

Evolución de los métodos de detección de inhibidores en hemofilia

Evolution of methods for the detection of hemophilia inhibitors

Maribel Tejeda González¹*<https://orcid.org/0000-0003-1076-0444>

Dunia Castillo González¹ <http://orcid.org/0000-0002-4953-9440>

¹Instituto de Hematología e Inmunología. La Habana, Cuba.

*Autor para la correspondencia: rchematologia@infmed.sld.cu

Recibido: 05/04/2020

Aceptado: 05/08/2020

Al director:

La hemofilia es una enfermedad hemorrágica hereditaria grave que afecta a los varones en la mayoría de los casos.

Por lo general, los pacientes son diagnosticados en etapas tempranas de la vida y requieren de terapia sustitutiva o de reemplazo, con productos que contengan factor VIII o IX (FVIII, FIX) para lograr el control de los eventos hemorrágicos.

Una de las complicaciones más temidas que presentan estos pacientes, es la aparición de inhibidores secundarios al tratamiento con los productos de reemplazo, observándose más en pacientes con hemofilia A.

Son varios los factores de riesgo asociados a la presencia de estos anticuerpos: antecedentes de familiares con inhibidores, tipo de mutación; terapia sustitutiva utilizada, intensidad de algunos tratamientos, entre otros.^(1,2) Es prioridad de los servicios integrales de atención a los pacientes con hemofilia la detección temprana y oportuna de estos anticuerpos con el propósito de tomar medidas terapéuticas.⁽³⁾

Los inhibidores son aloanticuerpos tipo IgG, tipo 1 o 4 que reconocen epítopes específicos en los FVIII y FIX inhibiendo la función. En la hemofilia A congénita son de tipo I, según el tipo de cinética, porque neutralizan completamente la acción de estos factores, además son tiempo y temperatura dependientes, reaccionando de forma lenta contra el FVIII a temperatura de 37 °C.⁽⁴⁾

El primer método descrito, “Oxford”, fue comunicado por Biggs y Bidwell en el año 1959, donde a través de un ensayo de coagulación en dos etapas, utilizaba crioprecipitado como fuente de FVIII y la muestra era incubada durante 1 hora. Una unidad de inhibidor era definida como la cantidad que destruía el 75 % de la actividad del FVIII.⁽⁴⁾

Este método fue sustituido por el “Bethesda”, descrito por Kaspery y otros en el año 1975,⁽⁵⁾ que resultó el ensayo recomendado para esta determinación durante muchos años. Se basa en mezclar el plasma del paciente con hemofilia con una mezcla de plasma normal en cantidades iguales y se compara con una mezcla de tampón imidazol y una mezcla de plasma normal, incubados durante 2 horas a 37 °C., posteriormente se analizan los resultados obtenidos de cada mezcla y se calcula el FVIII residual.

Este método tiene como desventaja que puede estimar por defecto o por exceso los títulos de anticuerpos, factores como: cambios en el pH en el tiempo de incubación, la temperatura mantenida y la cantidad de FVIII residual, pueden influir en los resultados, ya sea por la presencia de FVIII endógeno, secundario al uso de la terapia sustitutiva o la presencia del anticoagulante lúpico.⁽⁶⁾

En 1995 Verbruggen y otros⁽⁷⁾ introdujeron la modificación de “Nijmegen”, con el fin de disminuir la incidencia de resultados falsos positivos y negativos en aquellos casos con títulos bajos de inhibidores. Hubo dos modificaciones importantes en este método, agregar el buffer imidazol a la mezcla de plasma a pH 7.4 y utilizar plasma deficiente en factor VIII en lugar del tampón en la mezcla del control. Con estos cambios se lograba mejorar la sensibilidad y especificidad del método, al mantenerse la estabilidad de la concentración de la proteína y del pH. Este método se convirtió en el estándar para el diagnóstico de los inhibidores en hemofilia.⁽⁸⁾

