

## Actualización en diagnóstico inhibidor de factor VIII

### Update on diagnostic of factor VIII inhibitor

Arias M

Unidad Asistencial Dr. César Milstein. CABA. Argentina

ariasmi@pami.org.ar



SIMPOSIO 5

HEMATOLOGÍA  
Volumen 20 • Número Extraordinario  
XII Congreso del Grupo CAHT: 174-179  
Septiembre 2016

**Palabras clave:** Inhibidor de FVIII,  
Ensayo Bethesda Nijmegen,  
Hemofilia.

**Keywords:** FVIII inhibitor,  
Bethesda Nijmegen assay,  
Hemophilia.

#### Introducción

Los inhibidores específicos de factores son un subgrupo de anticuerpos que interfieren con la función de los factores de coagulación.

El anticuerpo contra el FVIII puede ser de carácter inhibitorio, ya que neutraliza la actividad del FVIII, o no inhibitorio, es decir, no neutralizante, que puede incrementar la depuración del FVIII. Los anticuerpos inhibitorios se titulan por Bethesda o Nijmegen, y los no inhibitorios se titulan por ELISA.

El inhibidor de factor VIII (FVIII) es una inmunoglobulina (IgG) que reconoce epítopes funcionales en la molécula de FVIII, inhibiendo de este modo la funcionalidad de la proteína.

Los anticuerpos sin actividad de inhibidor también pueden disminuir la respuesta de los concentrados de FVIII como resultado de un aumento de la tasa de depuración del complejo antígeno-anticuerpo. Por lo tanto, encontrar una farmacocinética anormal en el factor VIII infundido no siempre es debido a la

presencia de inhibidores funcionales.

EL inhibidor de FVIII puede ser caracterizado como de tipo I o de tipo II, de acuerdo a su cinética de acción. El inhibidor de tipo I es un aloanticuerpo de inhibición completa que puede aparecer en hemofílicos tratados con FVIII, y el tipo II es un autoanticuerpo de inhibición parcial con actividad residual de FVIII, que reacciona contra el FVIII endógeno.

La incidencia de aparición de inhibidores en pacientes con hemofilia A congénita es de 25-30% en hemofilia A severa, afectados por los genotipos que carecen por completo de FVIII, y de 1-7% en pacientes con hemofilia A leve o moderada<sup>(1-2)</sup>.

En pacientes con hemofilia A severa el desarrollo de inhibidor se debe a la respuesta inmune contra la terapia de reemplazo.

En pacientes con hemofilia A no severa (leve o moderada) la presencia de un inhibidor es una complicación grave, y debe sospecharse ante un patrón de

sangrado similar al de hemofilia A severa, y en algunos casos la clínica se asemeja a la observada en hemofilia A adquirida. En hemofilia A leve el inhibidor puede ser tanto de tipo I como de tipo II, aunque éste último es el más frecuente. Se caracterizan por ser inhibidores de alto título y por ser más frecuentes en la segunda y tercer década de la vida<sup>(3)</sup>.

Existe otro trastorno hemorragiparo, conocido como hemofilia A adquirida, que surge por la aparición de autoanticuerpos contra el FVIII. Su incidencia es de 1.5 casos cada millón de habitantes por año, pero entre los 65 y 85 años llega a ser de 9 casos por millón de habitantes, y en los mayores de 85 años, 15 por millón.

Teniendo en cuenta las dificultades asociadas con el tratamiento en pacientes con inhibidores de FVIII, la predicción, prevención, y la detección temprana de inhibidores en los pacientes hemofílicos se ha convertido en una importante prioridad de gestión. Se requieren exámenes regulares con un ensayo de inhibidor de FVIII sensible y específico.

#### **Método de detección de inhibidor: aPTT incubado 2 horas a 37°C**

El inhibidor de FVIII tiene una característica única, que es tiempo y temperatura dependiente y no ocurre con ningún otro inhibidor específico o no específico de los factores de la coagulación, con la posible excepción del factor V<sup>(4)</sup>.

Está informado que un 15% de anticoagulantes lúpicos son tiempo y temperatura dependiente, esto es debido a un artefacto del cambio del pH con la incubación más que a una característica de este inhibidor<sup>(5)</sup>.

