



VI CONGRESO LATINOAMERICANO DE BIOQUIMICA CLÍNICA

II CONGRESO INTERNACIONAL DEL COLEGIO NACIONAL DE BACTERIOLOGÍA

¡El riesgo es que te quieras quedar!

Cartagena, Colombia 3 al 6 OCTUBRE 2024

Retos y desafíos en el diagnóstico de la Hemofilia

Retos y desafíos en el diagnóstico de la Hemofilia

Gloria Ramos Ramos

Bacteriologa Clínica Especialista en Hemostasia

Epidemióloga y Especialista en docencia universitaria

Docente de hemato-oncología U. Nacional

Directora Científica H&H lab.

Consultora externa de hemostasia

Líder del comité científico de Hemostasia

Latam CLAHT-FMH



Declaración de conflicto de intereses

Ninguno para esta conferencia

“La información y las opiniones expresadas en la presentación, son propiedad y responsabilidad del conferencista”.

No he empleado sistemas de inteligencia artificial 

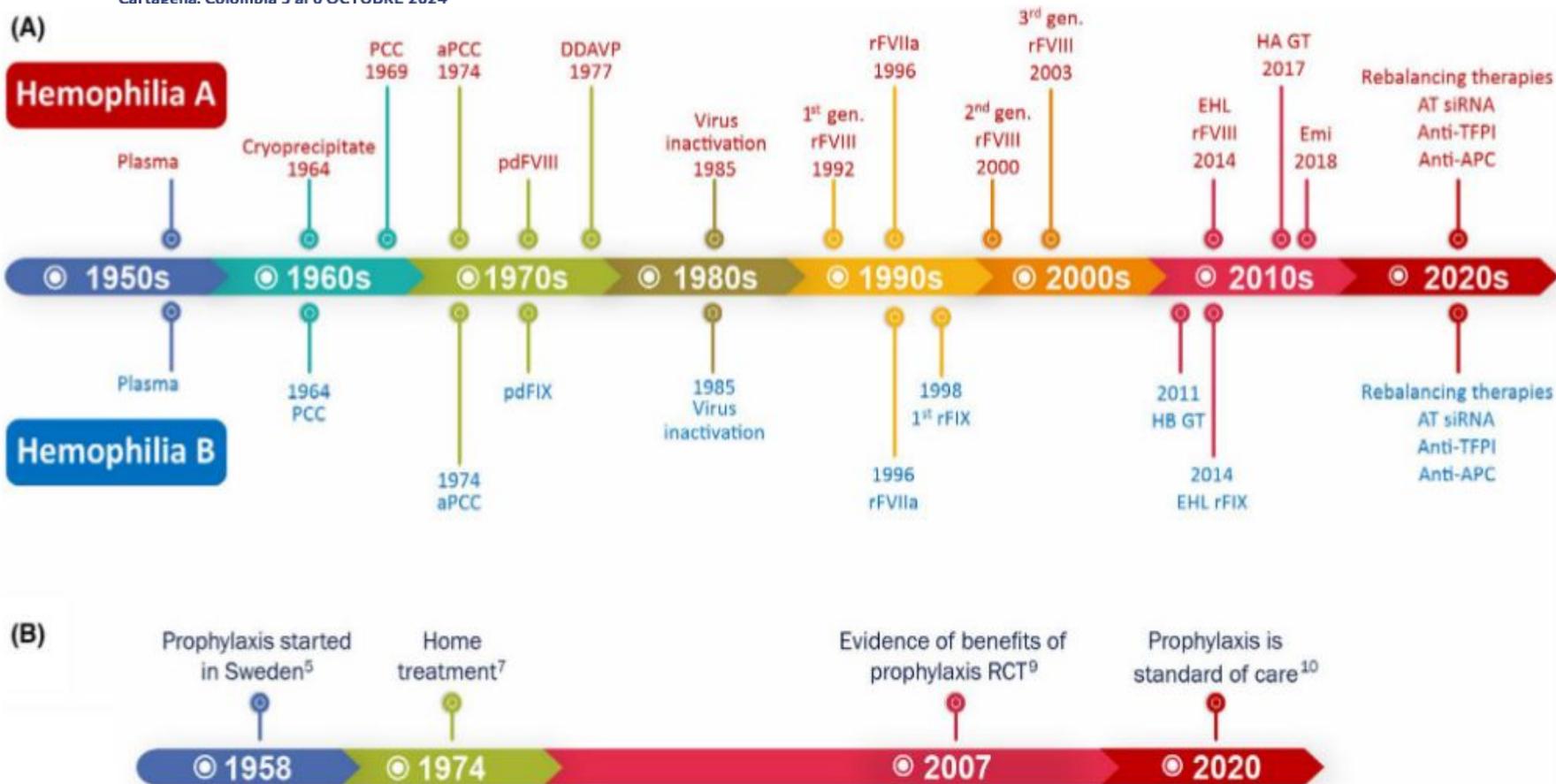


Temas a tratar

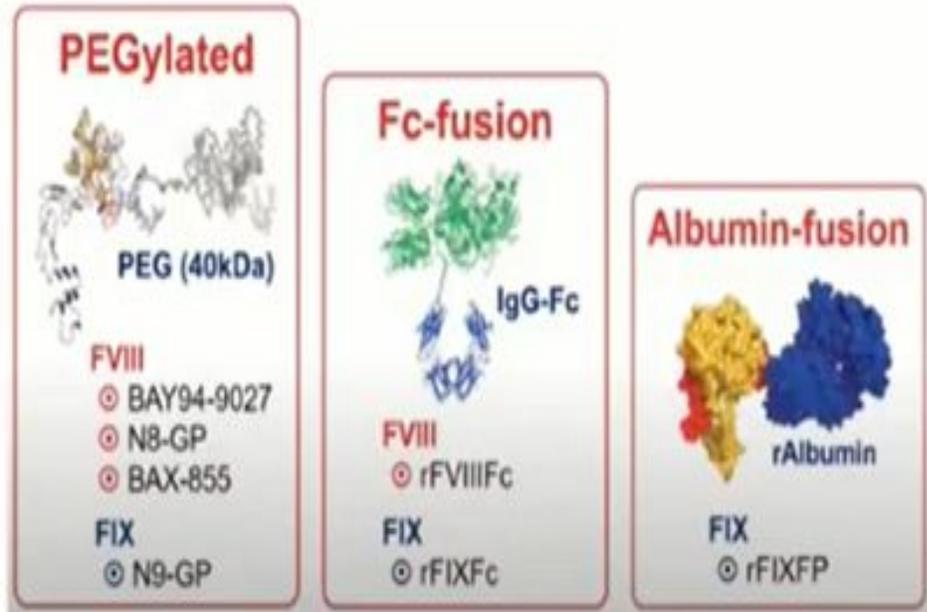
- Importancia del laboratorio en el diagnóstico de la Hemofilia
 - Pruebas del Laboratorio básicas
 - Factor VIII coagulométrico
 - Factor VIII Cromogénico
 - Importancia del paralelismo
- Papel del Laboratorio en el seguimiento y monitorización del tratamiento
- Mensajes para llevarnos a casa



