
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).

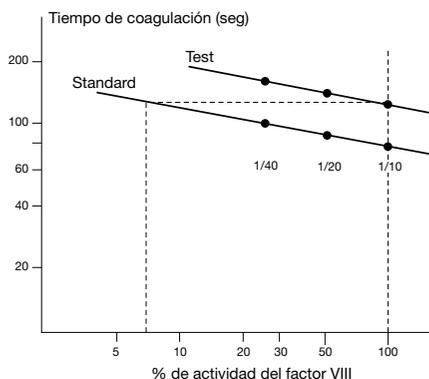


Figura 7. Gráfico del ensayo del FVIII

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 BDDractorVIlkC 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 (rFVIHFc). *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 dezaparvovec 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 elaparvovec. *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 roxaparvovec. *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.