalaleh et al, 2016). La mayoría de los ensayos de actividad FXIII solo son sensibles a las deficiencias de la subunidad FXIII-A. El fibrinógeno se recubre en la superficie de una placa de microtitulación. La fijación no específica se evita mediante un agente de bloqueo especial. El FXIII en la muestra es activado por la trombina y los iones de calcio. En la etapa de incorporación, FXIIIa en el plasma de prueba incorpora el sustrato, 5-biotinamidopentilamina (BAPA), en el fibrinógeno del sustrato FXIII recubierto en la placa en presencia de calcio. La cantidad de BAPA incorporado es proporcional a la actividad FXIII de la muestra de prueba. En el siguiente paso, un conjugado Strept-AP (estreptavidina-fosfatasa alcalina) se une al BAPA incorporado.

La fosfatasa alcalina convierte el sustrato sintético pNPP (p-nitro fenil fosfato) en fosfato y p-nitrofenol, que se puede medir a 405 nm. Los reactivos para el método que se describe a continuación están disponibles comercialmente en forma de kit (ensayo de incorporación Pefakit FXIII. Pentapharm, Suiza). Tenga en cuenta que hay otros ensayos de actividad disponibles de otros fabricantes, incluido el kit Berichrom FXIII (Siemens, Marburgo, Alemania), la liberación de amoníaco y el ensayo fluorogénico de actividad Technofluor FXIII (Technoclone, Viena, Austria)

Reactivos: Todos los reactivos necesarios están contenidos en el kit comercial.

Método:

Día 1

- ✓ Deje que los componentes del kit alcancen la temperatura ambiente durante 30 minutos.
- ✓ Reconstituya el reactivo de recubrimiento (R2) en agua destilada, según el volumen recomendado por el fabricante.
- ✓ Añada 100 µl de reactivo de recubrimiento por pocillo a los pocillos vacíos de las tiras de placa de microtitulación.
- ✓ Congele cualquier exceso de reactivo de recubrimiento para su uso posterior. Se mantiene estable durante 6 meses a -20°C.

- ✓ Selle las tiras con el sello de plástico provisto e incube durante la noche (14 a 16 horas) a temperaturas de 20-25 ° C.

Día 2

- ✓ Diluya 20 veces concentrado TBS R1 (solución salina tamponada tris) 50 ml en 950 ml de agua destilada o en un volumen menor, si es necesario.
- ✓ Diluya 3 ml del reactivo bloqueante R3 con 27 ml de TBS R1 diluido. Congela el exceso de R3.
- ✓ Deseche el reactivo de recubrimiento de la placa de microtitulación, invierta la tira y golpee el tejido para eliminar los residuos.
- ✓ Añada 300 µl de reactivo bloqueante diluido a cada pocillo.
- ✓ Incube durante 1-1,5 horas a 37°C en una incubadora.
- ✓ Reconstituya el calibrador R10 en 0,5 ml de agua destilada y los tres controles, R11, R12 y R13, en 0,2 ml de agua destilada.
- ✓ Descongele los plasmas de prueba congelados a 37 °C durante 5 minutos antes del análisis.
- ✓ Prepare un recipiente con unos cientos de ml de mezcla de hielo y agua como un baño de hielo.
- ✓ Realice diluciones de todos los plasmas de prueba y control, 10 µl de plasma y 1 ml de tampón TBS R1 diluido (dilución 1:101). Mezcla de vórtice.
- ✓ Realice las diluciones del calibrador de la siguiente manera:

Cal 1: 30 µl R10-t 970 µl TBS R1

Cal 2: 20 µl R10-t 980 µl TBS R1

Cal 3: 75 µl R10-t 25 µl TBS R1

Cal 4: 25 µl R10-t 75 µl TBS R1

Cal 5: 10 µl R10 + 90 µl TBS R1

Nota: Las diluciones 1 y 2 están listas para usar. Diluir aún más 10 µl de diluciones del calibrador 3-5 en 1 ml TBS R1. Lave la placa tres veces con 300 µl/pocillo TBS R1. Invierta y golpee el pañuelo para eliminar el exceso de líquido. Reconstituya el reactivo activador parte A (R4) y parte B (R5) en 5 ml de agua destilada cada uno. Continúe derritiendo el baño de hielo / hielo de agua durante no más de 30 minutos. Agregue 25 µl de cada calibrador, control o plasma de prueba en los pocillos apropiados. Incluya un espacio en blanco de TBS R1. Mezcle los reactivos activadores parte A y B (R4 y R5) para formar el reactivo de incorporación final. Añada 75 µl de reactivo de incorporación final a cada pocillo, incluido el pocillo del blanco. Incubar durante 30 minutos a 37°C en incubadora. Agregue 200 µl/pocillo de solución de detención de incorporación R6. Mezclar suavemente durante 10 minutos en la coctelera de platos. Reconstituya el reactivo de detección R7 añadiendo 12 ml de agua destilada. Congele el R7 diluido sin usar. Lave la placa cuatro veces con TBS de 300 µl/pocillo. Golpee para eliminar el exceso de líquido. Añada 100 µl/pocillo de reactivo de detección R7. Incubar durante 15 minutos a 37°C en la incubadora. Lave la placa cuatro veces con TBS de 300 µl/pocillo. Golpee para eliminar el exceso de líquido. Prepare la solución de sustrato inmediatamente antes de usar:

- ✓ Para 96 pocillos (plato lleno), añadir 9 comprimidos R8b a 22,5 ml de tampón dietanolamina R8a
- ✓ Para 64 pocillos (8 tiras), añadir 6 comprimidos a 15 ml de dietanolamina
- ✓ Para 32 pocillos (4 tiras), añadir 3 comprimidos a 7,5 ml de dietanolamina
- ✓ Para 24 pocillos (3 tiras), añadir 2 comprimidos a 5 ml de dietanolamina

Agregue 180 µl/pocillo de solución de sustrato. Incubar durante 11 minutos a 37°C en la incubadora. Agregue 50 µl/solución de tope de pocillo (4M NaOH) R9. Lea densidades ópticas en 15 minutos a 405 nm en un lector de placas de microtitulación.

Nota: Varios reactivos de kit se pueden almacenar ultracongelados para su uso posterior, como se ha descrito anteriormente. Sin embargo, el sustrato, las partes A y B del reactivo activador, los calibradores y los controles no deben congelarse. Los kits de reactivos parciales que contienen estos últimos materiales se pueden comprar para su uso con cualquier reactivo parcialmente utilizado que se haya congelado. Esto reduce el costo por prueba si las muestras de prueba se analizan en lotes pequeños.

Cálculo de resultados: Las diluciones del calibrador y los valores de control se suministran con cada kit. Utilizando un software de manejo de datos adecuado o papel cuadriculado, construya una curva de calibración trazando la concentración contra la densidad óptica (DO) de las diluciones del calibrador después de restar la DO del blanco. Utilice una escala lineal-lineal. Reste la DO del blanco de la DE de la muestra de prueba/diluciones de control y convierta la DO en actividad FXIII, utilizando la curva de calibración. Los resultados del paciente pueden ser aceptados si los valores de la muestra de control están dentro del rango aceptable.

Referencias

Dorgalaleh A, Tabibian S, Hosseini S, Shamsizadeh M. Directrices para el diagnóstico de laboratorio de la deficiencia del factor XIII. *Fibrinólisis de coágulos sanguíneos* 2016; 27(4): 361-364.

Dorgalaleh A, Tabibian S, Hosseini MS, Farshi Y, Roshanzamir F, Naderi M, Kazemi A, Zaker F, Aghideh AN, Shamsizadeh M. Diagnóstico de la deficiencia del factor XIII. *Hematología* 2016; 21(7): 430-439.

Jennings I, Kitchen S, Woods TA, Preston FE. Problemas relacionados con el diagnóstico de laboratorio de la deficiencia del factor XIII: un estudio NEGAS del Reino Unido. *J Thromb Haemost* 2003; 1(12): 2603-2608.

Karimi M, Peyvandi F, Naderi M, Shapiro A. Diagnóstico de la deficiencia del factor XIII: desafíos y herramientas. *Int J Lab Hematol* 2018; 40(1): 3-11.

Kohler HP, Ichinose A, Seitz R, Ariens RA, Muszbek L. Diagnóstico y clasificación de las deficiencias del factor XIII. *J Thromb Haemost* 2011; 9(7): 1404-1406.

Mumford AD, Ackroyd S, Alikhan R, Bowles L, Chowdary P, Grainger J, Mainwaring J, Mathias M, O'Connell N. Guía para el diagnóstico y tratamiento de los trastornos raros de la coagulación: una guía de la Organización de Médicos del Centro de Hemofilia del Reino Unido en nombre del Comité Británico de Estándares en Hematología. *Br J Haematol* 2014; 167(3): 304-326.

Palla R, Peyvandi F, Shapiro AD. Trastornos hemorrágicos raros: diagnóstico y tratamiento. *Sangre* 2015; 125(13): 2052-2061.

TEMAS TRATADOS

- ✓ Recuento de plaquetas
 - ✓ Pruebas de función plaquetaria
 - ✓ Pruebas de función plaquetaria por citometría de flujo
-

Recuento de plaquetas: La sangre se mezcla con un diluyente que causa hemólisis de los glóbulos rojos. Se llena un hemocitómetro con el líquido diluyente y las plaquetas se cuentan bajo el microscopio, preferiblemente mediante el uso de contraste de fase, si está disponible.

Materiales/equipos:

- ✓ Cámara de recuento delgada de fondo plano (hemocitómetro de contraste de fase con regla de Neubauer)
- ✓ Microscopio de contraste de fase equipado con condensador de fase de larga distancia de trabajo, si está disponible; de lo contrario, un microscopio óptico ordinario
- ✓ Pipeta de 20 μ l
- ✓ Pipeta graduada de 2 ml
- ✓ Tubo de 12 x 75 mm
- ✓ Mezclador mecánico

Reactivo: Fluido diluyente: oxalato de amonio al 1 % en agua destilada. Guárdelo en el refrigerador y siempre filtre justo antes de usarlo.

Muestra: Si la muestra de sangre proviene de una punción capilar, el sitio de la punción debe estar limpio y la sangre debe fluir libremente. Limpie la primera gota de sangre. Si la muestra de sangre proviene de sangre venosa, debe recogerse en una jeringa de plástico seca (o vidrio siliconado) con una aguja corta no menor de calibre 21. La aguja debe retirarse antes de que la sangre se coloque en un recipiente de plástico con EDTA. La sangre y el anticoagulante deben mezclarse suavemente, para evitar la formación de espuma, sin demora.

Método: Pipetear 0,38 ml de líquido diluyente en un tubo de ensayo. Llene la pipeta de 20 μ l hasta la marca y limpie el exterior de la pipeta. Vierta el contenido de la pipeta en el líquido diluyente y lave la pipeta extrayendo la sangre y vertiéndola en el tubo unas cuantas veces. Mezclar durante al menos 10 minutos a mano o, preferiblemente, con batidora mecánica. Llene el hemocitómetro, como se describe a continuación. Cubra la cámara con una placa de Petri durante 10 a 20 minutos para permitir que las plaquetas se asienten. Deje un trozo de algodón húmedo o papel filtro en el plato para evitar la evaporación. Con un microscopio, cuente las plaquetas en cuadrados grandes de 1 mm (= 0,1 μ l). Cuente las plaquetas en tantos cuadrados como sea necesario para alcanzar un conteo de al menos 100. Las plaquetas parecen redondas u ovaladas, y su estructura granular interna y su brillo púrpura permiten distinguirlas de los desechos. En el fondo se ven fantasmas de los glóbulos rojos que han sido lisados por el oxalato de amonio. Si no se dispone de contraste de fase, se puede utilizar un microscopio óptico ordinario, siempre que el condensador esté alejado de la muestra para reducir la intensidad de la luz. Calcule el número de plaquetas por litro de sangre de acuerdo con la siguiente fórmula.

El hemocitómetro: La cámara de recuento del hemocitómetro, con regla de Neubauer o Neubauer mejorada, está construida de manera que la distancia entre la parte inferior del cubreobjetos y la superficie de la cámara es de 0,1 mm. La superficie de la cámara contiene dos áreas especialmente rayadas con dimensiones como se muestra en la Figura 21. El 1 mm² central tiene líneas de límite dobles o triples. En las áreas centrales, hay 25 casillas en el Neubauer mejorado y 16 casillas en el fallo Neubauer. Cada cuadrado tiene un área de 0,04 mm² (0,2 x 0,2 mm). Estos cuadrados se dividen, a su vez, en cuadrados más pequeños, cada uno de 0,0025 mm² (0,05 x 0,05 mm). Los cuadrantes exteriores del área rayada son cada uno de 1 mm² y se dividen en 16 cuadrados.

Cálculos:

La fórmula para calcular el recuento de células es:

$$\text{Recuento (células/l)} = N \times D/A \times 10 \times 10^6$$

Donde N = número total de células contadas

D = dilución

A = área total contada (en mm²)

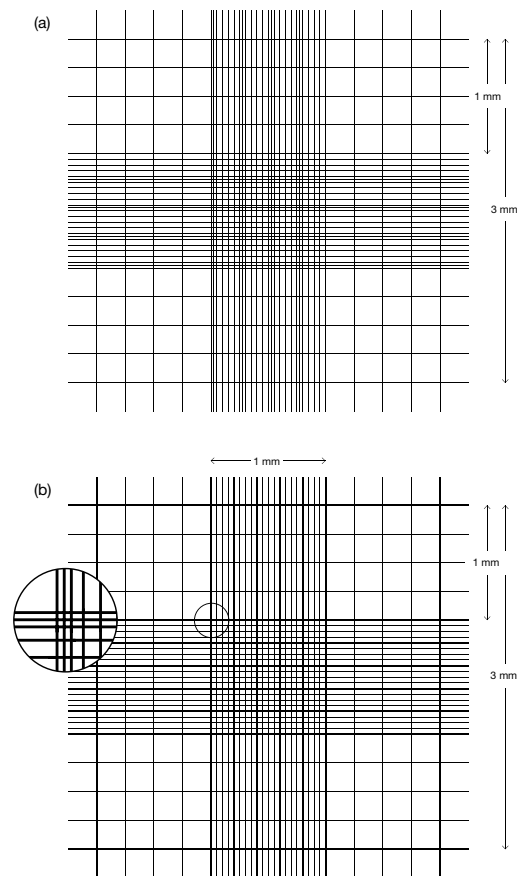
10 = factor para calcular el volumen en μL a partir del área (en mm²) y la profundidad de la cámara (0,1 mm)

10^6 = factor para convertir conteo/ μl a recuento/l

Fuentes de error en el recuento de células: Cuando se utiliza sangre capilar, se debe obtener una gota que fluya libremente. Cuando se utiliza sangre anticoagulada, la muestra debe mezclarse cuidadosamente invirtiendo el tubo de sangre al menos 20 veces antes de tomar una muestra. No agite el tubo, ya que al agitar se crea espuma, lo que hace imposible un pipeteo preciso. Inclina el tubo bien mezclado en un ángulo de 45° o un poco más, y pipetea desde el borde del tubo, siguiendo los mismos procedimientos que para la sangre capilar. Las pipetas para muestras de sangre deben estar limpias y secas. La pipeta debe llenarse rápidamente y la sangre debe extraerse con precisión mediante el uso de un dispositivo de succión de pipeta conectado a la pipeta, llenándola hasta la línea deseada. Si la línea se sobrepasa ligeramente, el exceso de sangre puede expulsarse tocando el borde de la pipeta con un trozo de papel filtro o servilleta de papel. Si la línea se sobrepasa, se debe utilizar una pipeta nueva. No debe haber burbujas de aire en la columna de sangre. El exterior de la pipeta debe limpiarse para eliminar la sangre (teniendo cuidado de no extraer sangre de la punta) antes de introducirla en el líquido diluyente. Una vez que el contenido de la pipeta se ha descargado en el diluyente, el líquido diluyente debe introducirse en la pipeta con una succión constante varias veces, para garantizar que toda la sangre se descargue en el fluido. El tubo que contiene la sangre diluida debe agitarse suavemente durante al menos dos minutos con la mano o, preferiblemente, en un agitador mecánico. Una vez agitado el tubo, la cámara se llena inmediatamente mediante una pipeta Pasteur o un tubo capilar. La cámara se llena por capilaridad, con el flujo de fluido de la pipeta o capilar regulado para que se llene rápida y suavemente. Debe llenarse por completo, pero el líquido no debe derramarse en el canal de contención. Deje que las celdas se asienten en el área de conteo durante 10 a 20 minutos, luego continúe con el conteo. La cámara del hemocitómetro y la cubierta de vidrio deben estar limpias y secas antes de usarlas. Pueden introducirse errores importantes por huellas dactilares o una película aceitosa. Se debe contar un número suficiente de células para reducir el error debido a la distribución aleatoria de las células. En la práctica, se deben contar al menos 100 células. Como control adicional de la correcta distribución de las células en la cámara, el número de células contadas en cada área (es decir, en los cuadrados grandes) no debe diferir en más del 10%.

Controles: Se deben hacer dos diluciones y tomar la media de los dos recuentos; los dos recuentos deben coincidir dentro del 10%.

Fuentes de error en el recuento de plaquetas: La sangre obtenida por venopunción es preferible a la sangre capilar, porque las plaquetas se adhieren a la herida y las diluciones sucesivas de un pinchazo en el dedo no siempre son reproducibles. Los errores generales del pipeteo y la hemocitometría se describen anteriormente. Además, se debe prestar especial atención a garantizar que la cámara de recuento esté escrupulosamente limpia, ya que la suciedad y los residuos pueden contarse como plaquetas. Lave la cámara con agua jabonosa, luego enjuague con agua destilada, deje secar y limpie con un pañuelo sin pelusa. Asegúrese de que el cubreobjetos esté limpio antes de usarlo. La presencia de grupos de plaquetas impide realizar recuentos fiables. Si la muestra contiene grumos, se debe recoger una muestra fresca. El diluyente de oxalato de amonio debe mantenerse refrigerado y debe desecharse si hay evidencia de contaminación bacteriana. El espécimen debe contarse dentro de las tres horas posteriores a la recolección.



10.2 Prueba de función plaquetaria

10.3 Retracción del coágulo

10.4 Medida de la agregación plaquetaria

Figura 21. Cámara de conteo del hemocitómetro (a) Neubauer y (b) Neubauer mejorado

Prueba de función plaquetaria: La función principal de las plaquetas es apoyar la hemostasia mediante la formación de tapón plaquetario en los sitios de la lesión vascular. Cuando el vaso sanguíneo se lesiona y las microfibrillas subendoteliales y las fibras de colágeno quedan expuestas, las plaquetas se unen a la pared del vaso, un proceso llamado adhesión plaquetaria. En los sitios de alto cizallamiento, las plaquetas se unen a los vasos indirectamente con la ayuda de multímeros FWW de alto peso molecular. El FWW se une al colágeno expuesto a través de su dominio A3, y las plaquetas se unen al FWW unido al colágeno a través de su receptor GPIIb. Las plaquetas también pueden adherirse directamente al colágeno en el subendotelio con los receptores de glicoproteína VI (GPVI) e integrina $\alpha 2\beta 1$. Una vez que las plaquetas se adhieren a la pared del vaso, experimentan una serie de cambios. A través de la reorganización del

citoesqueleto plaquetario, pasan de pequeñas estructuras en forma de disco a esferas espiculadas al desarrollar filopodios. La difusión transversa por la membrana transloca los fosfolípidos procoagulantes aniónicos, principalmente fosfatidilserina, a la superficie externa de las plaquetas, lo que forma una buena plataforma para la generación de trombina. Las plaquetas liberan el contenido que sea alfa (por ejemplo, fibrinógeno, FV, FVW y factores de crecimiento) y gránulos densos (por ejemplo, ADP, ATP, calcio y serotonina). Esto provoca una mayor activación de las plaquetas. La formación de tromboxano A₂ (TXA₂) se produce a partir del ácido araquidónico a través de la fosfolipasa A₂, la ciclooxigenasa-1 (COX-1) y la TXA₂ sintasa. Los agonistas plaquetarios (ADP, TXA₂ y trombina) se unen a receptores específicos de membrana e inician la agregación plaquetaria mediante la activación del receptor de integrina, $\alpha 2\beta 3$ (GPIIb-IIIa) que se une al fibrinógeno y/o al FVW para formar el tapón plaquetario. Las anomalías en cualquiera de estas vías que causan adhesión, activación, degranulación y agregación plaquetaria pueden causar disfunción plaquetaria. Los trastornos plaquetarios incluyen defectos cuantitativos (trombocitopenia) o cualitativos y pueden ser hereditarios o adquiridos. Los síntomas hemorrágicos son principalmente mucocutáneos, como equimosis, sangrado de encías, hematomas fáciles, menorragia, hemorragia posparto y hemorragia gastrointestinal (melena, hematemesis o hematoquecia). Los síntomas pueden ser leves o graves dependiendo de la anomalía. En la Tabla 33 se muestra una lista de trastornos hereditarios de la función plaquetaria (THFP) con características clínicas y de laboratorio destacadas asociadas. Se desconoce la verdadera prevalencia de los trastornos plaquetarios. Se cree que los trastornos de la función plaquetaria son más comunes de lo que se creía anteriormente debido al sub-diagnóstico. En las zonas del mundo donde la consanguinidad es común, los trastornos autosómicos recesivos como la trombostenia de Glanzmann y el síndrome de Bernard Soulier tienen una mayor prevalencia. Si bien el diagnóstico de la trombostenia de Glanzmann y el síndrome de Bernard Soulier son relativamente fáciles debido al patrón de agregación típico, el diagnóstico de la mayoría de los otros THFP es engorroso y requiere ensayos complejos. En la investigación de pacientes con sospecha de DPIP, es importante recopilar una historia clínica detallada, que incluya antecedentes personales y familiares. Se recomienda encarecidamente el uso de un BAT validado como el BAT del ISTH. Los antecedentes también deben incluir los antecedentes farmacológicos, la ingesta reciente de alimentos que posiblemente puedan interferir con la función plaquetaria y la presencia de otras características (p. ej., eccema, infecciones recurrentes, casos familiares de mielodisplasia, LMA) y posibles características sindrómicas (p. ej., pérdida de audición, defectos cardíacos, dismorfia facial u ósea, albinismo) que pueden ayudar en el diagnóstico. Las investigaciones preliminares de laboratorio deben incluir un hemograma completo, incluido el recuento de plaquetas, el examen de una muestra de sangre para buscar la morfología de las plaquetas y otras características de las células sanguíneas (ver más abajo), la determinación del tiempo de sangrado cutáneo (descrito en la sección 11), las pruebas de cribado para las pruebas hemostáticas secundarias (TP y TTPA) y el ensayo de fibrinógeno para excluir otros trastornos de la coagulación. Se recomienda realizar pruebas de detección de la EVW (es decir, actividad del FVW, antígeno del FVW) al mismo tiempo o antes de un estudio más extenso para los trastornos de la función plaquetaria. La enfermedad de Von Willebrand, la enfermedad de Von Willebrand tipo 2B y la enfermedad de Von Willebrand por tipo de plaquetas también pueden presentarse con macrotrombocitopenia y también deben considerarse en pacientes con recuentos bajos de plaquetas. Otra prueba sencilla que puede dar una indicación de la presencia de un defecto en la función plaquetaria es el método de retracción del coágulo, que se describe a continuación.

Retracción del coágulo: La retracción del coágulo en la sangre entera coagulada puede dar una indicación del número y la función de las plaquetas. Cuando el coágulo se retrae, se expone el suero y se puede medir el grado de retracción del coágulo.