En que momento de la hemofilia estamos

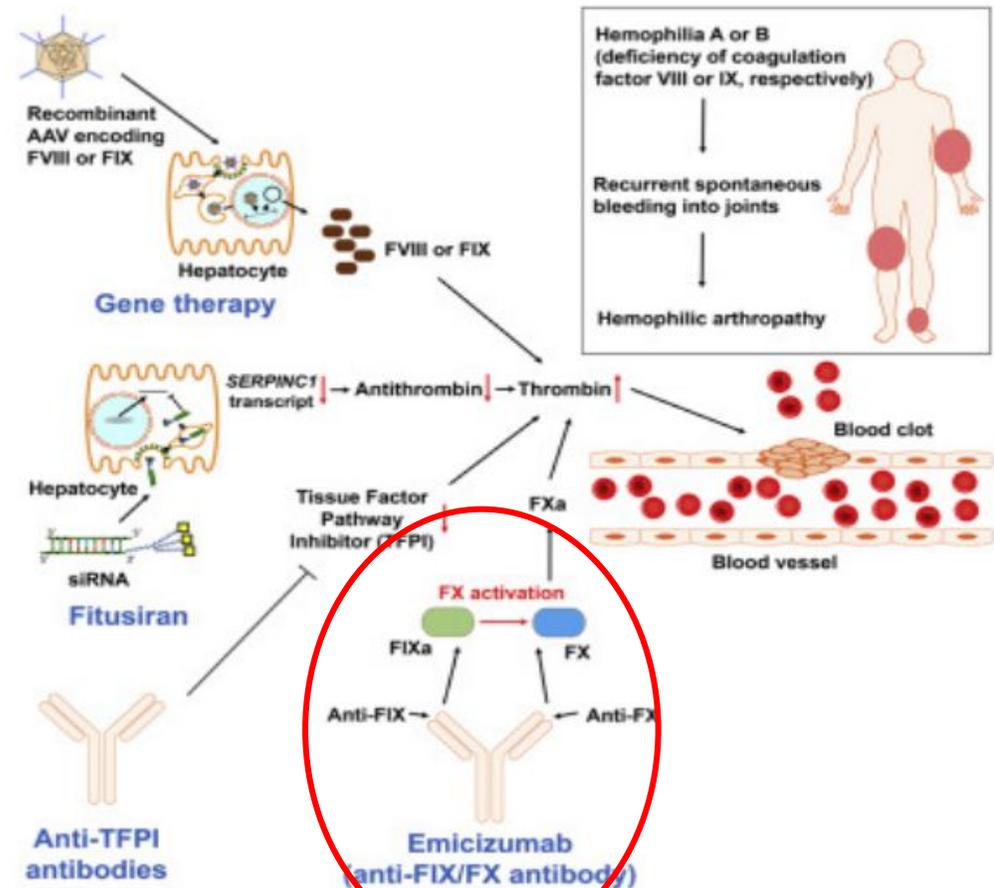


Vida media extendida EHL



Pacientes continúan enfrentando una carga de por vida de la terapia, una protección subóptima contra el sangrado, daño articular y el desarrollo de Ac.

Nuevas formas de tratar la hemofilia



Abordar estos problemas es la tarea de las nuevas terapias

Lo más importante, partir de lo básico

Inherited Bleeding Disorders of Secondary Hemostasis Lippi et al.

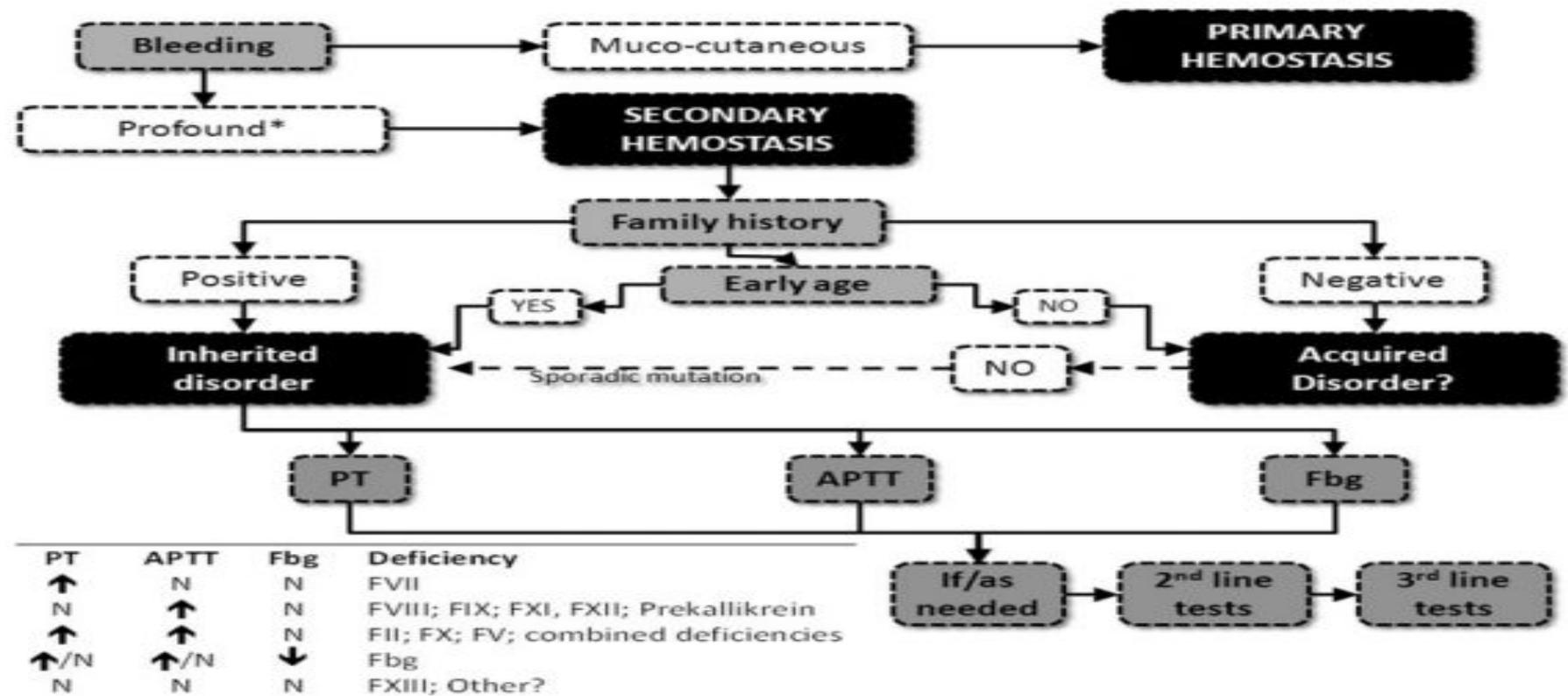


Fig. 3 Pragmatic approach for the screening of patients with inherited disorders of secondary hemostasis, where family history does not already identify a specific defect. *More frequent in, but not exclusive of, disorders of secondary hemostasis. APTT, activated partial thromboplastin time; Fbg, fibrinogen; PT, prothrombin time.