Para evaluar si el inhibidor es tiempo y temperatura dependiente se deben incubar en eppendorf distintos, cantidades iguales de pool de plasma normal y plasma del paciente, y además se debe realizar una mezcla 1:1 de plasma del paciente y pool de plasma normal (mezcla incubada), cuyo volumen final será igual al de los anteriores. Los tres eppendorf se incuban bien tapados en baño termostático a 37°C. Al transcurrir las dos horas (algunos autores indican luego de una hora) se retiran los eppendorf del baño y se realiza una mezcla 1:1 de pool de plasma normal incubado más plasma del paciente incubado (mezcla inmediata: mezcla control). El aPTT de un plasma normal incubado en estas condiciones se prolonga ligeramente por el descenso de la actividad

de FVIII. El aPTT en segundos de la mezcla control (mezcla inmediata) se compara con la mezcla de paciente más normal incubado 2 Hs a 37°C (mezcla incubada), y se dice que el inhibidor está presente cuando el resultado de la mezcla incubada es más largo que el control en un número de segundos (algunos utilizan mayor e igual a 8 ó 10 segundos) o en porcentaje, por ejemplo mayor o igual a 10%<sup>(6)</sup>.

Un resultado falso positivo de la mezcla de incubación puede ocurrir si se utiliza plasma con EDTA en lugar de citrato (esta situación podría suceder cuando se recibe una muestra derivada, sin que se haya tenido en cuenta las condiciones preanalíticas necesarias que se requieren)<sup>(7)</sup>.

Tanto los ensayos de inhibidor, como así también otras pruebas de coagulación, requieren que las condiciones preanalíticas del ensayo se cumplan, de forma contraria los resultados de la etapa analítica serán erróneos.

Tras la confirmación de la presencia de un inhibidor tiempo y temperatura dependiente, se debe titular el inhibidor.

#### **Titulación de inhibidor de FVIII**

Todos los ensayos de inhibidores de FVIII se basan en un método universal, que es la medición de la disminución de la actividad del factor VIII (actividad residual) de una mezcla testeada (fuente exógena de factor VIII -pool de plasma normal, calibrador- más el plasma del paciente con el supuesto inhibidor), respecto al FVIII de la mezcla control, luego de incubarlas 2 horas a 37°C. La mezcla control se realiza con el mismo método sustituyendo el plasma del paciente por buffer o por una muestra de plasma control que no contiene inhibidor (plasma deficiente en FVIII comercial, o plasma de un paciente con hemofilia A severa sin inhibidor).

La actividad residual del FVIII es definida como el porcentaje relativo de actividad del factor en una mezcla testeada comparada con la mezcla control.

Actividad residual % = (FVIII medido en la mezcla del paciente / FVIII medido en la mezcla control) \*100.

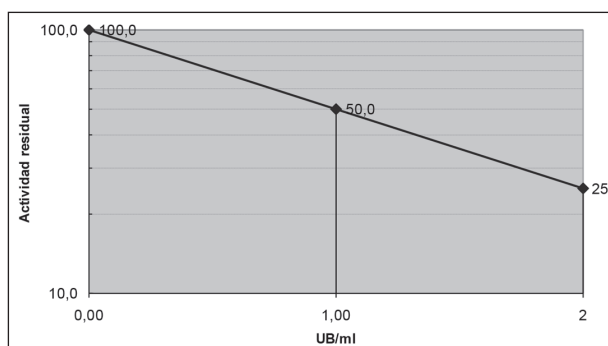
Es importante respetar el tiempo y la temperatura de incubación de las mezclas en el ensayo de inhibidor. Las condiciones estandarizadas son 2 Hs a 37°C. Si el tiempo de incubación es mayor a las 2 Hs aumenta la variabilidad del ensayo; lo mismo sucede si no se respeta la temperatura de incubación.

El FVIII se puede medir por ensayo coagulométrico en una etapa, sin embargo los ensayos basados en métodos coagulométricos tienen serios inconvenientes, pueden ser influenciados por la presencia de otros anticuerpos, como anticoagulante lúpico u otros inhibidores no específicos, o por muestras con heparina. Métodos alternativos como el ensayo cromogénico, ELISA o inmunoensayos basados en fluorescencia (FLI) pueden ser usados para mejorar la sensibilidad y especificidad del ensayo, aunque los ensayos inmunológicos no son recomendados para la detección de inhibidores, ya que no discriminan entre los anticuerpos inhibitorios y no inhibitorios<sup>(8-10)</sup>.

