

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE MEDICINA

**DISERTACIÓN PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
BIOQUÍMICA CLÍNICA**

**FRECUENCIA DEL INHIBIDOR DEL FACTOR VIII MEDIANTE
METODOLOGÍA NIJMEGEN EN PACIENTES CON HEMOFILIA “A”
QUE RECIBEN TRATAMIENTO CON FACTOR VIII LIOFILIZADO,
INSCRITOS EN LA FUNDHEC –NÚCLEO PICHINCHA, 2019**

WENDY LIZETH GUERRERO VINUEZA

KARLA VANESSA MOLINA MALDONADO

DIRECTORA: MTR. MARCELA MARDONES M

QUITO, 2019

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, Wendy Lizeth Guerrero Vinueza, C.I 1724220502; autora del trabajo de graduación intitulado: “Frecuencia del inhibidor del factor VIII mediante la metodología de Nijmegen en pacientes con hemofilia “A” que reciben tratamiento con factor VIII liofilizado, inscritos en la FUNDHEC – Núcleo Pichincha, 2019” previa a la obtención del grado académico de BIOQUÍMICA CLÍNICA en la Facultad de Medicina-Carrera de Bioquímica:

1.- Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.

2.- Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a difundir a través de sitio web de la Biblioteca de la PUCE el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de la Universidad.

Wendy Lizeth Guerrero Vinueza,

C.I. 1724220502

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, Karla Vanessa Molina Maldonado, C.I 0504391053; autora del trabajo de graduación intitulado: "Frecuencia del inhibidor del factor VIII mediante la metodología de Nijmegen en pacientes con hemofilia "A" que reciben tratamiento con factor VIII liofilizado, inscritos en la FUNDHEC – Núcleo Pichincha, 2019" previa a la obtención del grado académico de BIOQUÍMICA CLÍNICA en la Facultad de Medicina-Carrera de Bioquímica:

1.- Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.

2.- Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a difundir a través de sitio web de la Biblioteca de la PUCE el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de la Universidad.

Karla Vanessa Molina Maldonado,

C.I. 0504391053

DEDICATORIA

Este trabajo va dedicado a todos los que confiaron en mí;
en especial a mi madre que por su amor tengo la dicha de estudiar
y cumplir mis metas, a mi hermana por toda su comprensión y a Dios
por un día más de vida y porque me enseñó
que la distancia no impide el amor de una madre a su hija

Wendy Guerrero

A mis padres por su sacrificio, esfuerzo y apoyo constante durante
estos años, a mi hermana por ser mi motivación e inspiración para
salir adelante, a mi familia y a Dios por ser mi soporte en este arduo
camino.

Karla Vanessa Molina Maldonado

AGRADECIMIENTO

Me gustaría agradecer en estas líneas el apoyo y la confianza que muchas personas y familiares depositaron en mi durante el proceso y culminación de este trabajo.

En primer lugar, quiera agradecer a mi madre y mi abuelita por la inmensa fortaleza y sus valiosos consejos que me ayudaron a seguir adelante siempre.

Así mismo, a mi hermana que siempre ha estado para mí, por toda su paciencia y comprensión.

De igual manera agradezco a mi tutora de tesis, por habernos guiado, y brindado el apoyo para la elaboración de este trabajo de titulación.

A todos mis amigos que estuvieron siempre apoyándome para tomar las correctas decisiones. De una manera muy especial a mi compañera y amiga Karlita por toda la paciencia y ayuda durante la realización de este trabajo.

Asimismo, a los docentes y maestros que a lo largo de mi vida estudiantil me ayudaron para que mi conocimiento siga creciendo.

Por último, agradezco a las dos grandes instituciones Pontificia Universidad Católica del Ecuador y la Fundación Hemofílica Ecuatoriana por abrir sus puertas y tener confianza en nosotras.

Wendy Lizeth Guerrero Vinueza

AGRADECIMIENTO

Agradezco a mis padres por su paciencia, sacrificio, apoyo constante y sobre todo por la confianza que depositaron en mí durante estos años.

Agradezco a mi hermana por creer en mí y por ser mi motivación para seguir adelante.

Gracias a nuestra tutora, Mtr. Marcela Mardones por el apoyo brindado durante la investigación.

Gracias a todos nuestros profesores, excelentes personas y mentores que han sabido instruir sus conocimientos basándose en valores y principios éticos.

Gracias a todos mis compañeros y amigos por acompañarme en este largo camino, en especial a mi compañera y amiga Wendy por ser mi gran apoyo y soporte durante este proceso.

A las instituciones que nos brindaron su apoyo y colaboración para la ejecución de este proyecto.

Karla Vanessa Molina Maldonado

RESUMEN

Título: “Frecuencia del inhibidor del factor VIII mediante metodología Nijmegen en pacientes con hemofilia “A” que reciben tratamiento con factor VIII liofilizado, inscritos en la FUNDHEC –Núcleo Pichincha, 2019”

Introducción: La hemofilia es una enfermedad ligada al cromosoma X, es decir, los hombres presentan la enfermedad clínica y las mujeres son portadoras. Un individuo con dicha patología presenta mutaciones en genes que codifican para los factores de la coagulación VIII o IX, como consecuencia surgen deficiencias cuantitativas o funcionales de estas proteínas. Existen dos tipos de hemofilia dependiendo del factor alterado; hemofilia A (factor VIII) y hemofilia B (factor IX) siendo la primera la más frecuente. La presencia del inhibidor del factor VIII en pacientes con hemofilia A es una de las complicaciones más grandes, haciendo de su tratamiento un desafío para los médicos tratantes porque incrementa la morbilidad y la tasa de mortalidad. La detección temprana del inhibidor contra el FVIII es de gran importancia para el que médico busque el tratamiento adecuado del paciente hemofílico. Los principales métodos para detectar y cuantificar los inhibidores del FVIII; son las pruebas Bethesda y Nijmegen, esta última posee mayor sensibilidad y especificidad capaz de detectar cantidades mínimas del inhibidor y que fue objeto de nuestro estudio.

Materiales y métodos: Se analizó 118 muestras sanguíneas de pacientes que mediante la encuesta indicaron tener inhibidores de FVIII, recolectadas en tubos con citrato de sodio al 3.2% de pacientes con hemofilia A. Las muestras se centrifugaron a 3500 rpm durante 15 minutos para la obtención de plasma pobre en plaquetas. Con el plasma obtenido de las muestras se realizaron las mezclas de la prueba Nijmegen para la cuantificación del FVIII en el equipo coagulométrico CA 660 siemens. Se calculó el FVIII residual y el título del inhibidor en unidades Nijmegen Bethesda (UNB). Las muestras de pacientes con un FVIII residual inferior al 40% fueron diluidas hasta detectar el título del inhibidor, mientras que las muestras con un FVIII residual superior al 66% se consideraron negativas para inhibidores.

Resultados: La frecuencia de inhibidores del FVIII en los 118 pacientes con hemofilia A fue de n=14 (11,9%), de estos 9 fueron bajos respondedores y 5 altos respondedores, el grupo de pacientes con mayor frecuencia de inhibidores pertenecían al grupo etario adolescente (36%) de entre 12 y 18 años, seguido por el grupo preescolar (29%) de entre 1 a 4 años, escolar (21%) de entre 5 a 11 años y finalmente adulto (14%) mayor a 18 años y menor a 65 años. No hubo relación estadística entre la respuesta del inhibidor y el grado de severidad de la hemofilia A porque se obtuvo un valor de p superior a 0.05, en cambio, la asociación entre las variables tiempo de exposición al tratamiento con la respuesta del inhibidor indicó una alta significancia debido a que se obtuvo un valor de p inferior a 0.01.

Conclusiones y Recomendaciones: Se obtuvo una frecuencia de inhibidores del 11.9% en pacientes con hemofilia A. La presencia de inhibidores es más frecuente en pacientes de 1 a 18 años y es menor en adultos. Las variables grado de severidad de la hemofilia y respuesta del inhibidor del FVIII no se asocian en el estudio, por último, las variables tiempo de exposición al tratamiento y respuesta del inhibidor se asocian en esta investigación. Se recomienda hacer más investigaciones en este grupo de pacientes para estudiar otras variables que intervienen en el desarrollo de inhibidores.

Palabras clave: Hemofilia A, Inhibidor de FVIII, Nijmegen, Bethesda, Anticuerpo.

ABSTRACT

Title: "Frequency of factor VIII inhibitor using Nijmegen methodology in patients with hemophilia" A "treated with lyophilized factor VIII treatment, enrolled in the FUNDHEC - Pichincha Nucleus, 2019"

Introduction: Hemophilia is a disease linked to the X chromosome, that is, men have clinical disease and women are carriers. An individual with said pathology presents mutations in genes that code for coagulation factors VIII or IX, as a consequence quantitative or functional deficiencies of these proteins arise. There are two types of hemophilia depending on the altered factor; hemophilia A (factor VIII) and hemophilia B (factor IX) being the first the most frequent. The presence of the factor VIII inhibitor in patients with hemophilia A is one of the biggest complications, making its treatment a challenge for treating doctors because it increases morbidity and mortality rate. Early detection of the inhibitor against FVIII is of great importance for the physician to seek the appropriate treatment for the improvement of the hemophiliac patient. The main methods for detecting and quantifying FVIII inhibitors; These are the Bethesda and Nijmegen tests, the latter has greater sensitivity and specificity capable of detecting minimum amounts of the inhibitor and which was the object of our study

Materials and methods: 118 blood samples were analyzed from patients who indicated they had FVIII inhibitors, collected in tubes with 3.2% sodium citrate from patients with hemophilia A. The samples were centrifuged at 3500 rpm for 15 minutes to obtain of platelet poor plasma. With the plasma obtained from the samples, mixtures of the Nijmegen test were performed for quantification of FVIII in the CA 660 siemens coagulometric equipment. Residual FVIII and inhibitor titer in Nijmegen Bethesda units (UNB) were calculated. The samples of patients with a residual FVIII less than 40% were diluted until the inhibitor titer was detected, while the samples with a residual FVIII greater than 66% were considered negative for inhibitors.

Results: The frequency of FVIII inhibitors in the 118 patients with hemophilia A was $n = 14$ (11.9%), of these 9 were low responders and 5 high responders, the group of patients with the highest frequency of inhibitors belonged to the adolescent age

group (36%) between 12 and 18 years old, followed by the preschool group (29%) between 1 and 4 years old, schoolchild (21%) between 5 and 11 years old and finally an adult (14%) over 18 years old and Under 65 years. There was no statistical relationship between the inhibitor response and the degree of severity of hemophilia A because a value of p greater than 0.05 was obtained, on the other hand, the association between the variables time of exposure to treatment with the response of the inhibitor indicated a high significance because a p value of less than 0.01 was obtained.

Conclusions and recommendations: A frequency of 11.9% inhibitors was obtained in patients with hemophilia A. The presence of inhibitors is more frequent in patients aged 1 to 18 years and is lower in adults. The variables degree of severity of hemophilia and response of the FVIII inhibitor are not associated in the study; finally, the variables time of exposure to treatment and response of the inhibitor are associated in this investigation. More research is recommended in this group of patients to study other variables that are involved in the development of inhibitors.

Keywords: Hemophilia A, FVIII inhibitor, Nijmegen, Bethesda, Antibody.

TABLA DE CONTENIDOS

CAPÍTULO I	19
1.1. JUSTIFICACIÓN	19
1.2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	20
1.3. OBJETIVOS	22
1.3.1. OBJETIVO GENERAL	22
1.3.2. OBJETIVO ESPECÍFICOS	22
1.3.3. LIMITACIÓN DEL ESTUDIO.....	22
CAPÍTULO II	23
2.1. MARCO TEÓRICO Y CONCEPTUAL	23
2.1.1. Antecedentes	23
2.2. MARCO TEÓRICO	25
2.2.1. Hemostasia	25
2.2.2. Hemostasia primaria	25
2.2.3. Hemostasia secundaria.....	26
2.2.4. El FVIII y su importancia en la cascada de la coagulación	27
2.2.5. Teoría celular de la coagulación	27
2.2.6. Fisiopatologías de la coagulación	28
2.2.7. Hemofilia	28
2.2.8. Hemofilia A.....	29
2.2.9. Anticuerpos y sistema inmune	36
2.2.10. Inhibidor del factor VIII	37
2.2.11. Fisiopatología y factores predisponentes en el desarrollo de inhibidores.....	39
2.2.12. Diagnóstico por laboratorio en pacientes con hemofilia A que han desarrollado inhibidores	40
2.2.13. Tratamiento para pacientes con inhibidores al FVIII	41
2.2.14. Métodos para el diagnóstico de inhibidores	42
2.3. MARCO CONCEPTUAL.....	45
CAPÍTULO III	46

3.1.	MARCO METODOLÓGICO.....	46
3.1.1.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	46
3.1.1.1.	<i>Tipo de Estudio</i>	46
3.1.1.3.	<i>Tamaño de Muestra</i>	46
3.1.1.4.	<i>Criterios de Inclusión</i>	48
3.1.1.5.	<i>Criterios de Exclusión</i>	48
3.1.1.6.	<i>Análisis Estadístico</i>	49
3.2.	OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES	49
3.2.1.	Variable dependiente	49
3.2.2.	Variables independientes.....	49
3.3.	MATERIALES Y PROCESO.....	51
3.3.1.	Materiales	51
3.3.2.	Reactivos	51
3.3.3.	Control de Calidad	52
3.4.	PROCEDIMIENTO	53
3.4.1.	Fase Uno: Solicitudes, autorizaciones y aprobaciones.....	53
3.4.2.	Fase Dos: Recolección de información-consentimiento/asentimiento informado y encuesta.....	54
3.4.3.	Fase Tres: Toma de muestra sanguínea	55
3.4.4.	Fase Cuatro: Procedimientos por el laboratorio.....	57
3.1.2.	Fase Cinco: Análisis de resultados	59
3.1.3.	Fase Seis: Informe de resultados	59
3.1.4.	Fase Siete: Base de datos	60
	CAPÍTULO IV	61
4.1	CONTROL DE CALIDAD.....	61
5	CAPITULO V	64
5.1	RESULTADOS	64
5.1.1	Descripción de la Población de Estudio.....	64
5.1.2	Frecuencia del inhibidor del FVIII en pacientes con hemofilia A.....	64
5.1.3	Frecuencia del inhibidor del FVIII por grupo etario	64
5.1.4	Grado de severidad de hemofilia y respuesta del inhibidor del FVIII	64

5.1.5 Respuesta del inhibidor y tiempo de exposición al tratamiento con
FVIII 68

5.1.	DISCUSIÓN.....	70
5.2.	CONCLUSIONES.....	74
5.3.	RECOMENDACIONES	75
5.4.	BIBLIOGRAFÍA.....	76

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura del inhibidor del FVIII.....	39
Figura 2: Control normal FVIII	62
Figura 3: Control Patológico FVIII.....	63
Figura 4. Frecuencia del grado de severidad de hemofilia A.....	66

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Herencia de Hemofilia A	30
Tabla 2. Grados de severidad de la hemofilia A	31
Tabla 3. Factores predisponentes para el desarrollo de inhibidores	40
Tabla 4. Diferencias entre método Bethesda y Nijmegen	44
Tabla 5. Repetibilidad	61
Tabla 6. Imprecisión intercorrida	61
Tabla 7. Estimación de sesgo	62
Tabla 8. Frecuencia del inhibidor de FVIII en pacientes con hemofilia A	64
Tabla 9. Clasificación de participantes por grupo etario	65
Tabla 10: Grupo etario y frecuencia del inhibidor	65
Tabla 11 Grupo etario y respuesta del inhibidor	66
Tabla 12 Frecuencia de la repuesta del inhibidor de FVIII	67
Tabla 13. Respuesta del inhibidor de FVIII según el grado de severidad de hemofilia A	67
Tabla 14. Inhibidores de alta respuesta	68
Tabla 15. Inhibidores de baja respuesta	68
Tabla 16. Tiempo de exposición vs respuesta del inhibidor	69

LISTA DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1. Toma de muestras en FUNDHEC	118
Ilustración 2. Extracción de muestras sanguíneas en FUNDHEC	118
Ilustración 3. Toma de muestra sanguínea a paciente hemofílico tipo A.....	119
Ilustración 4. Estudiantes Wendy Guerrero y Karla Molina; autoras de la investigación.....	119
Ilustración 5. Equipo CA 660	120
Ilustración 6. Estudiantes realizando el proceso manual de la técnica Nijmegen.	120
Ilustración 7. Estudiante procesando muestra en el equipo, para la cuantificación de FVIII	121
Ilustración 8. Estudiante realizando las diluciones correspondientes	121
Ilustración 9. Pacientes con hemofilia A junto a sus familiares que concurren a la FUNDHEC	122

ANEXOS

Anexo 1: Consentimiento/Asentimiento informado	83
Anexo 2: Condiciones pre-analíticas para el paciente	89
Anexo 3: Solicitud al representante de la FUNDHEC	90
Anexo 4: Carta de aprobación FUNDHEC.....	91
Anexo 5: Solicitud para el uso de laboratorios.....	92
Anexo 6: Aprobación del uso de laboratorios	93
Anexo 7: Encuesta	94
Anexo 8: Indicaciones para recolección y transporte de muestras sanguíneas ..	95
Anexo 9: Insertos de reactivos	97
Anexo 10: Informe de resultados	112
Anexo 11: Manual para el manejo de desechos en establecimientos de salud .	113
Anexo 12: Check list para verificación de condiciones pre analítica	115
Anexo 13: Checklist para control de la toma de muestra y muestra obtenida ...	116
Anexo 14: Acuerdo de confidencialidad.....	117
Anexo 15: Proceso de estudio	118
Anexo 16: Presupuesto	123
Anexo 17: Cronograma.....	124

LISTA DE SIGLAS

CEISH-PUCE: Comité de Ética de la Investigación en Seres Humanos de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador

CPA: Célula presentadora de antígeno

ELISA: Inmunoensayo enzimático

FDA: Administración de alimentos y medicamentos

FMH: Federación Mundial de Hemofilia

FUNDHEC: Fundación Hemofílica Ecuatoriana

FVII: Factor VII de la coagulación

FVIIa: Factor VII activado

FVIII: Factor VIII de la coagulación

FVIIIa: Factor VIII activado

FIX: Factor IX de la coagulación

FX: Factor X de la coagulación

vWF:Factor von Wilebrand

IgG: Inmunoglobulina G

MSP: Ministerio de Salud Pública

TTPa: Tiempo de tromboplastina parcial activado

TP: Tiempo de protrombina

TT: Tiempo de trombina

INTRODUCCIÓN

Durante años la hemofilia ha sido considerada una enfermedad de la realeza europea, su origen radicó en una mutación de novo en el cromosoma X que resultó en la alteración de la molécula del FVIII o FIX causando hemorragias excesivas. Hallazgos científicos realizados en el siglo XX clasificaron a la hemofilia en dos tipos A o B de acuerdo a la carencia del FVIII o FXI respectivamente. La hemofilia A es el tipo más común a nivel mundial (Drive y Sprig, 2018)

A lo largo de los años el tratamiento para pacientes con hemofilia ha ido evolucionando. En un inicio se realizaban transfusiones sanguíneas, poco después crioprecipitados que contenían el factor carente y aunque tuvieron una gran efectividad surgieron nuevos problemas y desafíos que necesitaron ser abordados, uno de ellos la transmisión de enfermedades como el VIH y el VHC. Es así que en la actualidad se utilizan concentrados de FVIII comerciales que minimizan el riesgo de contagio. Sin embargo la complicación de los concentrados comerciales es el desarrollo de anticuerpos contra el FVIII conocidos como inhibidores, los mismos que complican el tratamiento y condición de vida del paciente (Schep et al., 2018)

El método para la detección de los inhibidores contra el factor VIII a través de la historia ha ido evolucionado para que el resultado reportado sea de mayor confiabilidad. En la actualidad en el Ecuador la metodología usada es la prueba de Bethesda pero en estudios realizados se ha demostrado que esta metodología tiene algunas limitaciones, es por eso que en el presente estudio se realiza la modificación de este método denominada Nijmegen para la cuantificación del inhibidor del FVIII.

CAPÍTULO I

1.1. JUSTIFICACIÓN

El Ministerio de Salud Pública del Ecuador (MSP) cataloga a la hemofilia como una enfermedad catastrófica, ubicándola dentro de un programa especial de atención para el diagnóstico oportuno y tratamiento adecuado. En el año 2018, el MSP reporta 799 casos de hemofilia, siendo la más frecuente la hemofilia “A” causada por la disminución o ausencia del factor VIII (FVIII), por lo que el tratamiento de elección para este grupo de pacientes consiste en la administración de un concentrado de FVIII liofilizado que cumple la función del factor ausente o escaso (Guía de Práctica Clínica-MSP, 2016).

La presencia de inhibidor del factor FVIII en pacientes con hemofilia no solo vuelve más complejo el manejo del paciente e incrementa los costos de atención, sino que también incrementa la morbilidad de esta enfermedad en un 30 y 40%. La tasa global de mortalidad debido al sangrado se encuentra entre el 20% y 30% (Ceresetto, Duboscq, Fondevila & Tezanos, 2015).

El inhibidor de FVIII supone uno de los mayores desafíos para este grupo de pacientes, sus familiares, médicos tratantes e incluso para el Estado encargado del aporte económico para tratamiento y seguimiento de esta enfermedad (FHM, 2012). Si a esta problemática se añade las técnicas de laboratorio que se utilizan para la detección de estos inhibidores como la prueba Bethesda, en la que se pueden tener resultados falsos negativos en cierto grupo de pacientes, complica aún más su seguimiento y control. (MSP, 2016).

El tratamiento para un paciente con hemofilia A que ha desarrollado inhibidores depende de la respuesta del inhibidor. Si el inhibidor es de baja respuesta el paciente debe someterse a un proceso de inmutolerancia con dosis elevadas de concentrados de FVIII recombinante o plasmático con el fin de neutralizar el inhibidor, por otro lado, la erradicación de inhibidores se torna más compleja en los pacientes con inhibidores de alta respuesta con títulos elevados, en este grupo se recomienda el uso de agentes baipaseantes como FVIIa recombinante y/o

concentrados de complejo protrombínico activado, es importante mencionar que estos últimos no constan en el Cuadro Nacional de Medicamentos Básicos y se requiere de una justificación para evaluar su adquisición por parte de la Red Pública Integral de Salud (MSP,2016).

Por lo tanto, la detección temprana de estos inhibidores y el nivel de respuesta que presentan los pacientes que reciben factor VIII es importante. Por esta razón esta investigación tiene el propósito de determinar la frecuencia del inhibidor al FVIII en pacientes con hemofilia A que reciben tratamiento con FVIII liofilizado, así como la relación con datos sociodemográficos, el grado de severidad de la hemofilia y el tratamiento que lleva el paciente, cuyos beneficiarios directos serán los pacientes atendidos en la FUNDHEC-Núcleo Pichincha y los médicos encargados de su seguimiento y control, al disponer de una herramienta más para orientar el tratamiento y buscar la mejora del paciente hemofílico. Además, el estudio aporta con datos actualizados sobre la frecuencia de pacientes con hemofilia A que han desarrollado inhibidores de FVIII.

Una ventaja adicional de esta investigación es la aplicación de un método más sensible y específico que la prueba Bethesda, la modificación Nijmegen, en la que se añade buffer de imidazol y plasma deficiente de FVIII comercial que permite sensibilizar y detectar títulos bajos de inhibidor, por lo tanto, se proporciona un tratamiento oportuno, mejora la condición de la enfermedad y disminuyen problemas asociados. Además, la inversión en salud será beneficiada mediante la detección temprana de inhibidores al disminuir los costos del tratamiento.

1.2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La hemofilia es una enfermedad de carácter genético-recesivo, ligada al cromosoma X. Un individuo con dicha patología presenta mutaciones específicas en los genes que codifican para los factores de la coagulación VIII o IX, como consecuencia surgen deficiencias cuantitativas o funcionales de estas proteínas. Dependiendo del factor alterado se conocen dos tipos de hemofilia, la hemofilia A

(factor VIII) y hemofilia B (factor IX) siendo la primera la más frecuente (Guía de Práctica Clínica-MSP, 2016).

En el Ecuador se han reportado 799 casos de pacientes con hemofilia registrados en la Fundación Hemofílica Ecuatoriana (FUNDHEC), de los cuales 585 tienen hemofilia "A" (MSP, 2018). El tratamiento para este grupo de pacientes involucra la administración de factor VIII (FVIII) liofilizado que sustituye al factor carente o ausente, si bien es cierto la administración de FVIII es útil en estos casos, se estima que alrededor de un 20 a 30% de pacientes con hemofilia severa y un 5 a 10% con hemofilia moderada o leve desarrollan inhibidores (anticuerpos) ante esta proteína de origen externo que neutraliza la actividad del factor administrado, lo que provoca que el tratamiento sea ineficaz en ciertos casos. La presencia de estos inhibidores en personas con hemofilia A leve o moderada resulta en una complicación grave de la enfermedad que disminuye la calidad de vida del paciente hemofílico (MSP, 2018).