Diagnóstico y monitorización por el laboratorio

Las coagulopatías tienen características clínicas similares. El laboratorio es útil para realizar la orientación diagnóstica

Identificar el tipo de sangrado para orientar el tipo de pruebas a realizar iniciando por las de detección

La confirmación del diagnóstico se realiza dosificando los factores de la coagulación y pruebas más especializadas cuando se consideren necesarias

Variables preanalíticas (cumplimiento de condiciones y calidad de la toma de muestra y preparación de la misma)

Medicamentos que este recibiendo: Terapias de reemplazo de factor, terapias no sustitutivas, antifibrinolíticas

Comorbilidades propias del paciente que puedan causar interferencias con los resultados ej. AL

Recomendación 3.1.1 las pruebas de diagnóstico y la monitorización deben ser realizadas por Personal con conocimiento y experiencia, utilizando metodologías y tecnologías validadas para éste propósito



Adherencia en procesos preanalíticos (minimizar hasta 70%)

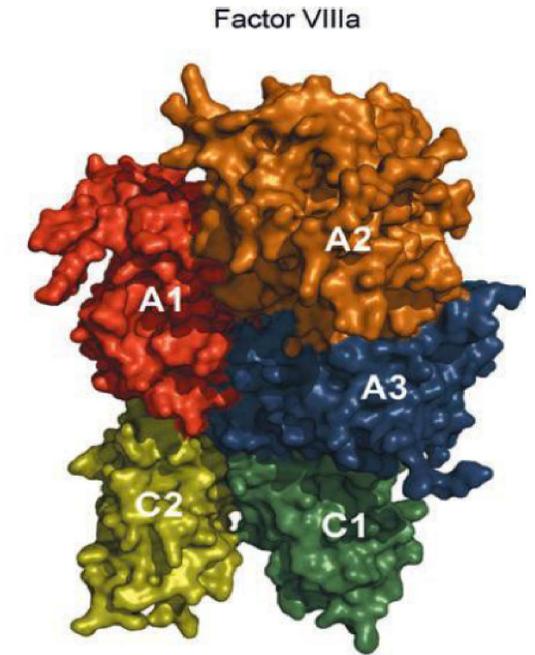
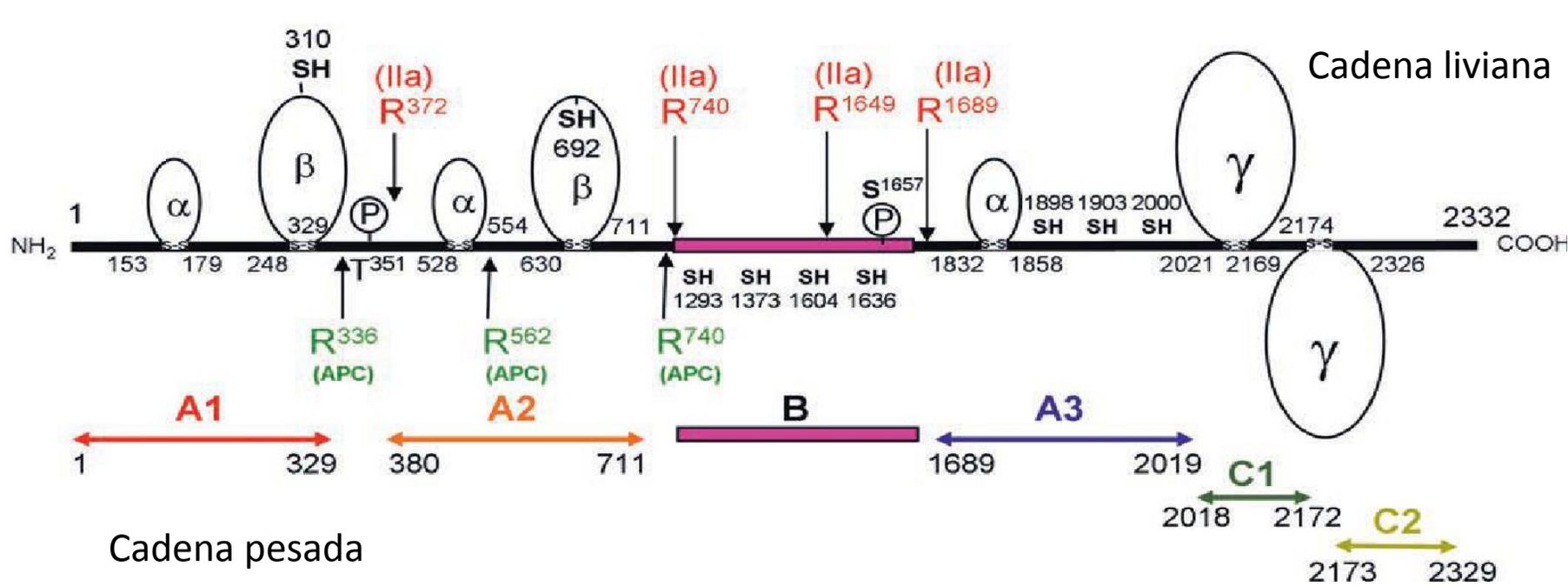
Comunicación con médico tratante y líder del programa