Método: Recoja 1 ml de sangre en un tubo de ensayo de vidrio (75 mm x 10 mm) y colóquelo a 37 ° C. Examine el tubo visualmente hasta que quede un coágulo firme. Dejar reposar a 37 °C durante una hora más. Mida la distancia desde la base del tubo hasta el menisco. Retire con cuidado el coágulo con un palito fino de madera (por ejemplo, un palito de cóctel), dejando el suero que se ha extraído del coágulo en el tubo. Mide la distancia desde la base del tubo hasta el menisco del suero. Divide la distancia del suero por la distancia total y multiplíquela por 100 para obtener un porcentaje.

Interpretación: Normalmente, se expresa más del 40% de suero. Una disminución de la expresión está presente en algunos defectos plaquetarios, en particular la trombostenia de Glanzmann. También puede ser anormal en la trombocitopenia grave, el síndrome de Wiskott Aldrich y el síndrome de Stormorken.

Notas: Los tubos y el palillo de madera deben estar absolutamente limpios para evitar que el coágulo se adhiera al tubo. El coágulo debe retirarse con cuidado y suavidad para evitar que se exprima y, por lo tanto, se extraiga más suero.

Recuento de plaquetas, morfología y examen del frotis de sangre periférica: las pruebas iniciales para un presunto trastorno de la función plaquetaria deben incluir un hemograma completo junto con una evaluación del frotis de sangre periférica. Esto ayuda a detectar anomalías en el número, el tamaño y la morfología de las plaquetas, lo que puede proporcionar pistas importantes para posteriores pruebas de laboratorio. El recuento de plaquetas se puede medir mediante un método microscópico manual, un recuento automatizado en analizadores de hematología y un marcaje inmunológico basado en citometría de flujo. La estimación del recuento de plaquetas en el frotis periférico debe realizarse para confirmar el recuento de plaquetas, especialmente en casos de macrotrombocitopenia o anisocitosis plaquetaria. En un frotis bien preparado y teñido, se cuenta el número promedio de plaquetas en 10 campos de inmersión en aceite (100x). Este valor debe multiplicarse por 15.000 para determinar el recuento de plaquetas/ μL . Es importante revisar el frotis para evaluar los aglomerados de plaquetas, el tamaño de las plaquetas, la morfología y la granularidad. Se debe excluir la pseudotrombocitopenia debida a la aglomeración de plaquetas dependiente de EDTA y al satelitismo (neutrófilos que forman rosetas con las plaquetas). Es importante recordar que los aglomerados de plaquetas también se pueden ver en la EVW de tipo plaquetario o tipo 2B y no deben confundirse con la aglomeración inducida por EDTA. La EVW de tipo plaquetaria también puede mostrar plaquetas grandes en el frotis. Un tamaño anormal de las plaquetas suele ser una característica de los trastornos plaquetarios hereditarios (con o sin disfunción plaquetaria), como se muestra a continuación:

- Plaquetas pequeñas: síndrome de Wiskott-Aldrich, trombocitopenia ligada al cromosoma X, deficiencia de ADAP
- Plaquetas grandes/gigantes: síndrome de Bernard Soulier (gigantes), trastornos relacionados con MYH9 (gigante), síndrome de plaquetas grises y síndromes de deficiencia de α gránulos, EVW tipo plaquetas, trombocitopenia relacionada con ITGA2B/ITGB3 (variante GT), filaminopatía, trombocitopenia relacionada con SLFN14, defectos de GATA1, síndrome velocardiofacial
- Plaquetas normales: todos los demás trastornos

El volumen plaquetario medio (VPM) es un parámetro fácilmente disponible en los analizadores hematológicos de recuento de plaquetas basado en impedancia y proporciona una estimación sobre el tamaño de las plaquetas. Los laboratorios deben establecer sus propios rangos de referencia, ya que el VPM puede variar de un instrumento a otro. Las plaquetas pequeñas pueden pasarse por alto fácilmente por la microscopía óptica y un MPV reducido podría ser una primera pista para un posible síndrome de Wiskott Aldrich. Varios factores pueden afectar la medición del MPV e interferir con el recuento de plaquetas basado en la impedancia, como las anomalías de los glóbulos rojos y las plaquetas. La presencia de glóbulos rojos microcíticos y fragmentados puede sobrestimar los recuentos de plaquetas, mientras que la presencia de plaquetas grandes y/o gigantes puede pasar desapercibida, lo que provoca una subestimación de los recuentos de plaquetas. En estos escenarios, los recuentos de plaquetas y el MPV no serán confiables. Es muy útil observar concomitantemente el histograma de plaquetas que puede identificar anomalías en el tamaño de las plaquetas y posibles interferencias/contaminación. En la macrotrombocitopenia, los recuentos ópticos o fluorescentes de plaquetas proporcionan recuentos de plaquetas más verdaderos. En el síndrome de plaquetas grises se pueden observar plaquetas grandes y pálidas con citoplasma gris azulado con gránulos azurófilos ausentes o marcadamente reducidos debido a la deficiencia de gránulos α . El síndrome de Paris Trousseau muestra plaquetas de grandes a gigantes, algunas de las cuales muestran gránulos A aglomerados/fusionados que forman un gránulo grande y aglomerados. La anisocitosis plaquetaria (es decir, la variación en el tamaño de las plaquetas) y la anisogranularidad (es

decir, la variación de la granularidad de las plaquetas) con presencia de plaquetas de aspecto vacío y pálido es una característica clásica de la disfunción plaquetaria adquirida con eosinofilia (APDE). La DPA es una diátesis hemorrágica transitoria asociada a la eosinofilia, que se presenta con frecuencia en niños del sudeste asiático y se revierte con el tratamiento de la eosinofilia. Las anomalías morfológicas también se pueden observar en otras células sanguíneas. Presencia de cuerpos de inclusión similares a Dohle en neutrófilos en trastornos relacionados con MYH9, gránulos citoplasmáticos gigantes positivos para peroxidasa en neutrófilos y/u otros leucocitos en el síndrome de Chediak Higashi, cuerpos de Howell Jolly en el síndrome de Stormoken y diseritropoyesis en mutaciones de GATA-1.

Medición de la agregación plaquetaria mediante agregación de transmisión de luz: La agregometría de transmisión de luz (LTA) es el estándar de oro para las pruebas de función plaquetaria. Fue descrito por primera vez de forma independiente por O'Brien y Born en la década de 1960. El principio se basa en los cambios en la densidad óptica del plasma rico en plaquetas (PRP) a medida que las plaquetas se activan y forman agregados. El PRP es turbio debido a la suspensión de plaquetas en comparación con el PPP. Una vez que se agregan agonistas al PRP, las plaquetas forman agregados y se sedimentan, limpiando así el plasma y permitiendo que pase más luz. El cambio en la luz transmitida se mide a lo largo del tiempo mediante un agregador y se representa gráficamente. Al comparar el patrón de respuesta de agregación con cada agonista, se puede sospechar y diagnosticar el tipo de trastorno de la función plaquetaria. Se han publicado una serie de excelentes revisiones y guías para las pruebas de función plaquetaria y el diagnóstico de los THFP.

Precauciones previas al estudio de la agregación plaquetaria (variables preanalíticas en la agregación plaquetaria): Las muestras de sangre para la LTA deben recogerse después de un breve período de descanso. Los sujetos deben abstenerse de fumar durante al menos 30 minutos antes y de tomar cafeína al menos 2 horas antes de la prueba. Se debe documentar un registro de todos los medicamentos, incluidos los medicamentos nativos/herbales tomados durante los últimos 10 días. Para obtener una lista de fármacos que pueden interferir con la función plaquetaria, consulte las guías de la Sociedad Británica de Hematología sobre las pruebas de función plaquetaria a las que se hace referencia a continuación. Los fármacos que se sabe que inhiben reversiblemente la función plaquetaria (por ejemplo, los AINE) deben suspenderse al menos 3 días antes de la toma de muestras. Los fármacos que se sabe que inhiben irreversiblemente la función plaquetaria (por ejemplo, aspirina, tienopiridinas) deben suspenderse al menos 10 días antes de la toma de muestras, a menos que su efecto esté siendo investigado específicamente. Lo ideal es que los pacientes estén en ayunas, preferiblemente después del ayuno nocturno. Si no está en ayunas, evite tomar muestras después de las comidas grasosas. Muchos otros componentes dietéticos "normales", como el alcohol, las cebollas, el ajo, el pimiento y el jengibre, también pueden inhibir la agregación plaquetaria. Esto debe tenerse en cuenta a la hora de evaluar los resultados. La sangre debe extraerse con venostasis mínima o sin venostasis utilizando una aguja de al menos calibre 21 en un anticoagulante tamponado con citrato de sodio de 109 mM o 129 mM. Los primeros 3-4 ml de sangre extraída deben desecharse o utilizarse para pruebas distintas de la LTA (por ejemplo, TP/TTPA). Cuando la recolección de muestras es difícil, los tubos con llenado insuficiente solo se pueden usar para excluir defectos graves de la función plaquetaria, como la trombostenia de Glanzmann o el síndrome de Bernard-Soulier.

Preparación de plasma rico en plaquetas y pobre en plaquetas: Las muestras de sangre deben dejarse "reposar" a temperatura ambiente durante al menos 15 minutos antes de la centrifugación. La refrigeración de las plaquetas puede causar activación y, por lo tanto, las muestras siempre deben mantenerse a temperatura ambiente. El PRP debe prepararse centrifugando muestras de sangre a 200 g durante 10 minutos a temperatura ambiente (~21 °C) sin utilizar un freno. Para muestras con plaquetas muy grandes, como el síndrome de Bernard-Soulier, el PRP debe prepararse mediante sedimentación sanguínea durante 30 minutos. El PRP se retira cuidadosamente, evitando la contaminación con glóbulos rojos o la capa leucocitaria (la agregación disminuirá si alguno de los dos está presente), en un tubo de polipropileno tapado que se mantiene en posición vertical a 20-25 °C. El PPP debe prepararse centrifugando sangre completa, o los tubos de sangre de los que se extrajo el PRP, a temperatura ambiente a 1500 g durante

15 minutos. Las muestras hemolizadas macroscópicas deben ser rechazadas. Si la muestra es lipémica, indíquelo en el informe final. Es necesario comprobar el recuento de plaquetas del PRP. Los resultados de los estudios de LTA pueden ser inexactos cuando el recuento de plaquetas en la muestra de PRP es inferior a $150 \times 10^9/l$. Las muestras con recuentos bajos de plaquetas deben interpretarse con precaución, pero se pueden analizar para excluir trastornos graves de la función plaquetaria, como la trombostenia de Glanzmann, el síndrome de Bernard Soulier, la EVW tipo 2B y la EVW plaquetaria. El recuento de plaquetas de las muestras de PRP NO debe ajustarse a un valor estandarizado con PPP autólogo. El recuento de plaquetas en PRP en muestras de sujetos con recuento de plaquetas normal ($200-600 \times 10^9/l$) no afecta a los resultados de los estudios de LTA. El ajuste del recuento de plaquetas en PRP utilizando PPP autólogo dentro de este rango puede inhibir la capacidad de respuesta de las plaquetas. Esto se debe probablemente a que el PPP puede contener sustancias liberadas por las plaquetas durante el trauma adicional de la centrifugación a mayor velocidad utilizada en la preparación del PPP. Persiste la incertidumbre sobre cuál es la mejor práctica a seguir cuando el recuento de plaquetas en PRP supera las $600 \times 10^9/l$. Para recuentos de PRP extremadamente altos ($>1000 \times 10^9/l$), puede ser ventajoso ajustar el recuento de plaquetas a un nivel más adecuado con el PPP del paciente.

Agentes agregantes o agonistas: Hay dos tipos de agonistas, agonistas débiles y agonistas fuertes. Los agonistas débiles (por ejemplo, ADP y epinefrina) en concentraciones críticas muestran una onda primaria inicial de agregación debido al efecto inducido directamente por el agonista, seguida de una onda secundaria de agregación causada por la liberación de gránulos de plaquetas y la síntesis de TXA₂. Por otro lado, los agonistas fuertes (por ejemplo, trombina, colágeno, TXA₂) muestran una sola curva sin distinción entre agregación primaria y secundaria, ya que estos agonistas inducen directamente la agregación plaquetaria, la síntesis de TXA₂ y la liberación de gránulos. En la figura 22 se muestran las diferentes fases de la agregación plaquetaria, que solo se evidencia con agonistas débiles.

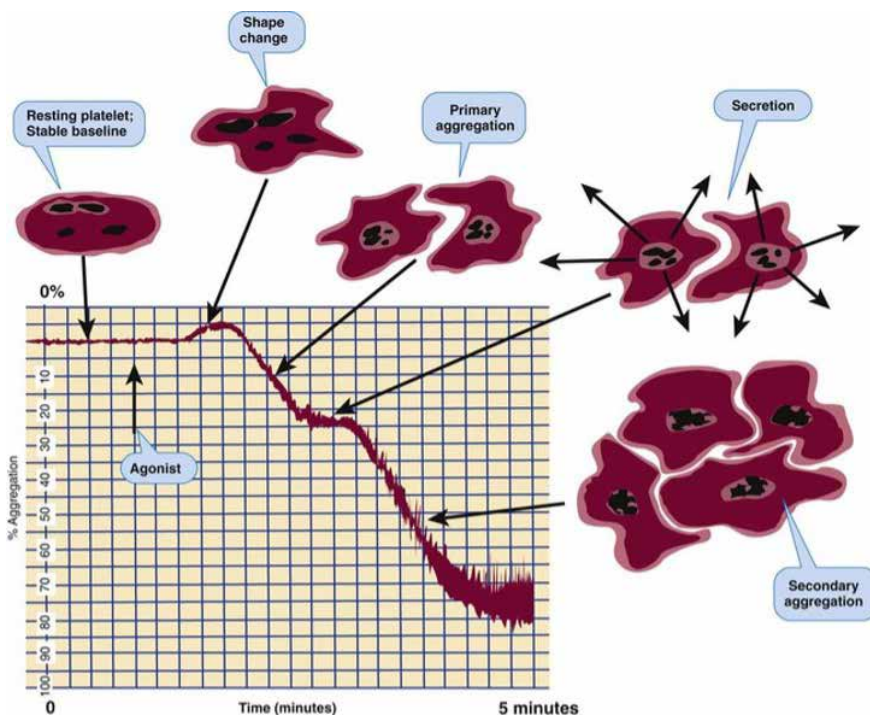


Figura 22. Imagen de Hematología de Rodak: Principios clínicos y aplicaciones, 5ª edición

Tabla 33. Resumen de los agonistas recomendados junto con las concentraciones que se pueden utilizar como panel inicial y panel ampliado (concentraciones según las guías de I STH)

Agonista	Panel inicial y concentración	Panel extendido y concentración
ADP*	2 µM	5 µM, 10 µM
Epinefrina*	5 µM	10 µM
Colágeno (Horm o fibrilar tipo 1)	2 µg/ml	
Ácido araquidónico	1mM	
Ristocetina (dosis baja)	0.5-0.7 mg/ml	
Ristocetina (dosis alta)	1.2-1.5 mg/ml	
Péptido activador del receptor de trombina (TRAP)*, PARI	-	10 µM
Tromboxano A2 mimético U46619	-	1 µM

*Se deben usar concentraciones más altas si se observan resultados anormales con la concentración inicial.

Adenosina-5-difosfato (ADP): Se prepara una solución madre de 1 mM/l de sal disódica en OBS y se almacena en pequeñas cantidades a -40 °C. Esto es estable durante al menos tres meses. Una vez descongelada, la solución debe usarse dentro de las tres horas o desecharse. Para su uso, se preparan diluciones adicionales en OBS. El patrón de respuesta al ADP depende de su concentración final. A 2 pmol/l, se pueden ver ondas primarias y secundarias claramente definidas: la primera representa el efecto inducido por agonistas directos y la segunda se debe a la liberación de ADP endógeno y a la generación de TXA₂, que a su vez agrega plaquetas. Por debajo de 2 pmol/l, un número cada vez menor de sujetos normales muestran una respuesta secundaria, y la onda primaria suele invertirse a medida que el ADP se degrada enzimáticamente. Por encima de 3 pmol/l, la fase primaria suele ser tan intensa que se enmascara la distinción entre ella y la fase secundaria. El ADP induce un cambio en la forma de las plaquetas de un disco a una esfera puntiaguda. Esto provoca inicialmente un ligero aumento en la densidad óptica de la suspensión plaquetaria, que solo se puede ver si la agregación primaria está afectada.

Adrenalina (epinefrina): Se prepara una solución madre de 1 mM/l de sal de bitartrato en OBS. Debe almacenarse y utilizarse como para ADR. Con la adrenalina, las concentraciones utilizadas y los patrones de respuesta son similares a los de la ADR. Sin embargo, en ausencia de una onda secundaria, la onda primaria no se invierte, ni es tan intensa que la onda secundaria quede enmascarada.

Colágeno: Una suspensión muy estable de fibrillas de colágeno del tendón equino (1 mg/ml), disponible en Hormon-Chemie, Munich, Alemania, es ampliamente utilizada. Una serie de otros materiales son igualmente adecuados. Se almacena a 4 °C y debe mezclarse bien inmediatamente antes de la dilución en el tampón envasado con él. Debe utilizarse a una concentración final de 0,5-2,0 µg/ml en PRP, y las suspensiones diluidas son estables durante una semana a 4 °C. Con el colágeno, no se produce una onda primaria. La respuesta suele definirse por la duración de la fase de retraso antes del inicio de la agregación y por la intensidad de esta última. Un ligero aumento en la densidad óptica causado por el cambio de forma precede a la agregación. El colágeno de varias fuentes diferentes está en uso. Tanto el tipo de colágeno como la especie a partir de la cual se prepara el preparado (por ejemplo, equino o bovino) pueden tener un efecto importante en los resultados obtenidos. De hecho, se requiere un rango de concentraciones más de cien veces, dependiendo del material de origen. Por lo tanto, es importante seleccionar una fuente adecuada y establecer un rango de referencia local para este material, que debe ser reevaluado si se cambia la fuente. Para una revisión, véase Jennings et al. (2008).

Ristocetina: A una concentración final de ristocetina de 1 mg/ml en PRP, generalmente se distinguen ondas primarias y secundarias distintas, pero por encima de esto el efecto directo es tan intenso que las dos fases se fusionan. La onda primaria es una medida de la cantidad de FWW presente en el plasma, mientras que la segunda onda se debe a la liberación de sustancias endógenas.

Ácido araquidónico: El araquidonato de sodio (99% de pureza) se disuelve en OBS a una concentración de 10mM/l. Las pequeñas alícuotas se colocan en viales de vidrio oscurecido que se enjuagan con nitrógeno para evitar la oxidación, luego se tapan herméticamente y se almacenan congelados por debajo de -20 ° C. La agregación es generalmente monofásica y está precedida por una breve fase de retraso.

Reactivos: A continuación, se muestran algunos ejemplos de concentraciones y diluciones de reactivos

Nota: Estas concentraciones son apropiadas si se añade una parte a nueve partes de PRP. Las diluciones se pueden hacer en agua destilada o solución salina, o según las instrucciones del fabricante.

- ✓ ADP (solución madre 1000 µM)

Haga una dilución 1 en 10 = 100 µM (es decir, 0,1 ml de solución de 10.000 µM + 0,9 ml de OBS). A partir de esto, haga las concentraciones de trabajo adecuadas: 20 µM (es decir, 0,2 ml 100 µM + 0,8 ml OBS), concentración final de PRP de 2-50 µM (es decir, 0,5 ml 100 µM + 0,5 ml OBS), concentración final de PRP de 5 µM. En los casos en los que se está probando la hiperagregabilidad, es posible que se necesiten fuerzas de trabajo de menor concentración (por ejemplo, 10 µM, 5 µM).

- ✓ *Adrenalina (epinefrina):* Diluir como para ADP para hacer una fuerza de trabajo de 50 µM. Esto dará una concentración final de PRP de 5 µM.
- ✓ *Colágeno:* Mezclar bien y diluir en OB/otros diluyentes: 1 en 500 (es decir, 0,1 ml de solución madre + 4,9 ml de OBS) = 20 µg/ml, concentración final de PRP de 2 µg/ml
- ✓ *Ristocetina:* Se utiliza hasta en dos concentraciones diferentes en función de los resultados obtenidos. Ristocetina en dosis normales de 15 mg/ml o 12,5 mg/ml, y ristocetina baja en 7,5 mg/ml o 5 mg/ml. Esto dará una concentración final de PRP de 1,5 mg/ml o 1,25 mg/ml, y una dosis baja de ristocetina de 0,75 mg/ml o 0,5 mg/ml respectivamente, dependiendo de la concentración utilizada.

Método/procedimiento: Los estudios de LTA deben completarse en un máximo de 4 horas después de la toma de muestras de sangre. Debido a la refractariedad de las plaquetas a la agregación después de la centrifugación, las muestras de PRP deben dejarse reposar a temperatura ambiente durante al menos 15 minutos antes de la prueba. El PRP debe almacenarse en tubos completos y herméticamente tapados hasta que se realice la prueba. Antes de comenzar, lleve los reactivos/agonistas a temperatura ambiente. Prepare diluciones frescas de reactivos si es necesario. Encienda el agregador y la computadora/grabadora y espere hasta que la temperatura del agregador alcance los 37 °C. Ajuste la velocidad de agitación a 1000 rpm a menos que el fabricante del agregador especifique lo contrario. Pipetee 450 µl de PRP en una cubeta de vidrio con una barra de agitación magnética. El número de cubetas utilizadas depende del número de agonistas que se van a analizar. Precaliente las cubetas de PRP en los pocillos de incubación que rodean el bloque calefactor durante 2-5 minutos. Pipetee 500 µl de PPP en otra cubeta de vidrio sin barra de agitación y colocar en el pocillo de referencia en el blanco correspondiente. Se deben utilizar PRP y PPP autólogos para establecer la transmisión de luz del 0% y el 100% en el agregador. Deje correr durante 1 minuto antes de agregar el agonista. Pipetear 50 µl de agonista en el fondo de la cubeta de PRP sin producir burbujas. El volumen de agonista añadido para la LTA debe ser consistente y nunca más del 10% del volumen total de la muestra. Una muestra conocida de control debe correrse en paralelo con la del paciente. La agregación plaquetaria debe controlarse durante un mínimo de 3 minutos después de agregar un agonista, y hasta 10 minutos para los agonistas que no alcanzan la agregación máxima a los 3-5 minutos. Repita el procedimiento para cada agonista.

Notas: Si se observa una respuesta anormal con el panel inicial de agonistas, se puede agregar un panel extendido adicional (Tabla 35) junto con la liberación de ATP mediante lumiagregometría (ver más abajo). Se deben utilizar concentraciones más altas de agonistas (por ejemplo, ADP, epinefrina) si se observa una respuesta anormal en la concentración inicial. Si no se observa ninguna respuesta de agregación con el ácido araquidónico, agregue el agonista, análogo del receptor TXA₂ (TRA), U46619. En los defectos de

síntesis de TXA₂ (deficiencia de COX/TXA₂ sintasa) o en el efecto de la aspirina, se observa una respuesta normal con TRA. En los casos de defecto del receptor TXA₂, se observan respuestas anormales tanto con el ácido araquidónico como con el TRA. Se puede observar una respuesta anormal aislada con epinefrina en una proporción de sujetos sanos. Sin embargo, esta puede ser la única característica de LTA del síndrome de plaquetas de Quebec. Cuando se estudia la agregación plaquetaria como parte de una evaluación de la hiperagregabilidad, el ADP y la adrenalina se utilizan en concentraciones más bajas para obtener una curva de dosis-respuesta. Las concentraciones utilizadas son: 2 µM, 1 µM, 0,5 µM y 0,1 µM de concentración final en PRP. También se realiza una agregación espontánea antes de probar el resto de los agonistas. Si las plaquetas se hiperagregan con 0,5 mg/ml de ristocetina, esto indica una posible EVW de tipo 2B o de tipo plaquetaria. Compruebe la agregación espontánea mediante el seguimiento del PRP en las mismas condiciones de agitación en el agregador sin añadir ningún agonista para estimular la agregación. Realice estudios de mezcla para diferenciar entre los dos subtipos. Esto se puede hacer mediante dos métodos. Procedimiento básico: Mezclar volúmenes iguales de plasma del paciente con plaquetas normales (es decir, 225 µl de PPP del paciente + 225 µl de PRP de control). A continuación, esta mezcla se analiza con ristocetina a 0,5 mg/ml. Si hay aglutinación, sugiere la EVW tipo 2B. La ausencia de aglutinación puede deberse a una EVW de tipo plaquetario. Es importante tener en cuenta que una respuesta ausente también puede deberse a la dilución adicional de PRP.