El inhibidor de FVIII puede ser clasificado como de alta o baja respuesta dependiendo de su título o concentración y depende de diversos factores para su aparición como: factores genéticos que determinan el grado de severidad de la enfermedad (leve, moderada o severa) y no genéticos como el tiempo de administración del tratamiento. El desarrollo de inhibidor de FVIII es el mayor problema generado al recibir tratamiento con FVIII en los pacientes con hemofilia A debido a que los pacientes no controlan los procesos hemorrágicos tras recibir la dosis usual de factor liofilizado, lo que dificulta el tratamiento y control de los procesos hemorrágicos (MSP, 2016).

El Estado ecuatoriano invierte aproximadamente 9 '751. 883, 93 dólares al año para el diagnóstico y tratamiento de la hemofilia. Además, el MSP ha proporcionado una guía para el tratamiento de la hemofilia congénita. La guía sugiere realizar la confirmación y titulación de la presencia del inhibidor utilizando la prueba Bethesda o la prueba Nijmegen. La modificación Nijmegen es una prueba más sensible y específica capaz de detectar cantidades mínimas del inhibidor que no son detectadas por la prueba Bethesda, mejorando sensiblemente los resultados dando lugar a una detección temprana que permite modificar el tratamiento a este tipo de

pacientes, mejorando las tasas de morbilidad y mortalidad relacionadas con la enfermedad. En el país se utiliza la prueba Bethesda para evaluar estos inhibidores, sin embargo, es probable la obtención de resultados falsos negativos en ciertos pacientes, sin dar la oportunidad de una detección temprana y en los que además la concentración de inhibidores puede incrementar en el transcurso del tiempo y la respuesta a los mismos (MSP, 2016).

1.3. OBJETIVOS

1.3.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar la frecuencia del inhibidor del factor VIII mediante metodología Nijmegen en pacientes con hemofilia “A” que reciben tratamiento con FVIII liofilizado, inscritos en la FUNDHEC – Núcleo Pichincha, 2019.

1.3.2. OBJETIVO ESPECÍFICOS

- Determinar la frecuencia de pacientes con hemofilia “A” que han desarrollado inhibidor al FVIII tras terapia con FVIII liofilizado, por grupo etario.
- Asociar el grado de severidad de la hemofilia “A” con la respuesta al inhibidor del FVIII en pacientes con hemofilia “A” tras terapia con FVIII liofilizado.
- Asociar la respuesta al inhibidor al FVIII con el tiempo exposición al tratamiento con FVIII liofilizado en pacientes con hemofilia “A”.

1.3.3. LIMITACIÓN DEL ESTUDIO

El estudio se realizará a los pacientes con hemofilia “A” inscritos en la FUNDHEC- Núcleo Pichincha, se ha seleccionado este grupo de pacientes por ser el más representativo del universo de estudio, y por limitaciones económicas que no permiten realizar el estudio a pacientes inscritos en la FUNDHEC en otras provincias del Ecuador. El estudio no pretende en ningún momento demostrar alguna relación causa-efecto, está enfocado en la descripción del objeto de estudio y la asociación o no con otras variables.

CAPÍTULO II

2.1. MARCO TEÓRICO Y CONCEPTUAL

2.1.1. Antecedentes

Las investigaciones realizadas en pacientes con hemofilia A desde hace más de veinte años a nivel mundial reportaron la presencia del inhibidor al FVIII en pacientes que recibieron tratamiento con productos con FVIII (Federación Mundial de Hemofilia, 2014). En un estudio realizado en el año 2016 el cual afirma que la principal complicación en pacientes con Hemofilia A es la presencia de inhibidores (Guerrero, 2016)

La medición de la concentración de dicho inhibidor hasta la fecha en muchos laboratorios sigue siendo realizada por el método Bethesda (Kasper et.al, 1975), el cual posee una sensibilidad del 85 % y es la técnica más utilizada en Ecuador y en toda Latinoamérica para la detección del inhibidor al FVIII. Cuando la concentración del inhibidor es baja se añade una variación interlaboratorial en los resultados por el uso de diferentes técnicas en la prueba Bethesda por esta razón la detección de inhibidores en estos pacientes se ve afectada con repercusiones en el tratamiento. Por lo tanto, se recomienda una estandarización de métodos entre laboratorios para la determinación del factor VIII (Meijer & Verbruggen, 2009).

En el año 1995 se realizan modificaciones al método Bethesda para mejorar la sensibilidad y especificidad en la cuantificación del inhibidor del factor VIII, conocida como prueba Nijmegen que presenta ventajas frente a la prueba anterior, esta metodología es la que se utilizó para desarrollar en el estudio. Actualmente existe el método cromogénico que sustituyó al método coagulométrico con mejor sensibilidad y especificidad en la cuantificación del inhibidor y también existe un método de inmunoensayo basado en fluorescencia con capacidad para detectar títulos de anticuerpos menores a 0,03 UNB/mL (Blanco, Peirano, Grosso y Lazzari, 2007).

La Federación Mundial de Hemofilia (FMH) en el 2014 señaló que el desarrollo del inhibidor del FVIII es una de las causas más importantes que complica el

tratamiento en pacientes con hemofilia A, involucrando diversos factores en su desarrollo. Mutaciones genéticas, antecedentes en la familia, tratamiento con dosis altas del factor a edades tempranas durante varios días, aumentan el riesgo de desarrollar el inhibidor en algunos pacientes.

En una investigación realizada en Brasil, en el año 2014, se informa que la presencia del inhibidor contra el FVIII infundido es la mayor complicación relacionada con el tratamiento de hemofilia A. De la población brasileña estudiada $n = 6,835$ 7,5% presentaba inhibidores y de estos el 50,9% correspondieron a inhibidores de alta respuesta. Aunque se ha reportado que el 25.1% de pacientes no han sido analizados o no tienen datos registrados. (Ferreira, Leite, Bustamante-Teixeira y Guerra, 2014).

En el año 2015, Oldenburg afirma que del 20% al 30% de los pacientes con hemofilia A y alrededor del 5% de los pacientes con hemofilia B severa desarrollarán un inhibidor, anticuerpos dirigidos contra el factor VIII o IX bloqueando la efectividad del factor plasmático o recombinante infundido (Oldenburg, 2015).

En el año 2016, Feng y colab. evaluaron el valor clínico del ensayo de Bethesda y el ensayo de Nijmegen para la detección del inhibidor del FVIII en pacientes con hemofilia A. Se analizaron a 257 pacientes mediante los métodos ya mencionados, se compararon las tasas de positividad y los títulos de inhibidor de FVIII en función del valor de corte positivo de los inhibidores de FVIII ≥ 0.60 BU/ml. Los resultados en las tasas de positividad fueron de 79,38% con el método Bethesda y del 85,21% para el método Nijmegen. Concluyeron que el ensayo Bethesda tiene una sensibilidad menor que el ensayo de Nijmegen (Feng, Li, Xu, Chen y Zheng, 2016).

El año 2017, se realizó un estudio con el objetivo de determinar la frecuencia de inhibidores de FVIII y FIX en 104 pacientes hemofílicos que acuden a FUNDHEC. Se detectaron 34.6% de pacientes con hemofilia A moderada, 23.08% con hemofilia A severa y 13.4% con hemofilia A leve, el porcentaje de pacientes con hemofilia B moderada fue del 2.88%. Para la determinación del inhibidor se realizó la prueba de Bethesda como prueba estándar, el 40.8% de los resultados fueron positivos para la prueba Bethesda y de estos 5 pacientes resultaron tener inhibidores de alta respuesta. Se recomendó realizar una prueba de mayor sensibilidad para evitar

resultados erróneos, puesto que algunas concentraciones del inhibidor se encuentran por debajo del límite de detección de la prueba Bethesda. (Mardones, M; Pérez, Francisco; Pino, Marco, 2017).

2.2. MARCO TEÓRICO

2.2.1. Hemostasia

La hemostasia es el proceso mediante el cual el organismo responde a un daño en los vasos sanguíneos y el procedente sangrado. Este mecanismo incluye una serie de procesos que involucran a las plaquetas y a ciertas proteínas de la sangre llamadas factores de coagulación cuyo fin es la formación de un coágulo para detener el sangrado (Rodak, 2014).

Este proceso permite que el organismo cumpla tres funciones vitales: la formación de un tapón en la lesión del vaso, el fluido constante de sangre en el mismo, así como la restauración del vaso dañado y la remoción del coágulo (Martinuzzo, 2017)

2.1.1.1. Vasoconstricción refleja

Es una respuesta transitoria que ocurre en el vaso sanguíneo y es mediada por el sistema nervioso simpático. En esta fase ocurre un proceso de vasoconstricción (disminución del diámetro del vaso sanguíneo) para retrasar la hemorragia y favorecer el tránsito de células sanguíneas hacia el sitio de la lesión favoreciendo el contacto del subendotelio con las plaquetas (Pérez & Gómez, 2012).

2.2.2. Hemostasia primaria

La hemostasia primaria involucra una serie de procesos entre las plaquetas y el endotelio vascular para la formación del tapón plaquetario o tapón hemostático primario (Rodak, 2014)

- Adhesión plaquetaria

El colágeno es una proteína del endotelio importante en el proceso de adhesión plaquetaria, por lo tanto, el colágeno se adhiere al factor de von Willebrand y cambia

su conformación y permite que se fije a la plaqueta mediante la glicoproteína Ib/IX (Pérez & Gómez, 2012).

- Activación plaquetaria

Las plaquetas se activan y emiten una especie de pseudópodos, a la vez secretan sustancias plaquetarias contenidas en los gránulos alfa y delta como ADP, factor plaquetario 4, factor de crecimiento plaquetario, calcio, serotonina, tromboxano A₂, fibrinógeno y factor V (Pérez & Gómez, 2012).

- Agregación plaquetaria

La liberación de sustancias agonistas como epinefrina, ATP, tromboxano A₂, colágeno y trombina estimulan la unión entre plaquetas mediante el fibrinógeno y su receptor la glicoproteína IIb/IIIa y el reclutamiento de otras para la formación del tapón plaquetario que consiste en una masa de plaquetas degranuladas y rodeadas de escasa fibrina (Rodak, 2014).

2.2.3. Hemostasia secundaria

La hemostasia secundaria consiste en la activación de proteínas plasmáticas conocidas como factores de la coagulación para formar un coágulo estable de fibrina. En el plasma sanguíneo circulan alrededor de 16 proteínas llamadas serin proteasas que circulan como zimógenos inactivos, estas proteínas se activan en el proceso de coagulación y son capaces de activar a otras hasta formar el coágulo de fibrina, ciertas proteínas actúan como cofactores que junto con los factores son capaces de formar complejos que incrementan la actividad enzimática, otras proteínas controlan el proceso evitando una generación excesiva de trombina (Pérez & Gómez, 2012).

El factor tisular (FT) es una proteína presente en los fibroblastos y en las células del músculo liso del subendotelio. El FT expuesto tras una lesión vascular forma un complejo con el FVIIa y activa a los factores IX y X, el FIX junto a su cofactor VIII activan también al FX y este junto a su cofactor FV convierte a la protrombina en trombina y esta última separa los péptidos de fibrinógeno para formar fibrina y activa al FXIII que estabiliza el coagulo de fibrina formado (Rodak, 2014).

2.2.4. El FVIII y su importancia en la cascada de la coagulación

El factor VIII, conocido también como factor anti-hemofílico A, es una glicoproteína de origen hepático que se encuentra en el plasma unido al factor de von Willebrand. Actúa como cofactor de la coagulación necesario para la regulación y modulación de la hemostasia secundaria (Rodak, 2014).

El FVIII es una proteína que actúa como cofactor soluble unida al factor de von Willebrand confiriéndole una vida media mayor, el factor VIII es activado por la trombina y por el FX. Una vez activados, el FIX se une al FVIII y junto al calcio en presencia de fosfolípidos forman el complejo quinasa, importante para la activación del factor X (Gómez, Guerra, Dita, Fernández & Cabrera, 2011).

2.2.5. Teoría celular de la coagulación

La teoría celular de la coagulación se divide en las siguientes fases: iniciación, amplificación y propagación.

2.2.5.1. Iniciación

El factor tisular (FT) se expresa en la membrana celular de los fibroblastos y otras células endoteliales y actúa como cofactor del FVIIa, este complejo activa cantidades pequeñas de FIX y FX. El FXa se une a su cofactor el FVa y forman el complejo protrombinasa que genera una cantidad pequeña de trombina, el FV se activa por acción de FXa o por las plaquetas, este complejo está exento de la inactivación por parte de las proteínas de regulación, pero si FXa-FVa se disocia de las células es inactivado por inhibidores de proteasas TFPI (Martinuzzo, 2017).

El FIXa puede moverse a otra célula sin ser inhibido por TFPI y su activación no avanza si no se produce una lesión. La cantidad mínima de trombina generada por el complejo protrombinasa no produce un coágulo de fibrina (Cervera, 2012).

2.2.5.2. Amplificación

Tras una lesión vascular las plaquetas y el complejo formado por el FVIII-FvW se colocan en el espacio extravascular. Las plaquetas son activadas en el sitio de la

lesión vascular por la cantidad pequeña de trombina generada en la iniciación (Rodak, 2014).

Las plaquetas parcialmente activadas por el colágeno y trombina poseen una actividad procoagulante superior a las plaquetas solamente adheridas al colágeno. La trombina no solo activa a las plaquetas, también activa al FV, al FVII disociándolo del FvW y activa a FX (Pérez & Gómez, 2012).

2.2.5.3. Propagación

Estas reacciones ocurren en la superficie de las plaquetas activadas. El FIXa se une al FVIIIa formando el complejo tenasa que activa al FX, el FXa forma un complejo con el FVa que activa la protrombina formando un estallido de trombina que disocia el fibrinógeno para formar fibrina. La formación de trombina activa al FXIII que estabiliza el coágulo (Cervera, 2012) (Martinuzzo, 2017).

2.2.6. Fisiopatología de la coagulación

Las enfermedades asociadas a problemas en la coagulación pueden deberse a problemas asociados al proceso de coagulación, plaquetas o a los vasos sanguíneos. Los trastornos pueden ser hereditarios o secundarios a otro trastorno (Rodak, 2014). Los trastornos de la coagulación hereditarios más comunes están asociados al déficit o mal funcionamiento de un factor de la coagulación:

- Enfermedad de von Willebrand
- Hemofilia (Hemofilia A y B)

Los trastornos de la coagulación asociados a otra enfermedad:

- Deficiencia de vitamina K
- Enfermedades hepáticas
- Coagulación intravascular diseminada (CID)
- Desarrollo de anticoagulante (Pérez & Gómez, 2012).

2.2.7. Hemofilia

La hemofilia es una enfermedad ligada al cromosoma X, por ello, las mujeres son portadoras de la enfermedad y los hombres padecen de ella. La enfermedad se

caracteriza por presentar sangrados prolongados debido a la ausencia total o parcial del FVIII o FIX de la coagulación (FMH, 2012)^a.

2.2.8. Hemofilia A

La Hemofilia A es la forma más frecuente de hemofilia caracterizada por la presencia de hemorragias prolongadas o espontáneas ocasionadas por la ausencia total o parcial del FVIII de la coagulación. Se estima que alrededor de 1 de cada 6000 hombres sufren de esta enfermedad (Orphanet, 2009).

2.2.8.1. Alteración cromosómica

Las alteraciones cromosómicas incluyen deleciones, inserciones, mutaciones puntuales, inversiones y reordenamientos. En la hemofilia A grave se puede presentar dos inversiones, la inversión del intrón 1 y la inversión del intrón 22. Estas se pueden apreciar en un 20% de los casos totales de la enfermedad mientras que el 80% de los casos restantes se deben a mutaciones puntuales que pueden darse por la sustitución de un nucleótido, deleciones o inserciones siendo estas últimas las menos usuales (Rosetti, 2016).

2.2.8.2. Genética de la Hemofilia "A"

La hemofilia A tiene una herencia de carácter recesivo ligada al sexo con mutaciones en el cromosoma X. Estas mutaciones se dan en genes que codifican el factor VIII y como consecuencia producen la deficiencia de factor tanto cualitativa como cuantitativamente (Sanchez y otros, 2018). Es importante conocer si son mutaciones espontáneas (de novo) o heredadas con el fin de establecer un pronóstico a los hijos. Se conoce que el 70% de los pacientes son de origen hereditario y tan solo el 30% son mutaciones de novo. (Cervera, 2012)

Al ser una enfermedad ligada al sexo solo los hombres hemicigotos presentan las manifestaciones clínicas y las mujeres heterocigotas al tener un cromosoma X normal son capaces de producir una cantidad de factor FVIII adecuada. Las mujeres que poseen la mutación en el gen del factor VIII son llamadas portadoras. (Hatton, Hughes, Hay y Keeling, 2014).

A continuación, se presenta en la tabla 1 la herencia de Hemofilia A:

Tabla 1.

Herencia de Hemofilia A

Madre portadora	<ul style="list-style-type: none"> - 25% hija portadora - 25% hija sana - 25% hijo hemofílico - 25% hijo sano
Padre hemofílico	<ul style="list-style-type: none"> - Todas las hijas son portadoras - Todos los hijos son sanos
Padre hemofílico + Madre portadora	<ul style="list-style-type: none"> - 25% hija portadora - 25% hija hemofílica - 25% hijo hemofílico - 25% hijo sano

Fuente: Rodak, 2014

Los casos de mujeres con hemofilia son muy raros y se dan en tres situaciones; al tener una madre portadora y un padre hemofílico, una inactivación al azar del cromosoma X (fenómeno de Lyon) y una asociación con el síndrome de Turner (Hatton, Hughes, Hay y Keeling, 2014).

2.2.8.3. Grado de severidad de la enfermedad en la Hemofilia "A"

El grado de severidad de la hemofilia A se establece en base al nivel de deficiencia de FVIII determinada mediante un método coagulométrico o cromogénico clasificándose de la siguiente manera (Ver Tabla 2):

Tabla 2.

Grados de severidad de la hemofilia A

Grado de severidad	Concentración de FVIII	Descripción
Leve	>5 %	Hemorragias infrecuentes. Los problemas hemorrágicos suelen presentarse como consecuencia de lesiones importantes o después de procesos quirúrgicos.
Moderada	1-5 %	Hemorragias poco comunes, sin causa aparente. Frecuencia hemorrágica mensual. Las hemorragias se presentan después de procesos quirúrgicos, lesiones o tratamientos dentales.
Grave	<1 %	Hemorragias musculares y/o articulares son frecuentes en codos, tobillos y rodillas. La frecuencia de las hemorragias suele ser de una a dos por semana. Hemorragias sin motivo aparente.

Fuente: Cabré, Fernández & Grases, 2014

2.2.8.4. Fisiopatología de la hemofilia A

Para que el proceso de coagulación sea normal se requiere una vasoconstricción del vaso, activación y agregación plaquetaria para la formación del tapón primario y por último la participación de los factores de coagulación que al formar un tapón secundario tienen como finalidad detener el sangrado (Sánchez y otros, 2018).

Por lo general para que este proceso se cumpla se necesita de por lo menos el 30% de concentración del factor VIII de la coagulación (Moake, 2018). Los pacientes hemofílicos con concentraciones bajo el 30%, no crean el tapón

secundario ya que el factor VIII no permite la formación de fibrina cuya función es estabilizar al coágulo y la regeneración de vaso sanguíneo (Sánchez y otros, 2018).

2.2.8.5. Manifestaciones clínicas

Las manifestaciones clínicas en pacientes con hemofilia A depende de los niveles de factor VIII en plasma. Los pacientes con hemofilia A severa presentan hemorragias espontáneas en articulaciones como: codo, rodilla, cadera y tobillos; también pueden presentar hemorragia digestiva y hematuria. En pacientes con hemofilia A moderada o leve los sangrados se presentan después de traumatismo leves y no de manera espontánea (Pérez y Gómez, 2012).

Los sangrados más frecuentes se encuentran en las articulaciones y son conocidos como hemartrosis, se manifiestan con dolor, aumento de temperatura en la articulación tras un traumatismo previo o no y como consecuencia no existe una correcta funcionalidad de la articulación y al no tener un adecuado tratamiento el daño es irreparable (Cervera, 2012). Los sangrados menos frecuentes se presentan en sistema gastrointestinal, genitourinario y en mucosas oral y nasal después de una intervención quirúrgica (Sánchez y otros, 2018). (Tabla 2)

2.2.8.6. Diagnóstico por laboratorio en pacientes con hemofilia A

El déficit de factor VIII prolonga el tiempo de tromboplastina parcial activado (TTPa) mientras que los valores del tiempo de protrombina se encuentran normales. Valores de actividad coagulante del FVIII inferior al 50% o 50UI/dl confirman una sospecha de hemofilia A, esto puede ocurrir por un déficit de la proteína o por una alteración en su función. Debido a la estrecha relación entre el FVIII y el FwW se debe realizar un diagnóstico diferencial determinando los niveles y función del FwW (Cervera, 2012).

2.2.8.7. Tratamiento para pacientes con hemofilia A

- Farmacología del FVIII

El factor VIII liofilizado permite el reemplazo temporal del factor de coagulación VIII para una hemostasia adecuada, por lo tanto, previene y controla hemorragias en pacientes con hemofilia A. Comercialmente existen muchos productos de

reemplazo del factor VIII, estos difieren en la pureza y fuente del FVIII. Estos pueden ser: recombinantes o derivados plasmáticos y dependiendo del tipo de FVIII varia la farmacocinética, vida media, absorción, distribución, metabolismo y eliminación del fármaco (ANMAT,2015).

La farmacodinámica radica en los cambios que el organismo tiene debido al fármaco, es decir, el mecanismo de acción que tiene el FVIII infundido en el paciente. El producto de reemplazo del FVIII actúa en la cascada de coagulación acelerando la disociación del factor X por el factor activado IX. El FVIII forma un complejo con el vWF aumentando su síntesis y protegiéndolo de la proteólisis. Una vez liberado el FVIII del vWF, el FVIII es activado uniéndose a la superficie de fosfolípidos de las células dañadas y las plaquetas activadas. El FVIIIa es inestable y pierde rápidamente su actividad, por lo que su concentración en el plasma varía según el producto comercial (ANMAT,2015).

La farmacocinética hace referencia a los cambios que el fármaco (FVIII) sufre al entrar al organismo. La absorción máxima tiene un pico de actividad de 1 a 2 horas. La vida media del FVIII difiere tanto de la pureza como de la fuente del FVIII, pero aproximadamente tiene un promedio de 6 a 14 horas. La vida media del fármaco (FVIII) se reduce en pacientes con inhibidores (ANMAT,2015).

El conocimiento de la respuesta farmacocinética de un paciente que se está infundiendo FVIII es útil para el manejo clínico. Para conocer el perfil farmacocinético de concentrados de FVIII se deben tomar de 10 a 11 muestras de sangre durante 2 o 3 días y realizar una curva con las concentraciones de FVIII obtenidas a las 12, 24, 36 y 48 horas (Björkman et al., 2013).

Uno de los factores importantes que se debe tomar en cuenta en cómo funciona el fármaco es la edad; en niños la vida media del fármaco es más corta que en adultos, sin embargo, también existe variación en grupos de pacientes de la misma edad. Es importante conocer que el nivel de vWF sea normal, porque este posee una influencia importante en la vida media del FVIII. En la actualidad se están creando nuevos concentrados de factor y medicamentos basados en otras tecnologías con semividas mejoradas y rutas de administración alternativas (Oldenburg,2015).

El tratamiento principal para este grupo de pacientes consiste en administrar un concentrado plasmático altamente purificado de FVIII para tratar las hemorragias de forma precoz o como una medida profiláctica, sin embargo, este tipo de tratamiento puede generar el desarrollo de inhibidores (Cervera, 2012).

Una unidad de concentrado por kilogramo eleva la actividad del FVIII en un 2% con una vida media de 12 horas en el organismo por lo que es necesario dos administraciones al día (Sánchez et al., 2018).

En los casos de hemofilia grave existen medidas profilácticas que consisten en administrar el factor dos o tres veces a la semana a pacientes de 1 a 2 años de edad con el fin de evitar artropatías (Sánchez et al., 2018).

El mayor problema que surge del tratamiento es la formación de inhibidores (anticuerpos anti FVIII), estas proteínas aparecen en un 20% a 30% de los pacientes con hemofilia A grave por lo que en este grupo se sugiere administrar FVIII liofilizado que genera trombina de manera directa sin la intervención del FVIII, otra medida para este grupo de pacientes es la inducción de inmuno-tolerancia para una posterior administración de FVIII recombinante (Cervera, 2012).