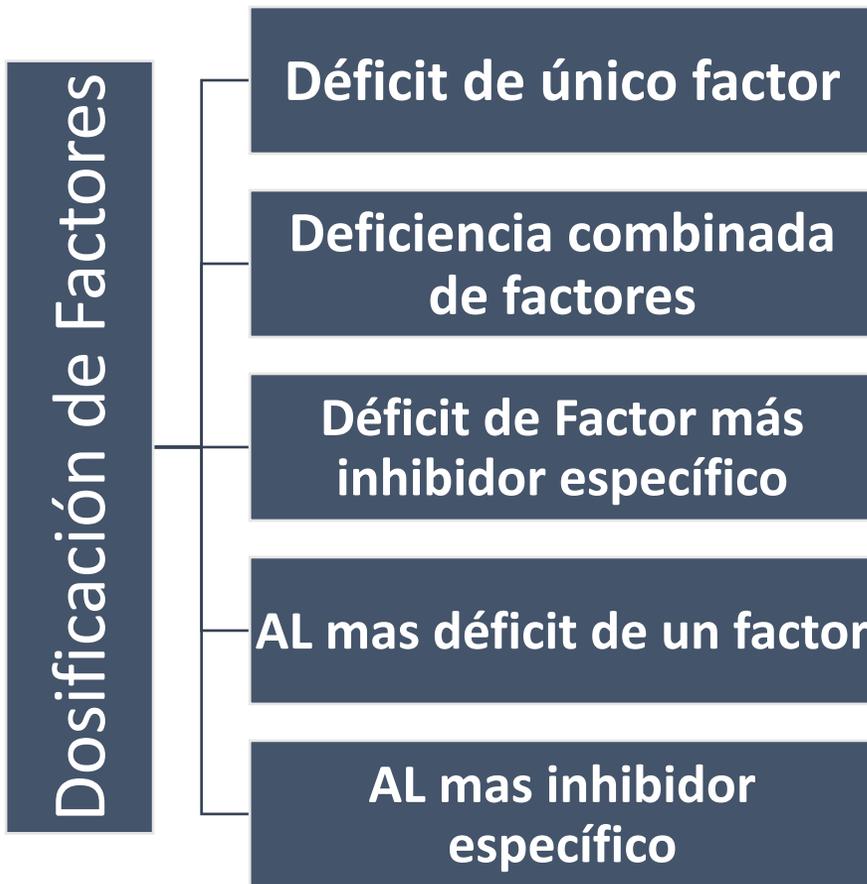
Lo que debe tener un laboratorio

Implementación de nuevas tecnologías y metodologías

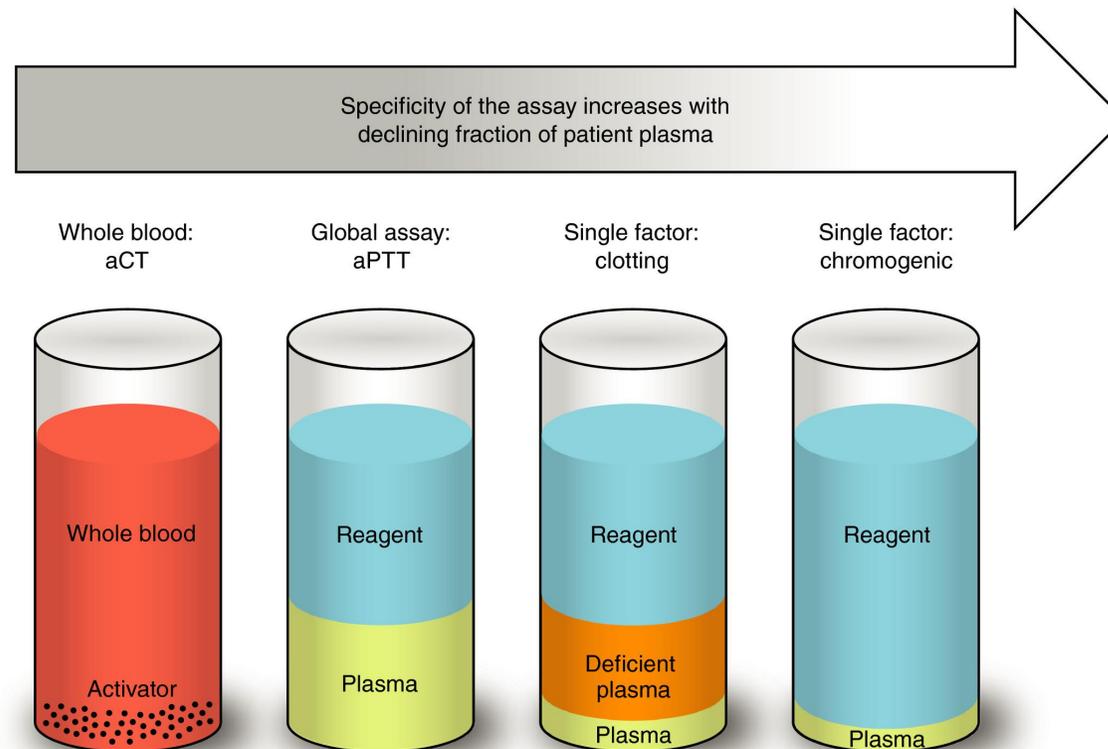
Establecer protocolos y procedimientos estandarizados

Síntesis y estructura de FVIII





Utilidad de la dosificación de factores

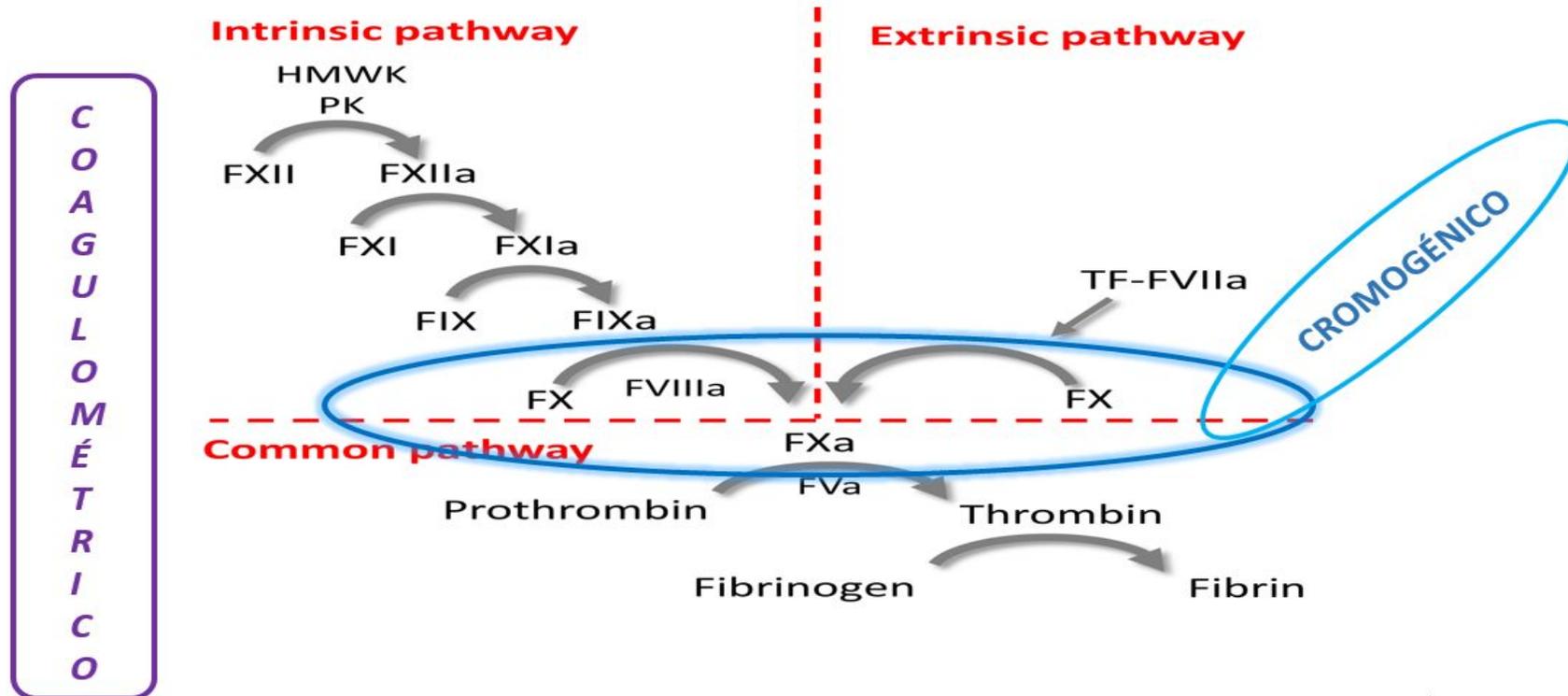


Diagnóstico diferencial

- Deficiencias combinadas de factores
 - ✓ FV y FVIII
 - ✓ FVII con FIX
 - ✓ Vitamino K dependientes
- Von Willebrand
 - ✓ EvW tipo 1 severo, 2N y tipo 3
- Deficiencias adquiridas
 - Hepatopatías
 - Inhibidores de interferencia
 - Enfermedad de von Willebrand adquirida
 - DOACS
 - Inhibidores específicos
 - Hemofilia adquirida