Cuando se realiza el método “Nijmegen” en pacientes que padecen hemofilia A moderada, leve, o con enfermedad grave, pero que poseen FVIII residual luego de infundirse, es necesario eliminar el FVIII presente en esas muestras. Con ese fin, debe calentarse el plasma a 56 o a 58 °C en un tiempo de incubación que va desde 30 minutos hasta 1 hora y media, según diferentes comunicaciones.⁽⁹⁾

En la actualidad, los métodos “Bethesda” y la modificación “Nijmegen” son los más utilizados en la práctica médica para pesquisar y dar seguimiento a los pacientes hemofílicos con inhibidores. Es reconocido que estos ensayos no detectan anticuerpos con baja actividad, y que pueden tener relevancia clínica en tratamientos como la inmunotolerancia.⁽¹⁰⁾ Existen otros factores que interfieren en el resultado, como es la presencia de otros anticuerpos no específicos dirigidos contra los factores de la coagulación, el anticoagulante lúpico o la contaminación de las muestras con elementos presentes en el plasma de los pacientes estudiados lo cual impide la confiabilidad de los resultados.⁽¹¹⁾

Se desarrolló el método “LTA” (por sus siglas en inglés, low-titre FVIII inhibitor assay), ensayo de detección de inhibidores de bajos títulos, cuyo principio es idéntico al “Nijmegen”, excepto por la fuente de la mezcla de plasma. Su valor límite de detección es 0,03 UB. ⁽¹¹⁾

Se han desarrollado otros ensayos no coagulométricos que buscan mayor sensibilidad para el rastreo de anticuerpos en títulos bajos. Ellos son: el método cromogénico, métodos de detección por absorción inmunoenzimáticos (ELISA) e inmunofluorescencia (FLI, por sus siglas en inglés, fluorescence-based immunoassay).

Los ensayos ELISA tienen muy alta sensibilidad pero baja especificidad, ya que detectan además anticuerpos no neutralizantes. Aquellos casos que resulten positivos en este ensayo deben pesquisarse por los métodos coagulométricos tradicionales. El método FLI, que en la actualidad puede ensayarse en plataforma Luminex, tiene igualmente alta sensibilidad. Existe otra modificación que se basa en la unión de los anticuerpos al FVIII recombinante ligado a microesferas de poliestireno, que muestra detección de títulos de anticuerpos por debajo de 0,03 NBU/mL. (11, 12, 13,14)

Otro método es el “SMIA” (por su siglas en inglés, South Mimms Inhibitor Assay), desarrollado por Raut S y otros⁽¹⁵⁾ donde se compara el método “Nijmegen”, pero con sustitución del plasma deficiente en FVIII por plasma normal a pH 7,4, lo que permite reducir los pasos y los costos del método. Aún no ha sido implementado de forma sistemática.

Como puede observarse existe diversidad de métodos para reconocer la presencia y cuantía de inhibidores en hemofilia. Es necesario unificar criterios y seleccionar un algoritmo de trabajo que minimice los errores derivados en estas detecciones, lo que permitirá la evaluación correcta de los pacientes con hemofilia y sospecha de inhibidores