La guía de práctica clínica para el diagnóstico y tratamiento de la hemofilia congénita proporcionada por el MSP en el año 2016 señala las siguientes pautas para el manejo de pacientes con y sin inhibidores.

- Tratamiento para pacientes sin inhibidores

Los pacientes con hemofilia A deben recibir terapia de reemplazo con concentrados de FVIII de origen plasmático o concentrados de coagulación recombinantes dentro de las dos primeras horas del inicio de la hemorragia o traumatismo. En caso de no contar con los concentrados de FVIII se puede recurrir al uso de plasma fresco congelado o crioprecipitados (MSP, 2016).

En individuos hemofílicos sin inhibidores se infunde por vía intravenosa cada unidad de FVIII por kilogramo de peso, esto elevará el nivel plasmático en 2 UI/dL o 2% de actividad de FVIII y se recomienda cuantificar el FVIII 15 minutos después de la infusión para corroborar la dosis administrada (MSP, 2016).

- Cálculo en la dosis

$$\text{Dosis de FVIII} = \text{Peso en kg} * \text{aumento deseado del nivel de FVIII} \left(\frac{\text{UI}}{\text{dL}} \right) * 0.5$$

- Tratamiento para pacientes con inhibidores

Los inhibidores en pacientes con hemofilia A pueden clasificarse en transitorios o de baja respuesta y permanentes o de alta respuesta. Una vez que se hayan desarrollado los inhibidores se sigue el siguiente abordaje clínico (MSP, 2016).

- Inducción a inmunotolerancia

Los pacientes con inhibidores de alta respuesta deben evitar administrarse productos de FVIII con el fin de disminuir el título del inhibidor y evitar un aumento amnésico constante. Ciertos pacientes pueden desarrollar una respuesta inmunológica retardada a las moléculas de FVIII inactivas en concentrados de complejo protrombínico activado por lo que la alternativa sería el uso de FVII recombinante (MSP, 2016).

Los pacientes con títulos inferiores a 10 UB tienen un 85% de éxito en ITU por lo cual tienen un buen pronóstico. Los pacientes con títulos superiores a 200 UB tienen mal pronóstico por lo cual la erradicación de los inhibidores se torna mucho más compleja. Los pacientes que presenten títulos bajos de inhibidor, pero con historial de inhibidor de alta respuesta deben recibir tratamiento como en los casos de emergencia hasta generar una respuesta anamnéstica en un periodo de tres a cinco días (MSP, 2016).

En el caso de pacientes con títulos altos de inhibidor y con historia de inhibidores de alta respuesta pueden recibir dos dosis de FVII recombinante y una dosis de concentrados de complejo protrombínico activado (bypassantes) para el manejo de hemorragias articulares (MSP, 2016).

La tolerancia al FVIII se demuestra cuando ya no se detecta un inhibidor y tiene una respuesta farmacocinética normal. Una recuperación del 66% de lo esperado y una vida media de 6 a 7 horas se han considerado respuestas farmacocinéticas

suficientemente normales para caracterizar la tolerancia completa (Kempton y Meeks, 2014).

- Tratamiento de eventos hemorrágicos agudos

El tratamiento para episodios hemorrágicos debe basarse en el título del inhibidor, en la historia de respuesta clínica al producto y el lugar de la hemorragia. Los pacientes que presenta inhibidores de baja respuesta pueden recibir FVIII en dosis más elevadas con el objetivo de neutralizar el inhibidor con cantidades excesivas de factor y así detener la hemorragia (MSP, 2016).

2.2.9. Anticuerpos y sistema inmune

Los anticuerpos son glucoproteínas pertenecientes al grupo de gammaglobulinas que yacen de forma soluble en el plasma sanguíneo, actúan como receptores de los linfocitos B y son utilizados por el sistema inmune para identificar agentes extraños y neutralizarlos. Estos agentes extraños son conocidos como antígenos, los cuales producen una respuesta inmune específica para cada uno de ellos. Los anticuerpos al ser específicos y diversos son los principales mediadores de la inmunidad humoral (Rodak,2014).

El sistema inmune adaptativo confiere al ser vivo la capacidad de reconocer y recordar agentes extraños específicos generando un grado de inmunidad con respuestas más potentes cada vez que el organismo se pone en contacto con esta molécula extraña (antígeno) (Pérez y Gómez, 2012).

Los linfocitos B y T poseen receptores específicos para cada antígeno, esta información se replica en cada generación de células nuevas. Pero hay veces que el sistema pierde tolerancia a determinados antígenos como es el factor deficitario sustitutivo que el paciente hemofílico necesita para su tratamiento y crea anticuerpos ya que lo reconoce como un invasor. Por lo tanto, los linfocitos B crean anticuerpos de tipo G contra el factor VIII (ACH,2014).

2.2.9.1. Respuesta inmune al FVIII

La respuesta inmune que presentan los pacientes con hemofilia A al recibir un antígeno peptídico exógeno, como es el FVIII, se da a través de varias interacciones

entre: las células presentadoras de antígenos (CPA), los linfocitos T CD4+ y los linfocitos B (Medina *et al.*, 2010).

La infusión de concentrados de FVIII en pacientes con hemofilia puede generar una respuesta inmune que inicia cuando las células presentadoras de antígeno (CPA) interactúan con los linfocitos T y estos con los linfocitos B que tras un proceso de endocitosis del agente extraño presentan moléculas peptídicas derivadas del antígeno a los linfocitos T cooperadores (Ochoa, 2010).

En la respuesta primaria interactúan el FVIII y las CPA. Todo inicia con el reconocimiento y endocitosis del FVIII por las células presentadoras de antígenos (CPA), a través de vesículas. Posteriormente las secuencias peptídicas del FVIII pasan a presentarse con el complejo mayor de histocompatibilidad II (MHC II) a los receptores de linfocitos T (TCR) y CD45 presentes en el ganglio linfático para que se activen y se diferencien en células T CD4+ específicas para el FVIII (Schep *et al.*, 2018).

Las células cooperadoras CD4+ ayudarán a los linfocitos B a que se diferencien en células B de memoria específicas para el FVIII y células plasmáticas productoras de anticuerpos (Martínez, 2018). Finalmente, en la respuesta secundaria se da la producción de anticuerpos inhibitorios frente al FVIII estos son de características policlonales que generalmente son de carácter IgG4 o IgG (Medina *et al.*, 2010).

El FVIII exógeno puede generar una respuesta inmune débil o fuerte. En la hemofilia A la mayoría de los casos con inhibidores son de *alta respuesta*; es decir, que a los pocos días después de la exposición al tratamiento con el factor exógeno el nivel de inhibidor se eleva rápidamente. Unos pocos pacientes poseen inhibidores de *baja respuesta* que se caracterizan porque el nivel de inhibidor no se eleva de manera rápida después de la exposición al FVIII exógeno (Collins *et al.*, 2013).

2.2.10. Inhibidor del factor VIII

Un inhibidor del FVIII es un anticuerpo que interviene en la función normal del FVIII de la coagulación. El inhibidor de FVIII puede ser de carácter inhibitorio (neutralizan

la actividad del factor VIII) o no inhibitorio (incrementa la depuración de este factor) (Arias, 2016).

El desarrollo del inhibidor de FVIII es una complicación importante relacionada con el tratamiento con FVIII como terapia de reemplazo en pacientes con hemofilia A. Estos inhibidores son inmunoglobulinas IgG desarrolladas por el sistema inmunológico tras exposiciones frecuentes al FVIII externo, carente o ausente en estos pacientes y actúan al reconocer epítomos funcionales de la molécula de este factor inhibiendo de tal manera su función (Ochoa, 2010).

Cuando un inhibidor es detectado se lo clasifica como de alta respuesta o baja respuesta, esto depende del nivel de estimulación que haya alcanzado el sistema inmune después de exposiciones frecuentes con el FVIII. Cuando el sistema inmune presenta un nivel de participación alto, es decir una reacción fuerte y rápida, la concentración del inhibidor puede alcanzar niveles elevados; por otro lado, si no existe una exposición frecuente al factor, los niveles de inhibidor llegan a un nivel bajo después de meses o años haber recibido el tratamiento (FMH, 2012) ^b.

2.2.10.1. Características del inhibidor del FVIII

El inhibidor del factor VIII se caracteriza por ser un anticuerpo anti-FVIII de tipo IgG policlonal de una alta afinidad con la IgG 4. Este anticuerpo reacciona con sitios estratégicos de la molécula de factor VIII como son: A2, A3, C1 y C2, aunque los más frecuentes son el A2 y C2. La función principal de este inhibidor es contrarrestar el efecto procoagulante del FVIII de varias maneras; la principal es mediante la unión del inhibidor a los epítomos funcionales del factor VIII (A2 y C2). Y la otra va dirigida hacia los epítomos no funcionales (A1 y C1) limitando la función del FVIII mediante la formación de complejos inmunes que aceleran la eliminación del FVIII. También existe inhibidor que posee una actividad enzimática e inactivan mediante hidrólisis al FVIII (Schep et al., 2018).

La probabilidad de que el inhibidor del FVIII se fije al complemento o se precipite es muy baja al igual que no está relacionado con la producción de reacciones alérgicas. La reacción del factor VIII con su inhibidor es tiempo y temperatura

dependiente lo que indica su importancia en la medición y tratamiento clínico (Arias, 2016).

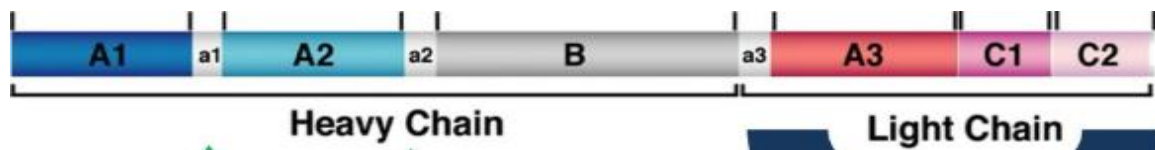


Figura 1. Estructura del inhibidor del FVIII, se pueden observar los sitios estratégicos de unión con el inhibidor

Fuente: Núñez, 2017

2.2.10.2. Clasificación de inhibidores

Los inhibidores de factores de la coagulación pueden ser adquiridos o específicos

- Inhibidores adquiridos

Son anticuerpos que afectan una o más fases de la coagulación y pueden alterar las pruebas de tiempo de tromboplastina parcial activado (TTPa), tiempo de protrombina (TP) y/o tiempo de trombina (TT), también pueden alterar la actividad coagulante de uno o más factores al inhibirlo o al interferir con su reacción. Se dividen en específicos y de interferencia. (Remotti et al., 2016).

- Inhibidores específicos

Son aloanticuerpos que se desarrollan en pacientes con un déficit total o parcial de un factor de la coagulación o autoanticuerpos que pueden presentarse en personas sin antecedentes de coagulopatías. Este tipo de inhibidores pueden inhibir la función del factor o aumentar su depuración y no inhibirlo (Remotti et al., 2016).

- Inhibidores de interferencia

Son anticuerpos que interfieren en el proceso de coagulación y pueden alterar la actividad de los factores en la vía. Estas proteínas ejercen su función en una o más fases de la coagulación (Remotti et al., 2016).

2.2.11. Fisiopatología y factores predisponentes en el desarrollo de inhibidores

La presencia de inhibidores es más frecuente en individuos con hemofilia A especialmente en aquellos en los que su condición es severa. Se ha relacionado la presencia de inhibidores a factores genéticos como etnia, inmunofenotipo de antígenos leucocitarios, defectos moleculares de las citoquinas y a factores no genéticos como el tipo de medicamento utilizado, edad de la primera administración, vacunas o transfusiones previas, etc (CDC, 2017).

Los factores predisponentes para el desarrollo de inhibidores son múltiples. A continuación, se describen dos condiciones importantes para el desarrollo de estos anticuerpos, los relacionados con el paciente y los asociados al tratamiento.

Tabla 3.

Factores predisponentes para el desarrollo de inhibidores

Factores relacionados con el paciente	Factores relacionados con el tratamiento
Etnia	Tratamiento intensivo con factores
Historia familiar	Edad de la primera exposición
Mutación en el gen que codifica para el FVIII	Cirugías o procesos inflamatorios
Polimorfismos en genes partícipes de la respuesta inmune	Profilaxis con factores
	Tipo de concentrado de factor (recombinante o plasmático).

Fuente: Cabré, Fernández & Grases, 2014

2.2.12. Diagnóstico por laboratorio en pacientes con hemofilia A que han desarrollado inhibidores

El diagnóstico de un paciente con inhibidores se da mediante pruebas de laboratorio, estas pruebas determinan si una persona presenta inhibidores al medir el valor de estas sustancias en el plasma sanguíneo. Los títulos del inhibidor se miden en unidades Nijmegen-Bethesda (UNB) o unidades Bethesda (UB)

dependiendo de la metodología aplicada. Mientras mayor sea el título del inhibidor más alta será su concentración en la sangre (CDC, 2017).

2.2.13. Tratamiento para pacientes con inhibidores al FVIII

Una de las mayores complicaciones para un paciente con hemofilia A es el desarrollo de inhibidores, anticuerpos de tipo IgG anti FVIII que se generan por la terapia de reemplazo con FVIII. La inducción de inmunotolerancia es la alternativa más efectiva para tratar a los pacientes con inhibidores al FVIII, este proceso implica una infusión diaria de concentrado de factor (Cervera, 2012).

Las siguientes estrategias son las actualmente aplicadas a este grupo de pacientes:

- Inducción de tolerancia inmune: Exposición constante al FVIII durante meses o años. El propósito de esta medida es generar un agotamiento de linfocitos T a causa de una sobreestimulación conduciendo a un estado de anergia e inhibición de la diferenciación a linfocitos B.
- Agentes bypass: Favorecen la generación de trombina sin partir de los factores VIII o IX. Incluyen concentrados recombinantes de complejo de protrombina activado. Esta medida no solo se aplica a los episodios agudos de hemorragias sino también en el manejo profiláctico de pacientes con hemofilia y pacientes que han desarrollado inhibidores y que han sido sometidos a inmunotolerancia exitosa o fallida.
- Otros agentes terapéuticos como el anticuerpo recombinante FIXa/FX que posee una actividad similar al FVIIIa (Sánchez et al., 2018).

Actualmente el enfoque para el tratamiento se basa en productos farmacéuticos que tengan una acción prolongada para que el número de infusiones en el paciente hemofílico sea mejor de manera que la calidad de vida sea mejor y tenga una mejor adherencia terapéutica. Por ser una enfermedad genética se ha estudiado el desarrollo de la terapia génica con el fin de curar al paciente hemofílico, a través de vectores virales (adenovirus). Por último, las investigaciones se han centrado en presentaciones orales que mejoran una adherencia del medicamento en el paciente (Sánchez et al., 2018).

2.2.14. Métodos para el diagnóstico de inhibidores

Los inhibidores suelen ser diagnosticados tras un seguimiento rutinario del paciente o tras observar una respuesta baja al tratamiento con concentrados de FVIII. Se han descrito cinco métodos para detectar la presencia de inhibidores, estos son, la prueba de Kasper; de Keeling; ELISA anti-FVIII; prueba de Bethesda y prueba de Nijmegen (Cabré, Fernández & Grases, 2014).

- Prueba de Kasper: Utilizada para detectar la presencia de inhibidor que afecta únicamente la vía intrínseca de la coagulación mediante el ensayo de TTPa.
- Prueba de Keeling: Para la detección de inhibidor específico de FVIII.
- ELISA anti FVIII: Detecta anticuerpos (inhibidores) anti FVIII.
- Prueba Bethesda: Útil para cuantificar inhibidores de FVIII.
- Prueba Nijmegen: Prueba Bethesda modificada en cuanto a sensibilidad y especificidad con el fin de disminuir la incidencia de falsos resultados positivos dados por la prueba convencional de Bethesda (Arias, 2016).

La prueba Bethesda y Nijmegen dan resultados muy similares en títulos altos de inhibidor del FVIII, pero en títulos bajos la prueba Bethesda puede dar falsos positivos. Mientras tanto que en la prueba Nijmegen daría niveles cero de inhibición (Dacie y Lewis, 2018).

El método empleado comúnmente para la detección de inhibidores es la prueba de Bethesda, esta fue desarrollada para estandarizar la medición de inhibidores en una prueba de neutralización de FVIII. Una unidad Bethesda se define como la cantidad de inhibidor que genera una actividad residual de FVIII del 50%. La modificación de Nijmegen del método Bethesda original posee características especiales (el pH y la concentración de la proteína son estandarizadas) que le confieren una mejor sensibilidad y especificidad a la prueba (Cabré, Fernández & Grases, 2014).

2.2.14.1. Metodología Bethesda

El ensayo Bethesda es utilizado desde 1975, este se basa en medir la disminución de la actividad del FVIII mediante la mezcla en volúmenes iguales de un pool que

contiene una concentración de factor VIII normal y el plasma con el inhibidor durante 2 horas a 37°C ya que el inhibidor del factor VIII es dependiente al tiempo y a la temperatura. También se realiza una medición de referencia que es la mezcla del pool de plasma normal más tampón imidazol (Verbruggen, 2010).

Luego se cuantifica el factor VIII de la muestra control y la del paciente. Para conocer el porcentaje del factor VIII se compara la muestra del paciente con la muestra del control. El resultado debe estar expresado en Unidades Bethesda (UB) por mL; esto se determina a partir de un gráfico semilogarítmico de la recta teórica de FVIII residual (%) vs potencia del inhibidor. Una unidad Bethesda (UB) se define como la cantidad de inhibidor que resulta en un 50% de actividad residual de FVIII. Se consideran positivos para inhibidores el punto de cohorte mayor a 0,6 UB/mL y negativos valores menores al 0,6 UB/mL (Duncan, Collecutt y Street, 2013).

Solo se puede usar el porcentaje residual de FVIII: C entre 25 y 75% para determinar el nivel de inhibidor. Para un inhibidor > 2 UB / mL, se analizan diluciones de plasma del paciente y se corrige el resultado para el factor de dilución (Duboscq, Ceresetto, Arias y Forastiero, 2016)

2.2.14.2. Metodología Nijmegen

La modificación del método Bethesda conocida como Nijmegen se desarrolló para mejorar deficiencias del ensayo y aumentar la especificidad. Estudios han demostrado que los cambios del pH y las concentraciones de proteínas producen cambios en la estabilidad del factor VIII. El aumento de ph produce un incremento en la inactivación del FVIII y la concentración baja de proteínas en una inactivación de la actividad del FVIII (Dacie y Lewis, 2018).

La modificación Nijmegen al utilizar tanto en la mezcla control como en la del paciente un pool de plasma normal tamponado con imidazol 0,1 M a un pH de 7,4 ayuda a mantener el pH durante las 2 hora de incubación. Y para que la concentración de proteínas sea igual tanto de la mezcla control y del paciente se utiliza un plasma deficiente de FVIII. Todas estas modificaciones en el método Nijmegen evitan el deterioro del FVIII exógeno y mantienen la estabilidad del mismo (Duncan, Collecutt y Street, 2013)

Para calcular las Unidades Nijmegen- Bethesda (UNB) se realiza lo mismo que el método anterior; primero mediante una fórmula se obtiene el factor VIII residual y ese valor se compara con el gráfico semilogarítmico para tener el resultado en UNB. La Unidad Nijmegen-Bethesda (UNB) se define como la cantidad de inhibidor que deja 50% de FVIII residual (Duboscq, Ceresetto, Arias y Forastiero, 2016).

Tabla 4.

Diferencias entre método Bethesda y Nijmegen

	Método Bethesda	Método Nijmegen
Mezcla control	Pool de plasma normal + tampón imidazol	Pool de plasma normal taponado con imidazol pH 7,4 + plasma deficiente de FVIII.
Mezcla Paciente	Plasma del paciente + pool de plasma normal	Plasma del paciente + Pool de plasma normal taponado con imidazol pH 7,4
Tiempo de incubación	2 horas	2 horas
Temperatura de incubación	37°C	37°C
Diluciones	Con reactivo de Owen	Con plasma deficiente de FVIII (reactivo de FVIII)

Fuente: Miller, 2017

2.3. MARCO CONCEPTUAL

Hemofilia A: Forma más común de hemofilia, es una enfermedad genética ligada al sexo, la cual es originada por mutaciones en el cromosoma X y ocasionada el déficit total o parcial de FVIII (Sociedad Argentina de Hematología, 2017).

Inhibidor de FVIII: Anticuerpos que neutralizan la actividad del FVIII de la coagulación, pueden surgir como aloanticuerpos en pacientes con hemofilia "A" que reciben tratamiento de reemplazo con FVIII (FMH, 2014).

FVIII liofilizado: Fórmula utilizada como terapia de reemplazo en pacientes con hemofilia "A". Este como compuesto actúa como factor endógeno en el plasma del paciente (MINSAL, 2013).

Terapia de reemplazo: Terapia de sustitución que consiste en proporcionar al organismo ciertos compuestos carentes o ausentes en él. (FMH, 2014)

Prueba Bethesda: Prueba de referencia para determinar la potencia de inhibidores, descrita en 1975 por Kasper et al. Se obtiene al mezclar un volumen de plasma del paciente con un volumen de pool de plasma normal que contiene 100 UI/dl DE FVIII. El control se obtiene al mezclar en cantidades iguales el plasma normal y el tampón imidazol (Duboscq, Ceresetto, Arias y Forastiero, 2016).

Unidad Bethesda (UB): Una UB es la concentración del inhibidor presente en el plasma del paciente diluido, capaz de inactivar el 50% de FVIII de la mezcla control incubada por dos horas a 37°C (Duboscq et. al., 2016).

Prueba Nijmegen: Método recomendado por la subcomisión de Factores VIII/IX de la Sociedad Internacional de Trombosis y Hemostasia como método de referencia para la detección de inhibidores de FVIII/FIX. Consiste en tamponar el plasma normal con imidazol 10,1M a un pH de 7.4, se utiliza plasma deficiente en FVIII en lugar de buffer en la muestra control (Duboscq, et. al., 2016).

Inhibidores de baja respuesta: Inhibidor cuya concentración se encuentra en cantidades menores a 5UB (Arias, 2016).

Inhibidores de alta respuesta: Inhibidores que actúan poderosamente y neutralizan al factor inmediatamente. Su título es superior a 5UB (Arias, 2016).

CAPÍTULO III

3.1. MARCO METODOLÓGICO

3.1.1. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1.1.1. Tipo de Estudio

El presente estudio es de tipo observacional, descriptivo, transversal y correlacional. Es observacional porque se basa en la observación y registro de la presencia del inhibidor a través de una prueba de laboratorio y una encuesta, sin manipular o modificar la unidad de análisis; descriptivo porque a través de los datos se caracteriza el objeto de estudio y el comportamiento de las variables (presencia de inhibidor, respuesta al inhibidor, edad, severidad de la hemofilia) en una muestra específica y en un periodo de tiempo establecido; transversal ya que se realizarán las pruebas de laboratorio y la toma de datos en un solo momento durante el tiempo del estudio, y correlacional porque se busca la asociación de la respuesta del inhibidor con el tiempo de exposición al tratamiento y el grado de hemofilia.

3.1.1.2. Tipo de Muestreo

Se utilizó un muestreo aleatorio simple ya que todos los pacientes que forman parte del universo de estudio tienen una probabilidad similar de ser seleccionados para formar parte de la muestra de estudio.

3.1.1.3. Tamaño de Muestra

Para el cálculo del tamaño de muestra se utilizó la fórmula para población finita y una proporción, considerando una población finita de 184 pacientes con hemofilia A inscritos en la FUNDHEC-Núcleo Pichincha de acuerdo a los registros que la FUNDHEC.

$$n = \frac{N * Z_{\alpha}^2 * p * q}{d^2 * (N - 1) + Z_{\alpha}^2 * p * q}$$

Donde:

N: tamaño de la población total

n: tamaño de la muestra

Z: nivel de confianza

p: Probabilidad de que suceda el evento

q: Probabilidad de que no suceda el evento

d: Margen de error de muestra

Para el estudio:

$$n = \frac{184 * 1.96^2 * 0.3 * 0.7}{0.05^2 * (184 - 1) + 1.96^2 * 0.3 * 0.7}$$

$$n = 118$$

Considerando una población finita de 184 pacientes con hemofilia A pertenecientes a FUNDHEC- Núcleo Pichincha, un intervalo de confianza del 95% (z de 1,96), un margen de error del 5%, y una probabilidad de que suceda el evento (prevalencia) del 30% (MSP, 2016.), el tamaño muestral fue de 118 pacientes.

Tomando en cuenta las posibles pérdidas para un R del 15%:

N= 118

R= 15%

$$\text{Muestra ajustada a las pérdidas} = 118 * \left(\frac{1}{1-0.15} \right)$$

$$\text{Muestra ajustada a las pérdidas} = 139$$

Decisión: con un nivel de confianza de 95%, un margen de error del 5% y una probabilidad de que suceda el evento del 30% sin considerar el porcentaje de pérdidas se requirieron para el presente estudio 118 pacientes con hemofilia A.