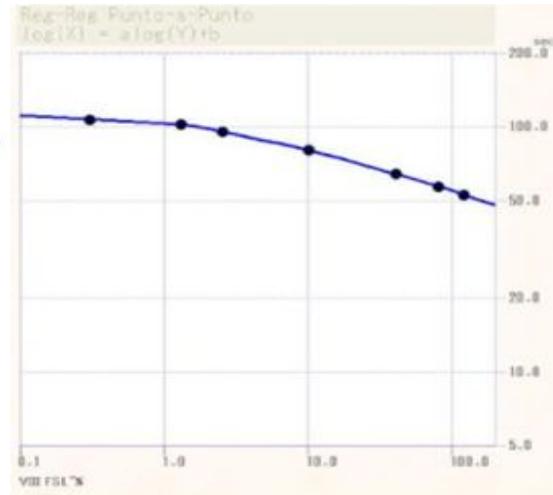
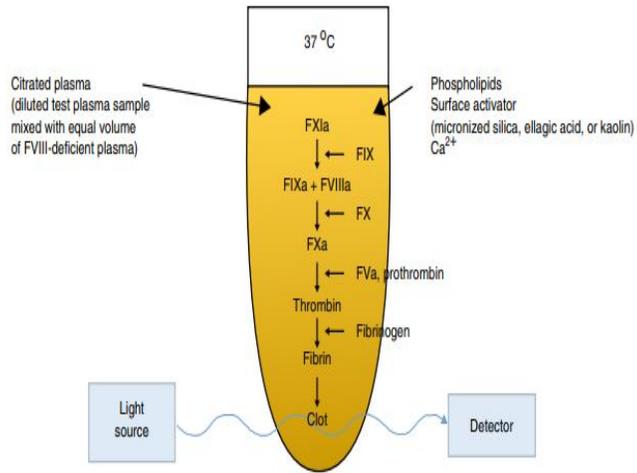


Dosificación de Factores

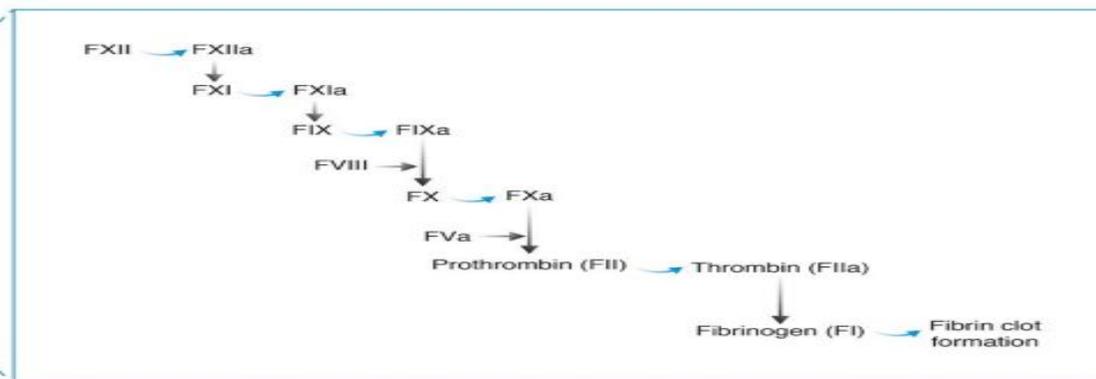
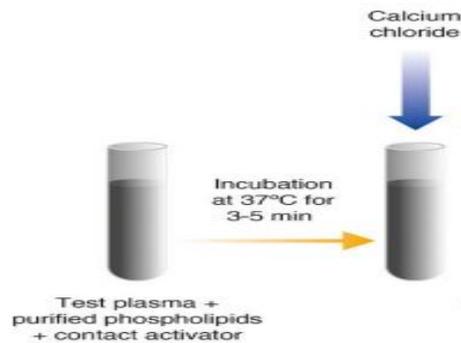


Métodos para medición de factores

Método coagulométrico



VIII FSL %	sec
0.3	107.1
1.3	102.3
2.5	95.5
10.0	80.2
40.0	64.2
80.0	57.0
120.0	52.7



Limitaciones y variables de interferencia pruebas de una etapa

- 20% de los pacientes Hemofílicos leves NO son detectados. Los resultados obtenidos pueden ser de dos a cinco veces superior al resultado del ensayo de coagulación de dos etapas o por método cromogénico.
- Frente a la dificultad diagnóstica se recurre a pruebas genéticas.
- El TTPa normal: No descarta la presencia de una hemofilia leve y NO descarta una portadora

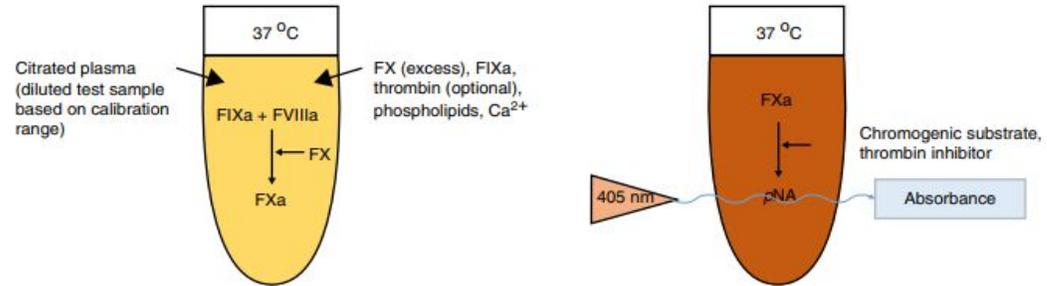
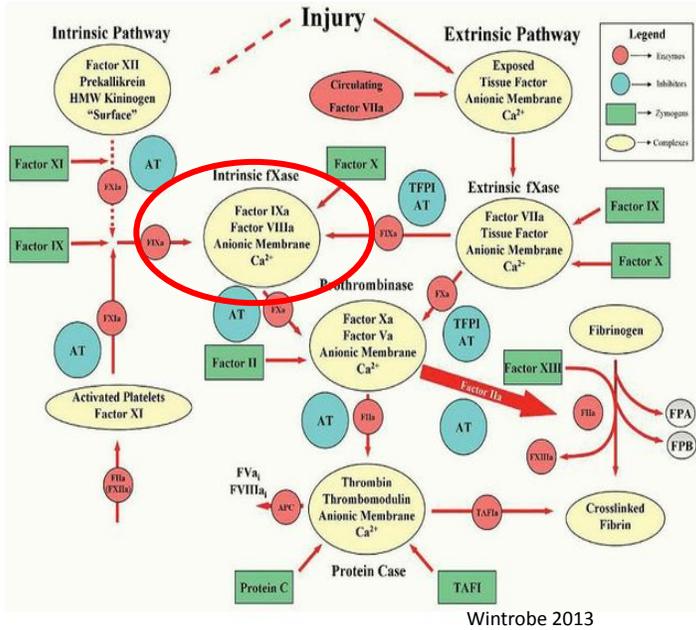
Según las guías internacionales, todos los laboratorios de coagulación de centros de hemofilia deberían utilizar ambos métodos para la determinación de la actividad del FVIII.