Procedimiento alternativo: Lavar al paciente y controlar las plaquetas tres veces con PBS-EDTA en tubos de centrifuga de 15 ml (baja velocidad de centrifugación para blandir las plaquetas). Resuspender cuidadosamente las plaquetas del paciente en plasma normal y las plaquetas normales en el plasma del paciente. Ajuste el recuento de plaquetas a 400 x 10⁶ plaquetas granuladas. (Tenga en cuenta que el PBS-EDTA se prepara agregando 9 mM de EDTA disódico al PBS y ajustando el pH a 7.0. El PBS utilizado contiene 135 mM de NaCl, 2,6 mM de KCl, 8 mM de Na₂HPO₄ y 1,5 mM de KH₂PO₄, con un pH de 7,4). Repetir la prueba con ristocetina a 0,5 mg/ml. Las reacciones deben ajustarse a uno de los siguientes patrones.

Tabla 34. Interpretación de la EVW tipo 2B y de plaquetas

Tubo 1	Plaquetas lavadas del paciente + PPP de control	Sin aglutinación	Agglutinación
Tubo 2	Plaquetas lavadas del control + PPP del paciente	Agglutinación	Sin aglutinación
	INTERPRETACIÓN	EVW Tipo 2 B	EVW por tipo de plaquetas

Las guías de la EVW de 2021 favorecen el uso de pruebas genéticas específicas para el diagnóstico de la EVW tipo 2B y de tipo plaquetario. Sin embargo, esto puede no ser factible para muchos laboratorios debido a las limitaciones de costos. El estudio de mezcla RIPA todavía se mantiene como una de las pruebas en el algoritmo de diagnóstico según I STH.

Interpretación e informe de los resultados: El rastreo de la agregación plaquetaria debe evaluarse en función de la presencia de cambio de forma, la duración de la fase de retraso (algunos agonistas como el colágeno pueden tener una fase de retraso más larga), la agregación máxima (el método más conveniente y comúnmente utilizado para reportar los resultados), la pendiente de agregación (indica la tasa de agregación), el examen visual de los trazados de agregación (es decir, la desagregación). dosis bajas de ADP). La desagregación con ADP es particularmente llamativa con los defectos P2Y12 heredados. El PRP preparado de la misma manera a partir de un donante normal sano debe procesarse y correrse simultáneamente con el paciente como control de los reactivos. Esto es especialmente importante si se obtienen resultados anormales en el paciente, ya que algunos agonistas son lábiles, especialmente una vez diluidos a concentraciones de trabajo. Los laboratorios clínicos deben establecer intervalos de referencia apropiados para la concentración de cada agonista. Los resultados de sujetos normales sanos evaluados junto con el paciente se pueden utilizar para derivar rangos de referencia. Se requiere mucha precaución al interpretar los patrones de agregación plaquetaria. Una serie de factores técnicos pueden influir en los resultados. Hay que tener en cuenta que hay una serie de diferencias importantes entre la agregación

determinada por nefelometría y la que se produce en el organismo. No obstante, se puede obtener información diagnóstica útil, y en la Tabla 35 se muestran algunos ejemplos de patrones de agregación.

Tabla 35. La agregación plaquetaria da lugar a diversos trastornos

Desorden	ADP	Colágeno	Ristocetina 1,25 mg/ ml	Ristocetina 0,5 mg/ml	Ácido araquidónico	Adrenalina
EVW tipo 1 y 2A	N	N	A/R**	A	N	N
EVW tipo 2B	N	N	N	H	N	N
Síndrome de Bernard-Soulier	N	N	A	A	N	N
Trombastenia de Glanzmann	A	A	N	A	A	A
Enfermedad por almacenamiento de plasma combinado	P/N	R/N	N	A	R/N	P/N
Defecto de la ciclooxygenasa*	R/N	R	N	A	R/A	R/N

N = Normal; A = Ausente; R = Reducido; H = Respuesta intensificada; P = Solo onda primaria

*O efecto por aspirina

**Puede ser normal en la EVW tipo 1 de tipo silvestre o no mutada

Investigación adicional de la función plaquetaria: Si se observa un patrón de agregación anormal en un individuo, es aconsejable repetir la evaluación al menos una vez más para comprobar la consistencia de la anomalía. En presencia de una agregación anormal, puede ser útil realizar más investigaciones. Estos incluyen la medición del contenido de nucleótidos plaquetarios y su liberación durante la agregación plaquetaria. La cuantificación de las glicoproteínas de membrana se puede realizar para el diagnóstico inequívoco del síndrome de Bernard-Soulier y la trombastenia de Glanzmann (ver más abajo).

Liberación de ATP por lumiagregometría: La lumiagregometría es el método más utilizado para evaluar la función de liberación de gránulos densos plaquetarios. Tiene la ventaja de que la liberación de LTA y ATP de gránulos densos se puede medir simultáneamente. Se basa en el principio de la reacción luciferina-luciferasa. Cuando las plaquetas se activan, los gránulos densos liberan su ATP y ADP almacenados. El ATP liberado reacciona con la luciferina en presencia de luciferasa para dar luminiscencia que se puede cuantificar, en relación con un estándar de ATP. La secreción defectuosa de ATP se puede observar tanto en la deficiencia de gránulos densos como en los defectos de secreción primaria. La distinción entre las dos entidades requiere pruebas adicionales, como la medición del contenido total de ATP-ADP plaquetario mediante ensayos bioluminiscentes, ensayos de liberación de serotonina con ¹⁴C-5-HT radiomarcado, ensayo de mepacrina mediante citometría de flujo (ver más abajo) o evaluación de gránulos densos mediante microscopía electrónica de transmisión de montaje completo.

Tabla 36. Factores técnicos que influyen en la función plaquetaria

Anticoagulante	1/10avo volumen de citrato trisódico.
Hora	Comience las pruebas 30 minutos después de la preparación del PRP. Complete los estudios dentro de las cuatro horas posteriores a la extracción de sangre.
Centrifugación	Debería ser suficiente para eliminar los glóbulos rojos y los glóbulos blancos, pero no las plaquetas grandes. Debe hacerse a temperatura ambiente, no a 4°C. Las plaquetas grandes se pueden separar por sedimentación.
Conteo plaquetario	Los recuentos bajos <100 x 10 ⁹ /l provocan respuestas lentas y débiles. Los recuentos altos >1000 x 10 ⁹ /l pueden mostrar una respuesta reducida.
pH	<pH 7.7 inhibe la agregación. >pH 8.0 mejora la agregación.
Velocidad de mezcla	<800 rpm muestra una agregación reducida. >1200 rpm rompe los aglomerados de plaquetas.
Hematocrito	>55% muestra progresivamente menos agregación, especialmente inhibición en la segunda fase debido al aumento de la concentración de citrato.
Temperatura	<35 °C muestra una disminución de la agregación con dosis regulares de todos los agonistas, pero una mayor respuesta a dosis bajas de ADP.
Lipemia	El aumento de quilomicrones provoca una reducción de la agregación.
Cubeta sucia	Puede causar una agregación espontánea aparente.
Sin barra de agitación	No hay respuesta sobre la adición del agente agregante
Burbujas de aire	Oscilaciones rápidas y grandes de la pluma antes de la agregación. También es causada por un recuento bajo de plaquetas.

Diferencias entre las condiciones in vivo e in vitro para la agregación plaquetaria: Con los análisis de sangre in vitro, la sangre se anticoagula, se eliminan los glóbulos rojos y los leucocitos, los componentes vasculares no están involucrados, la coagulación no está involucrada, se selecciona la población plaquetaria, se retienen los productos de activación y liberación de plaquetas, los reactivos utilizados son no fisiológicos en composición y dosis, las plaquetas son inestables fuera del cuerpo, y los fármacos pueden mostrar efectos más o menos marcados que in vivo.

Pruebas de función plaquetaria por citometría de flujo: La citometría de flujo puede proporcionar información útil para el diagnóstico y la clasificación de los trastornos de la función plaquetaria. Se puede utilizar para el análisis de los receptores de glicoproteínas, las pruebas de función plaquetaria después de la estimulación con agonistas, la medición de la función procoagulante plaquetaria (por ejemplo, la fijación de la anexina V) y la evaluación del contenido de gránulos alfa y densos. Las principales ventajas de la citometría de flujo son el requisito de pequeños volúmenes de muestra, se puede realizar en sangre total y no está limitada por la trombocitopenia. Esto se vuelve particularmente útil en sujetos pediátricos y trombocitopénicos.

Análisis de glicoproteínas de superficie plaquetaria por citometría de flujo: la trombostenia de Glanzmann, caracterizada por una α IIb β 3 anormal o ausente, puede detectarse con anticuerpos monoclonales GPIIb (CD41) o CDIIIa (CD61) marcados con fluorescencia, y el síndrome de Bernard Soulier, caracterizado por GP1 b/V/IX anormal o ausente, puede diagnosticarse utilizando anticuerpos dirigidos contra anticuerpos GPIb (CD42b) o GPIX (CD42a). Además, otras THFP menos comunes que afectan a los receptores α 2 β 1 (CD49/CD29), GPIV (CD36) o GPVI también pueden diagnosticarse utilizando los anticuerpos respectivos. El análisis de las moléculas de superficie se puede realizar incluso hasta 24 horas después de la recolección. Prueba de activación plaquetaria por citometría de flujo (PACT). La PACT permite la medición simultánea de una amplia gama de diferentes marcadores de activación de la función plaquetaria, lo que permite un

análisis más completo de las diversas vías involucradas en la función plaquetaria. Las plaquetas pueden identificarse por sus características propiedades de dispersión lateral frontal (FSC) y dispersión lateral (SSC) y, preferiblemente, mediante la adición de un receptor de glicoproteína específico (por ejemplo, CD41). Algunos de los marcadores de activación más utilizados son: PAC-1 (anticuerpo monoclonal que se une específicamente a la forma de conformación activada de α IIb β 3), CD62P o P-selectina (uno de los contenidos de los gránulos α , puede utilizarse como marcador de la liberación de gránulos α) y CD63 (puede utilizarse como marcador de la liberación de gránulos δ). Las pruebas se pueden realizar utilizando una combinación de agonistas para dirigirse a diferentes como el ADP, el péptido activador del receptor de trombina (TRAP) y la convulxina. La expresión de los marcadores de activación en las plaquetas se mide (utilizando MFI y/o %) al inicio (antes de añadir el agonista) y después de la estimulación del agonista. Una expresión reducida después de la estimulación con agonistas sugiere un defecto/anomalía en la vía específica. Es importante correr una muestra de control simultáneamente de manera similar a LTA.

Fijación del FVW inducido por ristocetina por citometría de flujo: La función del receptor GP1b/V/IX y el FVW también puede evaluarse mediante citometría de flujo midiendo la expresión de FVW en las plaquetas después de la adición de dosis normales y bajas de ristocetina. Se puede utilizar un anticuerpo monoclonal contra el FVW. La mezcla de estudios con plasma de pacientes y plasma de control y viceversa a dosis bajas de ristocetina puede diferenciar entre el tipo 2B y la EVW por tipo de plaquetas.

Ensayo de captación y liberación de mepacrina mediante citometría de flujo: El ensayo de captación y liberación de mepacrina también puede utilizarse para evaluar defectos de δ gránulos. La mepacrina es un derivado fluorescente de la acridina que se une a los nucleótidos de adenosina plaquetaria con alta afinidad. Después de la incubación de las plaquetas con mepacrina a 37 °C durante 30 minutos, es absorbida selectivamente por gránulos densos que se pueden medir mediante el aumento de la fluorescencia mediante citometría de flujo. La función de liberación también puede evaluarse midiendo la fluorescencia de la mepacrina después de la estimulación con agonistas (por ejemplo, convulxina o TRAP). La fluorescencia se mide al inicio del estudio (solo plaquetas), después de la adición de mepacrina (plaquetas + mepacrina) y después de la adición de un agonista (plaquetas + mepacrina + agonista). Se pueden calcular las relaciones de absorción y liberación. La disminución de la absorción y liberación se observa en la deficiencia de gránulos densos, mientras que una absorción normal con liberación reducida se observa en los defectos de secreción.

Actividad procoagulante plaquetaria: Tras la estimulación simultánea de las plaquetas con convulxina y trombina, un subconjunto de plaquetas expresa fosfolípido procoagulante aniónico, fosfatidilserina en la superficie de las plaquetas activadas. Esto puede evaluarse utilizando anexina V o lactadherina marcada con fluorescencia, que se une a la fosfatidilserina. La translocación de fosfolípidos procoagulantes facilita el ensamblaje de factores de coagulación para la generación de trombina en la superficie de las plaquetas. La citometría de flujo permite detectar la alteración (síndrome de Scott) o el aumento de la actividad procoagulante (síndrome de Stormoken) y sus síndromes asociados.

Tabla 37a. Resumen de los trastornos hereditarios de la función plaquetaria con características clínicas y de laboratorio

Desorden	Defecto genético	Recuento y morfología de plaquetas/otras características del PBS	LTA	Características adicionales del laboratorio	Características clínicas adicionales (+/- características sindrómicas)
Defectos de los receptores de glicoproteínas					
Tromboastenia de Glanzmann	ITGA2B, ITGB3	Normal	Ausencia de respuesta a todos los agonistas, excepto la aglutinación a la ristocetina	La citometría de flujo identifica la deficiencia de GPIIb/GPIIIa	Hemorragia autosómica recesiva grave
Trombocitopenia relacionada con ITGA2B/ITGB3	ITGA2B, ITGB3	Macrotrombocitopenia con anisocitosis	Respuesta ausente/deficiente a todos los agonistas excepto la aglutinación a la ristocetina	Reducción de la expresión de GPIIb/ GPIIIa Expresión defectuosa de PAC1	Sangrado autosómico dominante, de leve a moderado
Síndrome de Bernard Soulier	GP1BA, GP1BB, GP9	Macrothrombocytopaenia	Ausencia de respuesta aglutinante a la ristocetina	La citometría de flujo identifica la deficiencia de GP1b-IX-V	Hemorragia autosómica recesiva, moderada/grave
DiGeorge/ Síndrome velocardiofacial/ Síndrome de delección 22q11.2	Del22q11.2	Recuentos de plaquetas normales/levemente reducidos con plaquetas grandes.	Agregación normal/variable (respuesta reducida a Ristocetina en ~30% de los casos)	Reducción de la expresión de GP1 b/IX/V por citometría de flujo	Paladar hendido, defectos cardíacos, facies anormal, discapacidades del desarrollo, inmunodeficiencia, sangrado leve a significativo
Tipo de plaquetas EVW	Mutación de ganancia de función en GP1BA	Macrotrombocitopenia, grupos de plaquetas	Aumento de la aglutinación con baja concentración de ristocetina	Reducción de multímeros de FVW de alto peso molecular (reducción de la actividad del FVW)	Sangrado autosómico dominante, de leve a moderado
Defectos de los receptores de colágeno	GP6 ND	Normal	Respuesta aislada de agregación reducida al colágeno	Deficiencia de GPVI o $\alpha 2\beta 1$ por citometría de flujo	Sangrado autosómico recesivo, leve

Tabla 37b. Resumen de los trastornos hereditarios de la función plaquetaria con características clínicas y de laboratorio

Desorden	Defecto genético	Recuento y morfología de plaquetas/otras características del PBS	LTA	Características adicionales del laboratorio	Características clínicas adicionales (+/- características sindrómicas)
Anomalías de los receptores acoplados a proteínas G					
Defecto del receptor TXA2 (TP)	TBXA2R	Normal	Agregación anormal con análogos AA y TXA2 (U46619)		Diátesis hemorrágica autosómica recesiva leve
Defecto del receptor ADP (P2Y12)	P2Y12	Normal	Respuesta de agregación marcadamente alterada a ADP (solo onda primaria); También se puede observar una respuesta reducida con otros agonistas	Disminución de la expresión de marcadores de activación en la estimulación de agonistas por ADP	Hemorragia autosómica recesiva, leve después de un traumatismo/ cirugía
Defectos de los gránulos de plaquetas (aislados/sindrómicos)					
Defectos de los gránulos alfa					
Síndrome de las plaquetas grises	NBEAL2	Macrotrombocitopenia; plaquetas grandes con citoplasma gris azulado y ausencia de gránulos azurófilos	Anomalías variables y leves; puede ser normal	Expresión de P-selectina disminuida/ ausente por citometría de flujo/ ELISA	Autosómico recesivo, sangrado leve, mielofibrosis progresiva con esplenomegalia
Síndrome de artrogriposis, disfunción renal y colestasis (ARC)	VPS33B, VIPAS39	Plaquetas grises grandes	Anomalías variables y leves; puede ser normal	La P-selectina EM está reducida en algunos y es normal en otros	Contracturas en flexión, hipotonía, ictericia colestásica, acidosis tubular renal, retraso del crecimiento, ictiosis, infección, diátesis hemorrágica leve
Síndrome de París-Trousseau/ Jacobsen	Del11q23 incluyendo FL1	Plaquetas grandes, pocas con gránulos A fusionados	variable	Gigante fusionó un gránulo en EM, dismegacariopoi-esis	Diátesis hemorrágica leve, retraso en el desarrollo, defectos cardíacos, anomalías craneofaciales

Tabla 37c. Resumen de los trastornos hereditarios de la función plaquetaria con características clínicas y de laboratorio

Desorden	Defecto genético	Recuento y morfología de plaquetas/otras características del PBS	LTA	Características adicionales del laboratorio	Características clínicas adicionales (+/- características sindrómicas)
Defectos de gránulos densos					
Deficiencia aislada de gránulos densos/6 deficiencias del almacenamiento combinado		Normal	Variable. Puede disminuirse a varios agonistas: ADP, colágeno y epinefrina, o normal	Disminución de la liberación de ATP por lumi-aggregometría Reducción de la ADP plaquetaria y aumento de la relación ATP/ADP	
Síndrome de Hermansky-Pudlak	HPS1, AP3B1 (HPS2), HPS3, HPS4, HPS5, HPS6, DNTBP1 (HPS7), BLOC1 83 (HPS8) y BLOC1S6 (HPS9)	Normal	Variable	Gránulos densos reducidos/ausentes por TEM de montaje completo Reducción de CD63 y disminución de la captación y liberación de mepacrina por citometría de flujo	Albinismo oculocutáneo, inmunodeficiencia, diátesis hemorrágica leve, fibrosis pulmonar, colitis granulomatosa y neutropenia.
Trombocitopenia relacionada con SLFN14	SLFN14	Macrotrombocitopenia	Variable		
Síndrome de Chediak-Higashi	LYST	Giant peroxidase positive cytoplasmic granules in leucocytes; lymphohistiocytosis	Variable		Albinismo oculocutáneo variable, infecciones recurrentes potencialmente mortales, diátesis hemorrágica leve
Trastornos combinados de α-gránulos/δ-gránulos	ND	Pale grey platelets by light microscopy	Variable	Ausencia o reducción de gránulos α y δ - en TEM, y otras características como se observa en los trastornos de gránulos alfa y densos	Diátesis hemorrágica leve a moderada
Defecto de secreción de gránulos o defecto de secreción primaria	ND	Normal	Variable	Disminución de la liberación de ATP por lumi-aggregometría, absorción normal de mepacrina con liberación reducida de mepacrina por citometría de flujo Reducción de la expresión de CD63 por citometría de flujo; alfa normal y gránulos densos por EM	Diátesis hemorrágica leve a moderada.