La muestra estuvo conformada por 118 pacientes con Hemofilia "A" desde un año de edad, inscritos en la FUNDHEC que reciben tratamiento con FVIII liofilizado y que cumplan con los criterios de inclusión señalados a continuación. La muestra para estudio fue enfocada únicamente en el FUNDHEC-Núcleo Pichincha porque

se prefirió mantener cercanía entre la zona de obtención de la muestra y el área de análisis para un transporte adecuado y rápido de las mismas, además el número de pacientes con hemofilia A pertenecientes la provincia de Pichincha es el más representativo del total de paciente con Hemofilia A.

3.1.1.4. *Criterios de Inclusión*

- Pacientes con hemofilia A registrados en la FUNDHEC- Núcleo Pichincha que reciben tratamiento con FVIII liofilizado.
- Se incluyen pacientes varones adultos y niños desde un año de edad hasta 65 años de edad.
- Pacientes, padres de familia o representantes legales cuyos hijos o representados reciben FVIII liofilizado y que de forma libre y voluntaria deseen participar en el estudio y firmen el consentimiento / asentimiento informado (Anexo 1).
- Paciente sin haber realizado ejercicio por lo menos 60 minutos antes.

3.1.1.5. *Criterios de Exclusión*

- Pacientes con hemofilia A registrados en la FUNDHEC- Núcleo Pichincha que han recibido FVIII liofilizado en las últimas 72 horas previas a la toma de muestra sanguínea.
- Pacientes que deciden retirarse del estudio.
- Padres de familia o representantes legales que deciden retirar al niño del estudio.
- Pacientes que presenten otra coagulopatía.
- Pacientes que presentan alguna inflamación o infección aguda.
- Paciente con hemofilia adquirida de factor VIII.
- Pacientes que no acepten participar en el estudio y que no hayan firmado el consentimiento informado/asentimiento informado
- Pacientes menores de un año de edad.
- Pacientes mayores de 65 años.

3.1.1.6. *Análisis Estadístico*

La información de la encuesta y los resultados de los análisis del laboratorio se ingresaron al programa estadístico SPSS versión 25.0. La información de las variables cualitativas y de las variables cuantitativas discretas se trabajaron con frecuencias absolutas y relativas, información que se resumirá en tablas y gráficas; para las variables cuantitativas continuas se calcularán las medidas de tendencia central y dispersión en caso de requerirlas.

La asociación de variables, grado de severidad de la Hemofilia A vs respuesta al inhibidor al FVIII, y la asociación de tiempo de exposición al tratamiento vs la respuesta al inhibidor al FVIII se trabajarán con la ayuda de tablas de contingencia y se aplicará la prueba de Chi cuadrado, para un alfa del 0.05.

3.2. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

3.2.1. Variable dependiente

- Inhibidor del FVIII

3.2.2. Variables independientes

- Grado de severidad de la enfermedad
- Tiempo de exposición al tratamiento con FVIII
- Edad

Operacionalización de Variables

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Categoría	Tipo de variable	Escala de medición	Indicador	Técnica	Instrumento
Inhibidor de FVIII	Anticuerpo generado tras el tratamiento con FVIII como terapia de reemplazo.	Anticuerpo detectado en plasma mediante el método coagulométrico de Nijmegen	Presencia del inhibidor Ausencia del inhibidor	Cualitativa	Ordinal	Frecuencia relativa (%)	Laboratorio Modificación Nijmegen	Registro equipo
Respuesta del inhibidor de FVIII	Nivel de respuesta dependiente de la forma de estimulación del sistema inmune de una persona después de exposiciones repetidas a FVIII liofilizado.	La respuesta del inhibidor al FVIII se determina por el punto de corte de 5 NBU de concentración del inhibidor, para una respuesta baja si es inferior a 5 y una respuesta alta si es superior.	Alta respuesta: >5 NBU Baja respuesta: <5 NBU	Cualitativa	Ordinal	Frecuencia relativa (%)	Laboratorio Modificación Nijmegen	Registro equipo
Edad	Tiempo que ha vivido una persona u otro ser vivo contando desde su nacimiento.	Edad en años cumplidos al momento de realizar el estudio.	Preescolares o niñez: 1 – 4 años. Escolares: 5-11 años. Adolescentes: 12-18 años. Adulto: > 18 años a ≤ 65 años. Adulto mayor: > 65 años. (SIISE, 2017)	Cualitativa	Discreta	Frecuencia relativa (%)	Cuestionario	Encuesta
Grado de severidad de la hemofilia “A”	Grado de severidad de la enfermedad dependiente de la cantidad de factor de coagulación ausente en el paciente hemofílico.	Grado severidad de hemofilia “A” dado por la concentración de FVIII medido por coagulometría y de acuerdo a lo establecido la Sociedad de Hemofílica Ecuatoriana.	Leve: >5UI/DI Moderada: 1-5 UI/dL Severa: < 1UI/dL	Cualitativa	Ordinal	Frecuencia relativa (%)	Laboratorio Coagulometría	Registro equipo
Tiempo de exposición al tratamiento con FVII liofilizado	Tiempo de exposición al tratamiento con FVIII liofilizado.	Tiempo en meses que indique el paciente en el cuestionario.	Meses: 1 mes -12 meses Años: > 12 meses	Cualitativa	Ordinal	Frecuencia relativa (%)	Cuestionario	Encuesta

3.3. MATERIALES Y PROCESO

3.3.1. Materiales

Toma de muestras

- Agujas toma múltiple G21 y G23
- Tubos con citrato de sodio 3.2%
- Swabs de alcohol al 70%
- Torniquete
- Guantes de nitrilo talla XS
- Cápsulas para extracción al vacío

Análisis de muestras

- Tubos de vidrio nuevos
- Puntas para pipetas automáticas (azules y amarillas)
- Pipetas automáticas 50-100 uL; 100-200 uL; 200-1000 uL
- Papel absorbente
- Marcador para rotulación de tubos
- Guantes de nitrilo
- Tubos Eppendorf

3.3.2. Reactivos

- Hipoclorito de sodio al 0.75%
- Plasma deficiente de FVIII de la coagulación SIEMENS
- Tiempo de tromboplastina parcial activado (Dade actin) marca SIEMENS
- Plasma control Siemens CS (normal y patológico)
- Buffer de imidazol 1M

3.3.3. Control de Calidad

Calidad de toma de muestra y muestra obtenida

- Previa a la toma de muestra se confirmó que los pacientes hayan acudido cumpliendo las condiciones preanalíticas establecidas.
- Se utilizaron los implementos necesarios para la obtención de un plasma adecuado para el estudio de inhibidores del FVIII. (Anexo 8)

Calibración de la prueba de FVIII

- Se utilizó un estándar human plasma con concentración conocida para la calibración de la prueba de FVIII aplicando las diluciones pre establecidas por el fabricante y proveedor del equipo y reactivos.
- Se verificó que la curva cumpla con los criterios aptos para su validación.

Control instrumental

- Se tomó en cuenta los parámetros dictados por la Norma CLSIEPI5A3, lo cual considera precisión, error total, error permitido, vías porcentuales y variabilidad biológica, esto con el fin de garantizar un buen desempeño del método coagulométrico para una mayor confiabilidad de los resultados del FVIII.

Control de calidad normal y patológico

- Para cada corrida se utilizó un control de calidad interno dado por la casa comercial para asegurar la precisión y veracidad de los resultados obtenidos.
- Se utilizó plasmas con valores normales y patológicos de factor VIII, los cuales fueron adquiridos de la casa comercial SIEMENS.
- Se analizaron dos niveles de control de calidad (intervalo normal y patológico) al inicio de un ciclo de ensayo, con cada calibración, cuando se cambió el frasco de reactivo y al menos cada ocho horas en cada día de ensayo.
(Anexo 9).

3.4. PROCEDIMIENTO

El procedimiento para este estudio constó de siete fases

3.4.1. Fase Uno: Solicitudes, autorizaciones y aprobaciones

- Obtención de la autorización para la realización del estudio en la FUNDHEC-Núcleo Pichincha (Anexo 4), con la presentación de la solicitud respectiva en la que se manifieste el deseo de realizar el estudio, se detalla su importancia y los beneficios para los pacientes que allí acuden (Anexo 3), y el compromiso de que las investigadoras (estudiantes) respetarán la confidencialidad de la información (Anexo 14).
- Solicitud a las autoridades de la Facultad de Medicina y Carrera de Bioquímica Clínica de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador para el uso del laboratorio de Hematología, infraestructura, ultra congeladora y equipos, para la realización de las pruebas por el laboratorio (Anexo 5).
- Presentación del proyecto de investigación y la solicitud de autorización del mismo por el Comité de Ética de la Investigación en Seres Humanos de la PUCE (CEISH-PUCE) y la aprobación del Consentimiento informado y el asentimiento informado para su aplicación en la recolección de información y de muestras biológicas.
- Presentación del protocolo de investigación y solicitud de aprobación de la investigación por parte de la Dirección Nacional de Inteligencia de la Salud – DNIS del Ministerio de Salud Pública (MSP), previo a su ejecución.
- Reunión y planificación con representantes y otras autoridades de la FUNDHEC para planificación de reunión y convocatoria a los pacientes adultos hemofílicos tipo A inscritos en FUNDHEC pertenecientes a la provincia de Pichincha.

3.4.2. Fase Dos: Recolección de información- consentimiento/asentimiento informado y encuesta

- Una vez otorgado el permiso por parte de la FUNDHEC se estableció la fecha de la reunión de las investigadoras con los pacientes hemofílicos (Hemofilia A), padres o representantes legales de niños(as) y adolescentes menores de edad que presentan Hemofilia A. La convocatoria fue enviada por la FUNDHEC mediante vía electrónica y contacto telefónico con cada uno de los pacientes y representantes registrados en la base de datos.
- En la reunión con los pacientes adultos hemofílicos inscritos en FUNDHEC pertenecientes a la provincia de Pichincha, a los niños y adolescentes hemofílicos y sus padres o representantes legales y autoridades de la FUNDHEC, las estudiantes presentaron el estudio, sus objetivos y los beneficios de su realización, el tipo de muestra biológica a utilizar y el procedimiento para su obtención y además de detallar como se va a asegurar la confidencialidad de la información. Se designó los días de toma de muestra.
- El mismo día de la reunión y después de contestar cualquier pregunta o inquietud se presentó el consentimiento informado/asentimiento a los pacientes hemofílicos y padres o representantes legales de los menores de edad (Anexo 1) para que realicen la lectura de este. Las investigadoras contestaron toda pregunta e inquietud de los pacientes o representantes, luego de lo cual si decidieron participar libre y voluntariamente se les pidió firmen el consentimiento/asentimiento informado o se coloque la huella digital de ser el caso.
- Inmediatamente después de la firma libre y voluntaria del consentimiento/asentimiento informado se proporcionó la información necesaria sobre las condiciones previas para la toma de muestra sanguínea a los pacientes hemofílicos, padres o representantes legales. Esta información se dio a conocer mediante una charla por parte de las estudiantes y la entrega de un tríptico informativo que detalla las

condiciones preanalíticas (Anexo 2). Determinado esto se planificó con las autoridades de la FUNDHEC la hora y día para la cita de toma de muestras.

- Se creó una lista de datos en una hoja electrónica (excel versión 2016) que conectó el identificador (nombre completo del paciente) con el código alfanumérico único y exclusivo para cada paciente. El código fue utilizado tanto para la encuesta como para identificar las muestras biológicas y la base de datos que contienen la información obtenida de la encuesta y de las pruebas de laboratorio, y que se utilizó para el análisis estadístico.
- La lista con identificadores fue resguardada por la directora del proyecto en una memoria externa y en su computadora personal, con clave de acceso al archivo y las investigadoras pudieron acceder a este documento previa autorización de la directora. La base de datos únicamente con códigos de pacientes y datos de las variables en estudio fue guardado en la computadora de las investigadoras con claves de acceso y la directora de la investigación tuvo libre acceso al mismo. Los datos y la información obtenida se guardarán por 7 años, pasado este tiempo se borrará el archivo y cualquier copia o rastro del mismo de forma definitiva.
- La toma de muestras se realizó en la FUNDHEC posterior a una cita planificada y organizada con los pacientes que forman parte de la muestra de estudio, para prevenir los posibles daños generados durante la toma de muestras se contó con personas expertas en técnicas de flebotomía que brinde la asistencia adecuada de ser necesaria.

3.4.3. Fase Tres: Toma de muestra sanguínea

- La toma de muestra sanguínea se realizó en la FUNDHEC-Núcleo Pichincha ubicada en Av. Colón y Yanes Pinzón N 26-76.
- Una vez reunidos los pacientes para la toma de muestras, se realizaron las encuestas (anexo 7) para cerciorarse que el paciente se encontrara en las condiciones preanalíticas necesarias y cumpliera los criterios de inclusión.

- La toma de muestra sanguínea se realizó por punción venosa en antebrazo o zona anterocubital para los adultos y niños (as) mayores a un año, adolescentes y jóvenes, utilizando el sistema de extracción al vacío y recolectando 5 mL de sangre en tubos de extracción al vacío, utilizando como anticoagulante citrato de sodio al 3.2%. En el caso de los niños se utilizó una aguja de menor calibre (23G) y tres tubos pediátricos de 1 mL para la extracción de la muestra sanguínea.
- En el caso de niños que no colaboraron con el proceso el padre o representante legal ayudó, manteniendo al niño en su falda durante el proceso. Además, la tutora del proyecto colaboró en los casos que se dificultó la extracción sanguínea.
- La extracción de sangre venosa se realizó de acuerdo al procedimiento establecido en la guía Clinical Laboratory Standards Institute, CLSI GP41-A6 (Procedures for the Collection of Diagnostic Blood Specimens by Venipuncture; Approved Standard-Sixth Edition) (Ver detalle de la técnica en el anexo 8). Los tubos con las muestras recolectadas se identificaron con el código asignado a cada paciente y la fecha y hora en la que se realizó la toma, para asegurar la confidencialidad del paciente. Inmediatamente se centrifugaron las muestras de 15 a 20 minutos a 3 500 rpm para la obtención de plasma pobre en plaquetas, después de esto se separó el plasma en tubos plásticos nuevos de 5ml. Todo el material utilizado para la toma fue descartado en los recipientes para cortopunzantes y los demás en fundas rojas etiquetadas adecuadamente, las mismas que fueron trasladadas al laboratorio de Hematología de la Carrera de Bioquímica-PUCE para su procesamiento y desecho. Se llenará un check-list para la verificación de condiciones preanalíticas (Anexo 12) y para el control de la toma de muestra y la muestra obtenida (Anexo 13). Inmediatamente después de la toma muestra sanguínea se mantuvo presionada la zona de punción por al menos 10 minutos, evitando de esta manera un sangrado prominente posterior en la zona de extracción.

3.4.4. Fase Cuatro: Procedimientos por el laboratorio

3.4.4.1. Almacenamiento y transportes de muestras

Las muestras (plasmas) fueron transportadas hacia el laboratorio de Hematología de la Carrera de Bioquímica Clínica de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, respetando la norma de triple empaque para el transporte de muestras biológicas.

Las muestras fueron transportadas, con los tubos en posición vertical y firme en el transcurso no superior a cuatro horas a partir de su recolección, se utilizarán geles refrigerantes para mantener la temperatura adecuada, de acuerdo a las recomendaciones del CLSI, Guía H21-45 (Collection, Transport, and Processing of Blood Specimens for Testing Plasma-Based Coagulation Assays and Molecular Hemostasis Assays; Approved Guideline-Fifth Edition, p. 15) (Anexo 8)

3.1.1.1. Materiales, reactivos y equipos

Materiales para toma de muestras	Materiales para análisis de muestras
<ul style="list-style-type: none">• Agujas toma múltiple G21 y G23• Tubos con citrato de sodio 3.2%• Swabs de alcohol al 70%• Torniquete• Guantes de nitrilo talla XS• Cápsulas para extracción al vacío	<ul style="list-style-type: none">• Tubos de vidrio nuevos y eppendorf (viales)• Puntas para pipetas automáticas (azules y amarillas)• Pipetas automáticas 50-100 uL; 100-200 uL; 200-1000 uL• Papel absorbente• Marcador para rotulación de tubos• Guantes de nitrilo• Tubos Eppendorf

Reactivos:	Equipos:
<ul style="list-style-type: none"> • Hipoclorito de sodio al 0.75% • Plasma deficiente de FVIII de la coagulación SIEMENS • Tiempo de tromboplastina parcial activado (Dade actin) marca SIEMENS • Plasma control Siemens CS (normal y patológico) • Buffer de imidazol 1M 	<ul style="list-style-type: none"> • Macrocentrífuga de sobremesa de 2000 a 6000 RPM marca Rotofix 32^a • Microcentrífuga de sobremesa 1000-6000g • Equipo SIEMENS CA-600

3.1.1.2. Alícuotas de plasma

Se realizaron dos alícuotas del plasma en tubos eppendorf para la confirmación de resultados que se requieran en el estudio.

3.1.1.3. Prueba Nijmegen para cuantificación de FVIII

- **Técnica:** los inhibidores de FVIII fueron determinados por la prueba de Nijmegen de acuerdo al procedimiento establecido. (Anexo 9)

- **Cálculo y reporte de resultado:** a partir de la actividad residual del FVIII:C, se calculó la actividad del inhibidor en Unidades Nijmegen Bethesda (UNB).

El resultado fue en unidades Nijmegen-Bethesda (UNB). La UNB se define como la cantidad de inhibidor capaz de dejar el 50% de FVIII residual.

$$FVIII \text{ residual} = \frac{FVIII \text{ mezcla paciente}}{FVIII \text{ mezcla control}} * 100$$

- **Control de calidad:** Se utilizaron controles de calidad con valores normales y patológicos proporcionados por la casa comercial para asegurar la precisión y veracidad de los resultados obtenidos.

3.1.1.4. *Desecho de material*

Las muestras biológicas (plasma como el paquete celular) fueron eliminadas de acuerdo a los procedimientos establecidos para el tratamiento y disposición final mencionados en el art. 54 de desechos infecciosos del acuerdo ministerial 5186 del Ministerio de Salud Pública y de acuerdo al procedimiento establecido por OMS/OPS (Anexo 11).

La eliminación de los desechos peligrosos generados en el transcurso de la investigación se recolectó e identificó como tal en los envases respectivos. El proceso de tratamiento y eliminación de desechos se ejecutó siguiendo los protocolos y normas de la Carrera de Bioquímica Clínica de la PUCE; los investigadores asumieron los costos de los desechos generados en la presente investigación.

3.1.2. Fase Cinco: Análisis de resultados

La información de la encuesta y los resultados de los análisis del laboratorio se ingresaron al programa estadístico SPSS versión 25.0. La información de las variables cualitativas y de las variables cuantitativas discretas se trabajaron con frecuencias absolutas y relativas, información que se resumió en tablas y gráficas; para las variables cuantitativas continuas se calcularon las medidas de tendencia central y dispersión en caso de requerirlas.

La asociación de variables, grado de severidad de la hemofilia A vs respuesta al inhibidor al FVIII, y la asociación de tiempo de exposición al tratamiento vs la respuesta al inhibidor al FVIII se trabajó con la ayuda de tablas de contingencia y se aplicó la prueba de Ji cuadrado, para un alfa del 0.05.

3.1.3. Fase Seis: Informe de resultados

Se elaboraron los informes de resultados individuales (Anexo 10) y se entregaron en sobre sellado al médico hematólogo voluntario en FUNDHEC para que sean comunicados a los pacientes a través de ellos en las consultas de seguimiento.

3.1.4. Fase Siete: Base de datos

Se creó una lista de datos en una hoja electrónica (excel versión 2016) que conectó el identificador (nombre completo del paciente) con el código alfanumérico único y exclusivo para cada paciente. El código fue utilizado tanto para la encuesta como para identificar las muestras biológicas y la base de datos que contenía la información obtenida de la encuesta y de las pruebas de laboratorio y que se utilizaron para el análisis estadístico.

La lista con identificadores fue resguardada por la directora del proyecto en una memoria externa y en su computadora personal, con clave de acceso al archivo y podrán acceder a este documento las investigadoras previa autorización de la directora. La base de datos únicamente con códigos de pacientes y datos de las variables en estudio fue guardada en la computadora de las investigadoras con claves de acceso y la directora de la investigación tuvo libre acceso a la misma. Los datos y la información obtenida se guardarán por 7 años, pasado este tiempo se borrará el archivo y cualquier copia o rastro del mismo de forma definitiva.

CAPÍTULO IV

4.1 CONTROL DE CALIDAD

Para el control instrumental se tomó en cuenta los parámetros dictados por la Norma CLSIEPI5A3, que considera precisión, error total, error permitido, vías porcentuales y variabilidad biológica, esto con el fin de garantizar un buen desempeño del método coagulométrico para una mayor confiabilidad de los resultados del FVIII. Para este ensayo se realizaron cinco mediciones consecutivas de plasma control normal y patológico por cinco días seguidos.

Tabla 5.
Repetibilidad

Interpretación	Control normal	Control patológico
Media obtenida	93,3	29,0
CV intracorrída obtenido	6,3	4,3
CV intracorrída manufactura	6,3	4,7
UVL	8,19	6,11
Análisis	Cumple	Cumple

Fuente: Investigación propia
Autores: Guerrero y Molina 2019

Tabla 6. *Imprecisión intercorrída*

Interpretación	Control normal	Control patológico
Media obtenida	93,3	29,0
CV intercorrída obtenido	11,3	7,7
CV intercorrída Manufactura	11,2	8,3
UVL	14,56	10,79
Análisis	Cumple	Cumple

Fuente: Investigación propia
Autores: Guerrero y Molina 2019

Tabla 7. *Estimación de sesgo*

Interpretación	Control normal	Control patológico
Sesgo máximo permitido	8,9	8,9
Límite inferior inserto	75	20
Límite superior inserto	113	34
Media del inserto	94,0	27,0
DS inserto a 3 SD	6,33	2,33
Media obtenida	93,3	29,0
Límite de aceptación superior	102,366	29,403
Límite de aceptación Inferior	85,634	24,597
Estimación de sesgo en %	0,7	7,5
Análisis	Cumple	Cumple

Fuente: Investigación propia
 Autores: Guerrero y Molina 2019

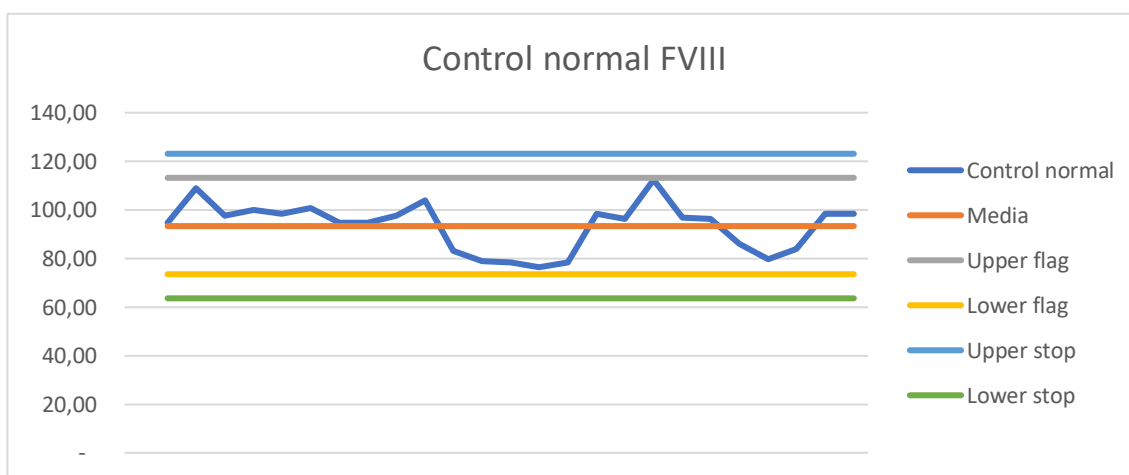


Figura 2: *Control normal FVIII*

Fuente: Investigación propia
 Autores: Guerrero y Molina 2019

Previo al análisis de las muestras se procesaron controles normales y patológicos de FVIII por cada 20 muestras procesadas o cambio de frasco de reactivo.