- Toma de muestra incorrecta puede activar el F.VIII
- Marcada variabilidad entre laboratorios numerosas combinaciones de reactivos APTT, instrumentos, patrones de calibración y plasmas deficientes en factores disponibles.
- Interferencia por anticoagulantes, específicamente heparina (niveles >0.7 UI/mL disminución de factores), inhibidores directos de trombina, inhibidores directos de Xa.



Métodos para medición de factores

Método cromogénico



Curva baja

Curva media

VIII ch %	dOD
1.3	0.0074
5.0	0.0116
20.3	0.0334
81.0	0.1089
121.5	0.1555

VIII ch % Low	dOD
0.1	0.0084
0.6	0.0098
2.4	0.0141
9.5	0.0347
14.3	0.0460

Utiliza componentes purificados de la vía de coagulación y elimina la necesidad de plasma deficiente de factor y formación de coágulos

Cortesía H&H Lab.



Ventajas

- No se ve afectado por la presencia de FVIIIa
- No muestra interferencia con heparinas estándar o inhibidores directos de la trombina
- No depende de un plasma deficitario en F. VIII

Desventajas

- Interferencia con inhibidores directos de Xa (falsa disminución de FVIII)
- El limitado número de kits de ensayo comercialmente disponibles.
- Tienden a ser mas costosos que las de un solo paso.

Ensayos cromogénicos

Diagnósticos discrepantes

Monitorizar Tratamientos de productos de VME

Seguimiento pacientes con Ac monoclonales

Titulación de inhibidores Metodología NB Para terapias sustitutivas

Interferencias por AL

Títulos bajos de inhibidor (0.6 a 2.0UB/mL)



Cuando usar ensayos cromogénicos

- Cuando los ptes tienen clínica de sangrado y los resultados con las pruebas coagulométricas dan normales. Generalmente en HA leve.
- Monitorizar productos de vida media extendida
- Interferencias por AL
- Títulos bajos de inhibidor (0.6 a 2.0UB/mL)
- Cuando no existe una recuperación esperada después de 30 minutos de haberse realizado la infusión del producto.



Table 2 Factors resulting in discrepancies between the one-stage clotting assay (OSA) and chromogenic substrate assay (CSA) for determination of FVIII activity

Factor	CSA/OSA ratio	Causes of discrepancy
Missense mutations in F8 Localized in the A1-A2-A3 domain interfaces	≤ 0.5	These mutations are associated with reduced stability of the FVIII heterodimer and FVIIIa heterotrimer. The effect is minimized in the OSA, whereas the incubation performed during the first step of the CSA favors a higher rate of A2 dissociation, leading to a reduction in observed FVIII activity.
Located close to or within thrombin cleavage, FIX-binding or VWF-binding sites	≥ 2.0	These mutations affect thrombin activation or FVIII binding to FIXa or VWF. The OSA is sensitive to alterations in thrombin binding or cleavage of FVIII, whereas the CSA is not.
rFVIII products	Approximately 1.1-1.3†	To be determined
Modifications to rFVIII BDD/B-domain truncation	> 1†	For ReFacto, the difference can be corrected by the type and concentration of the phospholipid used in the OSA. Some other B-domain-modified rFVIII products do not show significant discrepancies.
PEGylation	> 1†	Interaction of the PEG moiety with silica-based reagents in the OSA results in prolonged APTT and underestimation of FVIII activity.

APTT, activated partial thromboplastin time; BDD, B-domain deletion; FIXa, activated FIX; FVII (heparin glycol); rFVIII, recombinant factor. †Values of the CSA/OSA activities obtained with the CSA/the OSA.

Discrepancias en la dosificación del FVIII



Los defectos genéticos se agrupan en las interfaces de dominio A1-A2-A3. Estas mutaciones disminuyen la estabilidad del heterotrímero FVIIIa y aumento de la disociación A2.

(OSA > CSA)



Siete defectos genéticos se han descrito que se agrupan alrededor sitios de escisión de trombina (TCS) y sitios de unión al factor IX, causando una alteración en la activación de FVIII por trombina o una unión alterada de FVIII a FIXa. Mutaciones del FVIII en los sitios de unión del vWF. **(CSA > OSA)**

Del 20 a 30% de pacientes con hemofilia A leve, muestran discrepancias. Resultados 1.5 a 2 veces más bajo en los ensayos cromogénicos. Mas de 20 mutaciones de F. VIII hasta la fecha se han descrito con resultados discretamente menores de la actividad del F.VIII cromogénico.



Utilidad del paralelismo

- ✓ Aumentar la calidad de los resultados
- ✓ Diferenciar déficit de factor o inhibidor específico de un inhibidor de interferencia.
- ✓ Los inhibidores específicos presentan una unión de alta afinidad por el factor y este efecto NO se modifica por la dilución, se observa paralelismo en las curvas