### Ensayo Bethesda

En 1975, Kasper et al. describen el ensayo Bethesda, el cual se realiza mediante la mezcla 1:1 de plasma del paciente con un pool de plasma normal (como fuente de FVIII) y una mezcla 1:1 de pool de plasma normal con tampón imidazol como la mezcla de referencia<sup>(11)</sup>.

Unidad Bethesda: se define como la concentración de inhibidor capaz de inactivar la mitad del FVIII presente en una mezcla de partes iguales de plasma del paciente y de pool de plasma normal, incubado 2 Hs a 37°C (figura 1). Las UB/ml de las muestras de pacientes pueden calcularse como:  $(2 - \log \text{ actividad residual}) / 0.301$ .



**Figura 1.** Curva de calibración para la cuantificación de Inhibidor

En este ensayo es muy importante la preparación del pool de plasma normal. Según la "Guía de diagnóstico de hemofilia y trastornos de la coagulación" se prepara con donantes, como mínimo 20 personas sanas que no tomen medicación que puedan interferir en las pruebas de hemostasia. Se admiten mujeres que tomen anticonceptivos orales. Es conveniente que sea aproximadamente la misma cantidad de

hombres y mujeres, en un rango etario de entre 20 y 50 años. Anticoagulante: citrato de trisodio dihidratado 0,109M (3,2%).

ECAT Foundation es un control de calidad externo, que provee muestras incógnitas para testear el inhibidor de FVIII. A raíz de que la prueba tiene un CV% intra e inter-laboratorio muy elevado, se propuso ciertas condiciones para estandarizar el ensayo:

- pool de plasma normal (PPN):

La actividad del FVIII del PPN debe ser de 100% (=1 UI/ml) +/- 5%. El FVIII debe ser calibrado contra un estándar internacional.

Niveles mayores de FVIII en el PPN darán menor porcentaje de FVIII acomplejado, con mayor actividad residual y, por lo tanto, menor título del inhibidor. A la inversa, menor nivel de FVIII en el PPN dará un título de inhibidor más alto.

- dilución de las muestras:

Las muestras deben ser ensayadas sin dilución en casos de pacientes con títulos menores a 2 UB/ml. Si el título es mayor a 2 UB/ml se sugiere realizar las siguientes diluciones, dependiendo del rango del título del inhibidor:

Rango de inhibidor (UB/ml)	Factor de dilución correspondiente
0,0 - 2,0	0
2,1 - 6,0	3 (= 1 + 2)
6,1 - 20,0	10 (= 1 + 9)
20,1 - 60,0	30 (= 1 + 29)

Éstas fueron las diluciones recomendadas, sin embargo hay laboratorios que cuando el inhibidor es positivo, emplean diluciones al 1/2, al 1/4, etc. del plasma del paciente. Para calcular el título del inhibidor hay que tener en cuenta el valor de la dilución empleada. Por ejemplo si la dilución con un factor VIII residual de 50% es 1:10, el valor de 1 UB debe ser multiplicada por 10, entonces el título de inhibidor del paciente será 10 UB/ml.

Independientemente de cómo se realiza la dilución, la correcta será aquella que deja un FVIII residual lo más cercano al 50%, entre un 25% y un 75%, ya que fuera de esta actividad residual no hay linealidad entre la actividad del inhibidor y la actividad residual del FVIII. Escoger diluciones erróneas dará resultados erróneos, porque se obtendrá un FVIII residual

no adecuado, y por lo tanto el título del inhibidor será incorrecto.

### Ensayo Nijmegen

La sensibilidad y especificidad del ensayo de inhibidor fue mejorada por el método Nijmegen modificado, o también llamado ensayo Bethesda-Nijmegen, al utilizar un pool de plasma normal buffereado a PH 7.4 y al remplazar el buffer imidazol por plasma deficiente en FVIII libre de inhibidor<sup>(12)</sup>.