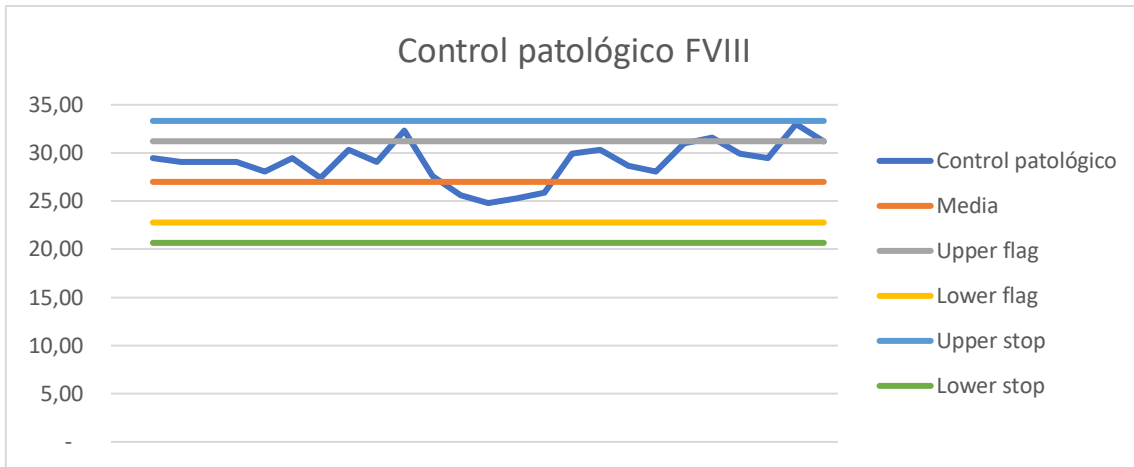


Figura 3: Control Patológico FVIII

Fuente: Investigación propia
 Autores: Guerrero y Molina 2019

CAPITULO V

5.1 RESULTADOS

5.1.1 Descripción de la Población de Estudio

La muestra de estudio estuvo conformada por 118 pacientes con Hemofilia “A” que reciben tratamiento con FVIII liofilizado, inscritos en la FUNDHEC-Núcleo Pichincha, desde un año de edad hasta los 65 años. Que cumplieron con los criterios de inclusión previamente señalados.

5.1.2 Frecuencia del inhibidor del FVIII en pacientes con hemofilia A

Tabla 8.

Frecuencia del inhibidor de FVIII en pacientes con hemofilia A

		Recuento	% Porcentaje
Inhibidor FVIII	Ausencia	104	88.1%
	Presencia	14	11.9%
	Total	118	100.0%

Fuente: Investigación propia
Autores: Guerrero y Molina 2019

La frecuencia encontrada mediante la metodología Nijmegen fue de 11.9 % como casos reportados con presencia del inhibidor del factor VIII y el 88.1% como ausencia. (Tabla 8)

5.1.3 Frecuencia del inhibidor del FVIII por grupo etario

Se clasificaron a los pacientes por grupo etario de acuerdo a las recomendaciones del Sistema de Indicadores Sociales del Ecuador (SIISE) de la siguiente manera:

Tabla 9.

Clasificación de participantes por grupo etario

Rango de edad en años	Grupo etario
1 – 4	Preescolar
5 – 11	Escolar
12 – 18	Adolescente
> 18 años a ≤ 65 años.	Adulto
> 65 años.	Adulto mayor

Fuente: Investigación propia
Autores: Guerrero y Molina 2019

Tabla 10:

Grupo etario y frecuencia del inhibidor

		Recuento	% Porcentaje
Edad	Preescolar	4	28.6%
	Escolar	3	21.4%
	Adolescente	5	35.7%
	Adulto	2	14.3%
	Adulto mayor	0	0.0%
	Total	14	100.0%

Fuente: Investigación propia
Autores: Guerrero y Molina 2019

Se obtuvo que el 28.6% de pacientes con inhibidor del FVIII pertenecían al grupo preescolar, el 21.4% al grupo escolar, 35.7% a adolescentes y el 14.3% al grupo adulto. (Tabla 10)

Tabla 11.

Grupo etario y respuesta del inhibidor

Grupo etario	Inhibidor de baja respuesta		Inhibidor de alta respuesta	
	Frecuencia	Porcentaje	Frecuencia	Porcentaje
Preescolar	3	75%	1	25%
Escolar	1	33%	2	67%
Adolescente	3	60%	2	40%
Adulto	2	100%	0	0%
Adulto mayor	0	0%	0	0%

Fuente: Investigación propia
Autores: Guerrero y Molina 2019

En el análisis de la respuesta del inhibidor con grupo etario se estableció que el 75% de inhibidores de baja respuesta fueron pertenecientes al grupo preescolar y el 67% de alta respuesta a escolares. Mientras que el 60% son de baja respuesta en adolescentes y el 100% de baja respuesta en adultos.

5.1.4 Grado de severidad de hemofilia y respuesta del inhibidor del FVIII

Para establecer el grado de severidad de la hemofilia A, se realizó una encuesta a los pacientes. Las respuestas fueron relacionadas con los valores de concentración del FVIII mediante la metodología Nijmegen.

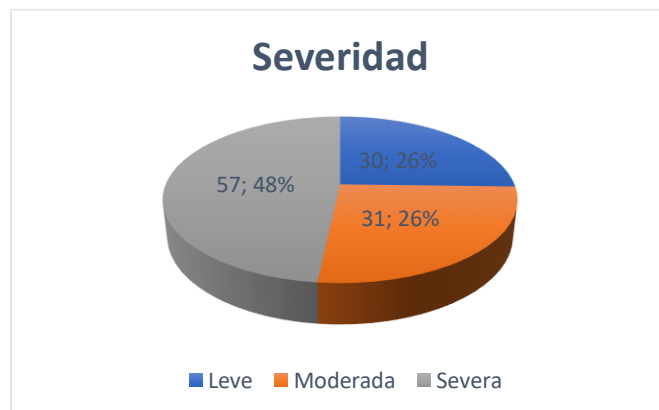


Figura 4. *Frecuencia del grado de severidad de hemofilia A*

Fuente: Investigación propia
Autores: Guerrero y Molina 2019

El 48.3 % de pacientes de acuerdo a las respuestas en la encuesta y la concentración de FVIII pertenecen a la clasificación de hemofilia A severa. Mientras que el 26.3% es de hemofilia A moderada y el 25.4% leve. A los 14 pacientes que desarrollaron inhibidor se los clasificó de acuerdo a la respuesta del inhibidor del FVIII como altos y bajos respondedores. (Tabla 12)

Tabla 12.

Frecuencia de la respuesta del inhibidor de FVIII

		Recuento	% Porcentaje
Respuesta de inhibidor	Alta respuesta (≥ 5 UB/mL)	5	35.7%
	Baja respuesta (< 5 UB/mL)	9	64.3%
	Total	14	100.0%

Fuente: Investigación propia
Autores: Guerrero y Molina 2019

El 64.3% de pacientes presentan inhibidores de baja respuesta, mientras que el 35.7% fueron de alta respuesta. (Tabla 12)

Tabla 13.

Respuesta del inhibidor de FVIII según el grado de severidad de hemofilia A

		Alta respuesta	Baja respuesta	Total	Porcentaje
Grado de severidad	Leve	0	1	1	7.2%
	Moderada	1	4	5	35.7%
	Severa	4	4	8	57.1%
Total		5	9	14	100%

Fuente: Investigación propia
Autores: Guerrero y Molina 2019

El 57.1 % de pacientes que desarrollaron inhibidores pertenecían a hemofilia A severa. El 35.7% a moderada y el 7.2% a leve. No se obtuvo una relación estadísticamente significativa en esta tabla $\chi^2 = < 0.05$ $n=118$ $p=0.34$. Debido a

la baja frecuencia de personas con presencia de inhibidores contra el FVIII en el estudio. (Tabla 13)

5.1.5 Respuesta del inhibidor y tiempo de exposición al tratamiento con FVIII

Tabla 14.

Inhibidores de alta respuesta

Tiempo de exposición (en años)	Frecuencia	Porcentaje
1 año	1	20%
4 años	1	20%
7 años	1	20%
11 años	2	40%
Total	5	100%

Fuente: Investigación propia
Autores: Guerrero y Molina 2019

Al obtener las frecuencias de pacientes que han desarrollado inhibidores de alta respuesta se observa que el 40 % son pertenecientes a un periodo de 1 a 11 años. (Tabla 14)

Tabla 15.

Inhibidores de baja respuesta

Tiempo de exposición (en años)	Frecuencia	Porcentaje
1 año	1	11.1%
2 años	1	11.1%
3 años	2	22.2%
9 años	1	11.1%
10 años	1	11.1%
12 años	1	11.1%
14 años	2	22.2%
Total	9	100%

Fuente: Investigación propia
Autores: Guerrero y Molina 2019

Los pacientes con inhibidores de baja respuesta que recibieron tratamiento con FVIII en un periodo de 1 a 14 años tiene el rango más amplio que el de los pacientes que desarrollaron inhibidores de alta respuesta. (Tabla 15)

Tabla 16.

Tiempo de exposición vs respuesta del inhibidor

		Respuesta de inhibidor		Total
		Inhibidores de alta respuesta	Inhibidores de baja respuesta	
Exposición	Meses	0	0	0
	Años	5	9	14
Total		5	9	14
Porcentaje		35.7%	64.3 %	100%

Fuente: Investigación propia
Autores: Guerrero y Molina 2019

El 35.7% de pacientes que desarrollaron inhibidor del FVIII de alta respuesta, mientras que el 64.3% fueron de baja respuesta. Se obtuvo significancia estadística entre ambas variables debido a que el valor de p es de 0.00018. (Tabla 16)

5.1. DISCUSIÓN

La detección temprana de inhibidores contra el factor VIII tiene gran importancia para un tratamiento precoz, adecuado y calidad de vida en pacientes con hemofilia. El tratamiento depende del grado de severidad de la enfermedad y la respuesta del inhibidor, por esta razón la cuantificación del factor VIII debe tener una alta sensibilidad y especificidad. En este estudio se utilizó la metodología Nijmegen con el fin de detectar cantidades mínimas del inhibidor contra el FVIII lo que hace que este método sea más sensible.

El método Nijmegen posee ciertas características que mejoran deficiencias que la prueba Bethesda presenta, esta modificación mantiene un pH estable al añadir tampón imidazol y controla la concentración de proteínas al añadir un plasma deficiente de FVIII (Dacie y Lewis, 2018).

La Federación Mundial de Hemofilia reportó 5 948 pacientes con hemofilia A que han desarrollado inhibidores en el año 2018, esto corresponde al 3.76% de los pacientes con hemofilia A a nivel mundial. Martínez et al., en el año 2018 menciona una frecuencia del 12% al 35% de pacientes con hemofilia A que desarrollaron inhibidores, estos datos fueron recopilados de investigaciones realizadas en América latina, además Medina et al., en el año 2010 señala que la frecuencia del inhibidor del FVIII en pacientes con hemofilia A en Honduras se encuentra entre el 14% y 25%. Finalmente, una investigación realizada en Guatemala por Álvarez en el año 2015 señala una frecuencia del 20% de inhibidores contra el FVIII.

El contraste de frecuencias en los datos antes mencionados se debe a las diferencias en la población y en la muestra de estudio en cada una de las investigaciones, sin embargo, se puede apreciar que el resultado obtenido en esta investigación se encuentra dentro de los rangos mencionados en dichas investigaciones.

En el estudio se analizaron 118 pacientes hemofílicos tipo A registrados en la Fundación Hemofílica Ecuatoriana (FUNDHEC) núcleo Pichincha. La frecuencia

de pacientes con inhibidores fue de 11.9%, los pacientes que no presentaron inhibidores fueron 88.1%, datos que concuerdan con las investigaciones anteriores.

Kempton *et al*, señala en su estudio que los pacientes que tienen mayor probabilidad de desarrollar inhibidores se encuentran en edades de 1 a 14 años; los reportes de la Federación Mundial de Hemofilia en el año 2018 señalan que los niños que reciben tratamiento por periodos cortos son más propensos al desarrollo de inhibidores y los adultos que recibieron dosis prolongadas pueden desarrollar inhibidores con menor frecuencia. Los resultados obtenidos en este estudio señalan una mayor frecuencia del inhibidor en pacientes de 1 a 18 años (86%) mientras que los adultos tienen una baja frecuencia (14%) relacionándose con lo citado por el autor anteriormente.

En el año 2018 la Federación Mundial de Hemofilia reportó una frecuencia de inhibidores del 25-40% en pacientes con hemofilia A severa y del 5-15% en pacientes con hemofilia A moderada y leve, por otro lado Mardones en el año 2017 evaluó 74 pacientes con hemofilia A de los cuales 32 resultaron positivos para inhibidor del FVIII, de estos, el 37.5% eran pacientes severos, 53.1% moderados y el 9.4% leves, además, los estudios realizados por Kempton *et al* en el año 2010 y por Gouw en el año 2013 indicaron que los pacientes con hemofilia A severa tienen un riesgo mayor a desarrollar inhibidores. En este estudio se obtuvo 14 pacientes con inhibidores, de los cuales el 57.1% eran severos, el 35.7% moderados y el 7.2% leves, coincidiendo con los estudios antes mencionados en los que se obtuvo una frecuencia mayor en pacientes con hemofilia A severa y una frecuencia menor en hemofilia moderada y leve. En este caso se pueden observar diferencias en las frecuencias entre los estudios, sin embargo, es importante aclarar que en todas las investigaciones mencionadas se observa que la mayor parte de pacientes que desarrollaron inhibidores pertenecían al grupo severo.

Por otra parte, Bimanis y Álvarez indican una mayor frecuencia de inhibidores de baja respuesta en los pacientes que desarrollaron inhibidores en su estudio, esta

información coincide con este estudio ya que, de los 14 casos positivos para inhibidor, el 64.3% tenían inhibidores de baja respuesta.

Al asociar las variables respuesta del inhibidor con grado de severidad no se obtuvo una asociación estadística debido a la baja frecuencia de pacientes que desarrollaron inhibidores, esta limitación se encontró en los estudios de Riveros y Álvarez en el año 2015.

En la investigación de Bimanis et al, en el año 2012 se valoró el inhibidor del FVIII en 41 pacientes con hemofilia A en Venezuela- Carabobo y se concluyó que el desarrollo de inhibidores en este grupo de pacientes se encontraba asociado con el tiempo de exposición a la terapia de reemplazo con FVIII. Por otro lado, en el estudio realizado por DiMichelle en el año 2008 señala que un tiempo de exposición prolongado e intenso al tratamiento con FVIII está asociado al desarrollo del inhibidor, en especial a los inhibidores de baja respuesta, sin embargo, el estudio de Kempton *et al*, en el año 2010 en el que se evaluaron 36 pacientes con hemofilia A leve y moderada determinó que no existe una asociación significativa entre el tiempo de exposición al tratamiento y el título del inhibidor.

En el presente estudio se obtuvo una asociación estadística significativa entre el tiempo de exposición al tratamiento y la respuesta de inhibidor al observar que todos los pacientes con resultados positivos para el inhibidor del FVIII estuvieron expuestos a la terapia de reemplazo con FVIII durante un año o más, de este grupo de pacientes el 36% presentaron inhibidores de alta respuesta y el 64% inhibidores de baja respuesta. Estos resultados coinciden con los estudios de Binamis y DiMichelle antes mencionados.

El tratamiento para pacientes que desarrollan inhibidores varía de acuerdo a la respuesta del inhibidor. Los pacientes con inhibidores de baja respuesta deben recibir tratamiento con FVIII de reemplazo en una dosis superior a la usual. Por otra parte, los pacientes con inhibidores de alta respuesta con un título inferior a 10 UNB tienen un buen pronóstico, sin embargo, pacientes con un título superior

a 200 UNB tienen un mal pronóstico y la erradicación del inhibidor se torna más compleja. De los pacientes que presentaron inhibidores de alta respuesta en este estudio, dos tienen un buen pronóstico, en estos pacientes se debe infundir concentrados de FVIII durante tres a cinco días de tal manera que alcancen condiciones fisiológicas normales de FVIII (50% al 100%) hasta lograr una respuesta anamnésica. Por otro lado, tres de los pacientes con inhibidores de alta respuesta presentaron títulos superiores a 200 UNB, por lo que, el tratamiento para este último grupo es más complejo ya que es indispensable el uso de FVIIa recombinado y agentes baipaseantes, estos medicamentos no constan en el Cuadro Nacional de Medicamentos Básicos por lo que es necesaria una justificación para ser adquiridos.

Es importante mencionar que, a pesar de obtener resultados similares con los estudios anteriores, existen diferencias en lo que concierne a la muestra de estudio, localización y año de realización de las investigaciones.

Para finalizar, se considera importante continuar con investigaciones en este grupo de pacientes en vista a que existen varios factores que intervienen en la aparición de inhibidores y no solo los expuestos en este estudio.

5.2. CONCLUSIONES

El estudio realizado en 118 pacientes con presunción de inhibidor de FVIII, se detectaron 14 (11,9%) pacientes positivos para la prueba de inhibidor Bethesda-Nijmegen. El 64% tenían inhibidores de baja respuesta y 32% alta respuesta.

La frecuencia de pacientes con hemofilia A que desarrollaron inhibidores tras la terapia con FVIII liofilizado fue superior en personas menores a 18 años de edad.

El grado de severidad de la hemofilia A no se asocia a la respuesta del inhibidor al realizar pruebas de asociación estadística de Chi cuadrado debido a las bajas frecuencias de casos positivos con presencia de inhibidores.

El tiempo de exposición al tratamiento con FVIII se encuentra asociado a la respuesta del inhibidor ya que se obtuvieron valores de pruebas estadísticas que lo comprueben, además se observó que los pacientes positivos para el inhibidor del FVIII estuvieron expuestos por un año o más a la terapia de reemplazo.

5.3. RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar un estudio de comparación de técnicas Nijmegen y Bethesda en pacientes con hemofilia A para conocer el porcentaje de falsos positivos y falsos negativos de las técnicas.

Es recomendable realizar un estudio de detección de inhibidores por el método cromogénico para mejorar la sensibilidad y especificidad del ensayo Nijmegen.

Realizar una asociación con otras variables como días de exposición al tratamiento y tipo de FVIII administrado (plasmático o recombinante).

Se debe realizar un rastreo de inhibidores a pacientes en otras provincias y que acuden a la Fundación Hemofílica Ecuatoriana, en provincias que no disponen de laboratorios capacitados y especializados en este tipo de pruebas.

5.4. BIBLIOGRAFÍA

Arias, M. (2016). Actualización en diagnóstico inhibidor de factor VIII. *SAH. Hematología*, 20, 174-179. Recuperado de <http://www.sah.org.ar/revista/numeros/24-vol-20-congre-2016.pdf>

Administración Nacional de Medicamentos, alimentos y Tecnología Médica Argentina (ANMAT). (2015). Factor VIII antihemofílico. Recuperado de: <https://www.iqb.es/cbasicas/farma/farma04/f064.htm>

Cabré, P., Fernández, A., & Grases, S. (2014). ¿Qué es necesario saber sobre los inhibidores?. Recuperado de: <http://www.hemofilia.cat/castellano/publica/lilibrets/Llibret%20cas.pdf>

Bimanis, J., Rojas, M., Tovar, M., y Vargas, H. (2012). Concentración de inhibidores anti VIII en pacientes con hemofilia A que acudieron a una consulta hematológica. *Salus*, (3), 026-032. Recuperado de http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1316-71382012000300007

Blanco, A., Peirano, A., Grosso, S. y Lazzari, MA.. (2007). Efecto del inhibidor lúpico o anti-factor VIII sobre la actividad del factor VIII-sustrato cromogénico. *Acta bioquímica clínica latinoamericana*, 41(3), 399-405. Recuperado de http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325-29572007000300015

Björkman, S., Oh, M., Spotts, G., Schroth, P., Fritsch, S., & Ewenstein, B. et al. (2012). Population pharmacokinetics of recombinant factor VIII: the relationships of pharmacokinetics to age and body weight. *Blood*, (2), 612-618. Recuperado de: <http://DOI.10.1182/blood-2011-07-360594>.

Björkman S, Collins P. (2013), for the Project on Factor VIII/Factor IX Pharmacokinetics of the Factor VIII/Factor IX Scientific and Standardization Committee of the ISTH. Measurement of factor VIII pharmacokinetics in routine clinical practice. *J Thromb Haemost* (11) 180-182. Recuperado de: [http://DOI: 10.1111/jth.12055](http://DOI:10.1111/jth.12055)

Centros para el control y prevención de enfermedades -CDC. (2017). *Inhibidores, Hemofilia*. Recuperado de <https://www.cdc.gov/ncbddd/spanish/hemophilia/inhibitors.html>

Ceresetto, J., Duboscq, C., Fondevila, C., & Tezanos, M. (2015). Hemofilia adquirida (inhibidor adquirido del factor VIII). *Medicina (Buenos Aires)*, 75(4), 231-238. Recuperado en 20 de octubre de 2018, de http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0025-76802015000400009&lng=es&tlng=es

CSL Behring. (2011). *All about bleeding*. Información global para Profesionales de la Salud. Behring. Recuperado de <http://mobile.allaboutbleeding.com/ES/hcp/hemophilia-b-christmas-disease.htm>

Collins PW, Björkman S, Fischer K, Blanchette V, Oh M, Schroth P, Fritsch S, Casey K, Spotts G, Ewenstein BM. (2010). Factor VIII requirement to maintain a target plasma level in the prophylactic treatment of severe hemophilia A: influences of variance in pharmacokinetics and treatment regimens. *J Thromb Haemost* (8),269–75. Recuperado de: [http://DOI: 10.1111/j.1538-7836.2009.03703.x](http://DOI:10.1111/j.1538-7836.2009.03703.x)

Collins, P., Chalmers, E., Hart, D., Liesner, R., Rangarajan, S., & Talks, K. et al. (2013). Diagnosis and treatment of factor VIII and IX inhibitors in congenital haemophilia: (4th edition). *British Journal Of Haematology*, (160), 153-170. Recuperado de: <http://doi:10.1111/bjh.12091>

- DiMichele, D. (2008). *Inhibidores en hemofilia: información básica*. Federación mundial de hemofilia. Recuperado de <http://www1.wfh.org/publication/files/pdf-1123.pdf>
- Drive, R., & Srings, S. (2018). La historia de la hemofilia. Recuperado el 8 de Septiembre del 2019, de <https://www.hog.org/handbook/esp/article/1/3/the-history-of-hemophilia>
- Duncan E., Collecutt M., Street A. (2013) Nijmegen-Bethesda Assay to Measure Factor VIII Inhibitors. doi: https://doi.org/10.1007/978-1-62703-339-8_24
- Duboscq, C., Ceresetto, J., Arias, M., & Forastiero, R. (2016). Detección de inhibidor adquirido específico de factor VIII. *Acta Bioquím Clín Latinoam*, 50 (2): 223-32. Recuperado de <http://www.scielo.org.ar/pdf/abcl/v50n2/v50n2a07.pdf>
- Federación Mundial de Hemofilia – FMH. (2012)^a. ¿Qué es la hemofilia? World Federation of Hemophilia. Montréal, Québec. Recuperado de <https://www.wfh.org/es/page.aspx?pid=932>
- Federación Mundial de Hemofilia – FMH. (2012)^b. ¿Cómo se diagnostican los inhibidores? [Internet]. World Federation of Hemophilia. Recuperado de : <https://www.wfh.org/es/page.aspx?pid=936>
- Federación Mundial de Hemofilia – FMH. (2014). *¿Qué son los inhibidores?* World Federation of Hemophilia. Montréal, Québec. Recuperado de <https://www.wfh.org/es/page.aspx?pid=935>
- Federación Mundial de Hemofilia- FMH. (2014). Una tercera publicación sugiere que un producto de FVIII recombinante estaría relacionado con un mayor riesgo de aparición de inhibidores en pacientes recién diagnosticados con hemofilia A que no han recibido tratamiento previo. Recuperado de:

<https://www.wfh.org/es/our-work/treatment-safety/tasas-de-inhibidores-pups-nov2014>

Feng, H., Li, Q., Xu, W., Chen, D. y Zheng, L. (2016). [Modified Bethesda, modified Nijmegen and blank assays for coagulation factor VIII inhibitor detection and factors affecting the results. [Abstract]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* 36(4):592-595. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27113194>

Ferreira A, Leite I, Bustamante-Teixeira MT, Guerra M. (2014) Hemophilia A in Brazil - epidemiology and treatment developments. *J Blood Med*, 5:175-184. doi: <https://doi.org/10.2147/JBM.S68234>

Food & Drug Administration-FDA. Los tratamientos para la hemofilia han avanzado bastante. 2014. Disponible en: <https://www.fda.gov/ForConsumers/ConsumerUpdates/ucm395382.htm>

Gómez, R., Guerra, T., Dita, L., Fernández, J., y Cabrera, M. (2011). Teoría celular de la coagulación: de las cascadas a las membranas celulares. *MediSur*. 9(2): 146-155. Recuperado de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1727-897X2011000200011&lng=es&tlng=es

Guerrero, C. (2016). Valoración de inhibidores de factor VIII de coagulación en pacientes hemofílicos. Recuperado de: <https://es.scribd.com/document/313216774/Valoracion-de-Inhibidores-de-Factor-VIII-de-Coagulacion-en-Pacientes-Hemofilicos>

