



Importancia del factor VIII Cromogénico en el laboratorio de Hemostasia

BQD. Montserrat Jiménez Chavarría y Dr. Alejandro Morales de la Vega, Instituto LICON

Generalidades

La medición del FVIII en plasma de pacientes se realiza en varios escenarios, que incluyen: diagnóstico y manejo de enfermedades congénitas y adquiridas como Hemofilia A (deficiencia específica del factor), diagnóstico y manejo de la enfermedad de von Willebrand congénita y el síndrome de von Willebrand adquirido, así como la evaluación del riesgo de trombofilia asociado a concentraciones muy elevadas de FVIII.

Contar con un método exacto y sensible para la determinación de este factor es esencial para el apoyo en el diagnóstico. Actualmente hay disponibles tres tipos de ensayos principales para la determinación de FVIII, estos incluyen ensayo de coagulación de una etapa, ensayos de coagulación de dos etapas y el ensayo cromogénico; la finalidad de esta revisión es mostrar las características, diferencias, así como las interferencias que se pueden presentar en cada uno.

El ensayo de FVIII utilizado debe ser capaz de detectar niveles de FVIII debajo de 1 UI/ dL en hemofilia A severa. Los ensayos de FVIII son cruciales en el diagnóstico de hemofilia A, clasificando la gravedad y el seguimiento de la terapia con FVIII.

Descripción de Métodos

Ensayo coagulométrico o de una etapa

El principio del método para medir la actividad de FVIII en una etapa consiste en la medición del tiempo transcurrido en la formación de un coágulo y está basado en el tiempo de tromboplastina parcial activado (TTPa), es el más comúnmente utilizado en el laboratorio clínico. Mide la capacidad de una muestra de plasma del paciente para acortar el TTPa de un plasma deficiente de FVIII (el cual ha sido obtenido o de un paciente con hemofilia A severa o por inmunodepleción del FVIII). El plasma deficiente de FVIII y la muestra del paciente son incubadas previamente con el reactivo de TTPa el cual contiene un activador de contacto (dependiendo del reactivo y presentación, pueden ser: caolín, ácido elálgico, sílice, polifenoles por mencionar algunos) y fosfolípidos. Finalmente, tras la incubación se añade cloruro de calcio para promover la formación de fibrina midiendo el tiempo que tarda en generarse el coágulo. Este resultado es comparado con un estándar, es decir una curva de calibración generada a partir de diferentes muestras que contienen concentraciones conocidas del factor o bien de un calibrador el cual ha sido sometido a diferentes diluciones.

Los beneficios de esta metodología incluyen la simplicidad y la facilidad de automatización. El ensayo de una etapa puede ser óptimo para detectar niveles de FVIII normal o disminuido más que de concentraciones elevadas.

Los desafíos del ensayo de una etapa incluyen que tiene mayor probabilidad de verse afectado por la presencia de fármacos anticoagulantes, específicamente heparina, inhibidores directos de trombina, inhibidores directos de Xa, con respecto a las otras metodologías.

La utilidad clínica del ensayo de una etapa parece ser cuestionable ya que se han reportado falsos niveles altos de FVIII en comparación con el ensayo FVIII cromogénico o de dos etapas en casos de hemofilia A leve. Intermedios activos como FX y trombina pueden causar niveles imprecisos de FVIII con el ensayo de una etapa, ya que el ensayo está basado en la formación del coágulo, también ha sido informado que las concentraciones de heparina en exceso de 0.7 UI/mL causan una reducción en los niveles de FVIII cuando se mide por ensayos de una etapa en comparación, la misma cantidad de heparina tenía poco o ningún efecto cuando el FVIII se mide por método cromogénico.

La presencia de inhibidores de FVIII e inhibidores como anticoagulante lúpico (en síndrome de anticuerpos antifosfolípidos) también pueden interferir obteniéndose niveles bajos de FVIII en el ensayo de una etapa. Por lo tanto, el método cromogénico tiene distintas ventajas sobre el ensayo de una etapa al no presentar interferencias por la presencia de inhibidores o heparina. Esto hace que sea un ensayo más robusto que el de una etapa.

Ensayo Cromogénico

El ensayo de actividad de FVIII por método cromogénico se basa en un principio similar al ensayo de dos etapas. En la primera etapa, el plasma del paciente (que contiene la cantidad desconocida del FVIII funcional) se agrega a una mezcla de reacción que consiste de trombina o protrombina, FIXa, FX, calcio y fosfolípidos. Esto casi de inmediato produce FVIIIa que funciona formando un complejo con el FIXa, para activar al FX.