Estas modificaciones se realizaron con el fin de disminuir la incidencia de resultados falsos positivos. Sin embargo, en los controles de calidad externa se observan falsos positivos (hasta 32%) y falsos negativos (hasta 5%) y no se observó una mejoría. Esto manifiesta la variedad de métodos usados por los diferentes laboratorios para realizar el ensayo Nijmegen<sup>(13)</sup>.

- pool de plasma normal buffereado. Puede ser obtenido de diferentes formas:

- tamponado con ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etano sulfónico (HEPES, por su denominación en inglés) a 5 g por 100 ml de citrato de trisodio<sup>(14)</sup>.
- tamponado con imidazol sólido en la siguiente proporción: cada 25 ml de solución de citrato 0,106M de sodio añadir 1,7 g de imidazol sólido. Esta modificación mejora la sensibilidad y especificidad de la prueba.
- tamponado con buffer imidazol 4M, pH7.4: mezclar 1 volumen de este buffer con 39 volúmenes de PPN. El pH del PPN buffereado debe ser verificado y eventualmente ajustado entre 7.3 and 7.5<sup>(15)</sup>.

El objetivo de este procedimiento es que el pH tanto de la mezcla control como de la mezcla a ensayar se mantenga estable durante las 2 horas de incubación entre 7,3 y 7,5.

Mezclas no tamponadas pueden resultar en el aumento del pH durante la incubación y causar una inactivación inespecífica del factor VIII, dando títulos de inhibidor aberrantes.

Hay reportes del uso de plasma calibrador en lugar de pool de plasma normal buffereado, pero esta modificación aún no está validada.

- plasma deficiente en FVIII:

Es empleado en la mezcla de referencia, y en el caso de que el inhibidor sea positivo será empleado para realizar las diluciones de la muestra del paciente.

Una recomendación de ECAT Foundation y otros autores es utilizar plasma deficiente en FVIII que contenga vWF en cantidades normales. La ausencia de vWF en el plasma deficiente puede dar resultados falsamente disminuidos del título de inhibidor. Como el vWF es el transportador natural del FVIII, su concentración es esencial para estabilizarlo durante el proceso de incubación.

El tipo de plasma deficiente en FVIII usado en la mezcla control y como plasma sustrato en el ensayo de actividad residual tiene influencia en el resultado del ensayo de inhibidor, especialmente en el rango de 0.0 a 1.0 NBU/ml<sup>(16)</sup>.

Para disminuir los costos del ensayo también puede utilizarse albúmina sérica bovina (BSA) al 4% en la mezcla control en combinación con plasma deficiente en FVIII que contenga vWF como sustrato. Estudios demuestran que hay buena correlación entre el título de inhibidor obtenido empleando plasma deficiente en FVIII congénito o inmunodepletado y el obtenido con BSA al 4% en la mezcla control. Además se reporta no haber diferencias entre emplear BSA al 4% o BSA al 4% que contenga vWF<sup>(17)</sup>. Cuando se realiza el método Nijmegen en plasma de pacientes que tienen hemofilia A moderada, leve, o que son HAS pero que tienen FVIII residual luego de infundirse, es necesario eliminar el FVIII presente en esas muestras. Para ello debe calentarse el plasma a 56 o 58°C en un tiempo de incubación que varía según los autores, algunos hacen el procedimiento durante 30 minutos, otros en un tiempo más prolongado durante una hora y media. Cada laboratorio debe establecer el tiempo de incubación necesario para eliminar la actividad de factor VIII. Luego de la incubación, el plasma es centrifugado durante al menos 2 min a 4000 g (centrífuga refrigerada de tubos eppendorf), y se separa el sobrenadante, que es el que se va a utilizar para realizar el ensayo. Este sobrenadante no contiene factores de coagulación, pero sí factor de von Willebrand y quedan los anticuerpos que van a titularse por ser temperatura-resistentes.

Cuando se realiza el método Nijmegen calentando el plasma del paciente a 56 o 58°C para eliminar el FVIII, es necesario realizar la mezcla control en las mismas condiciones que se ensayan a la mezcla del paciente. Con lo cual también habrá que incubar el plasma deficiente en FVIII a 56 o 58°C, que luego se va mezclar con el PPN buffereado y, en caso de



haber inhibidor, se empleará para realizar las diluciones del paciente.