Hernández, C. (2017). Redacción Médica. *Toda terapia de factor VIII puede generar anticuerpos neutralizantes*. Sanitaria Dos mil España: Redacción Sanitaria dos mil. Recuperado de <https://www.redaccionmedica.com/secciones/industria/toda-terapia-de-factor-viii-puede-generar-anticuerpos-neutralizantes-8254>

- Kasper CK. (1995).)Laboratory diagnosis of FVIII inhibitors in Kessler C, Garvey MB, Green D, et al. *Acquired Hemophilia*. 2nd Edition. Princeton: Excerpta Medica; p 9-23.
- Kempton, C., Soucie, J., & Abshire, T. (2006). Incidence of inhibitors in a cohort of 838 males with hemophilia A previously treated with factor VIII concentrates. *Journal Of Thrombosis And Haemostasis*, 4(12), 2576-2581. doi: 10.1111/j.1538-7836.2006.02233.
- Kempton, C., & Meeks, S. (2014). Toward optimal therapy for inhibitors in hemophilia. *Blood Journal*, (23), 364-371. Recuperado de: <http://DOI.10.1182/blood-2014-05-577643>.
- Mardones, M; Pérez, F; Pino, Marco. (2017). Detección de inhibidores de factor viii y ix en pacientes que reciben factores de coagulación liofilizados como profilaxis o tratamiento. *Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas*, 38(2); 121-126. doi: <https://doi.org/10.26807/remcb.v38i2.545>
- Martínez, L., Álvarez, L., Ruiz, C., Jaramillo, L., Builes, L., & Villegas, J. (2018). Hemofilia: abordaje diagnóstico y terapéutico. Revisión bibliográfica. *Rev. Fac. Nac. Salud Pública.*, (2), 85-93. Recuperado de: DOI:10.17533/udea.rfnsp.v36n2a11
- MSP. (2018). *Pacientes con hemofilia destacan mejoras en atención sanitaria – Ministerio de Salud Pública. Salud.gob.ec*. Recuperado de <http://www.salud.gob.ec/pacientes-con-hemofilia-destacan-mejoras-en-atencion-sanitaria/>
- Medina, C., Pineda, R., & Rush, M. (2010). Inhibidores contra el Factor VIII de coagulación en la hemofilia. *Rev. Fac. Cienc. Méd*, 7(2): 38-44. Recuperado de <http://cidbimena.desastres.hn/RFCM/pdf/2010/pdf/RFCMVol7-2-2010-6.pdf>

- Meijer P, Verbruggen B. (2009). The between-laboratory variation of factor VIII inhibitor testing: the experience of the external quality assessment program of the ECAT foundation. *Semin Thromb Hemost* (8): pg: 786-93
- Ministerio Coordinador de Desarrollo Social. (2017). *Sistema Integrado de Indicadores Sociales del Ecuador-SIISE*. Definición Niñez. Grupos de edad: niños, niñas y adolescentes. Recuperado de http://www.siise.gob.ec/siiseweb/PageWebs/glosario/figlo_gruedad.htm
- Ministerio de Salud Pública. (2016). *Diagnóstico y tratamiento de la Hemofilia Congénita. Guía de Práctica Clínica*. Recuperado de http://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2017/03/MSP_Gu%C3%ADa_hemofilia-cong%C3%A9nita_230117_D-3.pdf
- Ochoa, M. (2010). *Detección de inhibidores en pacientes con hemofilia heredada*. (Tesis de Especialidad). Recuperado de <https://tesis.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/4353/DETECCIONINHIB.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Oldenburg, J. (2015). Optimal treatment strategies for hemophilia: achievements and limitations of current prophylactic regimens. *Blood Journal*, 125(13): 2038-2044. doi: 10.1182/blood-2015-01-528414
- Orphanet. Portal de información de enfermedades raras y medicamentos huérfanos. (2009). *Hemofilia A*. París, Francia.: INSERM US14. Recuperado de https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?lng=ES&Expert=98878
- Remotti, L., Grosso, S., Ingratti, M., Vera, M., Woods, A., & Sánchez, A. et al. (2016). Inhibidores adquiridos de la coagulación: enfoque diagnóstico y casos especiales. Recuperado de http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325-29572016000200013

- Riveros, J. (2015). Frecuencia de inhibidores contra Factor VIII en pacientes con hemofilia tipo A del Centro de Hemofilia del "Hospital Nacional Dos de Mayo". *Lima - Perú 2015*. (Tesis de pregrado). Recuperado de <http://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/cybertesis/6777>
- Schep, S., Schutgens, R., Fischer, K., & Boes, M. (2018). Review of immune tolerance induction in hemophilia A. *Blood Reviews*, (4), 326-338. Recuperado de: <https://doi.org/10.1016/j.blre.2018.02.003>
- Verbruggen, B. (2010). Diagnosis and quantification of factor VIII inhibitors. *Haemophilia*, (16), 20-24. Recuperado de: DOI: 10.1111/j.1365-2516.2008.01924.x
- Villegas, D. (29 de mayo de 2017). Aprendizajes en hemofilia. *El Universo*. Recuperado de <https://www.eluniverso.com/vida/2017/05/30/nota/6205834/aprendizajes-hemofilia>.

5.2 ANEXOS

ANEXO 1: CONSENTIMIENTO INFORMADO

PARTE I: CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA ADULTOS PARTICIPANTES

Título de la investigación: Frecuencia del inhibidor del factor VIII mediante metodología Nijmegen en pacientes con hemofilia “A” que reciben tratamiento con factor VIII liofilizado, inscritos en la FUNDHEC –Núcleo Pichincha, 2019.

Instituciones: Pontificia Universidad Católica del Ecuador y Fundación Hemofilia Ecuatoriana (FUNDHEC).

Investigadoras principales: Wendy Lizeth Guerrero Vinueza y Karla Vanessa Molina Maldonado.

Objetivo: Esta investigación pretende proporcionarle a usted y a su médico información acerca de la presencia de sustancias en la sangre que afectan la funcionalidad del tratamiento, estas sustancias se llaman inhibidores.

Procedimiento: Usted deberá llenar una encuesta que consta de 6 preguntas sobre la edad, sexo, tiempo de inicio tratamiento y tipo de severidad de hemofilia A, si usted no tiene conocimiento de esta última, se recolectará esta información de los registros de la FUNDHEC-Núcleo Pichincha, esta información será confidencial y no será compartida con ninguna persona ajena a la investigación. Después se procederá a realizar una punción en su brazo con una aguja nueva, estéril y desechable, se recolectará 5mL (la cantidad de 1 cucharada) de su sangre en un tubo nuevo, estéril y con anticoagulante. Después de sacarle la muestra de sangre, esta será transportada hacia la Pontificia Universidad Católica del Ecuador sede Quito, donde serán almacenadas a -80°C hasta que sean procesadas y los resultados se hayan confirmado. Una vez terminado el proceso de análisis y confirmación de resultados, las muestras serán eliminadas y no se utilizarán para otras investigaciones.

Duración: La encuesta durará 5 minutos y la toma de muestra de sangre entre 10 y 15 minutos.

Participación voluntaria: La decisión de participar en la investigación es únicamente suya. (voluntaria)

Confidencialidad: Sus datos e información serán confidenciales. Para su seguridad las investigadoras no revelarán su información a otras personas ajenas a este proyecto. Se comunicarán los resultados a usted y a su médico.

Beneficios (individual y social): Los resultados del examen se le entregará en la FUNDHEC-Núcleo Pichincha aproximadamente 1 mes después de la toma de muestra sanguínea. Para conocer si sus resultados ya están listos, usted puede contactarse con las investigadoras o con el presidente de la FUNDHEC. Quizás no haya un beneficio directo e inmediato, sin embargo, más adelante con los resultados de esta investigación se espera mejorar el tratamiento que le están proporcionando.

Riesgos o molestias: Usted sentirá un leve dolor al momento de la punción y es probable que se forme un moretón (hematoma) por la salida de sangre fuera de la vena.

Costos, incentivos o recompensas: Usted no recibirá ninguna compensación económica ni material por participar en el estudio, la prueba será gratuita.

Derecho a retirarse: Usted tiene el derecho a retirarse del estudio en cualquier momento, en este caso se recomienda informar a las investigadoras. Si usted decide retirarse del estudio una vez que se haya recolectado la muestra cabe aclarar que ésta no será procesada, dicha decisión no implicará ninguna penalidad ni perjuicio para usted. La muestra será destruida, esto no afectará su relación con las investigadoras, médico y la FUNDHEC.

Manejo de datos y resultados: La muestra de sangre será identificada con un código único y los resultados serán almacenados y protegidos con la finalidad de que solo las investigadoras del proyecto tengan acceso a ellos. Posteriormente se le comunicarán los resultados del examen de sangre a su médico, y a su vez, a usted.

Mayor información: Si usted requiere información adicional, comunicarse con las investigadoras principales Wendy Lizeth Guerrero Vinueza, teléfono 0990406748 o Karla Vanessa Molina Maldonado, teléfono 0998281577, Carrera de Bioquímica Clínica, Facultad de Medicina, PUCE. Con el Sr. Javier Córdova, presidente de la FUNDHEC-Núcleo Pichincha, teléfono 099897343. O con el Mtr. Yan Arévalo, secretario del Comité de Ética de la Investigación en Seres Humanos (CEISH) de la PUCE, Av. 12 de octubre 1076 y Roca, Quito, edificio administrativo, piso 3, oficina 327, teléfono 2991700 – Ext. 2917.

PARTE II: FIRMA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA ADULTOS PARTICIPANTES

Yo _____, declaro que he leído la información

proporcionada o me ha sido leída y estoy al tanto del proyecto titulado “**Frecuencia del inhibidor del factor VIII mediante metodología Nijmegen en pacientes con hemofilia “A” que reciben tratamiento con factor VIII liofilizado, inscritos en la FUNDHEC –Núcleo Pichincha, 2019**”. He tenido la oportunidad de aclarar mis dudas sobre la investigación y se me ha contestado satisfactoriamente todas y cada una de las preguntas que he realizado.

Soy consciente de los siguientes aspectos:

- La investigación me proporcionará información acerca de la presencia de sustancias en la sangre que afectan la funcionalidad del tratamiento, estas sustancias se llaman inhibidores.
 - Debo contestar una encuesta que consta de 6 preguntas sobre la edad, sexo, tiempo de inicio de mi tratamiento y tipo de severidad de hemofilia A, si no conozco esta última se recolectará esta información de los registros de la FUNDHEC-Núcleo Pichincha, esta información será confidencial y no será compartida con ninguna persona ajena a la investigación. Después me realizarán una punción en mi brazo con una aguja nueva, estéril y desechable, se recolectará 5mL (la cantidad de 1 cucharada) de mi sangre en un tubo nuevo, estéril y con anticoagulante. Después de que me saquen sangre, esta será transportada hacia la Pontificia Universidad Católica del Ecuador sede Quito, donde serán almacenadas a -80°C hasta que sean procesadas y los resultados se hayan confirmado. Una vez terminado este proceso mis muestras serán eliminadas y no se utilizarán para otras investigaciones.
 - La encuesta durará 5 minutos y la toma de muestra de sangre entre 10 y 15 minutos.
 - Mi participación es voluntaria.
 - Tengo el derecho de retirarme del estudio en cualquier momento. Si decido retirarme del estudio una vez que se haya recolectado mi muestra, ésta no será procesada, dicha decisión no implicará ninguna penalidad ni perjuicio para mí, Mi muestra será destruida, esto no afectará mi relación con las investigadoras, médico y la FUNDHEC.
 - Mis datos e información no serán revelados a otras personas ajenas al proyecto.
 - El beneficio que recibo es conocer sobre la presencia o no de las sustancias llamadas inhibidores.
 - Podré tener los resultados del examen debo acercarme a la FUNDHEC-Núcleo Pichincha aproximadamente 1 mes después de la toma de muestra sanguínea. Para conocer si mis resultados ya están listos, debo contactarme con las investigadoras o con el presidente de la FUNDHEC.
 - No recibiré una compensación económica ni material por participar en el estudio. La prueba que se me realizará es gratuita.
 - Los resultados del examen de sangre serán comunicados a mí y a mi médico.
- Por lo tanto, estoy de acuerdo y autorizo en participar en la investigación

Firma o huella del participante



Nombres y Apellidos del participante _____

C.I del participante _____

En caso de ser analfabeto,

Testigo 1 Firma: _____ Nombre: _____ CI: _____

Testigo 2 Firma: _____ Nombre: _____ CI: _____

Firma del investigador

Nombres y Apellidos del investigador _____

CI del investigador _____ Fecha: _____

PARTE I: CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PADRES DE FAMILIA Y/O REPRESENTANTE LEGAL DE MENORES DE EDAD O PERSONAS DISCAPACITADAS

Título de la investigación: Frecuencia del inhibidor del factor VIII mediante metodología Nijmegen en pacientes con hemofilia “A” que reciben tratamiento con factor VIII liofilizado, inscritos en la FUNDHEC –Núcleo Pichincha, 2019.

Instituciones: Pontificia Universidad Católica del Ecuador y Fundación Hemofilia Ecuatoriana (FUNDHEC).

Investigadoras principales: Wendy Lizeth Guerrero Vinueza y Karla Vanessa Molina Maldonado.

Objetivo: Esta investigación pretende proporcionarle a usted y al médico de su hijo/hija o representado, información acerca de la presencia de sustancias en la sangre que afectan la funcionalidad del tratamiento, estas sustancias se llaman inhibidores.

Procedimiento: Usted deberá llenar una encuesta que consta de 6 preguntas sobre la edad, sexo, tiempo de inicio del tratamiento y tipo de severidad de hemofilia A de su hijo/hija o representado, si usted no tiene conocimiento de esta última será recolectará esta información de los registros de la FUNDHEC-Núcleo Pichincha, esta información será confidencial y no será compartida con ninguna persona ajena a la investigación. Después se procederá a realizar una punción en su brazo con una aguja nueva, estéril y desechable, se recolectará 5mL (la cantidad de 1 cucharada) o 3ml (la cantidad de media cucharada) de su sangre en un tubo nuevo, estéril y con anticoagulante. Después de sacarle la muestra de sangre, esta será transportada hacia la Pontificia Universidad Católica del Ecuador seos de Quito, donde serán almacenadas a -80°C hasta que sean procesadas y los resultados se hayan confirmado. Una vez terminado el proceso de análisis y confirmación de resultados, las muestras serán eliminadas y no se utilizarán para otras investigaciones.

Duración: La encuesta durará 5 minutos y la toma de muestra de sangre entre 10 y 15 minutos.

Participación voluntaria: La participación de su hijo/hija o representado en la investigación es absolutamente voluntaria.

Confidencialidad: Los datos e información de su hijo/hija o representado serán confidenciales. Para su seguridad las investigadoras no revelarán su información a otras personas ajenas a este proyecto. Se comunicarán los resultados a usted y al médico.

Beneficios (individual y social): Los resultados del examen se le entregara en la FUNDHEC-Núcleo Pichincha aproximadamente 1 mes después de la toma de muestra sanguínea de su hijo/hija o representado. Para conocer si sus resultados ya están listos, usted puede contactarse con las investigadoras o con el presidente de la FUNDHEC. Quizás no haya un beneficio directo e inmediato, sin embargo, más adelante con los resultados de esta investigación se espera mejorar el tratamiento proporcionado.

Riesgos o molestias: Su hijo/hija o representado sentirá un leve dolor al momento de la punción y es probable que se forme un moretón (hematoma) por la salida de sangre fuera de la vena.

Costos, incentivos o recompensas: Usted, su hijo/hija o representado no recibirá ninguna compensación económica ni material por participar en el estudio, la prueba será gratuita.

Derecho a retirarse: Usted tiene el derecho a retirar a su hijo/hija o representado del estudio en cualquier momento, en este caso se recomienda informar a los investigadores. Si usted decide retirar a su hijo/hija o representado del estudio una vez que se haya recolectado la muestra cabe aclarar que ésta no será procesada dicha decisión no implicará ninguna penalidad ni perjuicio para usted o su hijo/a o representado. La muestra será destruida, esto no afectará su relación con los investigadores, médico y la FUNDHEC.

Manejo de datos y resultados: La muestra de sangre será identificada con un código único y los resultados serán almacenados y protegidos con la finalidad de que solo las investigadoras del proyecto tengan acceso a ellos. Posteriormente se le comunicarán los resultados del examen de sangre de su hijo/hija o representado a usted y al médico.

Mayor información: Si usted requiere información adicional, comunicarse con las investigadoras principales Wendy Lizeth Guerrero Vinueza, teléfono 0990406748 o Karla Vanessa Molina Maldonado, teléfono 0998281577, Carrera de Bioquímica Clínica, Facultad de Medicina, PUCE. Con el Sr. Javier Córdova, presidente de la FUNDHEC-Núcleo Pichincha, teléfono 099897343. O con el Dr. Hugo Navarrete Zambrano, secretario del Comité de Ética de la Investigación en Seres Humanos (CEISH) de la PUCE, Av. 12 de octubre 1076 y Roca, Quito, edificio administrativo, piso 3, oficina 327, teléfono 2991700 – Ext. 2917.

PARTE II: FIRMA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PADRES DE FAMILIA Y/O REPRESENTANTE LEGAL DE MENORES DE EDAD O PERSONAS DISCAPACITADAS

Yo _____, representante de _____ declaro que he leído la información proporcionada o me ha sido leída y estoy al tanto del proyecto titulado **“Frecuencia del inhibidor del factor VIII mediante metodología Nijmegen en pacientes con hemofilia “A” que reciben tratamiento con factor VIII liofilizado, inscritos en la FUNDHEC –Núcleo Pichincha, 2019”**. He tenido la oportunidad de aclarar mis dudas sobre la investigación y se me ha contestado satisfactoriamente todas y cada una de las preguntas que he realizado.

Soy consciente de los siguientes aspectos:

- La investigación me proporcionará información acerca de la presencia de sustancias en la sangre de mi hijo/hija o representado que afectan la funcionalidad del tratamiento, estas sustancias se llaman inhibidores.
- Mi hijo/hija o representado responderá una encuesta que consta de 6 preguntas sobre su edad, sexo, tiempo de inicio de su tratamiento y tipo de severidad de hemofilia A, si no conozco esta última se recolectará esta información de los registros de la FUNDHEC-Núcleo Pichincha, esta información será confidencial y no será compartida con ninguna persona ajena a la investigación. Después le realizarán una punción en el brazo con una aguja nueva, estéril y desechable, se recolectará 5mL (la cantidad de 1 cucharada) o 3ml (la cantidad de media cucharada) de la sangre de mi hijo/hija o representado. Después de que le saquen sangre, esta será transportada hacia la Pontificia Universidad Católica del Ecuador sede Quito, donde serán almacenadas a -80°C hasta que sean procesadas y los resultados se hayan confirmado. Una vez terminado este proceso de análisis y confirmación de resultados, las muestras de mi hijo/hija o representados serán eliminadas y no se utilizarán para otras investigaciones.
- La encuesta durará 5 minutos y la toma de muestra de sangre entre 10 y 15 minutos.
- La participación es voluntaria.
- Yo puedo retirar del estudio a mi hijo/hija o representado en cualquier momento. Si decido retirarle del estudio una vez que se haya recolectado la muestra de mi hijo/hija o representado ésta no será procesada, dicha decisión no implicará ninguna penalidad ni perjuicio para mí o su hijo/a o representado. La muestra será destruida, esto no afectará su relación con los investigadores, médico y la FUNDHEC.
- Los datos e información mi hijo/hija o representado no serán revelados a otras personas ajenas al proyecto.
- El beneficio que recibe mi hijo/hija o representado es conocer sobre la presencia o no de las sustancias llamadas inhibidores.
- Podré tener los resultados del examen de mi hijo/hija o representado y debo acercarme a la FUNDHEC-Núcleo Pichincha aproximadamente 1 mes después de la toma de muestra sanguínea. Para conocer si los resultados ya están listos, debo contactarme con las investigadoras o con el presidente de la FUNDHEC.
- El procedimiento de extracción de sangre tiene riesgos y molestias mínimas para mi hijo/hija o representado.
- El examen no tiene costo, tampoco incentivos o recompensas económicas o materiales para mi hijo/hija o representado o para mí.

Por lo tanto, estoy de acuerdo y autorizo en participar en la investigación

Firma o huella del representante



Nombres y Apellidos del representante _____

C.I del representante _____

En caso de ser analfabeto,

Testigo 1 Firma: _____ Nombre: _____ CI: _____

Testigo 2 Firma: _____ Nombre: _____ CI: _____

Firma del investigador

Nombres y Apellidos del investigador _____ Fecha: _____

CI del investigador _____

ASENTIMIENTO INFORMADO
PARTE I: ASENTIMIENTO INFORMADO PARA MENORES DE EDAD

Nuestros nombres son Wendy Lizeth Guerrero Vinueza y Karla Vanessa Molina Maldonado, estudiantes de la carrera de Bioquímica Clínica de la PUCE, actualmente estamos trabajando en el proyecto llamado "Frecuencia del inhibidor del factor VIII en pacientes con hemofilia "A" que reciben tratamiento con factor VIII liofilizado mediante metodología Nijmegen, inscritos en la FUNDHEC – Núcleo Pichincha, 2019".

¿Cuál es propósito del estudio?: Proporcionarte a ti y a tu médico información sobre la presencia de algo en tu sangre que hacen que tu medicamento no funcione bien.

¿Qué vamos a hacer?: Si tú decides realizarte el examen deberás contestar unas preguntas, sobre tu edad, sexo, tiempo que empezaste a usar tu medicamento y tipo de severidad de tu enfermedad. Si no entiendes las preguntas puedes consultarnos y te ayudaremos con mucho gusto. Después te pincharemos en tu brazo con una aguja nueva y limpia para recolectar un tubo de sangre, vamos a sacarte aproximadamente una cucharada o media cucharada de tu sangre. Luego llevaremos tu muestra a la universidad para realizar los exámenes. Cuando ya acabemos de realizar el examen de tu muestra la botaremos y no la usaremos para ninguna otra prueba

¿Cuánto tiempo estarás con nosotros?: La encuesta durará 5 minutos y la toma de muestra de sangre entre 10 y 15 minutos.

¿Cómo puedes participar en la investigación?: La decisión de participar en la investigación es solo tuya, nadie puede obligarte a sacarte sangre.

¿Qué sucederá con tu información?: Para que te sientas seguro no compartiremos tus datos, ni los resultados de los exámenes con ninguna otra persona ajena a la investigación tus datos personales y los resultados de los exámenes. Los resultados de los exámenes serán entregados a tus papás o tu representantes 1 mes después de haberte pinchado. Para retirar tus resultados tus papas o representante debe acercarse a la fundación a la que vas.

¿Qué beneficios tendrás?: Conocerás el resultado de tu examen de sangre con lo que se espera que tu médico mejore el tratamiento.

¿Qué sentirás durante el proceso? Durante el pinchazo sentirás molestia en el brazo que durará unos pocos segundos. Es probable que después del pinchazo te quede un moretón.

¿Recibirás algo por tu participación?: No recibirás dinero ni regalos por tu participación. El examen que se te realizará es gratuito.

¿Qué pasa si deseas retirarte?: Si en algún momento ya no quieres participar puedes decir que no y retirarte. Si ya te sacamos sangre, pero tú no quieres que te hagamos el examen puedes decirnos y tu muestra será eliminada. Nosotras no nos enojaremos contigo y tampoco tu médico

¿Qué haremos con tus datos?: Tus datos serán protegidos y almacenados con una contraseña para que ninguna persona extraña tenga acceso a ellos.

¿Con quien me puedo comunicar?: Si tienes alguna duda o necesitas más información, comunicarse con Wendy Lizeth Guerrero Vinueza, teléfono 0990406748 o Karla Vanessa Molina Maldonado, teléfono 0998281577, Carrera de Bioquímica Clínica, Facultad de Medicina, PUCE. Con

el Sr. Javier Córdova, presidente de la FUNDHEC-Núcleo Pichincha, teléfono 099897343. . O con el Dr. Hugo Navarrete Zambrano, secretario del Comité de Ética de la Investigación en Seres Humanos (CEISH) de la PUCE, Av. 12 de octubre 1076 y Roca, Quito, edificio administrativo, piso 3, oficina 327, teléfono 2991700 – Ext. 2917.


PARTE II: FIRMA DEL ASENTIMIENTO INFORMADO PARA MENORES DE EDAD

Yo _____, declaro que he leído la información proporcionada o me ha sido leída y estoy al tanto del proyecto titulado **“Frecuencia del inhibidor del factor VIII mediante metodología Nijmegen en pacientes con hemofilia “A” que reciben tratamiento con factor VIII liofilizado, inscritos en la FUNDHEC –Núcleo Pichincha, 2019”**. He tenido la oportunidad de aclarar mis dudas sobre la investigación y se me ha contestado satisfactoriamente todas y cada una de las preguntas que he realizado.