Cuando se detiene la reacción, se supone que la producción de FXa es proporcional a la cantidad de FVIII funcional presente en la muestra. La segunda etapa del ensayo mide la actividad del FXa a través de la escisión de

un péptido sintético similar al sustrato natural específico para el FXa que está ligado a un cromóforo (para-nitroanilina). Esta ruptura produce la liberación de para-nitroanilina dando reacción colorida que se puede medir fotométricamente por absorbancia a 405 nm. El color producido es directamente proporcional a la cantidad de FVIII funcional presente en la muestra interpolando la lectura en una curva de calibración estándar.

El ensayo cromogénico no se ve afectado por la presencia de FVIIIa similar al ensayo de dos etapas. También es menos probable que exista interferencia por heparina o inhibidores directos de la trombina en los ensayos de una etapa. Sin embargo, puede verse afectada por la presencia de inhibidores directos del FXa, que resulta en una actividad falsamente disminuida de FVIII, limitándonos un poco en la utilidad de estos ensayos para el diagnóstico de la hemofilia A así como su seguimiento.

Cabe resaltar que hoy día existe un medicamento **Emicizumab**, para el tratamiento de hemofilia en pacientes que han desarrollado inhibidores (anticuerpos anti FVIII) como resultado de las terapias de reemplazo del factor VIII, aproximadamente un tercio del total del reemplazo.

Emicizumab contiene anticuerpos monoclonales biespecíficos diseñados para posibilitar la unión de los factores IXa y X permitiendo que el proceso de la coagulación continúe sin la necesidad de reemplazar el FVIII en pacientes con hemofilia A. Siendo un tratamiento profiláctico (preventivo) que se administra por vía subcutánea para utilizarse una vez por semana o como el hematólogo lo considere.

Para pacientes que llevan este tratamiento está recomendado realizar el ensayo de FVIII Cromogénico en la titulación de inhibidores para evitar las interferencias que se pueden presentar.

Conclusión

El ensayo cromogénico se correlaciona de manera satisfactoria con el ensayo basado en la detección de la formación de coágulo de una etapa para muestras de pacientes normales, su precisión es mejor que el método coagulométrico de una etapa con niveles elevados de factor VIII, y no existen interferencias relacionadas con heparinas, inhibidores directos de la trombina o anticoagulante lúpico. Tanto la precisión y sensibilidad a niveles bajos de la actividad del factor VIII es similar a la de los ensayos coagulométricos. Puede ser posible reemplazar el ensayo basado en la detección de coágulo de una etapa por el método cromogénico.

El método cromogénico para medir la actividad del FVIII muestra ser superior al método coagulométrico de una etapa cuando se analizan muestras heparinizadas. Sin embargo, la estabilidad de ambos ensayos debe evaluarse más a fondo, determinando el efecto de otros factores externos, como FX, anticoagulante lúpico (APS), inhibidores de FVIII y trombina.

El ensayo cromogénico de FVIII se puede introducir al panel de pruebas diagnósticas y de monitorización en los laboratorios cuando se realice un estudio más profundo en personas con hemofilia A. Recientemente se ha recomendado que todos los pacientes con hemofilia y los centros de tratamiento de hemofilia implementen este método.

El ensayo cromogénico de FVIII está siendo cada vez más utilizado en la asignación de la potencia del FVIII para las terapias de reemplazo por los fabricantes de concentrados terapéuticos y solicitados por los médicos que manejan a pacientes con hemofilia A.



BIBLIOGRAFÍA

1. M., K. A. (2014). *Chromogenic factor VIII activity assay. American Journal of Hematology* , 781-783.
2. Steve Kitchen, A. M. (2010). *Diagnóstico de la hemofilia y otros trastornos de coagulación* . Montréal, Quebec : Federación Mundial de Hemofilia .
3. W. Pickering, M. H. (2016). *Factor VIII Chromogenic assays can be used for potency labeling and postadministration monitoring of N8-GP. Journal of Thrombosis and Haemostasis* , 1579-1587.
4. Wayne L. Chandler, M. C. (2003). *Comparison of three methods for measuring Factor VIII Levels in plasma. Coagulation and Transfusion Medicine*, 34-39.
5. Kitchen S, Signer-Romero K, Key NS. (2015). *Current laboratory practices in the diagnosis and management of haemophilia: a global assessment. Haemophilia*; 21: 550-7.
6. *Method recommendation for assignment of FVIII potency for high purity and recombinant FVIII concentrates – Chromogenic method recommended by Factor VIII and FIX Subcommittee of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis in 1993.*
7. *Chromogenic method adopted as the European Pharmacopoeia reference method in 1995 (replaced two-stage FVIII assay)*