Tabla 37d. Resumen de los trastornos hereditarios de la función plaquetaria con características clínicas y de laboratorio

Desorden	Defecto genético	Recuento y morfología de plaquetas/otras características del PBS	LTA	Características adicionales del laboratorio	Características clínicas adicionales (+/- características sindrómicas)
Defectos de los factores de transcripción					
Trastornos plaquetarios familiares con neoplasia mieloide maligna asociada (FPD/LMA)	RUNX1	Trombocitopenia	Agregación anormal a múltiples agonistas	Defecto de secreción de δ gránulos	Predisposición a desarrollar MDS y AML
Defecto de δ gránulos relacionado con FLI1	FLI1	Trombocitopenia	Reducción de la agregación a colágeno y TRAP	Defecto de secreción de δ gránulos	
GATA1 - defecto	GATA1	Macrotrombocitopenia	Reducción de la agregación a colágeno y ristocetina	Reducción del contenido y liberación de gránulos A	
Defecto relacionado con GFI1 B	GFI1B	Macrotrombocitopenia, diseritropoyesis	Normal	Liberación reducida de gránulos A	Autosómico dominante
Defectos de proteínas de transducción de señales					
Defecto de la fosfolipasa A2 citosólica / Deficiencia de ciclooxigenasa / Deficiencia de TXA2 sintasa	PLA2G4A/ND/TBXAS1	Normal	Ausencia de respuesta con AA y respuesta normal con TXA ₂		
Defecto de CalDAG-GEFI	RASGRP2	Normal	Respuesta marcadamente reducida/ausente a ADP, epinefrina, respuesta reducida/normal al colágeno, TRAP y ristocetina	Expresión normal de GPIIb/GPIIIa Expresión defectuosa de PAC1	Hemorragia autosómica recesiva grave
Deficiencia de adherencia leucocitaria	FERMT3	Leucocitosis	Patrón similar a GT	Expresión normal de GPIIb/GPIIIa Expresión defectuosa de PAC1	Autosómico recesivo, infección bacteriana grave, mala cicatrización de heridas, sangrado intenso

Tabla 37e. Resumen de los trastornos hereditarios de la función plaquetaria con características clínicas y de laboratorio

Desorden	Defecto genético	Recuento y morfología de plaquetas/otras características del PBS	LTA	Características adicionales del laboratorio	Características clínicas adicionales (+/- características sindrómicas)
Defectos de las proteínas del citoesqueleto					
Síndrome de Wiskott Aldrich (WAS) /trombocitopenia ligada al cromosoma X	ERA	Microtrombocitopenia		Disminución de los subconjuntos de células T y de la función de las células asesinas naturales, disminución de los gránulos α y δ por TEM	WAS: herencia ligada al cromosoma X; Eczemas, inmunodeficiencias, neoplasias malignas y autoinmunidad.
Enfermedad relacionada con MYH9 (anteriormente conocida como síndromes de Sebastian, May-Hegglin, Fechtner y Epstein)	MYH9	Inclusión de Macrothrombocitopenia, tipo Dohle en neutrófilos	Normal		Autosómico dominante; Asociación variable con hipoaacusia neurosensorial, cataratas y nefritis
Defecto de ADAP	FYB	Microthrombocytopenia		Aumento de la expresión de P-selectina y PAL-1, pero alteración de la expresión tras la activación	
Defectos de los fosfolípidos de membrana					
Síndrome de Scott	TMEM16F	Normal	Normal	Reducción de la fijación de anexina por citometría de flujo	Autosómico recesivo
Síndrome de Stormorken	STIM1, ORAI1	Anemia Howell Cuerpos alegres	Normal	Unión mejorada a la anexina V y expresión defectuosa de PAL-1	Dismorfia faical, ictifosis, miopatía
Aumento de la actividad fibrinolítica plaquetaria					
Trastorno plaquetario de Quebec	PLAU (duplicación)	Trombocitopenia variable	Respuesta anormal con epinefrina	Exceso de activador de uroquinasa del plasminógeno plaquetario causante de proteólisis de proteínas α -granuladas y fibrinólisis	Sangrado autosómico dominante, de aparición tardía después de una cirugía/ traumatismo, que no responde a los antifibrinolíticos, pero sí a los antifibrinolíticos

Referencias

- Bolton-Maggs PH, Chalmers EA, Collins PW, Harrison P, Kitchen S, Liesner RJ et al. Una revisión de los trastornos plaquetarios hereditarios con pautas para su manejo en nombre de la UKHCDO. *Br J Haematol* 2006; 135(5): 603-633.
- Bourguignon A, Tasneem S, Hayward CP. Detección y diagnóstico de trastornos plaquetarios hereditarios. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2022; 59(6): 405-444.
- Grupo de Trabajo de Hemostasia y Trombosis de la Sociedad Británica de Hematología. Directrices sobre las pruebas de función plaquetaria. *J Clin Pathol* 1988; 41(12): 1322-1330.
- Cai H, Mullier F, Frotscher B, Briquel ME, Toussaint M, Massin F, Lecompte T, Latger-Cannard V. Utilidad de la captación/liberación de mepacrina por citometría de flujo combinada con el ensayo CD63 en el diagnóstico de pacientes con sospecha de trastorno de gránulos densos plaquetarios. *Semin Thromb Hemost* 2016; 42(3): 282-291.
- Cattaneo M, Cerletti C, Harrison P, Hayward CP, Kenny D, Nugent D et al. Recomendaciones para la estandarización de la agregometría de transmisión de luz: Un consenso del grupo de trabajo del subcomité de fisiología plaquetaria de SSC/ISTH. *J Thromb Haemost* 2013; 11 (6): 1183-1189.
- Cattaneo M, Hayward CP, Moffat KA, Pugliano MT, Liu Y, Michelson AD. Resultados de una encuesta mundial sobre la evaluación de la función plaquetaria mediante agregometría de transmisión de luz: un informe del subcomité de fisiología plaquetaria del SSC de la ISTH. *J Thromb Haemost* 2009; 7(6): 1029.
- Cattaneo M, Lecchi A, Zighetti ML, Lussana F. Estudios de agregación plaquetaria: el plasma autólogo pobre en plaquetas inhibe la agregación plaquetaria cuando se agrega al plasma rico en plaquetas para normalizar el recuento de plaquetas. *Haematologica* 2007; 92(5): 694-697.
- Chanarin I (ed). *Hematología de laboratorio: una descripción de las técnicas de laboratorio*. Edimburgo: Churchill Livingstone; Año 1989.
- Dave RG, Geevar T, Chellaiya GK, Mammen JJ, Vijayan R, Samuel A, Gown M, Nair SC. Estabilidad y utilidad de las pruebas de activación plaquetaria por citometría de flujo: una modalidad para cerrar la brecha entre la demanda y la oferta de diagnóstico. *Plaquetas* 2022; 33(7): 1043-1051.
- Franchini M, Montagnana M, Lippi G. Aspectos clínicos, de laboratorio y terapéuticos de la enfermedad de von Willebrand tipo plaqueta. *Int J Lab Hematol* 2008; 30(2): 91-94.
- Frontroth JP, Favalaro EJ. Estudios de agregación plaquetaria inducida por ristocetina (RIPA) y mezcla RIPA. *Métodos Mol Biol* 2017; 1646: 473-494.
- Gomez K, Anderson J, Baker P, Biss T, Jennings I, Lowe G, Platton S. Diagnóstico clínico y de laboratorio de los trastornos plaquetarios hereditarios en adultos y niños: una guía de la Sociedad Británica de Hematología. *Br J Haematol* 2021; 195(1): 46-72.
- Gresele P. Diagnóstico de los trastornos hereditarios de la función plaquetaria: orientación del SSC de la ISTH. *J Thromb Haemost* 2015; 13(2): 314-322.
- Gresele P, Bury L, Mezzasoma AM, Falcinelli E. Ensayos de función plaquetaria en el diagnóstico: una actualización. *Expert Rev Hematol* 2019; 12(1): 29-46.
- Gresele P, Falcinelli E, Bury L. Diagnóstico de laboratorio de trastornos de la función plaquetaria clínicamente relevantes. *Int J Lab Hematol* 2018; 40 Suppl 1:34-45.
- Jennings I, Woods TA, Kitchen S, Walker ID. Pruebas de función plaquetaria: práctica entre los participantes del Plan Nacional de Evaluación de Calidad Externa del Reino Unido para la Coagulación de la Sangre, 2006. *J Clin Pathol* 2008; 61(8): 950-954.
- Le Blanc J, Mullier F, Vayne C, Lordkipanidze M. Avances en las pruebas de función plaquetaria: agregometría de transmisión de luz y más allá. *J Clin Med* 2020; 9(8): 2636.
- Linnemann B, Sch won berg J, Mani H, Prochnow S, Lindhoff-Last E. Estandarización de la agregometría de transmisión luminosa para el seguimiento de la terapia antiplaquetaria: no es necesario un ajuste para el recuento de plaquetas. *J Thromb Haemost* 2008; 6(4): 677-683.
- Rand ML, Reddy EC, Israels SJ. Diagnóstico de laboratorio de los trastornos hereditarios de la función plaquetaria. *Transferencias Apher Sci* 2018; 57(4): 485-493.
- van Asten I, Schutgens REG, Baaij M, Zandstra J, Roest M, Pasterkamp G, Huisman A, Korporaal SJA, Urbanus RT. Validación del análisis de citometría de flujo de la función plaquetaria en pacientes con sospecha de defecto de la función plaquetaria. *J Thromb Haemost* 2018; 16(4): 689-698.

PARTE 11 Investigación de laboratorio del síndrome de anticuerpos antifosfolípidos (SAF)

Silmara Montalvão

TEMAS TRATADOS

- ✓ Clasificación y criterios diagnósticos para SAF
- ✓ Anticuerpos antifosfolípidos
- ✓ Anticoagulante lúpico

Un grupo heterogéneo de anticuerpos que pueden causar prolongación de la prueba de TTPA son los anticuerpos antifosfolípidos, que generalmente reaccionan con epítomos en proteínas que están conjugadas con fosfolípidos cargados negativamente. Muchos de estos anticuerpos requieren beta-2-glicoproteína 1, una proteína que se une a los fosfolípidos. Otros pueden dirigirse contra la protrombina. La identificación adecuada de estos anticuerpos permitirá caracterizar el síndrome de anticuerpos antifosfolípidos (SAF) (Ruiz-Irastorza et al, 2010; Schreiber et al, 2018). Es importante tener en cuenta que estos anticuerpos pueden interferir en las reacciones de coagulación en el laboratorio, prolongando las pruebas dependientes de fosfolípidos como el TTAP y, en ocasiones, el TP, pero no se asocian a sangrado, salvo en algunos casos raros en los que hay una importante deficiencia de protrombina adquirida. Paradójicamente, estos anticuerpos están claramente asociados a la trombosis venosa y arterial por mecanismos poco conocidos. En los centros de diagnóstico de trastornos hemorrágicos es necesario poder detectar estos anticuerpos mediante pruebas específicas para la investigación de pacientes con TTPA prolongado (Barbosa et al, 2019). En la actualidad existen guías específicas para la correcta realización de las pruebas utilizadas para el diagnóstico de laboratorio del SAF que pueden utilizarse para actualizar la información de laboratorio, véase más abajo.

- Devreese, K.M.J.; de Groot, P.G.; de Laat, B.; Erkan, D.; Favaloro, E.J.; Mackie, I.; Martinuzzo, M.; Ortel, T.L.; Pengo, V.; Rand, J.H.; et al. Guía del Comité Científico y de Normalización para los anticuerpos anticoagulantes/antifosfolípidos del lupus de la Sociedad Internacional de Trombosis y Hemostasia: Actualización de las guías para la detección e interpretación de anticoagulantes lúpicos. *J. Trombo. Hemosta.* 2020; 18, 2828-2839.
- Devreese KM, Pierangeli SS, de Laat B, Tripodi A, Atsumi T, Ortel TL; Subcomité de Anticoagulantes/Fosfolípidos/Anticuerpos Dependientes del Lupus. Pruebas de anticuerpos antifosfolípidos con ensayos en fase sólida: orientación del SSC del ISTH. *J Hemosta de trombo.* 2014; 12(5): 792-795.
- Vandeveldel A, Gris JC, Moore GW, Musial J, Zuily S, Wahl D, Devreese KMJ. Hacia una interpretación armonizada de la detección de anticuerpos anticardiolipina y anti-P2-glicoproteína I para el diagnóstico del síndrome antifosfolípido utilizando intervalos de nivel definidos y cocientes de probabilidad: comunicación del Subcomité de Anticoagulantes/Antifosfolípidos Lúpicos del ISTH SSC. *J Hemosta de trombo.* 2024: S1538-7836(24)00236-8.

Clasificación y criterios diagnósticos para el SAF: Dado que se hizo evidente que los anticuerpos antifosfolípidos se asociaban significativamente con la trombosis vascular y la morbilidad del embarazo, la necesidad de criterios de consenso para el SAF dio lugar a los criterios de Sydney. Tabla 38 (Miyakis et al, 2006). Los pacientes se clasifican como portadores de SAF cuando se produce un evento clínico junto con al menos un criterio de laboratorio positivo. Los criterios de laboratorio para definir el SAF son la presencia de anticoagulante lúpico, aCL IgG/IgM o a2GPI IgG/IgM, presente de forma persistente durante al menos 12 semanas. Actualmente, se está llevando a cabo una novedosa iniciativa internacional para

desarrollar nuevos criterios de clasificación de SAF. Los criterios de laboratorio propuestos incluyen solo los anticuerpos de los criterios actuales (anticoagulante lúpico, aCL IgG/IgM y a2GPI IgG/IgM).

Tabla 38. Criterios de Sydney 2006 para clasificar el SAF

Criterios clínicos	Criterios de laboratorio
1. Trombosis vascular	1. Anticoagulante lúpico
Venoso, arterial o microvascular;	>2 resultados positivos
Confirmado por criterios objetivos validados;	Con al menos 12 semanas de diferencia
No hay evidencia de inflamación en la pared de los vasos	
Y/o	
2. Morbilidad del embarazo	2. Anticuerpo anticardiolipina IgG y/o IgM
>1 muerte fetal inexplicable _10th semana de gestación o;	Suero y plasma
>1 parto prematuro <semana 34 de gestación debido a: Eclampsia o preeclampsia severa, insuficiencia placentaria;	Título medio o alto (>40 GPL o MPL, o >percentil 99).
>3 abortos consecutivos inexplicables <10a semana de gestación.	Medido por ELISA estandarizado
	>2 resultados positivos
	Con al menos 12 semanas de diferencia
Y/o	
	3. Anticuerpo antiβ2-glicoproteína I IgG y/o IgM
	Suero y plasma
	Título medio o alto (>40 GPL o MPL, o >percentil 99).
	Medido por ELISA estandarizado
	>2 resultados positivos
	Con al menos 12 semanas de diferencia

Anticoagulante para el lupus

¿Cómo elegir la prueba? El anticoagulante lúpico se puede detectar mediante diferentes pruebas de coagulación dependientes de fosfolípidos. La actualización más reciente de las guías de la ISTH sobre la detección de anticoagulantes lúpicos recomienda el uso de dos pruebas en paralelo, el tiempo de veneno de víbora de Russell diluido (dRWT) y el TTPA (Devreese et al, 2020). El dRWT es más específico, mientras que el TTPA es más sensible para el anticoagulante lúpico (dependiendo en gran medida del reactivo utilizado). Los dos ensayos son complementarios porque los anticuerpos no siempre reaccionan en ambos ensayos. El ensayo dRWT se basa en la activación directa de FX por una enzima presente en el veneno de las víboras de Russell. El ensayo TTPA se basa en la activación de la vía de contacto (intrínseca) de la cascada de coagulación. La selección de los reactivos adecuados para las pruebas de anticoagulación lúpica es importante, ya que hay varios reactivos disponibles, especialmente para el TTAP (Favaloro et al, 2019). Es necesario abordar dos temas en la selección del reactivo TTPA, la elección del agente activador y la composición y concentración de fosfolípidos. Como alternativa al TTPA, la prueba de tiempo de coagulación de sílice (SCT) se puede utilizar para las pruebas de anticoagulantes lúpicos. El desempeño de los ensayos de anticoagulantes lúpicos debe ser validado o verificado antes de su implementación en la práctica clínica. Parte del proceso de verificación debe incluir el análisis de muestras con anticoagulante de lupus conocido y valores medios bien caracterizados (Gardiner et al, 2021a; Gardiner et al, 2021b).

¿Cómo se realiza la prueba? La evaluación de los anticoagulantes lúpicos consta de un procedimiento de tres pasos: cribado, mezcla y confirmación (Devreese et al, 2020). La PPP es necesaria para evitar

resultados falsos negativos debido a la interacción de fosfolípidos y plaquetas. La etapa de cribado incluye pruebas con reactivos dRWT y TTPA a bajas concentraciones de fosfolípidos. La deficiencia de factores de coagulación o inhibidores distintos del anticoagulante lúpico pueden dar positivo en la prueba de detección, por lo que es necesario mezclar y realizar una prueba de confirmación. El procedimiento escalonado puede reducir costes, ya que evita realizar innecesariamente la etapa de mezcla y confirmación si la etapa de cribado es negativa. En la etapa de confirmación, un exceso de fosfolípidos aniónico añadido al reactivo de prueba y el exceso de fosfolípidos pueden reducir o neutralizar los anticuerpos. En las pruebas de dRWT, los ensayos de cribado y confirmación se llevan a cabo en paralelo, y el resultado de la etapa de confirmación se expresa como una relación normalizada según el cálculo: $[(\text{resultado del cribado del paciente}) / (\text{resultado del cribado del grupo})] / [(\text{resultado de confirmación del paciente}) / (\text{resultado de confirmación del grupo})]$. En la etapa de mezcla, la prueba de cribado se realiza en una mezcla de plasma del paciente 1:1 y grupo de plasma normal. La prueba de mezcla se expresa como la relación normalizada $[(\text{mezcla de cribado}) / (\text{cribado de plasma normal combinado})]$. Cuando se prolonga el tiempo de coagulación en el ensayo de confirmación, se puede realizar un paso de mezcla adicional con los reactivos de confirmación (mezcla de confirmación), y la proporción es más robusta y menos afectada por la interferencia de deficiencias congénitas o adquiridas de factores. Existen ensayos integrados que llevan a cabo las tres etapas en un solo procedimiento. En estos ensayos, las pruebas de cribado y confirmatorias se realizan en paralelo en el plasma del paciente mezclado con PNP y los resultados se expresan principalmente como la diferencia entre las dos pruebas.

Valores de corte: Para interpretar los resultados de los anticoagulantes lúpicos, es necesario determinar valores de corte para definir la positividad en todos los estadios. En primer lugar, los laboratorios deben determinar los valores de corte utilizando una población de individuos sanos con al menos 120 personas, determinando el punto de corte como el percentil 99 después de rechazar los valores atípicos (Devreese et al, 2020). Sin embargo, el número de 120 individuos normales para calcular los valores de corte puede ser difícil de obtener para muchos laboratorios. Un enfoque que requiere menos voluntarios es la transferencia de los valores de corte recomendados por el fabricante. Esto supone que los puntos de corte de fabricación se basan en una gran población de referencia sana con datos demográficos adecuados, un método estadístico correcto y una combinación correcta de reactivo e instrumento (Castellone, 2017). Cuando se cumplen estas condiciones, los valores de corte del fabricante deben verificarse antes de la transferencia mediante la prueba de 20 voluntarios sanos que representen la demografía de la población local. Después de rechazar los valores atípicos y reemplazarlos con nuevos resultados de voluntarios sanos, los resultados (población libre de valores atípicos) deben compararse con el valor de corte sugerido.

Interferencias y limitaciones: La proteína C reactiva interfiere in vitro con la prueba de TTPA a través de su afinidad por los fosfolípidos, lo que conduce a resultados falsos positivos. Aunque este efecto no se ha observado para el ensayo dRWT, puede variar entre los reactivos. Además, el aumento de la actividad coagulante del FVIII se relaciona con un TTAP más corto que da resultados falsos negativos. Los niveles elevados de FVIII se pueden observar durante el embarazo, la cirugía, la inflamación, la malignidad y otras afecciones. No se recomiendan las pruebas de anticoagulación lúpica durante el evento trombotico o durante el tratamiento anticoagulante (Devreese et al, 2020). Las guías más recientes de la ISTH no aconsejan la dilución previa de las muestras para las pruebas de anticoagulación del lupus en presencia de AVK (Devreese et al, 2020). Los ACOD inhiben directamente la trombina (p. ej., dabigatrán) o el FXa (p. ej., apixabán, betrixabán, edoxabán y rivaroxabán), con diversos efectos sobre las pruebas de coagulación, lo que lleva a la interpretación de resultados falsos negativos y falsos positivos. El TTAP y el TP deben realizarse antes de iniciar la prueba de anticoagulación lúpica para tener más información sobre la muestra, pero esto no excluye la presencia de ACOD o HBPM.

Anticuerpos antifosfolípidos:

¿Cómo elijo la prueba? Los anticuerpos anticardiolipina y anti-beta-2-glicoproteína¹ se identifican mediante inmunoensayos en fase sólida. Los criterios de clasificación del SAF indican la medición de estos anticuerpos mediante ELISA estandarizado. Sin embargo, se han puesto a disposición técnicas de detección

alternativas para las pruebas de anticuerpos, como la quimioluminiscencia, la enzima de fluorescencia y los inmunoensayos de flujo múltiple (Devreese et al, 2014). En comparación con los métodos manuales tradicionales de ELISA, las técnicas más nuevas son más fáciles de usar y muestran una mejor precisión. Los ensayos difieren en cuanto a la fase sólida, el principio de detección, el recubrimiento, la fuente de antígenos y anticuerpos, los agentes bloqueantes para evitar la fijación inespecífica, el protocolo de dilución, la calibración y las unidades (Devreese et al, 2014). Se recomienda realizar las pruebas de seguimiento del paciente en el mismo laboratorio, ya que las plataformas no se pueden utilizar indistintamente.

¿Cómo realizar la prueba? El suero o PPP se pueden utilizar para las pruebas de aCL y a2GPI (Devreese et al, 2018). La necesidad de realizar la prueba por duplicado depende de las características de rendimiento del ensayo. Las pruebas duplicadas se recomiendan especialmente para los ELISA manuales o si la imprecisión entre y durante la corrida del ensayo es del >10% (Devreese et al, 2014). En cada tirada, el material de control de calidad interno debe analizarse a los niveles de título relevantes. Las curvas de calibración deben determinarse en cada corrida de ELISA o para cada lote de reactivos en sistemas automatizados. Cada calibración debe evaluarse y rechazarse cuando no cumple con los requisitos del fabricante o cuando el coeficiente de correlación entre los valores de prueba y los valores objetivo es inferior a 0,90 (Devreese et al, 2014). Desafortunadamente, no hay uniformidad en el material de referencia para la calibración de pruebas. Se están realizando esfuerzos para desarrollar nuevos estándares monoclonales y policlonales para aCL y a2GPI con el objetivo de crear estándares de la OMS con UI/ml como unidad universal.

Valores de corte y perfil de anticuerpos: Los 40 GPL/M μ L como punto de corte de aCL se basaron en estudios que mostraron una mejor correlación de este punto con el SAF (Levine et al, 1997). Sin embargo, puede haber una marcada diferencia entre 40 GPL/M μ L y el percentil 99 para aCL (Vandeveldt et al, 2024). Y el ISTH-SSC no recomienda usar 40 GPL/M μ L como punto de corte. Se recomienda calcular un valor de corte específico del laboratorio para la positividad basado en un percentil 99 no paramétrico de al menos 120 sujetos de referencia. Se recomienda el rechazo de valores atípicos con el método de Dixon/Reed para evitar la sobreestimación de los valores de corte. La transferencia de los puntos de corte del fabricante después de la verificación en 20 o más sujetos de referencia es una alternativa válida si el punto de corte del fabricante se calcula sobre una población de referencia suficientemente grande y se ha aplicado una metodología estadística adecuada. Cada resultado de aCL y a2GPI por encima del punto de corte debe notificarse como positivo, acompañado del valor numérico y del valor de corte interno (Vandeveldt et al, 2024). La positividad en una de las pruebas (anticoagulante lúpico, aCL IgG, aCL IgM, a2GPI IgG o a2GPI IgM) es suficiente para diagnosticar el SAF. Se ha sugerido la interpretación combinada de diferentes μ L como perfiles de anticuerpos para identificar a los pacientes de alto riesgo, en comparación con la evaluación individual. En los portadores asintomáticos de μ L, la doble y triple positividad fue un factor de riesgo para el desarrollo de eventos trombóticos, pero la positividad única de aCL o a2GPI no lo fue (Mustonen et al, 2014).

Interferencias: La presencia de factor reumatoide puede causar resultados falsos positivos de aCL IgM y a2GPI IgM (Devreese et al, 2014; Forastiero et al, 2014). A diferencia de los ensayos de anticoagulantes lúpicos, las pruebas de anticuerpos con inmunoensayos de fase sólida no están sujetas a la interferencia analítica de los reactivos del reactor de fase aguda ni a la terapia anticoagulante. Sin embargo, se observa un aumento transitorio de aCL y a2GPI en condiciones inflamatorias (Exner et al, 2020; Laureano y Crowthe, 2018).

Referencias

Barbosa ACN, Montalva SAL, Barbosa KGN, Colella MP, Annichino-Bizzacchi JM, Ozelo MC, De Paula EV. TTPA prolongada de etiología desconocida: una evaluación sistemática de las causas y el uso de recursos de laboratorio en una unidad académica de hemostasia ambulatoria. *Res Pract Thromb Haemost* 2019; 3(4): 749-757.

Castellone DD. Establecimiento de intervalos de referencia en el laboratorio de coagulación. *Int J Lab Hematol* 2017; 39 Suppl 1: 121-127.

Devreese KMJ, de Groot PG, de Laat B, Erkan D, Favaloro EJ, Mackie I et al. Guía del Comité Científico y de Normalización para anticuerpos anticoagulantes/antifosfolípidos contra el lupus de la Sociedad Internacional de Trombosis y Hemostasia: Actualización de las guías para la detección e interpretación de anticoagulantes lúpicos. *J Thromb Haemost* 2020; 18(11): 2828-2839.

Devreese KMJ, Ortel TL, Pengo V, de Laat B. Criterios de laboratorio para el síndrome antifosfolípido: Comunicación del SSC del ISTH. *J Thromb Haemost* 2018; 16(4): 809-813.

Devreese KM, Pierangeli SS, de Laat B, Tripodi A, Atsumi T, Ortel TL. Pruebas de anticuerpos antifosfolípidos con ensayos en fase sólida: Guía del SSC de la ISTH. *J Thromb Haemost* 2014; 12(5): 792-795.