### **Métodos alternativos para mejorar la sensibilidad y la especificidad**

Tanto el método convencional Bethesda o la modificación Nijmegen son los ensayos más usados en el ámbito clínico, sin embargo ambos ensayos pueden no detectar inhibidores con baja actividad, que pueden ser clínicamente significativos y estar presentes, por ejemplo, en pacientes que están en la fase tardía de inducción de inmunotolerancia (ITI).

Ante estas circunstancias se desarrollaron métodos más sensibles y específicos de titulación. Una modificación está basada en el ensayo Nijmegen, pero la actividad residual del FVIII se mide por método cromogénico (CBA) en lugar de medirse por método coagulométrico en una etapa. El método cromogénico es más específico en la titulación de aFVIII ya que permite detectar inhibidores en forma aislada o en coexistencia con inhibidor lúpico, aportando de este modo, una solución al problema diagnóstico planteado en los pacientes con hemofilia A<sup>(18)</sup>. Otra es utilizar un nuevo método FLI, basado en la unión de los anticuerpos al FVIII recombinante ligado a microesferas de poliestireno. Estudios mostraron que este último método puede detectar títulos de anticuerpos por debajo de 0.03 NBU/ml<sup>(19)</sup>.

Inhibidores de bajo título detectados con ensayos coagulométrico en una etapa deben ser repetidos para confirmar, y muestras con 0.5-1.9 NBU/ml deben ser chequeadas con métodos CBA o FLI para asegurar la reactividad de los anticuerpos contra el FVIII<sup>(20)</sup>.

Ante un nuevo inhibidor se debe requerir una segunda muestra y evaluar la historia clínica del paciente, incluyendo a qué productos de infusión y dosis estuvo expuesto durante los 4 meses previos a la detección del inhibidor para evaluar los factores de riesgo.

Otro ensayo desarrollado es el método LTA, que presenta un bajo límite de detección y que es alrededor de 20 veces más sensible que el método Nijmegen para inhibidores de FVIII con un valor de corte <0.03 NBU/ml<sup>(21)</sup>.

El principio del método LTA es idéntico al ensayo Nijmegen excepto por el uso del plasma concentrado en lugar del plasma nativo, una relación de plasma concentrado/PPN bufferado en la mezcla

test de 3:1, y el uso de sustrato cromogénico para el ensayo de la actividad residual de FVIII. Hay reportes de pacientes que en la fase temprana post ITI con inhibidor negativo por ensayo Bethesda y Nijmegen, fueron positivos por LTA, correlacionando con una menor vida media y recuperación del FVIII infundido. Este método aún está en validación. Otro método aún no validado es el SMIA (South Mimms Inhibitor Assay), el cual reemplaza el plasma deficiente en FVIII del método Nijmegen por pool de plasma normal a pH controlado ("like for like"). Este ensayo elimina una variante, debido a la heterogeneidad de plasmas deficientes en FVIII que existen en el mercado, reduce un paso en el ensayo, y también reduce significativamente los costos. En la comparación con el ensayo Nijmegen se obtuvieron resultados equivalentes, sin embargo es un método más sensible que puede detectar títulos de inhibidor menores a 0.2 UB/ml<sup>(22)</sup>.

### **Declaración de conflictos de interés:**

La autora declara que ha recibido apoyo de Baxter y Pfizer para concurrir a congresos internacionales.

### **Bibliografía**

1. Darby SC, Keeling DM, Spooner RJ et al. The incidence of factor VIII and factor IX inhibitors in the hemophilia population of the UK and their effect on subsequent mortality, 1977-99. *J Thromb Haemost.* 2004;7:1047-54.
2. Van der Bom JG, Ter Avest P, Van den Berg HM, Psaty BM, Weiss NS. Assessment of incidence of inhibitors in patients with haemophilia. *Haemophilia.* 2009;15:707-711.
3. Franchini M, Favaloro EJ, Lippi G. Mild Hemophilia A. *J Thromb Haemost.* 2010;8(3):421-32.
4. Kershaw G, Orellana D. Mixing test: diagnostic aides in the investigation of prolonged prothrombin times and activated partial thromboplastin times. *Semin Thromb Hemost.* 2013;39(3):283-90.
5. Exner T. Conceptions and misconceptions in testing for lupus anticoagulants. *J Autoimmun.* 2000;15(2):179-83.
6. Lossing TS, Kasper CK, Feinstein DI. Detection of factor VIII inhibitors with the partial thromboplastin time. *Blood.* 1977;49(5):793-7.