Paralelismo en la dosificación de factores

Received: 18 December 2017 | Accepted: 24 April 2018
DOI: 10.1111/ijlh.12877

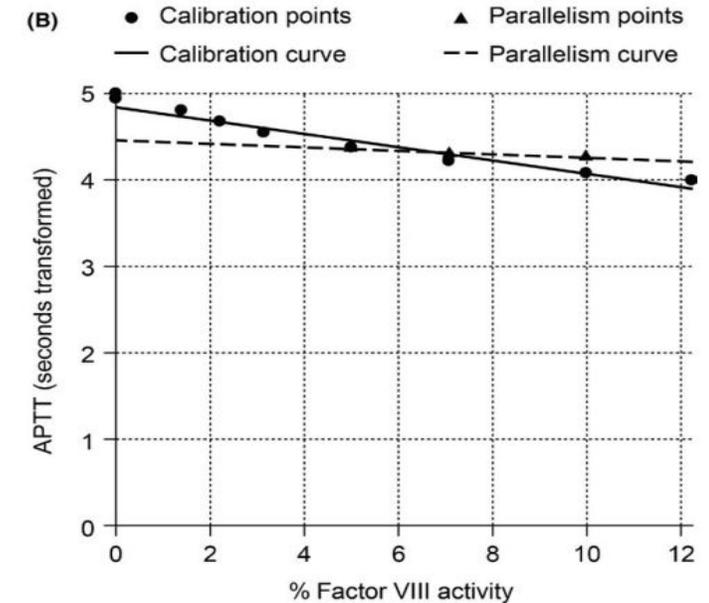
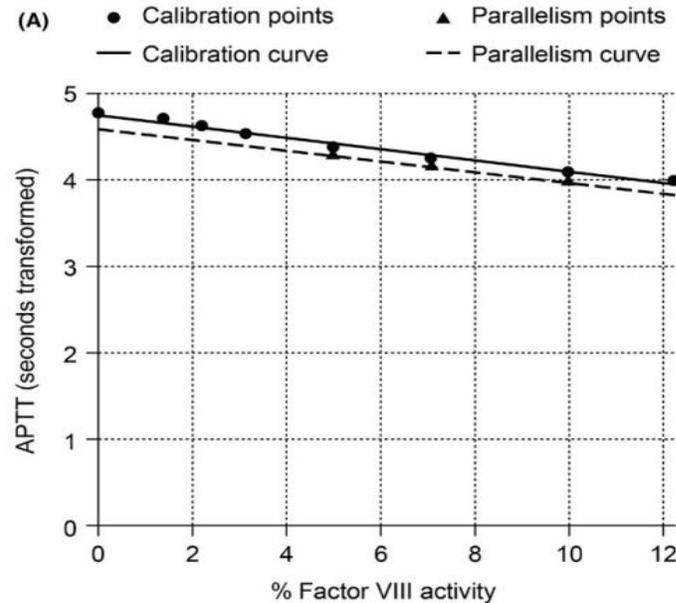
REVIEW ARTICLE

WILEY | ISLH International Journal of Laboratory Hematology

Advantages, disadvantages and optimization of one-stage and chromogenic factor activity assays in haemophilia A and B

D. M. Adcock¹ | K. Strandberg² | M. Shima³ | R. A. Marlar⁴

- Las pruebas de rutina son las de un solo paso
- Si el factor de medición es menor de 40% realizar dos o tres diluciones para evidenciar paralelismo ó no
- Si las líneas son paralelas estamos frente a una deficiencia de un factor.
- Las líneas no paralelas pueden deberse a :
 - Un error técnico.
 - la presencia de un inhibidor de interferencia tipo lúpico, heparinoide o PDF.



Paralelismo Recomendación 3.2.13:

- Para la investigación de laboratorio debida a una sospecha clínica de hemofilia usando ensayos de una etapa de FVIII/FIX, la FMH recomienda el análisis utilizando 3 diluciones diferentes de muestras de plasma de prueba.
- Los resultados de las diluciones de plasma de prueba y estándar deberían compararse mediante análisis de líneas paralelas.
- Una manera de valorar esto es calcular el coeficiente de variación (CV) de los 3 resultados usando la ecuación $CV = ([desviación\ estándar/mediana] \times 100)$.
- Si el CV de los 3 resultados fuera menor a 15%, entonces debería reportarse el promedio de los 3 resultados.
- Si el CV fuera mayor a 15%, deberían examinarse los resultados.
 - La presencia de inhibidores inespecíficos tipo Lúpico interfieren con algunos ensayos.
 - Algunos anticoagulantes terapéuticos también pueden mostrar este efecto de interferencia.
 - La actividad del factor se incrementa en el ensayo conforme aumenta la dilución del plasma. La actividad del factor se subestima cuando el plasma se diluye menos, y se obtiene un resultado más preciso de la actividad cuando el plasma de prueba se diluye más.



Ejemplos de paralelismo

Actividad del factor IX	Factor de dilución	Resultado final
10,0 UI/dL	directa	10,0 UI/dL
2,2 UI/dL	1:5	11,0 UI/dL
0,9UI/dL	1:10	9,0 UI/dL

Interpretación: Deficiencia de factor, no se presentó recuperación de los niveles con las diluciones

Actividad del factor XI	Factor de dilución	Resultado final
25,0 UI/dL	directa	25,0 UI/dL
4,7 UI/dL	1:10	47,0 UI/dL
4,6 UI/dL	1:20	92,0 UI/dL

Interpretación: se observa recuperación del factor con las diluciones realizadas, se recomienda descartar un inhibidor de interferencia





Molécula FVIII - EHL El que te quito Tamaño del PEG

Cartagena, Colombia 3 al 6 OCTUBRE 2024

Adynovate

20 kDa

40 kDa

Turoctocog alfa pegol

60 kDa

Damoctocog alfa pegol

Recomendaciones del Laboratorio

Monitorización

Cromogénicos o coagulométricos

Cromogénicos

Coagulométricos: activador A. Elálgico (actin FSL) y algún Silica como SynthaSIL.

Subestiman: APTT-SP, STA-PTT automate ó Triniclot HS.

Cromogénico bovino Siemens???

Coagulométricas: Actin FSL, algún Silica como SynthaSIL. Y pathromtin SL

Sobrestiman: Actin FS, CK Prest (Kaolin)

Subestiman: APTT-SP, STA-PTT automate.

Los ensayos cromogénicos y coagulométricos son robustos y se han utilizado durante todo el proceso y desarrollo de los productos unos con mejor desempeño que otros



- Lograr los niveles de factor plasmático apropiados
- Tener en cuenta variabilidad en las características clínicas propias del paciente.
- Estilos de vida del paciente
- La PK disminuye la probabilidad ensayo error para definir el régimen apropiado para cada paciente.

Objetivo de PK

- Direccionamiento
- Exactitud
- Control de sangrado
- Número de infusiones
- Costos
- Aplicabilidad
- Compromiso
- Carga de la enfermedad



Farmacocinética

Tiempos de muestreo

F. VIII

Protocolo de tres muestras
Separadas de 12 horas.

4 - 8 h

16 - 28 h

40 - 60 h

La muestra 24 horas es la mas importante

FVIII EHL

Adicionar 60 – 84 h

F. IX

Protocolo de dos muestras
Separadas de 24 horas.