Exner T, Rigano J, Favaloro EJ. El efecto de los ACOD en las pruebas de laboratorio y su eliminación por carbón activado para limitar la interferencia en los ensayos funcionales. *Int J Lab Hematol* 2020; 42 Suppl 1: 41-48.

Favaloro EJ, Kershaw G, Mohammed S, Lippi G. Cómo optimizar las pruebas de tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPA): soluciones para establecer y verificar intervalos de referencia normales y evaluar la sensibilidad de los reactivos de TTPA a la heparina, el anticoagulante lúpico y los factores de coagulación. *Semin Thromb Hemost* 2019; 45(1): 22-35.

Forastiero R, Papalardo E, Watkins M, Nguyen H, Quirbach C, Jaskal K et al. Evaluación de diferentes inmunoensayos para la detección de anticuerpos antifosfolípidos: Informe de un taller húmedo durante el 13° Congreso Internacional de Anticuerpos Antifosfolípidos. *Clin Chim Acta* 2014; 428: 99-105.

Gardiner C, Coleman R, de Maat MPM, Dorgalaleh A, Echenagucia M, Gosselin RC, Ieko M, Kitchen S. Guía de laboratorio del Consejo Internacional de Normalización en Hematología (ICSH) para la evaluación de los sistemas de prueba de analizadores y reactivos de hemostasia. Parte 1: Problemas específicos del instrumento y pruebas de detección de coagulación de uso común. *Int J Lab Hematol* 2021; 43(2): 169-183.

Gardiner C, Coleman R, de Maat MPM, Dorgalaleh A, Echenagucia M, Gosselin RC, Ieko M, Kitchen S. Guía de laboratorio del Consejo Internacional de Normalización en Hematología (ICSH) para la verificación de los sistemas de prueba de analizadores y reactivos de hemostasia. Parte 2: Pruebas especializadas y ensayos calibrados. *Int J Lab Hematol* 2021; 43(5): 907-916.

Harris EN, Gharavi AE, Patel SP, Hughes GR. Evaluación de la prueba de anticuerpos anti-cardiolipina: Informe de un taller internacional celebrado el 4 de abril de 1986. *Clin Exp Immunol* 1987; 68(1): 215-222.

Laureano M, Crowther MA. Aps de mayor riesgo: ¿Nos atrevemos a hacer DOAC? *Sangre* 2018; 132(13): 1357-1358.

Levine SR, Salowich-Palm L, Sawaya KL, Perry M, Spencer HJ, Winkler HJ, Alam Z, Carey JL. Título de anticuerpos IgG anticardiolipina > 40 G μ L y el riesgo de eventos trombo-occlusivos posteriores y muerte. Un estudio de cohorte prospectivo. *Accidente cerebrovascular* 1997; 28(9): 1660-1665.

Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, Branch DW, Brey RL, Cervera R et al. Declaración de consenso internacional sobre una actualización de los criterios de clasificación para el síndrome antifosfolípido definitivo (SAF). *J Thromb Haemost* 2006; 4(2): 295-306.

Mustonen P, Lehtonen KV, Javela K, Puurunen M. Anticuerpo antifosfolípido persistente (aPL) en portadores asintomáticos como factor de riesgo para futuros eventos trombóticos: un estudio prospectivo a nivel nacional. *Lupus* 2014; 23(14): 1468-1476.

Ruiz-Irastorza G, Crowther M, Branch W, Khamashta MA. Síndrome antifosfolípido. *Lancet* 2010; 376(9751): 1498-1509.

Schreiber K, Sciascia S, de Groot PG, Devreese K, Jacobsen S, Ruiz-Irastorza G, Salmon JE, Shoenfeld Y, Shovman O, Hunt BJ. Síndrome antifosfolípido. *Nat Rev Dis Primers* 2018; 4: 17103.

Vandeveldt A, Gris JC, Moore GW, Musial J, Zully S, Wahl D, Devreese KMJ. Hacia una interpretación armonizada de la detección de anticuerpos anticardiolipina y anti- β 2-glicoproteína I para el diagnóstico del síndrome antifosfolípido utilizando intervalos de nivel definidos y cocientes de probabilidad: Comunicación del Subcomité de Anticoagulantes Lúpicos/Anticuerpos Antifosfolípidos del I STH SSC. *J Thromb Haemost* 2024; 22(8): 2345-2362.

TEMAS TRATADOS

- ✓ Tiempo de lisis de coágulos de plasma inducido por tPA
- ✓ Ensayo de generación de plasmina

La fibrinólisis es una serie de reacciones enzimáticas que degradan la fibrina insoluble y depende de la cantidad y calidad de diversas enzimas fibrinolíticas, como el activador del plasminógeno de tipo tisular (tPA) y la plasmina, sus respectivos inhibidores, el inhibidor activador del plasminógeno tipo 1 (PAI-1) y el alfa-2-antiplasmina (a2AP), así como de la estructura del coágulo (Longstaff y Kolev, 2015). En un entorno clínico, el aumento de la tasa de fibrinólisis se utiliza para revertir la oclusión trombótica (p. ej., tPA recombinante para el tratamiento agudo del accidente cerebrovascular, el infarto de miocardio o la embolia pulmonar), mientras que la disminución de la tasa fibrinolítica se utiliza para reducir el sangrado (p. ej., ácido tranexámico para el tratamiento agudo del accidente cerebrovascular, el infarto de miocardio o la embolia pulmonar) (Draxler y Medcalf, 2015; Ilich et al, 2017; Kwaan et al, 2017). Recientemente, en hemofilia, se han utilizado ensayos que miden la formación de coágulos y la fibrinólisis para facilitar las comparaciones directas y funcionales entre agentes hemostáticos nuevos y emergentes que presentan diferentes mecanismos de acción (Hoile et al, 2024). Sin embargo, las pruebas globales para identificar el potencial fibrinolítico de un individuo no se implementan ampliamente. Por el contrario, la investigación básica de fibrinólisis se basa generalmente en la cuantificación de los diversos factores fibrinolíticos. Las concentraciones totales se miden mediante ensayos basados en antígenos y pruebas funcionales específicas para determinar su actividad. A pesar de la variedad de ensayos disponibles, sigue siendo un desafío asignar factores fibrinolíticos individuales que contribuyan al resultado fibrinolítico general debido a la naturaleza dinámica del entorno que rodea al coágulo (Longstaff, 2018). Durante décadas, los ensayos de lisis de coágulos controlados por turbidez se han utilizado como método estándar para cuantificar el potencial fibrinolítico general de una muestra, y se han desarrollado variaciones de este ensayo global y simplista para abordar las funciones de los factores fibrinolíticos. En este contexto, se han explorado dos ensayos en el contexto de la práctica clínica y muestran resultados prometedores para su uso en la evaluación del potencial fibrinolítico general.

Tiempo de lisis de coágulos de plasma inducido por tPA: Los tiempos de lisis de coágulos de plasma inducidos por activadores de plasminógeno se reportan con frecuencia para evaluar y cuantificar la propiedad fibrinolítica general de una muestra (Longstaff, 2018). Esta prueba se realiza mediante la adición simultánea de agonistas para iniciar la coagulación (p. ej., factor tisular y Ca^{2+}) y fibrinólisis (p. ej., tPA) al plasma citratado. Alternativamente, los coágulos pueden generarse primero y luego cubrirse con tPA para imitar el escenario clínico en el que se infunde tPA para degradar los trombos isquémicos existentes (Longstaff et al, 2011). La simplicidad del sistema de reacción y el mínimo procesamiento de muestras hacen de este ensayo un método ideal para investigar la susceptibilidad de los coágulos de plasma a la fibrinólisis (Hoile et al, 2024). La prueba también es sensible a las moléculas inhibitoras que se dirigen a factores específicos, como PAI-1 y a2AP, que pueden incluirse para inferir las funciones respectivas de PAI-1 y a2AP en la fibrinólisis general (Zheng et al, 2023).

Reactivos y método:

- Fosfolípidos [4 μM final]
- CaCl_2 [10 mM final]

- Factor tisular [dilución 1:15.000 de Innovin, factor tisular final 1 μ M]
 - Solución salina tamponada con HEPES (20 mM HEPES, pH7.4, 150 mM NaCl)
 - tPA (0,5 μ g/ml final)
- 1) En una placa de 96 pocillos con fondo en U, pipetee 10 μ l TF/PL/rtPA en cada pocillo (pipeteo inverso hasta el fondo del pocillo)
 - 2) Agregue 40 μ l de PPP en cada pocillo (pipeteo inverso al lado del pocillo en la parte superior)
 - 3) Precaliente la placa en la incubadora durante 5 min
 - 4) Después de 5 minutos de precalentamiento, use una pipeta multicanal para transferir 10 μ l Ca, mezcle bien y evite crear burbujas.
 - 5) Coloque rápidamente la placa en el lector de placas y comience a leer
 - 6) Controle la reacción durante 2 horas midiendo la turbidez a 405 nm cada 12 segundos con un lector de placas.

Ensayo de generación de plasmina: Los ensayos de generación de plasmina desarrollados por varios grupos comparten algunos elementos comunes (Longstaff, 2018; Zheng et al, 2023). En general, la actividad procoagulante en el ensayo de generación de plasmina se inicia mediante la adición de factor tisular exógeno al plasma recalcificado, y la actividad fibrinolítica se desencadena mediante la adición de tPA exógeno. La generación de plasmina se detecta a través de la escisión de un sustrato fluorogénico, y los parámetros se definen a partir de la acumulación de fluorescencia o mediante una derivada matemática de esta curva de fluorescencia. Las diferencias sutiles entre estos ensayos incluyen las concentraciones de factor tisular y tPA utilizadas y si se usa plasma diluido o no. Algunas variaciones de estos ensayos detectan la trombina y la plasmina simultáneamente, mientras que otras realizan estas mediciones por separado, pero en paralelo. Los estudios demuestran que estos ensayos son específicos para la plasmina y sensibles a la a2AP, y la actividad medida representa la plasmina libre. La generación de plasmina también es sensible al ácido tranexámico. Teniendo en cuenta las altas concentraciones de tPA necesarias para desencadenar la generación de plasmina medible, la prueba no es sensible a las concentraciones plasmáticas de PAI-1 (Miszta et al, 2021). Sin embargo, la respuesta de la generación de plasmina a la adición de tPA exógeno depende de la dosis. Un creciente cuerpo de trabajo sugiere que los ensayos de generación de plasmina, especialmente cuando se utilizan con ensayos de generación de trombina y turbidez, producen una impresión multidimensional de los efectos integrados de las actividades procoagulantes y fibrinolíticas en la salud y la enfermedad (Miszta et al, 2021; Zheng et al, 2023).

Reactivos y método:

- Solución salina tamponada (TBS) Tris, que contiene 66 mM de Tris y 130 mM de NaCl
 - 34 mM de CaCl_2
 - 10 μ M de factor tisular (factor tisular humano recombinante lipidado, Innovin, Siemens Healthcare, Erlangen, Alemania)
 - 900 ng/ml de tPA (activador tisular recombinante del plasminógeno de dos cadenas, Actylise, Boehringer Ingelheim, Biberach an der Riss, Alemania)
 - α -trombina (BOC-VAL-PrO-ARG-MCA, Peptides International, 5 mg)
 - Plasmina (BOC-GLU-LYS-LYS-MCA, Peptides International, 5 mg)
- 1) Prepare la solución reactiva con 34 mM de CaCl_2 , 10 μ M de factor tisular y 900 ng/ml de tPA en la solución de TBS. La concentración final de reactivos en plasma fue de 5 μ M TF y 450 ng/ml de tPA.
 - 2) Se prepararon dos sustratos con una concentración final de 100 μ M y se utilizaron para la detección de las enzimas: α -trombina y plasmina.
 - 3) Los dos primeros pocillos de la placa (Greiner, 96 pocillos, fondo plano, negro transparente) deben usarse como blanco, y las muestras se corrieron por duplicado en filas paralelas para cada sustrato, evitando posibles interferencias y/o interacciones en la detección de señales.

- 4) Añadir soluciones de sustrato (20 µl) a los pocillos de la placa, seguidas de 90 µl de las muestras y del blanco (solución TBS).
- 5) Con una pipeta automática multipunta, añade 90 µl de la solución de reacción precalentada (37 °C durante 3 min) a cada pocillo de la placa.
- 6) Finalmente, la placa debe leerse en la longitud de onda del fluorímetro de excitación de 340 nm y emisión de 450 nm durante 4 horas a intervalos de 45 segundos.
- 7) El análisis de datos se puede realizar utilizando el software Microsoft® Excel®. Las curvas para la trombina y la plasmina deben generarse calculando el promedio en cada punto de tiempo para los pocillos de plasma duplicados, restando los valores de lectura del blanco (para la trombina y la plasmina por separado). Parámetros que se calcularán en ambos ensayos, utilizando las herramientas de la aplicación Shiny: inicio (tiempo hasta el punto de inflexión antes del aumento de la turbidez), tasa máxima (pendiente de una línea ajustada a la tasa máxima de aumento de la turbidez utilizando 5 a 10 puntos para determinar la línea), tiempo hasta la meseta/pico (tiempo hasta la meseta de turbidez [formación de coágulos] o pico [fibrinólisis]), cambio de turbidez (turbidez máxima del coágulo menos la turbidez inicial), y área bajo la curva (ABC) (calculada como la suma de los trapecios formados por las curvas de turbidez).

Referencias

Draxler DF, Medcalf RL. El sistema fibrinolítico, ¿más que fibrinólisis? *Transfus Med Rev* 2015; 29(2): 102-109.

Hoile LA, Pantazis JC, Turecek PL, Wolberg AS. Los ensayos de formación de coágulos y fibrinólisis revelan diferencias funcionales entre los agentes hemostáticos en el plasma de la hemofilia A. *Res Pract Thromb haemost* 2024; 8(1): 102337.

Ilich A, Bokarev I, Key NS. Ensayos globales de fibrinólisis. *IntJ Lab Hematol* 2017; 39(5): 441-447.

Kwaan H, Lisman T, Medcalf RL. Fibrinólisis: Bioquímica, aspectos clínicos y potencial terapéutico. *Semin Thromb Hemost* 2017; 43(2): 113-114.

Longstaff C. Desarrollo de herramientas de aplicaciones Shiny para simplificar y estandarizar el análisis de los datos del ensayo de hemostasia: Comunicación del SSC de la ISTH. *J Thromb Haemost* 2017; 15(5): 1044-1046.

Longstaff C. Medición de la fibrinólisis: de la investigación a los ensayos de diagnóstico de rutina. *J Thromb Haemost* 2018; 16(4): 652-662.

Longstaff C, Kolev K. Mecanismos básicos y regulación de la fibrinólisis. *J Thromb Haemost* 2015; 13 Suppl 1: S98-105.

Longstaff C, Thelwell C, Williams SC, Silva MM, Szabo L, Kolev K. La interacción entre los dominios activadores tisulares del plasminógeno y las estructuras de fibrina en la regulación de la fibrinólisis: estudios cinéticos y microscópicos. *Sangre* 2011; 117(2): 661-668.

Miszta A, Huskens D, Donkervoort D, Roberts MJM, Wolberg AS, de La at B. Evaluación de la generación de plasmina en la salud y la enfermedad. *IntJ Mol Sci* 2021; 22(5): 1-17.

Zheng Z, Mukhametova L, Boffa MB, Moore EE, Wolberg AS, Urano T, Kim PY. Ensayos para cuantificar fibrinólisis: Fortalezas y limitaciones. Comunicación del Comité Científico y de Normalización de la Sociedad Internacional de Trombosis y Hemostasia sobre fibrinólisis. *J Thromb Haemost* 2023; 21(4): 1043-1054.

TEMAS TRATADOS

✓ Hemostasia del desarrollo

✓ Parámetros de coagulación en neonatos y niños versus adultos

El equilibrio hemostático pediátrico, que es diferente al de los adultos, es un proceso evolutivo a medida que el sistema hemostático cambia y madura de la vida fetal a la adulta, particularmente durante los primeros meses de vida. Comprender el concepto de hemostasia del desarrollo, que ahora es universalmente aceptado, es fundamental para garantizar un diagnóstico y tratamiento óptimos de las enfermedades hemorrágicas y trombóticas en los niños.

Hemostasia del desarrollo: La hemostasia es un mecanismo complejo que involucra factores procoagulantes y anticoagulantes. En última instancia, permite que la sangre permanezca líquida cuando circula en vasos intactos. También evita tanto el sangrado excesivo al promover la formación de coágulos después de una lesión endotelial como la coagulación excesiva al limitar la formación de coágulos al sitio de la lesión. El equilibrio hemostático depende principalmente de muchos parámetros, incluidas las plaquetas, así como los factores de coagulación y los inhibidores, aunque las células endoteliales y sanguíneas juegan un papel importante. Los niños no son solo adultos en miniatura, al menos para la hemostasia, ya que el equilibrio hemostático pediátrico es diferente al de los adultos. Además, se trata de un proceso evolutivo, como muestran Andrew M. et al (1987), hace más de 30 años, tanto en prematuros como en recién nacidos a término. Estos autores demostraron que el sistema hemostático cambia y madura a lo largo del tiempo desde la vida fetal hasta la edad adulta, principalmente durante los primeros meses de vida, y promovieron el concepto de hemostasia del desarrollo. Los factores de coagulación de origen materno son incapaces de atravesar la barrera placentaria debido a su tamaño. La síntesis de factores de coagulación por parte del feto comienza temprano (por ejemplo, durante la quinta semana de gestación para el fibrinógeno), y la sangre se vuelve coagulable después de once semanas de gestación. Se estudiaron los rangos de referencia fetal para los parámetros de coagulación en diferentes grupos de edad gestacional y la mediana de los niveles plasmáticos se situó entre el 10% y el 30% de los valores adultos, dependiendo del parámetro evaluado, en fetos de 19 a 23 semanas de edad, aumentando progresivamente a niveles entre el 10% y el 50% entre las 30 y 38 semanas de gestación. Los hallazgos iniciales de Andrew M, et al (1987) fueron confirmados por varios estudios que evaluaron diferentes poblaciones pediátricas en diversas condiciones técnicas (es decir, combinaciones de reactivos/analizadores). Los criterios de selección de los sujetos fueron relativamente homogéneos entre los estudios, sin embargo, algunos tenían criterios de inclusión/exclusión y grupos de edad ligeramente diferentes. La principal diferencia entre los estudios fue el número de sujetos evaluados en cada grupo de edad, que osciló entre 10 y más de 500 individuos. El proceso de muestreo, que es un punto clave a tener en cuenta, ya que la extracción de sangre de lactantes pequeños o neonatos puede ser más problemática que en los adultos, fue comparable en los diferentes estudios, con sangre recogida por venopunción en tubos que contenían citrato al 3,2% (1 vol./9 vol.) a través de agujas de calibre 18 a 24, dependiendo de la edad de los pacientes. La mayoría de estos estudios se centraron principalmente en ensayos de actividad para la mayoría de los parámetros implicados en el sistema de coagulación, mientras que un estudio evaluó las concentraciones de antígenos de varios analitos. Todos estos estudios mostraron que, al nacer, los niveles plasmáticos de la mayoría de las proteínas de la coagulación eran aproximadamente la mitad de los

medidos en los adultos, a excepción de FVI11:C y FVW, que son elevados, los prematuros tienen niveles más bajos que los nacidos a término. Los valores adultos se alcanzaron entre los pocos meses de edad y hasta más de 16 años para parámetros específicos como la coagulación, el FVII o la proteína C, como se muestra en la Tabla 39. Si bien la tendencia global es consistente en todos los estudios, es probable que las diferencias en los valores absolutos se deban a diferencias en los reactivos y/o los instrumentos utilizados para medir estos parámetros, en particular las pruebas de coagulación globales como el TP o el TTPA. En consecuencia, el Subcomité del Comité Científico y de Normalización del ISTH recomienda que cada laboratorio defina sus rangos de referencia dependientes de la edad utilizando su propia condición técnica. Para cumplir con la directriz C28A3 del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), los rangos de referencia deben establecerse mediante la prueba de al menos 30 individuos diferentes, en cada grupo de edad. Obtener suficiente plasma para realizar numerosas pruebas de un gran número de niños "aparentemente" sanos, plantea problemas logísticos que estarían mucho más allá de las capacidades de muchos laboratorios. Para sortear esta dificultad, es una práctica común remitirse a los datos de la literatura, teniendo en cuenta condiciones técnicas idénticas, aunque el proceso preanalítico, y en particular la extracción de sangre, pueda ser diferente del utilizado en una institución determinada. Las condiciones técnicas (es decir, la combinación de reactivos e instrumentos) utilizadas en las principales publicaciones se presentan en la Tabla 40. La hemostasia primaria fue menos estudiada. Sin embargo, el recuento de plaquetas suele ser normal o elevado al nacer, alcanzando los valores adultos dentro de 1 año después de los aumentos transitorios. A pesar de las plaquetas hiporreactivas, particularmente en el período neonatal, se encontró que el tiempo de sangrado y el tiempo de cierre de las plaquetas (PFA-100®) se acortaron en los recién nacidos, lo que sugiere un mayor potencial hemostático. La normalización se produjo antes del final del primer mes de vida. Se reportaron niveles significativamente más altos de FVW en los recién nacidos, que luego disminuyeron alcanzando valores adultos después de 1 año de vida, en un momento en que aparece el aumento significativo de los niveles plasmáticos en los grupos sanguíneos no O frente a los grupos sanguíneos O.

Conclusiones

La comprensión del concepto de hemostasia del desarrollo, que ahora es universalmente aceptado, es fundamental para garantizar la prevención, el diagnóstico y el tratamiento óptimos de las enfermedades hemorrágicas y trombóticas en los niños. Por lo tanto, es obligatorio que el laboratorio utilice rangos de referencia específicos por edad para los parámetros de coagulación. Parece imposible pedir a cada laboratorio que establezca sus propios intervalos de referencia para cada parámetro de coagulación en sus propias condiciones técnicas, analizando al menos a 120 individuos sanos en cada grupo de edad, como recomienda la Guía CLSI EP 28-A3C. Por lo tanto, la mejor opción para un laboratorio sería trasladar los hallazgos de la literatura a rangos de referencia locales para neonatos y niños, teniendo en cuenta su entorno técnico específico. En ese sentido, ya se dispone de datos para combinaciones de reactivos y analizadores de los fabricantes actuales. En el caso de los novatos, habría que realizar estudios específicos, y preferiblemente multicéntricos, para establecer los rangos de referencia pediátricos específicos utilizando estas nuevas combinaciones de reactivos/analizadores.