Soy consciente de los siguientes aspectos:

- Contestaré una encuesta con 6 preguntas sobre tu edad, sexo, tipo de hemofilia y el tiempo que empecé a usar mi medicamento. Después se me realizará un pinchazo en el brazo para sacarme una muestra de sangre, me sacarán aproximadamente 1 cucharada o media cucharada de sangre en un tubo.
 - Me demoraré 5 minutos en contestar la encuesta y en la toma de muestra de sangre entre 10 y 15 minutos.
 - Participaré en la investigación solo si yo quiero, si no deseo participar nadie me va a obligar y tampoco se enojarán conmigo.
 - Mis datos e información no serán revelados a personas extrañas.
 - Conoceré la presencia o no de unas sustancias en mi sangre que hacen que mi medicamento no funcione bien, esta información me ayuda a mí y a mi médico.
 - Informaran a mis papás o a mi representante y a mi médico sobre los resultados del examen de sangre. Mis papás podrán retirar mis resultados 1 mes después de haberme sacado sangre en la FUNDHEC.
 - Sentiré un ligero dolor al momento de la punción y es posible que se me forme un moretón
 - El examen no tiene costo y no recibiré regalos ni dinero por participar.
- Por lo tanto, estoy de acuerdo y autorizo en participar en la investigación.

- SI
 NO



Firma o huella del menor de edad

Nombres y Apellidos del menor de edad _____

C.I del menor de edad _____

Firma o huella del representante

Nombres y Apellidos del representante _____

C.I del representante _____

Firma del investigador

Nombres y Apellidos del investigador _____ Fecha: _____

CI del investigador _____

ANEXO 2. CONDICIONES PRE-ANALÍTICAS PARA EL PACIENTE



Para su seguridad las muestras de sangre serán identificadas con un código único y exclusivo para asegurar la confidencialidad. destruirá toda la información. El informe de resultados de su examen le será entregado a usted y compartido con el médico tratante del FUNDHEC.

Con el Auspicio de:



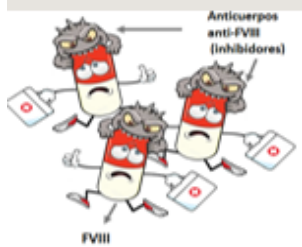
NOMBRE	TELÉFONO
Wendy Lizeth Guerrero Vinuceza	0990406748
Karla Vanessa Molina Maldonado	0998281577



**Hemofilia "A":
Inhibidores del
Factor VIII**

¿Qué es un inhibidor?

- Es una sustancia que puede aparecer en tu sangre e impide que se detenga un sangrado.
- Nosotras vamos a investigar si tienes o no estas sustancias, en el caso de que las tengas se comunicará a tu médico para que te de el tratamiento y atención que necesitas.



Te invitamos a ser parte de este proyecto !!!

El propósito de esta investigación es proporcionarle a usted y a su médico tratante información acerca de la presencia en sangre de unas sustancias llamadas inhibidores, que hace que no se detenga el sangrado fácilmente. Conociendo si usted tiene estos inhibidores en la sangre, su médico hará el seguimiento y el control de su tratamiento con otro dato más a los de los exámenes de rutina que usted se realiza o que su médico le solicita y que le ayudará a su médico a tomar decisiones sobre su tratamiento. Para ser parte de este proyecto debes cumplir las siguientes condiciones :



Condiciones preanalíticas para el paciente

- Paciente en ayunas por lo menos 8 horas.
- Paciente debe descansar por lo menos 8 horas antes de la toma de muestra
- En las horas de ayuno solo es permitido tomar agua.



- No haber realizado actividad física 24 horas antes de la toma
- No haber administrado el factor liofilizado 3 días antes de la toma de muestra.
- No ingerir bebidas alcohólicas antes ni durante la toma de la muestra.
- No fumar antes ni durante la toma de la muestra.

ANEXO 3. SOLICITUD AL REPRESENTANTE DE FUNDHEC

Quito, 18 de julio de 2018

Señor

Javier Córdova

Presidente de la Fundación Hemofílica Ecuatoriana- Núcleo Pichincha

Presente.-

De nuestra consideración:

Reciba usted un cordial y atento saludo. El motivo de la presente es hacerle conocer que como estudiantes de la carrera de Bioquímica Clínica de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, estamos desarrollando nuestro plan para trabajo de titulación enfocado en el área de coagulación, específicamente hemos propuesto el siguiente proyecto, "Frecuencia del inhibidor del factor VIII en pacientes con hemofilia "A" que reciben tratamiento con factor VIII liofilizado, inscritos en la FUNDHEC –Pichincha, 2019", el mismo que lo hemos estado trabajando con el apoyo de la docente Mtr. Marcela Mardones, como directora.

Con este antecedente, solicitamos a usted nos autorice realizar este trabajo en la FUNDHEC para lo cual es necesario reunirse con las autoridades y luego con los pacientes para explicar el estudio y solicitar su colaboración.

Atentamente,



Wendy Lizeth Guerrero Vinueza

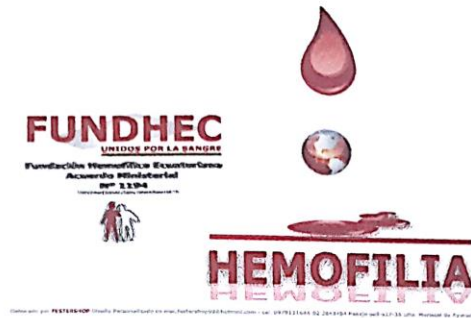
CI: 1724220502



Karla Vanessa Molina Maldonado

CI: 0504391053

ANEXO 4. CARTA DE APROBACIÓN FUNDHEC



Quito, 26 de septiembre de 2018

Mtr.

Marcela Mardones

Docente de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador-Tutora del proyecto

Presente.-

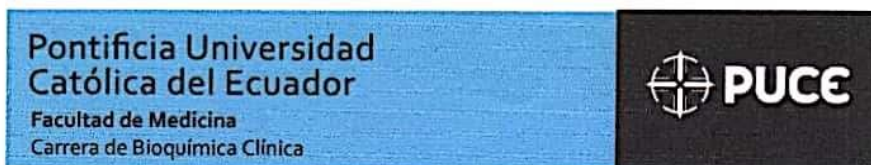
Reciba un cordial y atento saludo de Javier Alexander Córdova Suarez, presidente de la Fundación Hemofílica Ecuatoriana (FUNDHEC) portador de la cédula de ciudadanía No1716650286, conocedor del proyecto de investigación "Frecuencia del inhibidor del factor VIII en pacientes con hemofilia "A" que reciben tratamiento con factor VIII liofilizado, inscritos en la FUNDHEC –Pichincha, 2019" a realizar por parte de las estudiantes de la carrera de Bioquímica Clínica de la PUCE Wendy Guerrero y Karla Molina, informo que se les brindará el apoyo y la acogida necesaria para su investigación en vista a la utilidad e importancia que representa ésta para quienes formamos la FUNDHEC además de la experiencia satisfactoria que se ha obtenido de investigaciones anteriores que han podido ayudar a conocer la eficacia y eficiencia de los medicamentos anti hemofílicos que se dan en el Ecuador.

Por la favorable atención que se digné dar a la presente anticipo mi agradecimiento.

Atentamente.

Javier Alexander Córdova Suarez. 171665028-6.
Presidente y Paciente
Fundación Hemofílica Ecuatoriana FUNDHEC.
Cel: 0987075605. Fundación.
Correo elec. fundhececuador@hotmail.com
FUNDHEC: Yánez Pinzón 2676 entre Colón y La Niña,

ANEXO 5. SOLICITUD PARA USO DE LABORATORIOS



Quito, 27 de julio de 2018.

Dr. Francisco Javier Pérez Pazmiño
Decano de la Facultad de Medicina
Pontificia Universidad Católica del Ecuador
Presente.-

De nuestra consideración:

Nosotras, Wendy Lizeth Guerrero Vinueza y Karla Vanessa Molina Maldonado, estudiantes de la carrera de Bioquímica Clínica de la Facultad de Medicina, por medio de la presente nos permitimos solicitar de la manera más comedida se nos autorice el uso del laboratorio 008 de hematología y el equipo de coagulación que se encuentra en dicho laboratorio de la facultad de Bioquímica Clínica los meses marzo, abril y mayo; para el desarrollo del proyecto de investigación titulado "Frecuencia del inhibidor del factor VIII en pacientes con hemofilia "A" que reciben tratamiento con factor VIII liofilizado, inscritos en la FUNDHEC -Pichincha, 2019".

Agradeciéndole por su atención le anticipo mis agradecimientos

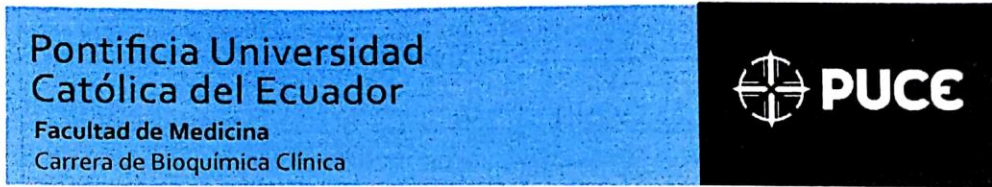
Atentamente,

f. J. Pazmiño
2018-07-27

Wendy Lizeth Guerrero Vinueza
CI: 1724220502

Karla Vanessa Molina Maldonado
CI: 0504391053

ANEXO 6: CARTA DE APROBACIÓN PARA EL USO DE LABORATORIOS



Quito, 27 de julio de 2018.

Dr. Francisco Javier Pérez Pazmiño
Decano de la Facultad de Medicina
Pontificia Universidad Católica del Ecuador
Presente.-

De nuestra consideración:

Nosotras, Wendy Lizeth Guerrero Vinueza y Karla Vanessa Molina Maldonado, estudiantes de la carrera de Bioquímica Clínica de la Facultad de Medicina, por medio de la presente nos permitimos solicitar de la manera más comedida se nos autorice el uso del laboratorio 008 de hematología y el equipo de coagulación que se encuentra en dicho laboratorio de la facultad de Bioquímica Clínica los meses marzo, abril y mayo; para el desarrollo del proyecto de investigación titulado "Frecuencia del inhibidor del factor VIII en pacientes con hemofilia "A" que reciben tratamiento con factor VIII liofilizado, inscritos en la FUNDHEC -Pichincha, 2019".

Agradeciéndole por su atención le anticipo mis agradecimientos

Atentamente,

Wendy Lizeth Guerrero Vinueza
CI: 1724220502

Karla Vanessa Molina Maldonado
CI: 0504391053

FACULTAD DE MEDICINA
VISTA ZUCINO
Dr. Francisco Javier Pérez Pazmiño
DECANO

ANEXO 7. ENCUESTA

Proyecto: "Frecuencia del inhibidor del factor VIII mediante metodología Nijmegen en pacientes con hemofilia "A" que reciben tratamiento con factor VIII liofilizado, inscritos en la FUNDHEC – Núcleo Pichincha, 2019"

Código: _____

Reciba usted nuestro cordial y atento saludo, ante todo agradecemos y su colaboración en este proyecto. A continuación, se le presentarán una serie de preguntas de deberá contestar con total sinceridad. Para seleccionar una respuesta deberá marcar con una X el recuadro que se encuentra junto a cada opción. Es importante aclarar que su identidad y la información recolectada en la encuesta es confidencial. Si durante la resolución del cuestionario tiene alguna duda, estamos dispuestas a ayudarle.

1. Seleccione su rango de edad

- < 1 año
- 1 – 4 años
- 5 - 11 años
- 12 -18 años
- > 18 años
- > 65 años

2. ¿Conoce usted el grado de severidad de hemofilia A que posee? En caso de contestar SÍ, señale el tipo de severidad de hemofilia A.

- SÍ
- NO

Tipo de severidad:

- Leve
- Moderada
- Severa

3. ¿Hace cuánto tiempo inició su tratamiento con FVIII liofilizado? Escriba su respuesta en meses o años.

4. ¿Ha recibido FVIII liofilizado en los últimos tres días?

- SÍ
- NO

5. ¿Conoce usted si tiene inhibidores?

- SÍ
- NO

6. ¿Le han realizado exámenes de laboratorio para la detección de inhibidores?

- SÍ
- NO

ANEXO 8. INDICACIONES PARA RECOLECCIÓN Y TRANSPORTE DE MUESTRAS SANGUÍNEAS

(Tomado de CLSI Guía H21-A5 y guía GP41-A6, traducido por las estudiantes)

1. Recolección de muestras

1.1 Etiquetado de muestras

Las muestras deben ser etiquetadas, manejadas y almacenadas de manera que se respete la confidencialidad del paciente.

1.2 Identificación de muestras

La muestra del o los pacientes debe ser identificada al momento de la recolección y en presencia del paciente después de la toma de muestra. Los tubos de las muestras no deben ser pre-etiquetados.

1.3 Información necesaria

- Número o código de identificación
- Sexo del paciente
- Fecha de nacimiento
- Fecha y hora de la recolección
- Tipo de muestra
- Información clínica relevante
- El departamento o localidad en la que fue tomada la muestra
- Otra información importante.

1.4. Métodos de obtención de muestras

Para la obtención de muestras es importante el uso de guantes ya que evita el contacto directo de las manos con el agente los fluidos biológicos, de esta manera se evitará la transmisión de ciertas enfermedades

1.4.1 Técnicas de recolección de muestras para ensayos de hemostasia

- Verificar que el nombre del paciente sea el correcto con el pedido.
- Preguntar si cumple con los requerimientos de la prueba (ayuno, medicamentos).
- Alistar el material necesario para la extracción de sangre venosa.
- Usar guantes y desinfectarlos en cada paciente el cambio debe ser por cada 3 pacientes.
- Escoger el brazo (mano) con una vena adecuada para la toma de muestra.
- Colocar el torniquete 5 cm arriba en la zona antero cubital y no colocarlo por más de un minuto.
- Desinfectar el área con alcohol de manera circular de adentro afuera.
- Dejar actuar el alcohol por 2 minutos.

- Realizar la punción en la vena con el bisel hacia arriba y con un ángulo de a 30 grados
- Extraer sangre en el tubo azul con citrato de sodio con la proporción adecuada con el anticoagulante. Invertir el tubo de 3 a 5 veces para evitar muestra coagulada.
- Eliminar el material en los tachos de basura correctos.
- Rotular los tubos frente al paciente.
- Pedir al paciente que se presione el sitio de punción por lo menos 5 minutos para evitar hematomas.

Dispositivos

Para la extracción de muestras de ensayos de hemostasia se extraer la muestra directamente en el tubo, este no debe conRRtener ninguna sustancia activadora de la coagulación.

Criterios para el rechazo de muestras

- Muestras coaguladas
- Muestras en el anticoagulante erróneo
- Muestras no etiquetadas

Temperatura de conservación de muestras para ensayos de coagulación (CLSI Guía H21-A5 y guía GP41-A6)

Ensayo	Almacenado como sangre total			Procesado y alicuota de plasma			
	Temperatura ambiente	Refrigerado	Congelado	Temperatura ambiente	Refrigerado	Congelado a -20°C	Congelado a --70°C
TP	Hasta 24 horas	No aceptable	No aceptable	Hasta 4 horas	No aceptable	2 semanas	12 meses
TTPa	Hasta 4 horas	No aceptable	No aceptable	4 horas	4 horas	2 semanas	12 meses
TTPa para análisis de FVIII y FvW	4 horas	No aceptable	No aceptable	4 horas	4 horas	2 semanas	6 meses
Otros	4 horas	No aceptable	No aceptable	4 horas	4 horas	Depende del analito	

ANEXO 9. INSERTOS DE REACTIVOS Y PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO

DETERMINACIÓN DE FVIII

Plasma diciente de FVIII	
Lote: 547689A	Fecha de expiración: 05-06-2021
Lote: 547678A	Fecha de expiración: 24-20-2020

Reactivos de diagnóstico *in vitro* para la determinación de la actividad de los factores de coagulación VIII, IX, XI y XII en plasma humano por medio de métodos coagulativos.

Significado diagnóstico

La determinación de los factores de coagulación VIII en plasma está indicada en los siguientes casos:

- para clarificar la causa de un tiempo de tromboplastina parcial activada prolongado,
- para el diagnóstico de estados de déficit de factor congénito o adquirido,
- para la diferenciación entre disproteinemias y trastornos en la síntesis de proteínas (junto con métodos inmunoquímicos).

Principio del método

Un plasma con una deficiencia en alguno de los factores que forman parte del sistema intrínseco dará lugar a un tiempo de tromboplastina parcial activada (APTT) prolongado. El plasma deficiente en factor de coagulación puede utilizarse para confirmar un déficit de factor, en general, y para identificar y cuantificar un déficit de factor de coagulación en el plasma del paciente. Se analiza una mezcla del plasma deficiente en el factor correspondiente y del plasma del paciente con el ensayo APTT, y el resultado se interpreta utilizando una curva de referencia obtenida a partir de diluciones de Plasma humano estándar o de un pool de plasmas normal mezclado con plasma deficiente. Un plasma de paciente deficiente en un factor específico no será capaz de compensar la ausencia del factor en el correspondiente plasma deficiente en el factor de coagulación y, por lo tanto, dará como resultado un APTT prolongado.

Materiales suministrados

Coagulation Factor VIII Deficient Plasma

8 x 1 mL , Plasma deficiente en factor VIII de coagulación

Composición

Los plasmas deficientes en los factores de coagulación son plasmas humanos, liofilizados, con una actividad residual de los factores VIII, IX, XI o XII ≤ 1 %. Los plasmas deficientes van a ser preparados por inmuoadsorción de plasmas normales y están libres de antígenos del factor respectivo. El contenido de fibrinógeno se encuentra sobre 1 g/L y la actividad de los otros factores de coagulación está sobre el 40 % de normalidad. Los plasmas contienen manitol (20 g/L) como estabilizador.

Preparación de Reactivos

Plasmas deficientes: Disuelva el contenido de un frasco con 1 mL de agua destilada o desionizada. Antes de usar, déjelo reposar al menos 15 minutos a 15 a 25 °C; a continuación, agítelo suavemente de manera que se mezcle (sin formar espuma). Vuelva a mezclarlo cuidadosamente antes de usar.

Reactivos APTT: Utilícelos según el correspondiente manual de instrucciones.

Solución de cloruro de calcio 0,025 mol/L: atemperado a 37 °C (no es necesario para los sistemas de coagulación automáticos con pipetas de reactivos termostatizadas)

Conservación y estabilidad

El plasma deficiente, sin abrir, conservado a una temperatura entre 2 a 8 °C, es utilizable hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.

Estabilidad después de la reconstitución:

entre 15 a 25 °C 8 horas

a -20 °C 4 semanas

Plasmas deficientes en factor de coagulación puede congelarse y descongelarse tras la reconstitución sin que se produzca una reducción de la actividad de coagulación. El frasco del plasma debe taparse bien y congelarse lo antes posible. La descongelación debe realizarse a 37 °C durante 10 minutos. El plasma descongelado debe utilizarse en un plazo de 2 horas, siempre que se mantenga entre 15 a 25 °C.

Material a investigar

Para obtener el plasma, mezcle con cuidado 1 parte de solución de citrato sódico (0,11 mol/L) con 9 partes de sangre venosa, evitando la formación de espuma. Centrifugue la muestra de sangre a 1500 x g al menos 15 minutos a 15 a 25 °C.

Estabilidad de las muestras:

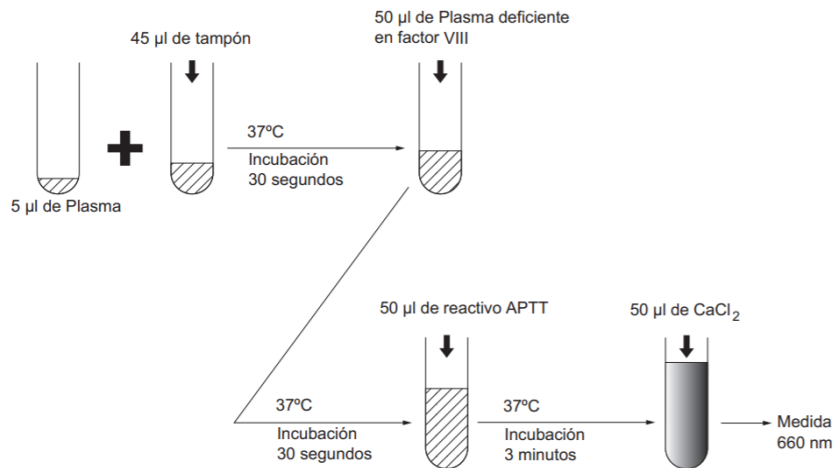
entre 15 a 25 °C 3 horas

a -20 °C 4 semanas para la determinación del factor VIII

El plasma almacenado a -20 °C debe descongelarse en baño María durante 10 minutos a 37 °C. A continuación, deberá mezclarse cuidadosamente y analizarse de inmediato. Si el análisis no puede realizarse inmediatamente, la muestra puede mantenerse un máximo de dos horas a 4 °C hasta ser analizada.

Procedimiento

Volúmenes para ensayo de factor intrínseco



Cálculo de los resultados del análisis

El contenido de factor de coagulación se obtiene leyendo en la curva de referencia en % de normalidad. Si el valor nominal dado para el plasma humano estándar no corresponde al 100 % de normalidad, si no por ej., al 95 %, el resultado leído se debe multiplicar por 0,95. Para tiempos de coagulación, los cuales correspondan a un contenido de factor de más del 100 % de normalidad, se necesitan otras determinaciones con diluciones mayores de las muestras (por ej., 1:10). En la valoración de estas muestras, el valor en % leído en la curva de referencia para esta dilución, se debe multiplicar por un factor de corrección, por ej., para una dilución de 1:10 por el factor de corrección 2.

Control de calidad interno

Deben medirse dos niveles de control de calidad (intervalos normal y patológico) al iniciar un ciclo de ensayo, con cada calibración, cuando vaya a cambiarse el frasco de reactivo y al menos cada ocho horas en cada día de ensayo. Los controles deben procesarse como las muestras. Cada laboratorio debe establecer su propio intervalo de control de calidad, ya sea por medio de valores objetivo e intervalos proporcionados por el fabricante de los controles o por medio de sus propios intervalos de confianza establecidos en el laboratorio. Si los valores de control se encuentran fuera del intervalo, el reactivo, la curva de calibración y el analizador de coagulación deberán examinarse. Los resultados de los pacientes no deberán reportarse hasta identificar y corregir la causa de la desviación.

Valores Esperados

Factor VIII 70 a 150 % de normalidad

Características específicas de rendimiento

Intervalo de medición

El intervalo de medición para la determinación de los factores VIII, IX, XI y XII abarca desde el 1 % hasta aproximadamente el 100 % de normalidad, pudiendo ampliarse hasta aproximadamente el 200 % si se utiliza una dilución de muestra mayor (consulte más arriba).

Precisión

Los estudios de reproducibilidad para la determinación de los factores VIII, IX, XI y XII se realizaron en un sistema BFA con muestras tanto en el intervalo normal como en el patológico. Las muestras se procesaron en determinaciones por octuplicado durante 5 días con curvas de calibración almacenadas. Los estudios de reproducibilidad dieron como resultado coeficientes de variación de 2 a 14 % para todos los factores.

Plasma control normal

Lote: 507769B Fecha de expiración: 08-07-2021

Campo de aplicación

El CONTROL N es un control valorado que se utiliza para evaluar la exactitud y la precisión analítica de los siguientes parámetros en el intervalo normal:

- Tiempo de Protrombina (TP)
- Tiempo parcial activado de tromboplastina (TTPA)
- Tiempo de trombina (TT)

- Tiempo de reptilasa (batroxobina)
- Fibrinógeno
- Factores de la coagulación II, V, VII, VIII, IX, X, XI, XII, XIII y FvW
- Inhibidores: antitrombina III, proteína C, proteína S, α_2 -antiplasmina, inhibidor C1
- Plasminógeno
- Parámetros de la línea ProC®
- Lupus anticoagulante

Los valores teóricos van a ser determinados por Siemens Healthcare Diagnostics con reactivos de Siemens en aparatos de medida de la coagulación mecánicos y foto-ópticos.

Reactivos

Contenido del envase

Control Plasma N

10 x 1,0 mL CONTROL N, Plasma control N

Cada caja de CONTROL N contiene una tabla de valores e intervalos asignados específicos del lote y del método.

Composición

El CONTROL N se obtiene a partir de una mezcla de plasmas procedentes de donantes sanos, seleccionados. El CONTROL N se estabiliza con solución de tampón HEPES (12 g/L) y se liofiliza. Para evitar una activación por contacto del sistema de coagulación, se utilizan frascos siliconados.

El CONTROL N no contiene agentes de conservación.

Sólo para uso diagnóstico *in-vitro*

Preparación del plasma

1. Reconstituir el CONTROL N con 1,0 mL de agua destilada o desionizada.
2. Disuélvalo agitando cuidadosamente (sin formación de espuma).
3. Déjelo reposar entre 15 y 25 °C durante al menos 15 minutos.
4. Antes de usarlo, vuelva a mezclarlo de nuevo con cuidado.