24 - 36 h

48 - 60 h

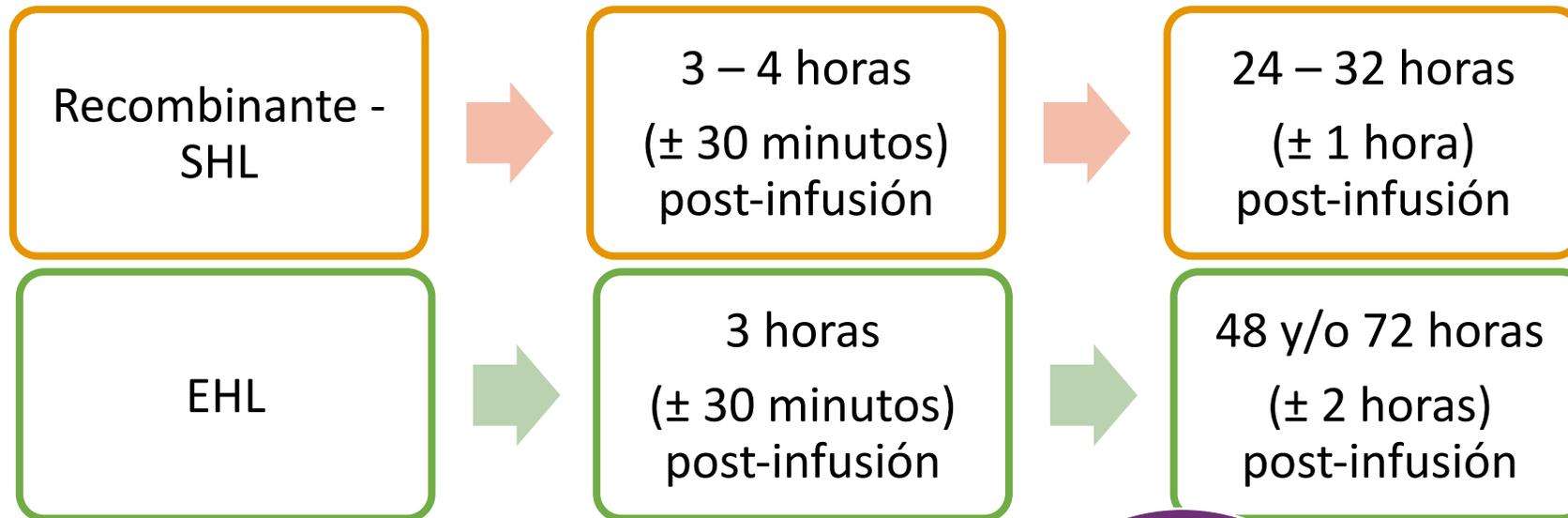
FIX EHL

Adicionar muestra 5 – 14 días

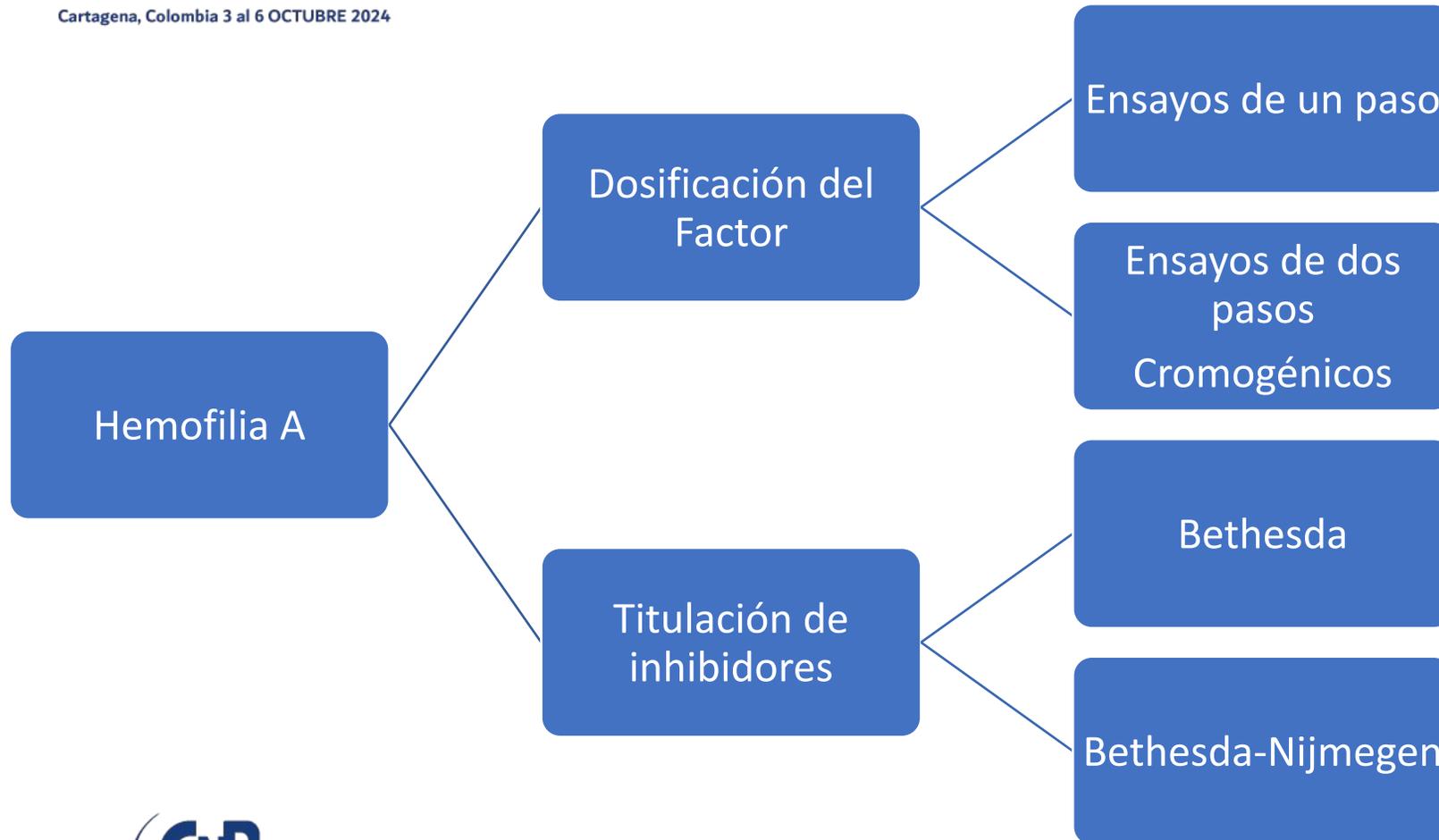
Journal of Thrombosis and Haemostasis, 15: 2461-2465



Tiempos de muestreo



Diagnóstico y seguimiento Hemofilia





Gloria Ramos Ramos
Celular +573002530421
direccioncientificahyh@gmail.com
gloriaramoshmc@gmail.com
www.hyhlab.com

Gracias por su atención





VI CONGRESO LATINOAMERICANO DE BIOQUIMICA CLÍNICA

II CONGRESO INTERNACIONAL DEL COLEGIO NACIONAL DE BACTERIOLOGÍA

¡El riesgo es que te quieras quedar!

Cartagena, Colombia 3 al 6 OCTUBRE 2024



COLABIOCLI
Confederación Latinoamericana
de Bioquímica Clínica



Colegio Nacional de Bacteriología

www.congresocolabiocli.com