Tabla 39. Parámetros de coagulación en neonatos y niños frente a adultos: resumen de los resultados de las pruebas y posible efecto sobre la hemostasia (adaptado de Toulon et al, 2016)

Componente	Parámetro	Período neonatal (valor medio)*	Normalización	Impacto en la hemostasia
Hemostasia primaria	Plaquetas FVW Tiempo de cierre plaquetario (PFA-100®)	Normal o aumentado Aumentado (153%)* Acortado	1 año (después de aumentos transitorios) 3 meses 2-4 semanas	Hemostasia primaria mejorada
Coagulación	FI I, FVII, FIJO, FX, FXI, FXII, PK, HMWK FV FVII I Fibrinógeno TP aTPT	Disminuido (40-66%)* Disminuido (37-54%)* Normal o disminuido (70%)* Normal o aumentado (100%)* Normal** Prolongado o normal Prolongado	1 año (hasta 16 años para FVII) 1 año 1 año (hasta 16 años) 1 mes 1 año 1 año 1 año (hasta 16 años)	Disminución del potencial de coagulación
Inhibidores naturales de la coagulación	Antitrombina Proteína C Proteína S	Disminución (63%) Disminuido (35%) Disminución (36%)*	3 meses 16 años 3 meses	Disminución del potencial regulatorio/inhibitorio
Fibrinólisis	Plasminógeno alfa 2 antiplasmina tPA Dímero D	Disminución (36%)* Normal o disminuido (85%)* Aumentado Aumentado	6 meses 6 meses 1 W 16 años	Aumento de la actividad fibrinolítica

*En porcentaje (%) de los valores adultos, de Andrew M, et al. (1987); **Puede haber fibrinógeno fetal

Tabla 40. Condiciones técnicas (marcas de instrumentos y reactivos) utilizadas en los principales estudios que informan valores habituales de los parámetros de coagulación en poblaciones pediátricas ("indica que el instrumento y/o los reactivos ya no están disponibles comercialmente")

Autores	Instrumentos	Reactivos
Andrew et al (1987,1988)	LCA (Werfen)*	Varios*
Flanders et al (2005, 2006)	STA-R (Stago) BCS (Siemens)	Principalmente Stago
mesnagle et al (2006, 2011)	STA Compact (Stago)	Stago
Apple et al (2012)	BCS (Siemens)	Siemens
CA-1500 (Sysmex)	Siemens	Stago
Atta rd et al (2013)	Lector de microplacas	Stago
Toulon et al (2016)	ACL TOP 500/700 (Werfen)	Siemens

Referencias

- Andrew M. Hemostasia del desarrollo: relevancia para los problemas hemostáticos durante la infancia. *Semin Thromb Hemost* 1995; 21(4): 341-356.
- Andrew M, Paes B, Milner R, Johnston M, Mitchell L, Tollefsen DM, Powers P. Desarrollo del sistema de coagulación humano en el lactante a término. *Sangre* 1987; 70(1): 165-172.
- Andrew M, Paes B, Milner R, Johnston M, Mitchell L, Tollefsen DM, Castle V, Powers P. Desarrollo del sistema de coagulación humano en el recién nacido prematuro sano. *Sangre* 1988; 72(5): 1651-1657.
- Andrew M, Vegh P, Johnston M, Bowker J, Ofosu F, Mitchell L. Maduración del sistema hemostático durante la infancia. *Sangre* 1992; 80(8): 1998-2005.
- Appel IM, Grimminck B, Geerts J, Stigter R, Cnossen MH, Beishuizen A. Dependencia de la edad de los parámetros de coagulación durante la infancia y la pubertad. *J Thromb Haemost* 2012; 10(11): 2254-2263.
- Atta rd C, van derStraaten T, Karlaftis V, monagle P, Ignjatovic V. Hemostasia del desarrollo: diferencias específicas de la edad en los niveles de proteínas hemostáticas. *J Thromb Haemost* 2013; 11(10): 1850-1854.
- Flanders MM, Crist RA, Roberts WL, Rodgers GM. Intervalos de referencia pediátricos para siete ensayos de coagulación comunes. *Clin Chem* 2005; 51(9): 1738-1742.
- Flanders MM, Phansalkar AR, Crist RA, Roberts WL, Rodgers GM. Intervalos de referencia pediátricos para trastornos hemorrágicos y trombóticos poco frecuentes. *J Pediatr* 2006; 149(2): 275-277.
- Horowitz GL, Altaie S, Boyd JC, Ceriotti F, Garg U, Horn P, Pasce A, Sine HE, Zakowski J. CLSI Documento EP28-A3C. definir, establecer y verificar los intervalos de referencia en el laboratorio clínico; Directriz Aprobada—Tercera Edición. Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio, Wayne, PA, EE. UU. 2010; Vol.28, n°30.
- Ignjatovic V, Kenet G, Monagle P; Subcomité de Hemostasia Perinatal y Pediátrica del Comité Científico y de Normalización de la Sociedad Internacional de Trombosis y Hemostasia. Hemostasia del desarrollo: recomendaciones para los laboratorios que informan muestras pediátricas. *J Thromb Haemost* 2012; 10(2): 298-300.
- Lippi G, Franchini M, Montagnana M, Guidi GC. Pruebas de coagulación en pacientes pediátricos: Los jóvenes no son solo adultos en miniatura. *Semin Thromb Hemost* 2007; 33(8): 816-820.
- mesnagle P, Barnes C, Ignjatovic V, Furmedge J, Newall F, Chan A et al. Hemostasia del desarrollo. Impacto para los laboratorios clínicos de hemostasia. *Thromb Haemost* 2006; 95(2): 362-372.
- mesnagle P, Massicotte P. Hemostasia del desarrollo: hemostasia secundaria. *Semin Fetal Neonatal Med* 2011; 16(6): 294-300.
- Roschitz BI, Sudi K, Kostenberger M, Muntean W. Tiempos de cierre de PFA-100 más cortos en neonatos que en adultos: papel de los glóbulos rojos, los glóbulos blancos, las plaquetas y el factor de von Willebrand. *Acta Paediatr* 2001; 90(6): 664-670.
- Toulon P. Hemostasia del desarrollo: implicaciones clínicas y de laboratorio. *IntJ Lab Hematol* 2016; 38 Suppl 1: 66-77. Toulon P, Berruyer M, Brionne-Fran[^]ois M, Grand F, Lasne D, Telion C, Arcizet J, Giacomello R, De Pooter N. Dependencia de la edad para los parámetros de coagulación en poblaciones pediátricas. Resultados de un estudio multicéntrico destinado a definir los rangos de referencia específicos por edad. *Thromb Haemost* 2016(1); 116: 9-16.
- Williams MD, Chalmers EA, Gibson BE; Grupo de Trabajo sobre Hemostasia y Trombosis, Comité Británico de Normas en Hematología. La investigación y el tratamiento de la hemostasia y la trombosis neonatal. *Br J Haematol* 2002; 119(2): 295-309.

PARTE 14 **Análisis Genético meslecular**

Carlos De Brasi & Megan Sutherland

TEMAS TRATADOS

- ✓ Características moleculares de los genes y proteínas relacionados con la hemofilia
- ✓ Espectro de variantes causales en la hemofilia
- ✓ Otros fenotipos asociados al gen F8
- ✓ / Otros fenotipos asociados al gen F9
- ✓ Protección contra la trombosis venosa profunda (TVP)
- ✓ Espectro de Enfoques Prácticos Aplicados en Pruebas Genéticas
- ✓ Nomenclatura estandarizada y potencial patogénico de las variantes

El análisis genético de la hemofilia es importante para definir la causa subyacente del trastorno hemorrágico en las personas afectadas y sus familiares. La comprensión de la variante genética asociada con el fenotipo puede ayudar a predecir la gravedad del trastorno, incluido el riesgo de desarrollo de inhibidores. También ayuda en la identificación de mujeres portadoras de hemofilia, a quienes se les puede ofrecer un diagnóstico prenatal. Es importante que las personas que están procediendo a una investigación genética se sometan a un asesoramiento genético adecuado antes de cualquier prueba. Las recientes Directrices de la FMH para el tratamiento de la hemofilia (3.ª edición) (Srivastava et al, 2019) contienen un capítulo dedicado a la evaluación genética de las personas con hemofilia A y hemofilia B. En este capítulo del manual de laboratorio se describen las bases genéticas de la hemofilia A y B y se destaca la heterogeneidad de los enfoques prácticos disponibles actualmente en todo el mundo que se pueden utilizar para investigar las variantes genéticas subyacentes. También describe el uso de la nomenclatura estandarizada para la descripción de las variantes genéticas y su clasificación de patogenicidad, además de destacar la importancia de un informe interpretativo claro y conciso que describa el resultado genético y las implicaciones para el individuo y su familia.

Características moleculares de los genes y proteínas relacionados con la hemofilia: Las características moleculares de los genes de la hemofilia, la coagulación FVIII o F8 y la coagulación FIX o F9, se muestran en la Tabla 41. La Tabla 41 muestra las coordenadas genómicas en GRCh38 (hg38), el tamaño del gen y la ubicación citogenética de F8 y F9, su complejidad de exones (número de exones), versiones curadas actualizadas de archivos RefSeq (es decir, NG_..., NM_..., NP_...), y el tamaño molecular relevante de las principales transcripciones de genes y sus isoformas polipeptídicas derivadas.

Tabla 41. Características moleculares de los genes F8 y F9

Símbolo oficial de HGNC	Nombre del gen	Localización citogenética	GRCh38 (hg38) (coordenadas) NC_000023.11 (longitud [pb])	Genómica RefSeq (rango de coordenadas)	Transcripción principal* RefSeq (longitud [nts]) (exones)	Proteína principal* RefSeq (longitud [aa])	OMIM #
F8	factor VIII de coagulación	Xq28	Dotación (154.835.792-155.022.723) (186.931)	NG_011403.2 (5,001-191,932)	NM_000132.4 (9032) (26)	NP_000123.1 (2351)	300841
F9	factor IX de coagulación	Xq27.1	(139,530,739-139,563,459) (32,720)	NG_007994.1 (5,001-37,723)	NM_000133.4 (2800) (8)	NP_000124.1 (461)	300746

HGNC: Comité de Nomenclatura Genética de HUGO. Longitud [Unidades]: [pb], pares de bases; [nts], nucleótidos; [aa]; Aminoácidos. "Solo se indica la variante de transcripción más larga (más significativa) y su isoforma principal derivada. OMIM: La herencia mendeliana en línea en el hombre (<https://omim.org/>); #, número de accesión. Los datos se recopilaron del NCBI (Centro Nacional de Información Biotecnológica) consultado el 18/ene/2024 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). RefSeq indica los archivos de secuencia de referencia de la plataforma del navegador NCBI.

Adicionalmente, en la Tabla 42 se muestran las características más relevantes de las proteínas FVIII y FIX de la coagulación. La Tabla 42 recopila datos de las principales isoformas de proteínas, la cartografía de aminoácidos (aa) de dominios de proteínas reconocibles (especificados por la base de datos UNIPROT) y los archivos de bases de datos de proteínas (PDB) asociados con modelos de estructura 3D (coordinadas tridimensionales de átomos FVIIIa y FIXa).

Tabla 42. Características moleculares de las proteínas del factor VIII y IX de la coagulación

Símbolo de la proteína	Nombre de la proteína: isoforma principal	Isoforma RefSeq (longitud [aa])	UNIPROT* #	Dominios de isoformas: UNIPROT (coordinadas aa)	Estructura 3D ID de PDB (coordinadas aa)
FVIII	factor de coagulación VIII isoforma una preproteína	NP_000123.1 (2351)	P00451	Péptido señal: (1-19) A1: F5/8 tipo A 1 (20-348) A2: F5/8 tipo A 2 (399-730) B: B-region (760-1667) A3: F5/8 tipo A 3 (1713-2040) C1: F5/8 tipo C 1 (2040-2188) C2: F5/8 tipo C 2 (2193-2345)	FVIIIa maduro 2R7E. PDB** A: Cadena pesada A1 -A2 (Legado 1-725) B: Cadena ligera A3-C1 -02 (Legado 1689-2332)
ARREGLAR	isoforma del factor IX de coagulación 1 preproteína	NP_000124.1 (461)	P00740	Péptido señal: (1-28) – Propéptido: (29-46) Gla: rico en γ -carboxiglutamato (47-92) EGF1: 1 tipo EGF de fijación a Ca^{++} (93-129) EGF2: 2 tipo EGF (130-171) Act_peptide: Péptido de activación (192-226) Tryp_SPc: Serina proteasa similar a la tripsina (227-457)	modelo de homología FIXa. pdb*** L: Cadena ligera Gla-EGF1-EGF2 (47-171) H: Cadena pesada Tryp_SPc (227-461)

*Navegador de proteínas UNIPROT (URL: <https://www.uniprot.org/>). **Shen et al, 2008. ***Los curadores del Proyecto de Bases de Datos de Variantes de EAHAD (Rallapalli et al, 2013; McVey et al, 2020). La mayoría de los datos se recogieron de las bases de datos de variantes del factor de coagulación de la EAHAD (Asociación Europea de Hemofilia y Trastornos Afines) (URL: <https://dbs.eahad.org/>), consultadas el 18/ene/2024. Los codones y aminoácidos (aa) se numeran siguiendo las reglas de HGVS (es decir, codón +1 que codifica para el primer residuo (Met) del polipéptido primario en FVIII y FIX). En la numeración Legacy, codón/aminoácido +1 se refiere a la codificación del primer aminoácido de la proteína FVIII madura (excluyendo 19 aa del péptido señal) y la proteína FIX (excluyendo 46 aa del péptido señal y el propéptido). Aunque se recomienda la numeración HGVS. La numeración heredada se ha utilizado ampliamente en publicaciones anteriores.

Espectro de variantes causales en la hemofilia: La mayoría de las variantes patógenas que afectan al gen F8 causan hemofilia A, mientras que la mayoría de las variantes patógenas F9 causan hemofilia B. La base de datos Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) (<https://www.omim.org/>) recopila un

amplio conjunto de información completa sobre los genes humanos, indica las variantes que afectan a su función y describe y clasifica sus fenotipos asociados. La base de datos OMIM indica que las variantes F8 se asocian a dos fenotipos diferentes: hemofilia A (#306700) y trombofilia 13 (ligada al cromosoma X, por defecto FVIII) (#301071) (THPH13); mientras que la F9, con cuatro fenotipos: hemofilia B (#306900), trombofilia 8 (ligada al cromosoma X, por defecto FIX) (#300807) (THPH8), protección contra la trombosis venosa profunda (DPV) (#300807) y sensibilidad a la warfarina (#301052). En la Tabla 43 y en la Tabla 44, respectivamente, se muestra el espectro de mutaciones F8 causantes de hemofilia A según los niveles de actividad del FVIII de la coagulación (FVIII:C) y mutaciones F9 causantes de hemofilia B, asociadas a los niveles de FIX (FIX:C). La mayoría de las prevalencias relativas de las variantes causales de hemofilia A y hemofilia B, enumeradas en las Tablas 43 y 44, se obtuvieron de las bases de datos de la Asociación Europea de Hemofilia y Trastornos Afines (EAHAD). La base de datos de variantes F8 de la EAHAD excluye las inversiones prevalentes asociadas con la hemofilia A grave que afectan a casi la mitad de los pacientes. Con el fin de presentar una prevalencia no sesgada de mutaciones causantes de la hemofilia A grave, sus frecuencias relativas se combinaron teniendo en cuenta los promedios mundiales de las inversiones del intrón F8 22 (Inv22) reportados por Antonarakis et al (1995), y los estimados para la inversión del intrón F8 1 (Inv1) de una serie internacional de pacientes con hemofilia A (Rossetti et al, 2004) (Cuadro 43).

Tabla 43. Variantes F8 causantes de la hemofilia A más típicas en pacientes hemocigotos de fuentes internacionales.

Tipo de variante por efecto	No inversiones graves # casos (%)	Grave a nivel mundial	Moderate # casos (%)	Mild # casos (%)	References
Missense o de cambio de sentido	mesderado	(16.2)	1340 (79.9)	3048 (95.8)	F8_var_db EAHAD*
In-frame-indel	Leve	(0.8)	19 (1.1)	32 (1.0)	F8_var_db EAHAD*
Frameshift-indel	Referencias	(17.0)	142 (8.5)	27 (0.9)	F8_var_db EAHAD*
Defecto de empalme	320 (6.8)	(3.7)	98 (5.8)	68 (2.1)	F8_var_db EAHAD*
Nonsense (sin sentido o parada prematura)	968 (20.6)	(11.1)	59 (3.5)	4 (0.1)	F8_var_db EAHAD*
Delección grande (SV)	426 (9.1)	(4.9)	19 (1.1)	3 (0.1)	F8_var_db EAHAD*
Total de no inversiones	4689 (100)	(53.7)	1677 (100)	3182 (100)	F8_var_db EAHAD*
Inv22 (SV) tipo 1		740 (35.4)			Antonarakis et al, 1995
Inv22 (SV) tipo 2		140 (6.7)			
Inv22 (SV) otros tipos		25 (1.1)			
Total Inv22		2093 (43.2)			
Inv1 (SV)		19 (3.1)			Rossetti et al, 2004
Total Inv1		622 (3.1)			

SV indica variantes estructurales, incluidas las variantes del número de copias (CNV) como delecciones F8 grandes e inversiones F8 grandes (no CNV) como la inversión del intrón 22 (Inv22) y la inversión del intrón 1 (Inv1). Los datos de los pacientes no informativos de las inversiones F8 se obtuvieron de las bases de datos de la EAHAD (Asociación Europea de Hemofilia y Trastornos Afines) que registraban pacientes individuales. *Base de datos de variantes F8 (<http://f8-db.eahad.org/>).

La variante más característica y recurrente causante de hemofilia A grave en todo el mundo, es la inversión del intrón F8 22, una gran inversión perfecta de 600 kb mediada por recombinación entre repeticiones invertidas de 10 kb (int22h o h) que interrumpe la estructura F8 impidiendo el empalme normal del ARN

entre los exones 22 y 23 (Lakich et al, 1993; Naylor et al, 1993). Hay una copia intragénica F8 de int22h dentro del intrón 22 (h1) y dos copias extragénicas (h2 y h3). Dependiendo de qué copia extragénica se recombina con la intragénica, el Inv22 muestra un patrón de tipo 1 (h1/h3) o un patrón de tipo 2 (h1/h2). El Inv22 se origina casi exclusivamente a partir de células germinales masculinas (Rossiter et al, 1995) y, en consecuencia, la mayoría de las madres de pacientes con el Inv22 son portadoras (Tizzano et al, 1995). El mecanismo molecular de la recombinación homóloga no alélica entre grandes repeticiones invertidas en la meiosis masculina apoya la recurrencia de Inv22 como la causa más prevalente de hemofilia A grave en todo el mundo (Tabla 43). De manera similar, la inversión del intrón F8 1 (Inv1) es una gran inversión perfecta del ADN causada por la recombinación entre repeticiones invertidas de 1 kb (inti h) que interrumpen la estructura F8 en el intrón 1 (Bagnall et al, 2001) e involucra un promedio estimado del 3% de los pacientes con hemofilia A grave en todo el mundo (Tabla 43).

El grupo restante de pacientes con hemofilia A grave, moderada o leve (Cuadro 43), que no incluye información para las inversiones F8, y todos los pacientes con hemofilia B (Cuadro 44) muestran un espectro típico de variantes deletéreas, incluidas las variantes de un solo nucleótido (SNV) que predicen errores de sentido, sinsentido o defectos de empalme; pequeñas inserciones/delecciones (INDEL) que predicen desplazamientos de marco o cambios en el marco; o, con menos frecuencia, grandes variaciones del número de copias (CNV), en su mayoría grandes delecciones.

Tabla 44. Variantes F9 causantes de hemofilia B más típicas en pacientes hemicigotos de fuentes internacionales

Variant type by effect	Graves # casos (%)	mesderado # casos (%)	Leve # casos (%)	Referencias
Missense o cambio de sentido	999 (52.3)	1039 (85.1)	719 (95.0)	F9_var_db EAHAD*
In-frame-indel	27 (1.4)	9 (0.7)	1 (0.1)	F9_var_db EAHAD*
Frameshift-indel	185 (9.7)	42 (3.4)	2 (0.3)	F9_var_db EAHAD*
Defecto de empalme	135 (7.1)	66 (5.8)	30 (4.0)	F9_var_db EAHAD*
Nonsense (sin sentido o parada prematura)	459 (24.0)	62 (5.1)	5 (0.7)	F9_var_db EAHAD*
Delección grande (SV)	107 (5.6)	3 (0.3)		F9_var_db EAHAD*
Total	1912 (100)	1221 (100)	757 (100)	F9_var_db EAHAD*

SV indica variantes estructurales como grandes delecciones que afectan parcial o totalmente al gen F9. Los datos de los pacientes con HB se obtuvieron de las bases de datos de la EAHAD (Asociación Europea de Hemofilia y Trastornos Afines) que registraban pacientes individuales. *Base de datos de variantes F9 (<https://f9-db.eahad.org/>).

La información sobre las variantes F8 y F9 se recopila en bases de datos de acceso público, como las desarrolladas por los CDC (Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades) denominadas CHAMP y CHBMP para la hemofilia A y la hemofilia B, respectivamente (<https://www.cdc.gov/ncbddd/hemophilia/champs.html>), y por la EAHAD (Asociación Europea de Hemofilia y Trastornos Afines) para F8 (<http://f8-db.eahad.org/>) y F9 (<http://f9-db.eahad.org/>) (Cuadros 43 y 44). Consultadas el 18 de enero de 2024, las bases de datos de EAHAD contienen información de 3052 variantes F8 únicas correspondientes a 10144 casos individuales y 1244 variantes F9 únicas correspondientes a 4713 casos individuales. En las Tablas 43 y 44, las variantes genéticas se clasifican por su efecto predicho a partir de la evidencia de secuencia de nucleótidos de ADN observada (es decir, cambio de sentido, delección in-frame, frameshift-indel, defecto de empalme, sin sentido, delección grande). Las variantes F8 y F9, respectivamente, enumeradas en los Cuadros 43 y 44 representan las variantes causantes de hemofilia con frecuencias significativas en todo el mundo, en contraste con las variantes prevalentes encontradas en poblaciones particulares típicamente asociadas con fenotipos no graves (por ejemplo, la duplicación del exón 13 F8 prevalente en la población italiana de hemofilia A leve (Acquila et al, 2004).

Otros fenotipos asociados con el gen F8

La trombofilia 13 (ligada al cromosoma X, debido a un defecto de FVIII): Shen et al (2013) evaluaron los niveles de actividad de FVIII:C y el número de copias del gen F8 en pacientes con tromboembolismo venoso (TEV) frente a controles sanos. Los pacientes con TEV mostraron un FVIII:C significativamente mayor y un mayor número de copias del gen F8. Simioni et al (2021) reportaron de dos familias italianas con trombofilia 13 e identificaron una duplicación parcial en tándem del gen F8, que es coherente con el patrón de herencia dominante ligado al cromosoma X, ya que los pacientes hemicigotos masculinos se ven más gravemente afectados que las mujeres portadoras.

Otros fenotipos asociados con el gen F9

La trombofilia 8 (debida a un defecto FIX) es un fenotipo hereditario recesivo ligado al cromosoma X asociado con TEV de inicio temprano causado por un defecto de cambio de sentido F9, R338L o variante de Padua, reportado por Simioni et al (2009). Se ha reportado que Padua mejora la resistencia fibrinolítica de los coágulos de plasma (Ammollo et al, 2014).

Protección contra la trombosis venosa profunda (TVP):

La variante polimórfica común FIX-Malmo (frecuencia alélica menor de 0,32), p.(Thr148Ala) debida a una sustitución de un solo nucleótido (SNV) G>A, se asocia con una protección contra el riesgo de TVP con odds ratios o razón de momios (OR) de 0,8 en pacientes masculinos y de 0,89 en pacientes femeninos (Bezemer et al, 2008). Sin embargo, los mecanismos moleculares para la protección de la TVP conferida por el polimorfismo FIX-Malmo seguían siendo desconocidos.

La warfarina es un anticoagulante ampliamente prescrito para la prevención de eventos tromboembólicos en pacientes "de riesgo". La sensibilidad a la warfarina (ligada al cromosoma X, debido a variantes FIX) se refiere a una complicación del fenotipo hemorrágico durante el tratamiento anticoagulante con antagonistas de la vitamina K. Pezeshkpoor et al (2018) reportaron de una asociación entre las variantes de cambio de sentido F9 que afectan al propéptido, como p.(Ala37Thr) y p.(Ala37Val), y la sensibilidad a la warfarina caracterizada por una reducción desproporcionada de los niveles de FIX:C durante el tratamiento con anticoagulación.