Referencias bibliográficas

1. Aledort L, Mannucci PM, Schramm W, Tarantino M. Factor VIII replacement is still the standard of care in haemophilia A. *Blood Transfus.* 2019;17(6):479-86.
2. Margaglione M, Intrieri M. Genetic Risk Factors and Inhibitor Development in Hemophilia: What Is Known and Searching for the Unknown. *SeminThrombHemost.* 2018;44(6):509-16.
3. Castillo-González D, Martínez-Triana R, Lavaut-Sánchez K, Verdura-Trujillo A, Callejas-Turiño Y, Reyes-Caballero O. Hemofilia y enfermedad de von Willebrand. Guías de actuación. La Habana: Ciencias Médicas; 2018.
4. Miller CH. Laboratory testing for factor VIII and IX inhibitors in haemophilia: A review. *Haemophilia.* 2018;24(2):186-97.
5. Kasper CK, Aledort L, Aronson D, Counts R, Edson JR, van Eys J, et al. Proceedings: A more uniform measurement of factor VIII inhibitors. *Thromb Diath Haemorrh.* 1975;34(2):612.
6. Grosso S y Blanco A. Inhibidores específicos neutralizantes. En: Blanco A, Kordich L (eds.) *Fundamentos para el manejo práctico en el laboratorio de hemostasia.* 2.ª ed. Buenos Aires: Grupo CAHT; 2013. P. 525-83
7. Verbruggen B, Novakova I, Wessels H, Boezeman J, van den Berg M, Mauser-Bunschoten E. The Nijmegen modification of the Bethesda assay for factor VIII: C inhibitors: improved specificity and reliability. *Thromb Haemost* 1995 Feb;73(2):247-51.
8. Giles AR, Verbruggen B, Rivard GE, Teitel J, Walker I. A detailed comparison of the performance of the standard versus the Nijmegen modification of the Bethesda assay in detecting factor VIII: C inhibitors in the haemophilia A population of Canada. Association of Hemophilia Centre Directors of Canada. Factor VIII/IX Subcommittee of Scientific and Standardization Committee of International Society on Thrombosis and Haemostasis. *Thromb Haemost.* 1998;79(4):872-5.
9. de Lima Montalvão SA, Tucunduva AC, de Almeida Sambo AL, De Paula EV, de Souza Medina S, Ozelo MC. Heat treatment of samples improve the performance of the Nijmegen-Bethesda assay in hemophilia A patients undergoing immune

tolerance induction. Thromb Res. 2015;136(6):1280-4. DOI:

<http://10.1016/j.thromres.2015.08.014>

10. Arias M. Actualización en diagnóstico inhibidor de factor VIII.

Rev.Hematología:2016; 20:174-9 Disponible en:

<http://www.sah.org.ar/revista/numeros/24-vol-20-congre-2016.pdf>

11. Favaloro EJ, Verbruggen B, Miller CH. Laboratory testing for factor

inhibitors. Haemophilia. 2014;20 (Suppl 4):94-8. DOI: <http://10.1111/hae.12408>

12. Boylan B, Rice AS, Dunn AL, Tarantino MD, Brettler DB, Barrett JC, et al. Characterization of the anti-factor VIII immunoglobulin profile in patients with hemophilia A by use of a fluorescence-based immunoassay. J Thromb Haemost. 2015;13(1):47-53.

13. Miller CH, Boylan B, Shapiro AD, Lentz SR, Wicklund BM. Limit of Detection and Threshold for Positivity of the Centers for Disease Control and Prevention Assay for Factor VIII Inhibitors. ThrombHaemost. 2017;15(10):19716.

14. Miller CH, Rice AS, Boylan B, Shapiro AD, Lentz SR, Wicklund BM et al.

Comparison of clot-based, chromogenic and fluorescence assays for measurement of factor VIII inhibitors in the US Hemophilia Inhibitor Research Study. J Thromb Haemost. 2013;11(7):1300-9. DOI: <http://10.1111/jth.12259>

15. Raut S, Heath A. South Mimms Inhibitor Assay (SMIA): An affordable and improved method form measurement of FVIII inhibitors. Presented at WFH congress 2016.

[acceso 15/01/2020]. Disponible en:

https://www.postersessiononline.eu/173580348_eu/congresos/WFH2016/aula/-PP-W_78_WFH2016.pdf

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existen conflicto de intereses de ningún tipo.

Contribuciones de los autores

Maribel Tejeda González: Concepción de la idea del artículo, selección de la bibliografía utilizada, redacción del borrador, revisión crítica de su contenido intelectual y aprobación de la versión final del artículo.

Dunia Castillo González: Selección de la bibliografía utilizada, redacción del borrador, revisión crítica de su contenido intelectual y aprobación de la versión final del artículo.