7. Favalaro EJ, Bonar R, Duncan E et al. Identification of factor inhibitors by diagnostic haemostasis laboratories: a large multi-centre evaluation. *J Thromb Haemost.* 2006;96(1):73-8.
8. Klinge J, Auerswald G, Budde U et al. Detection of all anti-factor VIII antibodies in haemophilia A patients by the Bethesda assay and a more sensitive immunoprecipitation assay. *Haemophilia.* 2001;7(1):26-32.
9. Martin PG, Sukhu K, Chambers E, Giangrande PL. Evaluation of a novel ELISA screening test for detection of factor VIII inhibitory antibodies in haemophiliacs. *Clin Lab Haematol.* 1999;21(2):125-128.
10. Blanco AN, Peirano AA, Grosso SH, Gennari LC, Bianco RP, Lazzari MA. An ELISA system to detect anti-factor VIII antibodies without interference by lupus anticoagulants. Preliminary data in haemophilia A patients. *Haematologica.* 2000;85:1045-1050.
11. Kasper CK, Aledort LM, Counts RB et al. A more uniform measurement of factor VIII inhibitors. *J Thromb Hemost.* 1975;34:869-872.
12. Verbruggen B, Novakova I, Wessels H et al. The Nijmegen modification of the Bethesda assay for FVIII:C Inhibitors: improved specificity and reliability. *J Thromb Haemost.* 1995;73(2):247-51.
13. Meijer P, Verbruggen B. The between-laboratory variation of factor VIII inhibitor testing: the experience of the external quality assessment program of the ECAT foundation. *Semin Thromb Hemost.* 2009;35(8):786-93.
14. Kitchen S, McCraw A, Echenagucia M. Preparación y calibración de un pool de plasma normal (PPN), Diagnóstico de la Hemofilia y otros trastornos de la coagulación. *FMH.* 2010(2);22-23, Federación Mundial de Hemofilia, Montreal, Québec.
15. Steve K, Olson JD, Preston FE. Detecting and quantifying acquired functional inhibitors in hemostasis. *Quality in Laboratory Hemostasis and Thrombosis.* 2013(2),124-135. Wiley-Blackwell, Oxford, UK.
16. Verbruggen B, Giles A, Samis J et al. The type of factor VIII deficient plasma used influences the performance of the Nijmegen modification of the Bethesda assay for factor VIII inhibitors. *J Thromb Haemost.* 2001;86(6):1435-9.
17. Verbruggen B, Van Heerde W, Nováková I, Lillicrap D, Giles A. A 4% solution of bovine serum albumin may be used in place of Factor VIII:C deficient plasma in the control sample in the Nijmegen Modification of the Bethesda Factor VIII:C inhibitor assay. *J Thromb Haemost.* 2002;88(2):362-4.
18. Blanco A, Peirano A, Grosso S, Lazzari M. Efecto del inhibidor lúpico o anti-factor VIII sobre la actividad del factor VIII-sustrato cromogénico. *Acta Bioquím Clín Latinoam.* 2007;41(3): 399-405
19. Miller CH, Rice AS, Boylan B 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.
20. Miller CH, Platt SJ, Rice AS, Kelly F, Soucie JM. Hemophilia Inhibitor Research Study Investigators. Validation of Nijmegen-Bethesda assay modifications to allow inhibitor measurement during replacement therapy and facilitate inhibitor surveillance. *J Thromb Haemost.* 2012;10(6):1055-61.
21. Dardikh M, Albert T, Masereeuw R et al. Low-titre inhibitors, undetectable by the Nijmegen assay, reduce factor VIII half-life after immune tolerance induction. *J Thromb Haemost.* 2012;10:706-8.
22. Sanj Raut; Haemostasis Section, NIBSC. Proposal: SSC Inhibitor Collaborative study to evaluate the South Mimms Inhibitor Assay (SMIA) in comparison to the Nijmegen Inhibitor Assay. 62nd Annual ISTH SSC Meeting 2016.