La relación causal entre una variante genética dada (por ejemplo, F8 Inv22) y un fenotipo particular (por ejemplo, hemofilia A grave en un paciente hemicigoto) puede modificarse en casos raros mediante la participación de un mosaicismo genético (MG), que se define como la coexistencia de al menos dos clones genéticamente diferentes en un individuo (por ejemplo, células Inv22 positivas y negativas). Un mosaicismo genético puede afectar parcial o totalmente, a algunos o a todos los órganos/tejidos de un individuo afectado, lo que da lugar, por ejemplo, a fenotipos más leves si afecta a las células somáticas (por ejemplo, células productoras de FVIII/FIX derivadas del endotelio hepático) y a la heredabilidad de la variante genética si afecta a las células germinales (por ejemplo, un paciente con hemofilia masculina en mosaico germinal puede ser padre de hijas no portadoras) (Abelleyro et al, 2018).

Como paradigmas históricos de los trastornos recesivos ligados al cromosoma X, la hemofilia A (OMIM #306700) y la hemofilia B (OMIM #306900) se expresan típicamente en pacientes varones hemicigotos (46, XY) y las mujeres heterocigóticas (46, XX) suelen ser asintomáticas. De acuerdo con un punto de vista consensuado entre los hematólogos, una nueva clasificación de la hemofilia femenina considera los niveles de actividad de coagulación del factor, indicando enfermedad grave cuando <1 UI/dl, moderada 1-5 UI/dl y hemofilia leve 5-40 UI/dl; y cuando los niveles del factor son >40 UI/dl, los individuos se clasifican como portadores sintomáticos y asintomáticos (van Galen et al, 2021). La base molecular de la hemofilia femenina implica la alteración de la expresión o el silenciamiento de los alelos F8 o F9 mediado por el fenómeno de inactivación del cromosoma X (XCI), que silencia la expresión génica en cis de una X en cada célula para compensar las dosis con los hombres. XCI tiene lugar al principio de la embriogénesis, normalmente al azar en cada célula, y este estado se hereda clonalmente en la vida adulta de las mujeres.

Se espera que una portadora femenina homocigota y un heterocigoto compuesto expresen hemofilia, así como portadores heterocigotos con XCI sesgado que silencian preferentemente el alelo normal (Radio et al, 2015). Además, Garagiola et al (2021) demostraron una asociación significativa entre los niveles de actividad de coagulación de FVIII/FIX y el patrón de XCI medido en leucocitos de sangre periférica de portadores heterocigotos de hemofilia A con <50 UI/dl.

Espectro de enfoques prácticos aplicados en las pruebas genéticas: Dependiendo de la disponibilidad de recursos y experiencia, hay una variedad de técnicas que se pueden emplear para la investigación de variantes genéticas asociadas con la hemofilia A y la hemofilia B. En este capítulo se proporcionan ejemplos de estos enfoques prácticos y referencias, cuando están disponibles. Existen varias técnicas diferentes para la investigación de la inversión del intrón F8 22, como el Southern blot, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de largo alcance y la PCR de desplazamiento inverso (Lakich et al, 1993; Liu et al, 1998; Bagnall et al, 2006; Rossetti et al, 2008; Abelleyro et al, 2016; Ding et al, 2016; Hudcovova et al, 2017; Pan et al, 2014; Kumar et al, 2015; Edison et al, 2016). La inversión del intrón 1 F8 puede detectarse mediante técnicas como la PCR doble o la PCR con desplazamiento inverso (Bagnall et al, 2002; Rossetti et al, 2008). El análisis de los SNV en F8 y F9 puede realizarse mediante una serie de técnicas, como la PCR y la secuenciación de Sanger, o tecnologías de secuenciación de alto rendimiento, como la secuenciación de próxima generación (NGS) (Al-Allaf et al, 2019; Li et al, 2014; Lyu et al, 2016; Manderstedt et al, 2019; Edison et al, 2016). Cuando los recursos son limitados, se podría emplear un enfoque de cribado previo a la secuenciación de Sanger (Salviato et al, 2019), como el análisis heterodúplex mediante electroforesis en gel sensible a la conformación (CSGE). Para el análisis de las SVN en F8 y F9, existen varias técnicas como la PCR gap, la amplificación de sonda dependiente de ligadura múltiple (MLPA), la PCR cuantitativa en tiempo real y la NGS (Rossetti et al, 2004; Payne et al, 2012; Costa et al, 2004; Belvini et al, 2017; Kinkle et al, 2017; Usted et al, 2013; Wu et al, 2014; Fernández-López et al, 2007; Tizzano et al, 2005; Johnsen et al, 2017). En los casos de hemofilia A y hemofilia B en los que no se encuentra una variante genética subyacente en las regiones esenciales de los genes F8 o F9 utilizando las técnicas descritas anteriormente, el análisis de las regiones intrónicas profundas para detectar posibles defectos de empalme puede estar disponible mediante secuenciación masiva paralela dirigida (MPS) o secuenciación del genoma completo (WGS) (Jourdy et al, 2018; Jourdy et al, 2020; Bach et al, 2015; Inaba et al, 2017; Castaman et al, (2011; Chang et al, 2019). El análisis de ligamiento también puede considerarse para estudios familiares en los que no hay una variante F8 o F9 identificable (Sun et al, 2015). La investigación de individuos con fenotipos atípicos que pueden deberse a reordenamientos genómicos complejos puede ser mediante análisis de microarreglos citogenéticos (Jourdy et al, 2016; Jourdy et al, 2017; Janczar et al, 2016; Lannoy et al, 2018). El análisis de la inactivación del cromosoma X puede realizarse mediante una serie de técnicas, como la enzima de restricción específica de metilación, la PCR y el análisis de fragmentos, u otras técnicas cuantitativas (Nisen et al, 1989; Coleman et al, 1993; Johansson et al, 2023; Machado et al, 2014).

Nomenclatura estandarizada y potencial patogénico de las variantes: La precisión en la descripción unívoca de las variantes genéticas es esencial para la investigación y la atención clínica. Para abordar este requisito, el Comité de Nomenclatura de Variantes (HVNC) de la Sociedad de Variación del Genoma Humano (HGVS), bajo el auspicio de la Organización del Genoma Humano (HUGO), desarrolló una serie de recomendaciones. Estos incluyen que las variantes genéticas deben describirse en el nivel más básico, el nivel del ADN, y las descripciones en el nivel del ARN y/o la proteína, en general predichas a partir de la evidencia del ADN, se pueden dar además (<https://hgvs-nomenclature.org/stable/>) (den Dunnen et al, 2016). La nomenclatura HGVS recomienda una numeración específica para las posiciones de los genes que indica el codón +1 que codifica para el primer residuo (Met) del polipéptido primario y el nucleótido +1 para el A del codón de iniciación AUG. En algunas publicaciones anteriores sobre hemofilia, la numeración heredada de codón/aminoácido +1 se refiere a la codificación del primer aminoácido de la proteína madura (es decir, en la numeración HGVS, codón FVIII 20 y codón FIX 47). Para ajustar y normalizar la nomenclatura de las variantes según el HGVS, el sitio web de Mutalyzer ofrece algoritmos eficientes para comprobar y verificar su correcta descripción a partir de las recomendaciones del HGVS (<https://mutalyzer.nl/>) (Lefter et al, 2021). Todas las variantes detectadas deben clasificarse de acuerdo con su potencial para causar el fenotipo observado de acuerdo con las pautas elaboradas por el Colegio

Americano de Genética Médica y Genómica/Asociación de Patología molecular (ACMG/AMP) (Richards et al, 2015). Las recomendaciones del ACMG se pueden aplicar a las pruebas genéticas convencionales o basadas en secuenciación de próxima generación que se utilizan en laboratorios clínicos y comprenden un sistema de clasificación de cinco niveles para las variantes relevantes para los trastornos mendelianos: (1) patógena, (2) probablemente patógena, (3) de significado incierto, (4) probablemente benigna y (5) benigna. Para lograr esta categorización, el ACMG/AMP recomienda un análisis exhaustivo de (a) datos de población, (b) datos computacionales, (c) datos funcionales y (d) datos de segregación.

Por ejemplo, el análisis de las variantes F8 y F9 implica:

El estudio de la variante genotipada en población general y su frecuencia en individuos hemicigotos, heterocigotos, etc. consultando gnomAD (<https://gnomad.broadinstitute.org/>), ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>), y en las bases de datos específicas de genes F8/HA y F9/HB, como EAHAD y CHAMP (referenciadas anteriormente).

La aplicación de herramientas bioinformáticas “in silico” para analizar cambios de cambio de sentido mediante la predicción de eventuales cambios estructurales o funcionales utilizando, por ejemplo, PolyPhen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>), MutationTaster (<https://www.mutationtaster.org/>) y Varsome (<https://varsome.com/>) entre otros; o para evaluar eventuales defectos de splicing, como NNSplice(https://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html), NetGene2 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetGene2-2.42/>) y ESEFinder para buscar diferencias en secuencias de potenciadores de empalme exónico (esefinder.ahc.umn.edu); y muchas otras herramientas computacionales para estimar el impacto de variantes en el promotor, 5'- o 3'-UTR, etc.

Los datos experimentales obtenidos de estudios funcionales in vitro e in vivo de la versión mutada frente a la versión normal que se va a probar, o una parte de ella, proporcionan información significativa para establecer el impacto de una variante genética.

Los datos de segregación asociados con un modo de herencia recesivo ligado al cromosoma X y la cosegregación con hemofilia en múltiples miembros de la familia afectados son indicativos de patogenicidad. Teniendo en cuenta este análisis, los ACMG/AMP indican los criterios para clasificar las variantes patogénicas puntuando la evidencia como muy fuerte (PVS), fuerte (PS), moderada (PM) y de apoyo (PP); y los criterios para clasificar el impacto benigno o neutro de las variantes puntuando la evidencia como independiente (BA), fuerte (BS) y de apoyo (BP). La clasificación final en una categoría para estimar la patogenicidad (1-5) es el resultado de la combinación de las puntuaciones de P_ y B_ evidencia (Richards et al, 2015).

Informes interpretativos: Los informes interpretativos deben ser claros y concisos, y abordar el diagnóstico de la persona investigada. Más allá de su enfoque principal que establece su conclusión molecular general al responder a la pregunta genética, un informe interpretativo debe incluir suficientes detalles para permitir la identificación de la variante en otros laboratorios (es decir, indicar los enfoques prácticos utilizados, las limitaciones de las técnicas, la secuencia genómica de referencia utilizada y la clasificación de la patogenicidad de acuerdo con las guías del ACMG, incluidas las pruebas aplicadas para la clasificación y las referencias; Directrices para la presentación de informes de ACGS, 2020; Deans et al, 2022; Claustres et al, 2014; Gómez et al, 2019). Los informes interpretativos deben incluir información que explique el alcance real del diagnóstico molecular en un lenguaje sencillo con una indicación clara de, por ejemplo, los riesgos específicos para el desarrollo de fenotipos específicos en la familia.

Aseguramiento de la calidad: En las pruebas genéticas, el aseguramiento de la calidad abarca todos los aspectos del proceso de diagnóstico, desde la extracción de ácidos nucleicos y los procedimientos analíticos, hasta la clasificación y descripción de las variantes detectadas y la elaboración de un informe interpretativo. El control de calidad interno (CCI) de las pruebas genéticas debe realizarse de forma rutinaria para garantizar la validez de los resultados obtenidos. Existen esquemas formales de EQA para garantizar que el proceso de diagnóstico y los procedimientos de notificación estén de acuerdo con otros laboratorios (por ejemplo, la Evaluación de la Calidad Genómica [GenQA], y específicamente para

la evaluación genética de la hemofilia por el Servicio Nacional de Evaluación de la Calidad Externa del Reino Unido [NEQAS] para la Coagulación de la Sangre). Los laboratorios de genética deben someterse a una acreditación periódica, si la hay, con arreglo a normas acordadas internacionalmente, por parte de un organismo aprobado. Esto garantiza una prestación de alta calidad del servicio de diagnóstico genético.

Referencias

Abelleyro MM, Rossetti LC, Curto Mde L, Radio CP, Marchione VD, De Brasi CD. Inversiones del intrón F8 22 y el SNP rs73563631 en familias no emparentadas con hemofilia A grave: características clínicas e implicaciones de las pruebas genéticas. *Thromb Haemost* 2016; 115(3): 678-681.

Abelleyro MM, Marchione VD, Elhelou L, Radio CP, Rossetti LC, Neme D, De Brasi CD. El mosaicismo somático/germinal de la delección de un promotor F8 confunde las predicciones clínicas en una familia con hemofilia A: Papel clave de la cuantificación del genotipo. *Thromb Haemost* 2018; 118(3): 617-620.

Acquila M, Pasino M, Lanza T, Bottini F, meslinari AC, Bicocchi MP. La duplicación del exón 13 causa un tercio de los casos de hemofilia A leve en el norte de Italia. *Haematologica* 2004; 89(6): 758-759.

Al-Allaf FA, Abduljaleel Z, Bogari NM, Owaidah TMA, Taher MM, Athar M et al. Identificación de seis nuevas variantes genéticas del factor VIII mediante secuenciación de próxima generación y simulación de dinámica molecular. *Acta Biochim Pol* 2019; 66(1): 23-31.

Ammollo CT, Semeraro F, Colucci M, Simioni P. El factor IX-Padua mejora la resistencia fibrinolítica de los coágulos plasmáticos. *Thromb Haemost* 2014; 111 (2): 226-232.

Antonarakis SE, Rossiter JP, Young M, Horst J, de meserlose P, Sommer SS et al. Inversiones génicas del factor VIII en la hemofilia A grave: resultados de un estudio de consorcio internacional. *Sangre* 1995; 86(6): 2206-2212.

Asociación para la Ciencia Genómica Clínica. Directrices de buenas prácticas de ACGS para la clasificación de variantes en enfermedades raras. 2020. <https://www.acgs.uk.com/quality/best-practice-guidelines/>.

Bach JE, Wolf B, Oldenburg J, Muller CR, Rost S. Identificación de variantes intrónicas profundas en 15 pacientes con hemofilia A mediante secuenciación de próxima generación de todo el gen del factor VIII. *Thromb Haemost* 2015; 114(4): 751-761.

Bagnall RD, Giannelli F, Green PM. Inversiones relacionadas con Int22h que causan hemofilia A: Una nueva perspectiva sobre su origen y una nueva prueba PGR más discriminante para su detección. *J Hemosta de trombo*. 2006; 4(3): 591-598.

Bagnall RD, Waseem N, Green PM, Giannelli F. La inversión recurrente que rompe el intrón 1 del gen del factor VIII es una causa frecuente de hemofilia A grave. *Sangre* 2002; 99(1): 168-174.

Castaman G, Giacomelli SH, Mancuso ME, D'Andrea G, Santacroce R, Sanna S, Santagostino E, Mannucci PM, Goodeve A, Rodeghiero F. Las variaciones intrónicas profundas pueden causar hemofilia leve a. *J Thromb Haemost* 2011; 9(8): 1541-1548.

Chang CY, Peng CL, Cheng SN, Hu SH, Wu TY, Lin SY, Chen YC. La variante intrónica profunda c.5999-277G>A del gen F8 puede ser una mutación puntual para los pacientes con hemofilia A leve sin mutación en el ADN exónico. *Eur J Haematol* 2019; 103(1): 47-55.

Claustres M, Kozich V, Dequeker E, Fowler B, Hehir-Kwa JY, Miller K et al. Recomendaciones para reportar los resultados de las pruebas genéticas diagnósticas (bioquímicas, citogenéticas y moleculares). *Eur J Hum Genet* 2014; 22(2): 160-170.

Coleman R, Genet SA, Harper JI, Wilkie AO. ¡Interacción del pigmento de la incontinencia! y mutaciones en el factor VIII en una mujer con inactivación sesgada del cromosoma X, que dan lugar a hemofilia. *J Med Genet* 1993; 30(6): 497-500.

Deans ZC, Ahn JW, Carre!ra IM, Dequeker E, Henderson M, Lovrecic L, Ounap K, Tabiner M, Treacy R, van Asperen CJ. Recomendaciones para reportar los resultados de las pruebas genómicas diagnósticas. *Eur J Hum Genet* 2022; 30(9): 1011-1016.

den Dunnen JT, Dalgleish R, Maglott DR, Hart RK, Greenblatt MS, McGowan-Jordan J, Roux AF, Smith T, Antonarakis SE, Taschner PE. Recomendaciones de HGVS para la descripción de variantes de secuencia: actualización de 2016. *Hum Mutat* 2016; 37(6): 564-569.

Ding Q, Wu X, Lu Y, Chen C, Shen R, Zhang X, Jiang Z, Wang X. Cuantificación de AccuCopy combinada con pre-amplificación de PCR a larga distancia para un análisis rápido de la inversión del intrón 22 en la hemofilia A. *Clin Chim Acta* 2016; 458: 78-83.

Edison E, Konkle BA, Goodeve AC. Análisis genético de los trastornos hemorrágicos. *Hemofilia* 2016; 22 Suppl 5(Suppl 5): 79-83.

Garagiola I, Mortarino M, Siboni SM, Boscarino M, Mancuso ME, Biganzoli M, Santagostino E, Peyvandi F. Inactivación del cromosoma X: Un modificador de los niveles plasmáticos de factor VIII y IX y del fenotipo hemorrágico en portadores de hemofilia. *Eur J Hum Genet* 2021; 29(2): 241-249.

Gomez K, Laffan M, Keeney S, Sutherland M, Curry N, Lunt P. Recomendaciones para la interpretación clínica de las variantes genéticas y la presentación de los resultados a los pacientes con trastornos hemorrágicos hereditarios. Documento de buenas prácticas de la Organización de Médicos del Centro de Hemofilia del Reino Unido. *Hemofilia* 2019; 25(1): 116-126.

Hudecova I, Jiang P, Davies J, Lo YMD, Kadir RA, Chiu RWK. Detección no invasiva de inversiones relacionadas con F8 int22h y variantes de secuencia en plasma materno de portadores de hemofilia. *Sangre* 2017; 130(3): 340-347.

Inaba H, Shinozawa K, Amano K, Fukutake K. Identificación de variantes individuales intrónicas profundas en pacientes con hemofilia A mediante la secuenciación de próxima generación de todo el gen del factor VIII. *Res Pract Thromb Haemost* 2017; 1 (2): 264-274.

Janczar S, Kosinska J, Ploski R, Pastorczak A, Wegner O, Zalewska-Szewczyk B, Paige AJ, Borowiec M, Mlynarski W. Hemofilia A y morbilidad cardiovascular en una mujer portadora del síndrome SHAM debido a la inactivación sesgada del cromosoma X. *Eur J Med Genet* 2016; 59(1): 43-47.

Johansson J, Lideus S, Hojjer I, Ameer A, Gudmundsson S, Anneren G, Bondeson ML, Wilbe M. Un novedoso análisis cuantitativo dirigido de la inactivación del cromosoma X (XCI) mediante secuenciación de nanoporos. *Sci Rep* 2023; 13(1): 12856.

Jourdy Y, Chatron N, Carage ML, Fretigny M, Meunier S, Zawadzki C, Gay V, Negrier C, Sanlaville D, Vinciguerra C. Estudio de seis pacientes con delección completa de F9 caracterizada por microarrays citogenéticos: papel del gen SOX3 en la discapacidad intelectual. *J Thromb Haemost* 2016; 14(10): 1988-1993.

Jourdy Y, Chatron N, Fretigny M, Carage ML, Chambost H, Claeysens-Donadel S, Roussel-Robert V, Negrier C, Sanlaville D, Vinciguerra C. Caracterización citogenética molecular de cinco reordenamientos del complejo F8: utilidad para el asesoramiento genético de la hemofilia A. *Hemofilia* 2017; 23(4): e316-e323.

Jourdy Y, Fretigny M, Lassalle F, Lillicrap D, Negrier C, Vinciguerra C. Las delecciones altamente prevalentes en el intrón F8 13 que se encuentran en los pacientes franceses con hemofilia a leve son el resultado tanto del efecto fundador como de los eventos recurrentes de novo. *J Thromb Haemost* 2020; 18(5): 1087-1093.

Jourdy Y, Janin A, Fretigny M, Lienhart A, Negrier C, Bozon D, Vinciguerra C. La delección intrónica recurrente de F8 encontrada en la hemofilia A leve causa exonización de Alu. *Am J Hum Genet* 2018; 102(2): 199-206.

Kumar P, Husain N, Soni P, Farid! Nueva Jersey, Goel SK. Nuevo protocolo para la detección de la mutación de inversión del intrón 22 en casos con hemofilia A. *Clin Appl Thromb Hemost* 2015; 21(3): 255-259.

Lakich D, Kazazian HH, Jr., Antonarakis SE, Gitschier J. Las inversiones que alteran el gen del factor VIII son una causa común de hemofilia A grave. *Nat Genet* 1993; 5(3): 236-241.

Lannoy N, Hermans C. Revisión de los mecanismos moleculares en Xq28 distal que conducen a reordenamientos genómicos equilibrados o desequilibrados y sus impactos fenotípicos en la hemofilia. *Hemofilia* 2018; 24(5): 711-719.

Lefter M, Vis JK, Vermaat M, den Dunnen JT, Taschner PEM, Laras JFJ. Mutalyzer 2: Comprobador de nomenclatura HGVS de última generación. *Bioinformática* 2021; 37(18): 2811 -2817.

Li T, Miller CH, Driggers J, Payne AB, Ellingsen D, Hooper WC. Análisis de mutaciones de una cohorte de pacientes estadounidenses con hemofilia B. *Am J Hematol* 2014; 89(4): 375-379.

Liu Q, Nozari G, Sommer SS. Reacción en cadena de la polimerasa de un solo tubo para el diagnóstico rápido del punto caliente de inversión de la mutación en la hemofilia A. *Sangre* 1998; 92(4): 1458-1459.

Lyu C, Xue F, Liu X, Liu W, Fu R, Sun T et al. Identificación de mutaciones en los genes F8 y F9 en familias con hemofilia mediante secuenciación dirigida de alto rendimiento. *Hemofilia* 2016; 22(5): e427-e434.

Machado FB, Machado FB, Faria MA, Lovatel VL, Alves da Silva AF, Radio CP et al. Las marcas epigenéticas 5meCpG vecinas a una repetición corta en tándem del promotor central conservado en primates indican inactivación del cromosoma X. *PLoS One* 2014; 9(7): e103714.

Manderstedt E, Nilsson R, Lind-Hallden C, Ljung R, Astermark J, Hallden C. Resecuenciación dirigida de F8, F9 y FVW: caracterización de los datos de Ion Torrent e implicaciones clínicas para el cribado de mutaciones. *PLoS One* 2019; 14(4): e0216179.

McVey JH, Rallapalli PM, Kemball-Cook G, Hampshire DJ, Giansily-Blaizot M, Gomez K, Perkins SJ, Ludlam CA. Bases de datos de variantes del factor de coagulación de la Asociación Europea de Hemofilia y Trastornos Afines (EAHAD): recursos importantes para médicos e investigadores de hemostasia. *Hemofilia* 2020; 26(2): 306-313.

Nisen PD, Waber PG. Patrones no aleatorios de metilación del ADN del cromosoma X en mujeres hemofílicas. *J Clin Invest* 1989; 83(4): 1400-1403.

Pan TY, Chiou SS, Wang CC, Wu SM. Separación de la inversión del intrón 22 tipo 1 y 2 de la hemofilia A mediante reacción en cadena de la polimerasa inversa modificada y electroforesis en gel capilar. *Talanta* 2014; 130: 328-335.

Pezeshkpoor B, Czogalla KJ, Caspers M, Berkemeier AC, Liphardt K, Ghosh S, Kellner M, Ulrich S, Pavlova A, Oldenburg J. Variantes en el propéptido FIX asociadas con la hipersensibilidad al antagonista de la vitamina K: análisis funcional y datos adicionales que confirman las mutaciones fundadoras comunes. *Ann Hematol* 2018; 97(6): 1061-1069.

Radio CP, Rossetti LC, Abelleyro MM, Tetzlaff T, Candela M, Neme D et al. Las correlaciones fenotipo-genotipo en portadores de hemofilia A son consistentes con el papel binario de la fase entre F8 y la inactivación del cromosoma X. *J Thromb Haemost* 2015; 13(4): 530-539.

Rallapalli PM, Kemball-Cook G, Tuddenham EG, Gomez K, Perkins SJ. Una base de datos interactiva de mutaciones para el factor IX de la coagulación humana proporciona nuevos conocimientos sobre los fenotipos y la genética de la hemofilia B. *J Thromb Haemost* 2013; 11(7): 1329-1340.

Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J et al. Estándares y guías para la interpretación de variantes de secuencia: una recomendación de consenso conjunta del Colegio Americano de Genética Médica y Genómica y la Asociación de Patología molecular. *Genet Med* 2015; 17(5): 405-424.

Rossetti LC, Candela M, Bianco RP, de Tezanos Pinto M, Western A, Goodeve A, Larripa IB, De Brasi CD. Análisis de la inversión del gen del factor VIII intrón 1 en familias argentinas con hemofilia A severa y revisión de la literatura. *Fibrinólisis de coágulos sanguíneos* 2004; 15(7): 569-572.

Rossetti LC, Radio CP, Larripa IB, De Brasi CD. Desarrollo de una nueva generación de pruebas para el genotipado de los reordenamientos causales de hemofilia que involucran puntos calientes int22h e inti h en el gen del factor VIII. *J Thromb Haemost* 2008; 6(5): 830-836. Salviato R, Belvini D, Radossi P, Tagariello G. Fusión de alta resolución para el análisis de mutaciones del gen F9 en pacientes con hemofilia B. *Transfus de sangre* 2019; 17(1): 72-82.

Shen BW, Spiegel PC, Chang CH, Huh JW, Lee JS, Kim J, Kim YH, Stoddard BL. Estructura terciaria y organización del dominio del factor VIII de coagulación. *Sangre* 2008; 111(3): 1240-1247.

Shen W, Gu Y, Zhu R, Zhang L, Zhang J, Ying C. Las variaciones en el número de copias del gen F8 se asocian con tromboembolismo venoso. *Blood Cells Mol Dis* 2013; 50(4): 259-262.

Simioni P, Cagnin S, Sartorello F, Sales G, Pagan! L, Bulato C et al. Duplicación parcial del gen F8 (factor VIII Padua) asociada a niveles elevados de factor VIII y trombofilia familiar. *Sangre* 2021; 137(17): 2383-2393.

Simioni P, Tormene D, Tognin G, Gavasso S, Bulato C, Lacobelli NP, Finn JD, Spiezia L, Radu C, Arruda VR. Trombofilia ligada al cromosoma X con un mutante del factor IX (factor IX Padua). *N Engl J Med* 2009; 361(17): 1671-1675.

Srivastava A, Santagostino E, Dougall A, Kitchen S, Sutherland M, Pipe SW et al. Directrices de la FMH para el tratamiento de la hemofilia, 3.ª edición. *Hemofilia* 2020; 26 Suppl 6: 1-158.

Sun P, Ma L, Diao G, Li CO, Lin FZ. Aplicación del análisis de ligamiento indirecto y genotipado directo a la detección de portadores de hemofilia A en Sichuan, China. *Genet Mol Res* 2015; 14(3): 8229-8235.

van Galen KPM, d'Oiron R, James P, Abdul-Kadir R, Kouides PA, Kulkarni R et al. Una nueva nomenclatura de portadores de hemofilia para definir la hemofilia en mujeres y niñas: Comunicación del SSC de la I STH. *J Thromb Haemost* 2021; 19(8): 1883-1887.

TEMAS TRATADOS

- ✓ Resultados inesperados en una muestra de prueba individual
 - ✓ Resultados CCI fuera de rango
 - ✓ Cómo investigar resultados fuera de consenso en encuestas externas de evaluación de la calidad
-

Resultados inesperados en una muestra de prueba individual: Los problemas relacionados con las pruebas de coagulación ocurren en todos los laboratorios de coagulación, independientemente de los métodos, reactivos y equipos que se utilicen. Los resultados inexactos pueden ocurrir como consecuencia de problemas con una muestra en particular debido a problemas con la muestra en sí. Esto puede ser consecuencia de un procesamiento inadecuado de la recolección de muestras o del almacenamiento antes del análisis. Estos temas se discuten en la Parte 3 de este manual. También se dispone de recomendaciones sobre el control de las variables preanalíticas, específicamente relacionadas con la hemofilia y los trastornos relacionados (Kitchen et al, 2020), y en relación con la recolección de muestras (Kitchen et al, 2021a) y el procesamiento (Kitchen et al, 2021b) en todos los aspectos de las pruebas de laboratorio de coagulación, y no se analizan más aquí. Pueden ocurrir problemas específicos durante el análisis de una muestra que se relacionan con el reactivo o la manipulación de la muestra durante esa prueba específica, a pesar del análisis exitoso de muestras adyacentes justo antes o justo después de la muestra con un resultado cuestionable. Muchos analizadores utilizan una sonda para aspirar automáticamente las muestras y dichas sondas a veces descienden hasta la detección de un líquido y luego aspiran un volumen de muestra de prueba adecuado para completar la prueba. Si esa muestra de prueba tiene burbujas en la superficie, esto puede conducir a un muestreo incorrecto con un volumen inadecuado, después de resultados falsamente anormales, como resultados de pruebas de detección falsamente prolongados o una actividad falsamente baja en ensayos calibrados. El pipeteo inexacto de los reactivos durante el análisis también puede dar lugar a resultados inexactos, por ejemplo, si una sonda utilizada para el movimiento de reactivos en un analizador se ha desalineado. Es probable que esto afecte a los resultados de varias muestras. Puede ser útil correr 10 réplicas de la misma muestra para evaluar la precisión de los resultados, que normalmente se ve comprometida si se ha producido una desalineación de la sonda. Las áreas de reactivos en los analizadores generalmente se mantienen a una temperatura constante, a menudo enfriadas por debajo de la temperatura ambiente, pero con mezclas de reacción calentadas a 37 ° C durante el análisis. La mayoría de los resultados de las pruebas de coagulación dependen en gran medida de la temperatura, por lo tanto, cualquier desviación fuera de un rango estrecho aceptable en el enfriamiento de los regentes o, en particular, en el calentamiento de las mezclas de reacción, puede causar resultados inexactos que generalmente son falsamente anormales. Los resultados falsos normales son mucho más raros que los falsos anormales, y solo se observan regularmente en relación con el falso acortamiento de TTPA como consecuencia de problemas preanalíticos como la hemólisis in vitro. Los coagulómetros totalmente automatizados a menudo utilizan soluciones de lavado/limpieza que se enjuagan a través de sondas entre operaciones sucesivas de pipeteo. Este proceso normalmente evita el arrastre de la muestra o el reactivo de una prueba a la siguiente mezcla de reacción, pero tales eventos han ocurrido. Por ejemplo, en el pasado se ha producido un arrastre parcial de la muestra a una mezcla de reacción siguiente en relación con componentes patológicos de la muestra, como anticuerpos antifosfolípidos o paraproteínas, o relacionados con fármacos terapéuticos, como el emicizumab, que puede causar un falso acortamiento de TTPA en la muestra siguiente. Los componentes de los reactivos, como el neutralizador de heparina

en los reactivos, se han trasladado a las siguientes muestras, lo que podría provocar la pérdida de la actividad de la heparina si está presente en la siguiente muestra. Los efectos de arrastre de reactivos se han erradicado en gran medida cuando se combinan reactivos e instrumentos del mismo fabricante. Es más probable que esto sea un problema si se utiliza un reactivo de un fabricante en un analizador de un fabricante diferente, si esa combinación no ha sido validada para su uso. Es fundamental que los laboratorios sigan las guías de la empresa de diagnóstico sobre los intervalos permitidos entre las visitas de mantenimiento preventivo para minimizar los riesgos de generar resultados de muestras de pacientes que no se pueden divulgar de forma segura para las decisiones de tratamiento del paciente. Es importante que los laboratorios reciban suficiente información clínica o del paciente, como se necesita para que el personal de laboratorio experimentado identifique resultados de pruebas inesperados o inusuales siempre que sea posible. Cualquier resultado inesperado de la prueba debe volver a analizarse para excluir la posibilidad de error analítico. Cuando se excluya un error analítico como explicación de un resultado inesperado que no parece ajustarse al cuadro clínico del paciente, se debe obtener una muestra repetida para confirmar el resultado.

Resultados de CCI fuera de rango: Como se describe en la Parte 2 de este manual, es conveniente mantener un registro de los resultados de CCI (control de calidad interno) en cada material de CCI en forma de gráfico. Muchos analizadores utilizan el enfoque de Levey-Jennings, como se muestra en la Figura 23. Hay sistemas disponibles para ayudar a los laboratorios a solucionar problemas, como las reglas de Westgard (www.westgard.com) que utilizan 5 reglas de control diferentes. Estos tienen pocas falsas alarmas y dan confianza en la detección de errores. Por otro lado, los patrones de pruebas de CCI necesarios para el uso efectivo de tales sistemas no son adecuados para el uso regular en la mayoría de los laboratorios de coagulación. Las posibles consecuencias clínicas de los errores de laboratorio en el tratamiento de los pacientes con hemofilia y trastornos relacionados significan que un enfoque cauteloso de los resultados de CCI fuera de rango es más seguro para los pacientes. Por esta razón, se debe evaluar cualquier CCI fuera del rango y, durante la investigación, se deben suspender las pruebas y el informe de los resultados del paciente. Es útil identificar el caso de un CCI fuera de los límites para ayudar a evitar futuros retrasos en el procesamiento de las muestras. Si una repetición de la prueba en el mismo vial de material de control de calidad genera un resultado que está claramente dentro del rango, entonces puede haber un problema con el analizador que se puede evaluar realizando 10 réplicas en la misma muestra de prueba. Se indica un problema del analizador si hay una gran variabilidad entre las réplicas. Más a menudo, en las pruebas de coagulación de rutina, una prueba repetida en el mismo material vuelve a estar fuera de rango, y la sustitución del material por un nuevo vial o alícuota genera un resultado dentro del rango, lo que confirma que el propio material CCI fue la fuente del problema. En este caso, los resultados para el paciente son seguros para ser publicados. Si, por otro lado, la prueba de un nuevo vial/alícuota de CCI también genera un resultado similar fuera de rango, existe un problema con el sistema de prueba que también afectaría los resultados del paciente. En este caso, los reactivos utilizados para la prueba deben reemplazarse en secuencia por un nuevo CCI después de cada reemplazo de un reactivo. Una vez que un reactivo de reemplazo conduce a un resultado de CCI dentro del rango, ese reactivo se identifica como la fuente del problema. Esto debe anotarse en los registros de CCI para que se puedan identificar patrones e iniciar una nueva evaluación de la estabilidad y el uso del reactivo. Si la sustitución de todos los reactivos relevantes sigue estando asociada a resultados fuera de rango, ese analizador debe retirarse del uso a la espera de la revisión por parte del fabricante y el laboratorio debe cambiar a un coagulómetro de respaldo, idealmente un coagulómetro alternativo que proporcione los mismos resultados o, en el caso de las pruebas con criterios de valoración de coagulación, una técnica manual (véase la Parte 4 de este manual). Cualquier resultado del paciente obtenido desde el resultado anterior de CCI dentro del rango debe revisarse con pruebas repetidas para establecer en qué parte de la secuencia de la prueba de la muestra puede haber comenzado el problema. Si se han publicado los resultados de los pacientes de muestras analizadas después de la CCI anterior dentro del rango, el laboratorio debe volver a realizar la prueba y recordar cualquier resultado que no esté conforme, y también debe revisar sus protocolos de prueba de CCI, ya que las pruebas de CCI adecuadas deben evitar la necesidad de recordar los resultados del paciente. La Figura 23 muestra el diagrama de Levey-Jennings de los resultados del CCI del TTPA.

Las líneas rojas punteadas muestran los límites superior e inferior del rango aceptable para este material. La primera serie de resultados se encuentra dentro del intervalo distinto del límite inferior. La segunda sección muestra un aumento gradual y progresivo de los tiempos de coagulación. Esta tendencia se produce si un componente de la prueba cambia gradualmente con el tiempo. Es poco probable que esto ocurra en relación con el material CCI liofilizado comercial almacenado de acuerdo con las instrucciones del fabricante, pero puede ocurrir si el material CCI se ha preparado localmente como se describe en la Parte 2. Las causas alternativas podrían ser un cambio gradual en uno de los reactivos si no se almacena adecuadamente o un deterioro gradual en algún aspecto del sistema de detección de puntos finales utilizado (por ejemplo, un deterioro en la fuente de luz de un sistema fotoóptico). Este tipo de problemas son raros con los coagulómetros automatizados modernos.

Los resultados del CCI - TTPA muestran una tendencia

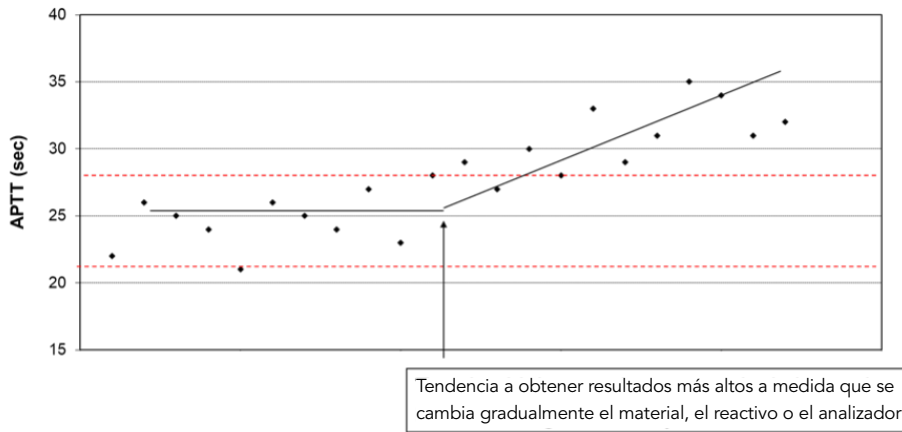


Gráfico CCI TTPA- Muestra de CCI inestable

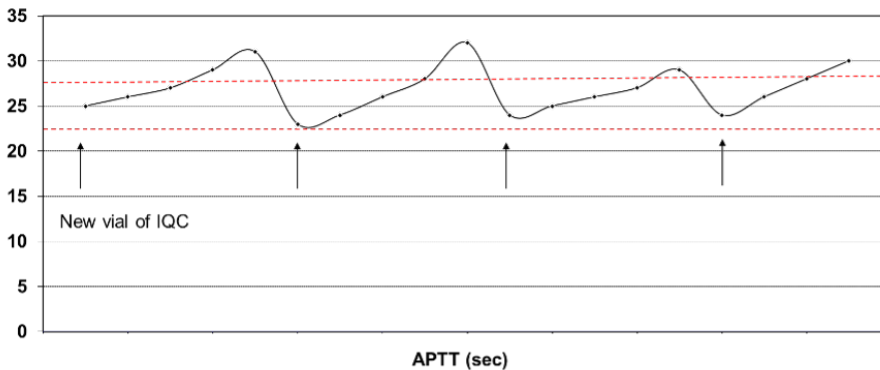


Figura 23. El diagrama de Levey-Jennings de TTPA da como resultado un material CCI inestable. Las líneas rojas punteadas muestran los límites superior e inferior del rango aceptable para este material. Cada flecha negra fija indica cuándo se cargó un nuevo vial de CCI en el analizador. Por cada nuevo vial se produce un aumento gradual de TTPA a lo largo del tiempo. Este ejemplo ocurrió debido a un material CCI congelado preparado localmente que era inestable después de la descongelación. En principio, esto también puede ocurrir después de la reconstitución de muestras liofilizadas si no se prepara adecuadamente o si el agua utilizada para reconstituir está contaminada.

Cómo investigar resultados fuera de consenso en encuestas externas de evaluación de la calidad: La participación en pruebas de aptitud o EQA es un requisito esencial para que un laboratorio garantice que produce resultados precisos. Los organismos de acreditación que evalúan según las normas ISO como la ISO 15189 (2022) lo exigen para cualquier prueba en la que se disponga de EQA. La FMH supervisa

un IEQAS centrado en la hemofilia y los trastornos relacionados (véase la Parte 2 de este manual). Los resultados obtenidos en los ejercicios de EQA se pueden utilizar para identificar problemas importantes relacionados con la precisión y exactitud de las pruebas de laboratorio de coagulación, siempre que el material de prueba en el programa EQA sea conmutable con las muestras de pacientes (es decir, se comporte de la misma manera en un método particular que lo harían las muestras de pacientes). La resolución eficaz de los resultados de la EQA que no están dentro del consenso de los resultados en otros centros, es importante para garantizar un manejo seguro del paciente. A la hora de considerar los resultados periféricos de la EQA, hay una serie de cosas que deben tenerse en cuenta. Un resultado local fuera del objetivo derivado de los resultados en otros centros, es menos preocupante si la diferencia no es lo suficientemente grande como para afectar el manejo del paciente. Una diferencia clínicamente significativa es mucho más problemática que una diferencia estadística que no se predice que altere el diagnóstico o el tratamiento de un paciente.

Un solo resultado que sea marcadamente diferente de la media o mediana de los resultados en otros centros, en la medida en que el manejo del paciente se vería afectado si la muestra hubiera sido de un paciente en el laboratorio, debe investigarse más a fondo. Esto podría incluir lo siguiente:

- i) Comprobar que la muestra se almacenó correctamente en el momento de su recepción, que se reconstituyó correctamente y que la prueba se realizó de acuerdo con el procedimiento escrito para ese método. Si se pensara que el problema se limitaba al análisis de la muestra de EQA, los resultados del paciente no se verían afectados.
- ii) Comprobar que el control de calidad interno en el momento en que se realizó la prueba de EQA fue satisfactorio. De lo contrario, es probable que haya habido un problema con las pruebas que podría haber afectado los resultados de los pacientes y los resultados de los pacientes deben revisarse.
- iii) Consideración de los detalles particulares de la muestra de ensayo. Si son anormales, los resultados obtenidos podrían ser una consecuencia del defecto particular en la muestra de EQA.

Cuando un laboratorio tiene resultados atípicos en encuestas consecutivas que se realizan a lo largo de varias encuestas, es necesaria una investigación que debe tener en cuenta el patrón en la relación entre los resultados locales y la media o mediana de los resultados en otros centros que utilizan una metodología similar. Además de las investigaciones posteriores a un solo resultado atípico mencionado anteriormente, se debe considerar lo siguiente:

- i) Se debe evaluar el impacto clínico de los resultados. Es posible que, para un ensayo con muy buena precisión, un laboratorio pueda estar persistentemente fuera de consenso, pero aún así registrar resultados relativamente cercanos al objetivo, sin consecuencias clínicas. También es posible que si se emplea un rango de referencia determinado localmente, cualquier sesgo en los resultados del paciente se compense con un rango de referencia apropiado.
- ii) Los resultados que son consistentemente altos o consistentemente bajos en comparación con la media o la mediana de los resultados, a menudo se relacionan con la calibración. Por lo general, los laboratorios con tales problemas tienen una curva de calibración establecida en algún momento en el pasado que no es apropiada para las pruebas actuales, ya sea debido a un cambio en el número de lote de un componente del ensayo o porque la variabilidad diaria en los resultados de las pruebas requiere una nueva calibración junto con el análisis de las muestras de prueba. La recalibración suele resolver este problema en los centros que utilizan una curva de calibración histórica. Se debe considerar la posibilidad de que se haya asignado una potencia inapropiada al calibrador, aunque sea poco frecuente. Al investigar la posibilidad de un problema relacionado con la calibración, puede ser útil analizar una muestra con un valor asignado de forma independiente como muestra de prueba para comprobar cuánto se están sobreestimando o subestimando los resultados de las muestras de prueba. Dicho material también se puede utilizar para realizar una nueva calibración. El programa IEQAS de la FMH tiene permiso para suministrar un vial del estándar de plasma ISTH SSC para este

tipo de investigación de solución de problemas. Esto ha asignado valores para una serie de diferentes parámetros de coagulación. El efecto de una nueva calibración se puede evaluar mediante el análisis de un pequeño grupo de muestras de prueba antes y después de la nueva calibración. El patrón de plasma SSC no está disponible para su uso rutinario en la calibración de métodos de ensayo locales.

- iii) Los resultados por encima de la media o la mediana en algunas encuestas, y por debajo de la media o la mediana en otras, sugieren imprecisión del ensayo. Esto puede ocurrir como consecuencia de un mal mantenimiento de los instrumentos, un manejo inadecuado de los reactivos (es decir, reconstitución o almacenamiento), inestabilidad de los reactivos o problemas relacionados con la formación o la competencia del personal.

En la medida de lo posible, el análisis de muestras repetidas una vez finalizada la investigación y después de realizar las mejoras necesarias es útil para confirmar el éxito o no de las intervenciones. Se debe realizar una revisión retrospectiva de los resultados de las encuestas anteriores de EQA, antes de que ocurra el problema de los resultados periféricos, junto con los registros de laboratorio de los cambios de lote, las calibraciones, el servicio de instrumentos y los cambios en la metodología, para evaluar si el cambio en el rendimiento corresponde a algún cambio interno relevante. El análisis de datos de EQA y los informes de rendimiento son, por naturaleza, retrospectivos, ya que el análisis y la presentación de informes normalmente tienen lugar algún tiempo después de que se realizaron las pruebas en el laboratorio. Por lo tanto, cualquier problema identificado puede haber afectado los resultados del paciente durante el mismo período de tiempo. El laboratorio debe revisar con los médicos los resultados de los pacientes anteriores para cualquier prueba en la que la EQA indique que podría haber habido una inexactitud clínicamente relevante. La revisión debe considerar si algún diagnóstico o tratamiento del paciente podría haberse visto afectado negativamente. Es posible que sea necesario repetir la prueba si el patrón de resultados atípicos podría haber afectado negativamente a los pacientes.

Referencias

Kitchen S, Adcock DM, Dauer R, Kristoffersen AH, Lippi G, Mackie I, Marlar RA, Nair S. Recomendaciones del Consejo Internacional de Normalización en Hematología (ICSH) para la recolección de muestras de sangre para pruebas de coagulación. *Int J Lab Hematol* 2021; 43(4): 571-580.

Kitchen S, Adcock DM, Dauer R, Kristoffersen AH, Lippi G, Mackie I, Marlar RA, Nair S. Recomendaciones del Consejo Internacional de Normalización en Hematología (ICSH) para el procesamiento de muestras de sangre para pruebas de coagulación. *Int J Lab Hematol* 2021; 43(6): 1272-1283.

Srivastava A, Santagostino E, Dougall A, Kitchen S, Sutherland M, Pipe SW et al. Directrices de la FMH para el tratamiento de la hemofilia, 3.ª edición. *Hemofilia* 2020; 26 Suppl 6: 1-158.

1184 rue Sainte-Catherine Ouest
Bureau 500
Montréal, Québec H3B 1K1 Canada
Tel.: (514) 875-7944
Fax: (514) 875-8916
Correo-e: wfh@wfh.org

www.wfh.org