Estabilidad y almacenaje

Almacene el CONTROL N sin abrir entre 2 y 8 °C y utilícelo antes de la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.

Estabilidad después de la reconstitución:

entre 15 a 25 °C 4 horas

entre ≤ -20 °C 4 semanas

El CONTROL N reconstituido puede congelarse y descongelarse una vez. El plasma control reconstituido debe congelarse lo antes posible en un recipiente herméticamente cerrado. La descongelación debe realizarse a 37 °C durante 10 minutos. El plasma control reconstituido no debe permanecer entre 15 y 25 °C durante más de dos horas tras la descongelación.

Aparatos

El CONTROL N se puede utilizar en aparatos de medida de la coagulación manuales o automáticos. Siemens pone a disposición manuales de referencia (reglamentos de aplicación) para diferentes aparatos de medida de la coagulación. Estos contienen información específica aparato/test para el manejo y el rendimiento, que pueden diferenciarse de la información dada en estas instrucciones de uso. En este caso, la información contenida en los manuales de referencia (reglamentos de aplicación) reemplaza la información de estas instrucciones de uso.

Procedimiento

Use los reactivos correspondientes según las indicaciones de las Instrucciones de Uso.

El CONTROL N debe analizarse al menos cada 8 horas y en cualquier serie analítica de pacientes durante ese intervalo. Los controles deben llevarse a cabo tras cada nueva curva de calibración y tras cada cambio de frasco de reactivo. Puede ser necesario repetir la calibración si los valores del control se encuentran fuera del intervalo esperado. No valide resultados de pacientes si los controles se encuentran fuera del intervalo.

Valores Esperados

Los valores esperados pueden consultarse en la tabla de valores asignados específicos del lote y del método que se adjunta. Estos valores sólo se proporcionan como referencia. Es recomendable que cada laboratorio establezca su propio intervalo.

Limitaciones del Procedimiento

Si se emplean otros principios de medición, los tiempos de coagulación obtenidos pueden diferir de los valores asignados proporcionados, dependiendo del instrumento utilizado. Los valores asignados (tiempos de coagulación medios) proporcionados para TP, TTPA, tiempo de trombina en segundos y el ensayo de lupus anticoagulante dependen en gran medida del método, del instrumento y de la técnica, por lo que sólo sirven de referencia.

Plasma control patológico

Lote: 556715A Fecha de expiración: 27-01-2021

Campo de aplicación

El CONTROL P es un control valorado que se utiliza para evaluar la exactitud y la precisión analítica de los siguientes parámetros en el intervalo patológico:

- Tiempo de Protrombina (TP)
- Tiempo parcial activado de tromboplastina (TTPA)
- Fibrinógeno (método Clauss)
- Factores de la coagulación II, V, VII, VIII, IX, X, XI, XII, XIII y FvW
- Inhibidores: antitrombina III, proteína C, proteína S, α_2 -antiplasmina, C1-inhibidor
- Plasminógeno
- Los valores teóricos fueron determinados usando los reactivos de
- Siemens Healthcare Diagnostics en aparatos de medida de la coagulación mecánicos y foto- ópticos.

Reactivos

Contenido del envase

Plasma control P 10x1mL

Cada caja de CONTROL P contiene una tabla de valores e intervalos asignados específicos del lote y del método.

Composición

- El CONTROL P se obtiene a partir de una mezcla de plasmas procedentes de donantes sanos, seleccionados y se calibra para una determinada concentración de los factores de la coagulación. El CONTROL P se estabiliza con solución de tampón HEPES (12 g/L) y se liofiliza. Para evitar una activación por contacto del sistema de coagulación, se utilizan frascos siliconados.
- El CONTROL P no contiene agentes de conservación.

Preparación del plasma

1. Reconstituir el CONTROL P con 1,0 mL de agua destilada o desionizada.
2. Disuélvalo mezclándolo cuidadosamente (sin formación de espuma).
3. Déjar reposar entre 15 y 25 °C durante al menos 15 minutos.
4. Antes de usarlo, vuelva a mezclarlo de nuevo con cuidado.

Estabilidad y almacenaje

Almacene el CONTROL P sin abrir entre 2 y 8 °C y utilícelo antes de la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.

Estabilidad después de la reconstitución:
entre 15 y 25 °C 4 horas
entre ≤ -20 °C 4 semanas

El CONTROL P reconstituido puede congelarse y descongelarse una vez. El plasma control reconstituido debe congelarse lo antes posible en un recipiente herméticamente cerrado. La descongelación debe realizarse a 37 °C durante 10 minutos. El control reconstituido no debe permanecer durante más de dos horas entre 15 y 25 °C tras la descongelación.

Aparatos

El CONTROL P se puede utilizar en aparatos de medida de la coagulación manuales o automáticos. Siemens pone a disposición manuales de referencia (reglamentos de aplicación) para diferentes aparatos de medida de la coagulación. Estos contienen información específica aparato/test para el manejo y el rendimiento, que pueden diferenciarse de la información dada en estas instrucciones de uso. En este caso, la información contenida en los manuales de referencia (reglamentos de aplicación) reemplaza la información de estas instrucciones de uso. Por favor consulte el manual de instrucciones del fabricante del aparato!

Procedimiento

Use los reactivos correspondientes según las indicaciones de las Instrucciones de utilización. El CONTROL P debe analizarse al menos cada 8 horas en cualquier serie analítica de pacientes durante ese intervalo. Los controles también deben realizarse tras cada nueva curva de calibración y tras cada cambio de frasco de reactivo. Puede ser necesario repetir la calibración si los valores del control se encuentran fuera del intervalo esperado. No valide resultados de pacientes si los controles se encuentran fuera del intervalo.

Valores Esperados

Los valores esperados pueden consultarse en la tabla de valores asignados específicos del lote y del método que se adjunta. Estos valores sólo se proporcionan como referencia. Es recomendable que cada laboratorio establezca su propio intervalo.

Limitaciones del Procedimiento

Si se utilizan analizadores de coagulación con otros principios de medición, los tiempos de coagulación obtenidos pueden diferir de los valores proporcionados.

Dade® Actin® Reactivo de cefaloplastina activada

Lote: 557298A Fecha de expiración: 23-10-2020

Lote: 538559 Fecha de expiración: 17-02-2021

Significado diagnóstico

La determinación del tiempo de tromboplastina parcial activada (aPTT) es una prueba de chequeo global, la cual se utiliza para evaluar la vía endógena de la coagulación, que indica una deficiencia de los factores II, V, X o del fibrinógeno. La determinación del aPTT es además una prueba reconocida para controlar la eficacia de la terapia con heparina no fraccionada, en donde la prolongación del tiempo de coagulación es proporcional al nivel de heparina. En pacientes bajo una terapia con anticoagulantes orales se espera igualmente una prolongación del aPTT, ya que en estos pacientes los niveles circulantes de los factores II, VII, IX y X están disminuidos. La existencia de sustancias inhibitoras no específicas, como sustancias similares al anticoagulante lúpico, pueden ocasionar una prolongación del aPTT; sin embargo, este efecto es variable y por lo general se relaciona con la composición del reactivo de aPTT que se ha utilizado.

Principio del método

La incubación del plasma con una cantidad óptima de fosfolípidos y un activador de superficie conduce a la activación de los factores del sistema endógeno de la coagulación. Al agregar calcio se origina el proceso de coagulación. A continuación, se mide el tiempo transcurrido hasta la formación del coágulo.

Reactivos

Contenido del envase comercial: Dade® Actin® Reactivo de cefaloplastina activada

Composición: Dade® Actin® Reactivo de cefaloplastina activada: Cefalina (extracto obtenido de cerebro de conejo y deshidratado) en $1,0 \times 10^{-4}$ M de ácido elálgico, con tampón, estabilizadores y agentes de conservación.

Advertencias y Medidas de Seguridad

Sólo para uso diagnóstico *in-vitro*.

Preparación del reactivo

Se debe mezclar con cuidado invirtiéndolo (entre 5 y 8 veces) antes de utilizarlo.

Estabilidad y almacenaje

Después de utilizarlo, guarde el recipiente cerrado a 2 a 8 °C. Guárdelo sin abrirlo a 2 a 8 °C,

se puede utilizar hasta la fecha de caducidad del etiquetado. Una vez abierto, el reactivo permanece estable durante 7 días a 2 a 15 °C. No congelar. Si se deja colocado el reactivo en posición vertical, se puede formar un depósito verde compuesto de ácido elálgico y lípidos.

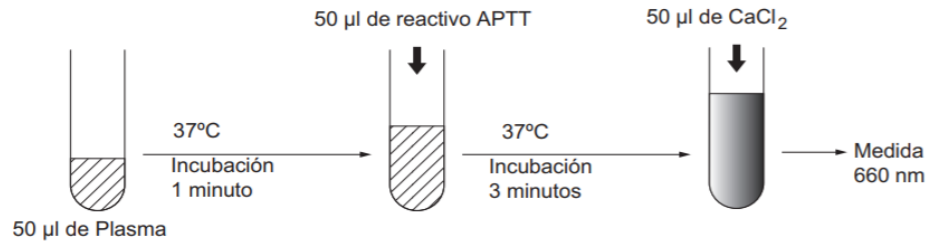
Antes del uso, mézclelo invirtiéndolo. Evite la contaminación con plasma.

Preparación de la muestra

Separar el plasma y colocarlo en un tubo de plástico. No conservar en hielo. El plasma pobre en plaquetas puede congelarse a ≤ -20 °C durante un máximo de 2 semanas en un congelador que no cree escarcha. El plasma congelado debe descongelarse rápidamente a 37 °C, mezclarse con cuidado y analizarse de forma inmediata. Las muestras no deben permanecer a 37 °C más de 5 minutos.

Procedimiento

Volúmenes para APTT



Resultados

Los resultados de las pruebas del tiempo de tromboplastina parcial activada deben darse como aPTT en segundos y se deben comparar con el intervalo normal propio del laboratorio para la determinación del aPTT.

Valores Esperados

Mediana (segundos)	90 % intervalo de referencia (segundos)	
	Percentil 5	Percentil 95
111 sujetos Sistema SYSMEX CA-1500	26,6	31,8
111 sujetos Sistema BCS®	26,1	31,0

Para otros colectivos, como por ej., pacientes pediátricos, se debe determinar, en cada caso, su propio intervalo de referencia.

Características Específicas del ensayo

Los estudios de precisión realizados con los métodos enumerados dieron en el intervalo normal una desviación estándar (DE), que corresponde a un coeficiente de variación (CV) menor del 5 %. Se han realizado estudios adicionales que demuestran que la reproducibilidad de determinaciones de aPTT por duplicado de una misma debe ser como máximo igual al 4 % en el intervalo de normalidad si todo el proceso se ha realizado correctamente.

Solución de cloruro de calcio

Lote: 563860 Fecha de expiración: 08-04-2024

Uso Previsto

La Solución de Cloruro del Calcio se utiliza como Reactivo complementario en diversos ensayos de coagulación.

Reactivos

Materiales suministrados

Solución de Cloruro de Calcio, **ORHO37**
0 x 15 mL Ca SOLUTION , **REF** Solución de Cloruro de Calcio
Composición
CaCl₂ solución 0,025 mol/L
Advertencias y Medidas de Seguridad
Sólo para uso diagnóstico *in-vitro*.

Estabilidad y Condiciones de Almacenaje

Almacenamiento entre 2 a 25 °C:

La fecha de caducidad está indicada en la etiqueta. Estabilidad una vez abierto:

8 semanas entre 2 a 25 °C

La información sobre la estabilidad en cada instrumento se especifica en las Guías de Referencia (Hojas de Aplicación) para los distintos analizadores de coagulación.

Materiales necesarios pero no suministrados

Coagulómetro

Reactivos y materiales utilizados con la Solución de Cloruro de Calcio correspondientes Instrucciones de uso de las pruebas de coagulación.

Procedimiento

Al llevar a cabo la prueba, el coagulómetro correspondiente añade la Solución de Cloruro de Calcio de forma automática.

Consulte las Instrucciones de Uso y las Hojas de aplicación de las pruebas en las que se va a utilizar la Solución de Cloruro de Calcio.

Buffer de Owren

Lote: 554675 Fecha de expiración: 24-07-2021

Campos de aplicación

- Tampón de dilución para las investigaciones de la coagulación.
- Significado diagnóstico
- El tampón veronal de Owren fue desarrollado especialmente para las investigaciones de la coagulación, pero además, puede ser utilizado en todas partes donde se necesite un tampón barbital isotónico con pH7,35.

Reactivos

Contenido del envase comercial

10x15mL de Buffer OV

Composición

Owren's Veronal Buffer: 2.84×10^{-2} M sodium barbital in 1.25×10^{-1} M sodium chloride; pH 7.35 ± 0.1

Advertencias y Medidas de Seguridad

- Sólo para ser usado en diagnósticos *in-vitro*.
- Las etapas de pipeteo deben realizarse cuidadosamente, para evitar una contaminación. La presencia de turbidez y floculación está indicando una contaminación.
- No es indicado para el uso interno o externo en personas o animales.

Preparación del reactivo

Listo para usar

Estabilidad y almacenaje

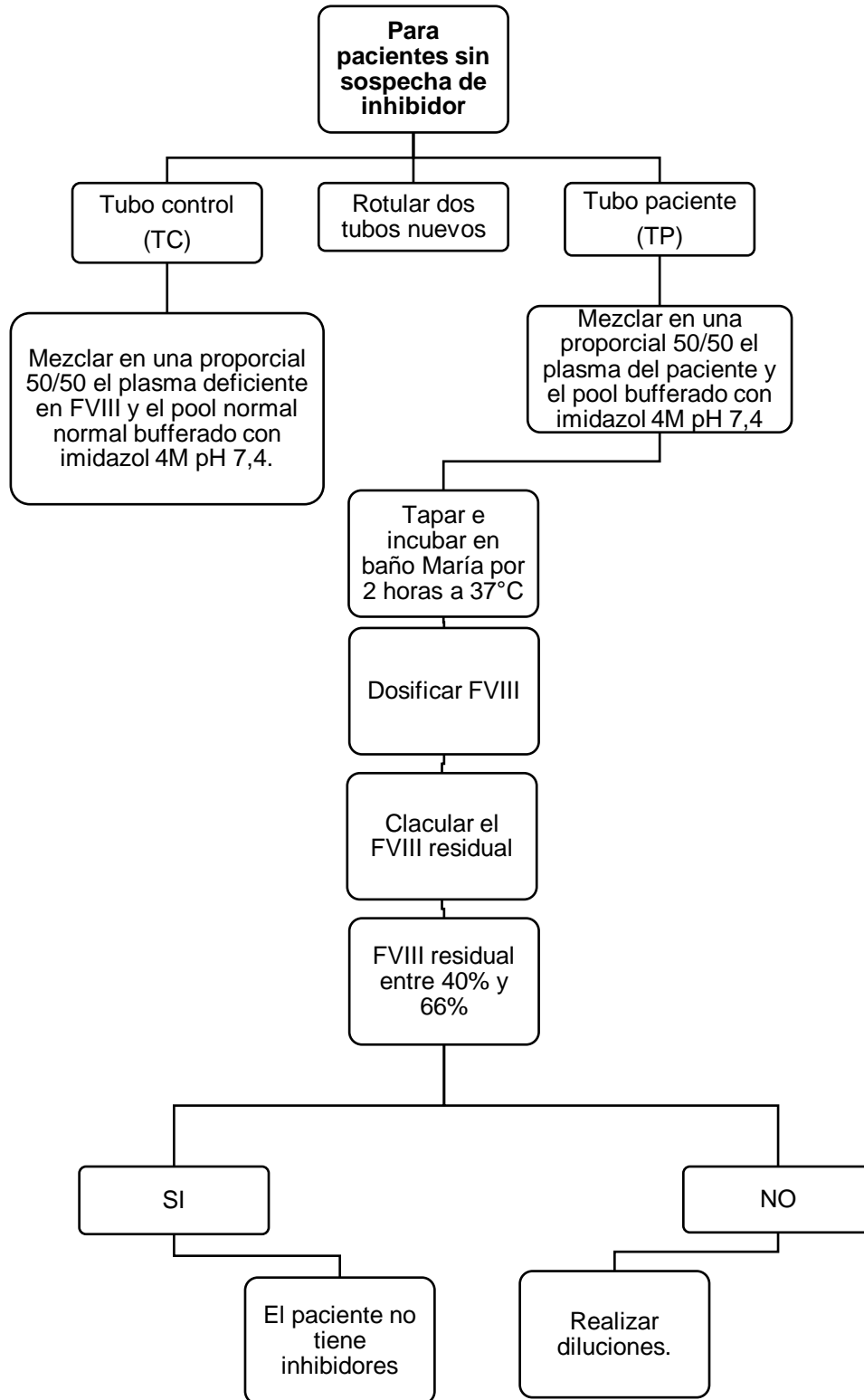
Almacenado entre 2 a 8 °C, sin abrir, es estable hasta la fecha de caducidad

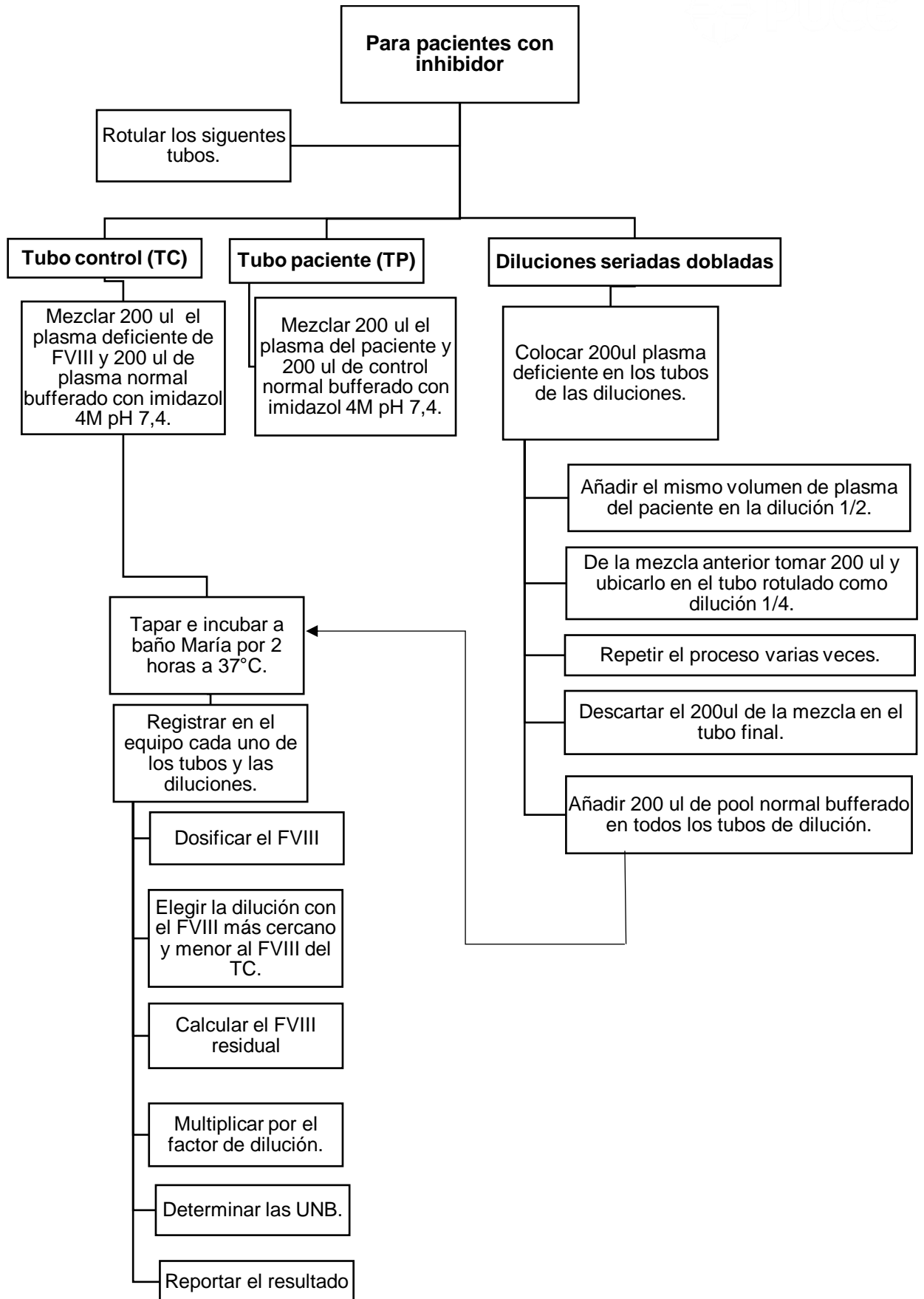
Solución amortiguadora de imidazol 4M pH 7,4

Imidazol	3,4 g
Agua destilada	150,0 mL
HCL 0,06 Normal	186,0 mL
NaCl	5,85 g

Ajustar el pH a 7,4 con HCl o NaOH antes de aforar a 1000 mL con agua destilada

ALGORITMO DE PRUEBA NIJMEGEN





PROCEDIMIENTO PRUEBA NIJMEGEN

Paciente		Control	
Plasma paciente	Plasma normal + Buffer imidazol pH 7.4	Plasma normal + Buffer imidazol pH 7.4	Plasma deficiente de FVIII
Mezcla 50/50		Mezcla 50/50	
Incubar por 2 horas a 37°C			
Medir FVIII			
Calcular FVIII residual			

- Para calcular la actividad residual de FVIII reemplazar en:

$$\text{Actividad residual de FVIII} = \frac{\text{FVIII mezcla paciente}}{\text{FVIII mezcla control}} * 100$$

Notas:

- El porcentaje de FVIII residual debe hallarse entre 40% y 66% para calcular el inhibidor.
- Si el FVIII residual es inferior al 40% se deben hacer diluciones.
- Si el FVIII residual supera al 66% el paciente no tiene inhibidor.

Procedimiento para pacientes con inhibidores

Control	Paciente	Diluciones			
		1/2	1/4	1/8	1/16
200 µL Plasma deficiente de FVIII	200 µL Plasma del paciente	200 µL Plasma deficiente de FVIII			
		200 µL Plasma del paciente	200 µL Plasma del paciente	200 µL Plasma del paciente	200 µL Plasma del paciente
+	+	+	+	+	+
200 µL Pool de plasma normal regulado con imidazol 4M pH 7,4					
Incubar 2 horas a 37°C					
Determinar el % de FVIII					
Calcular FVIII residual					

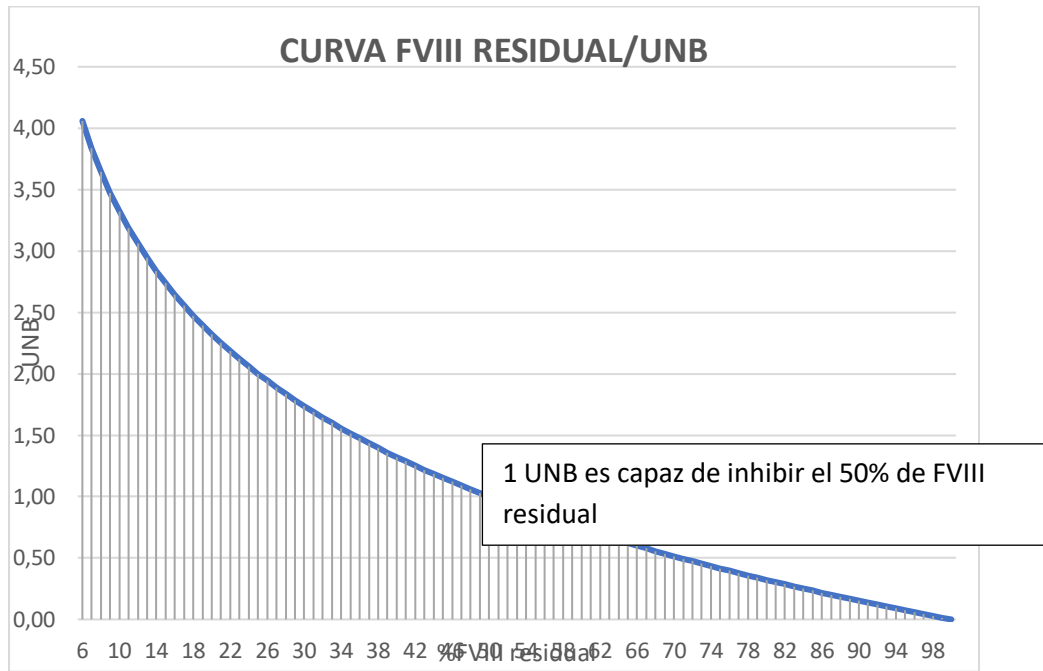
*Si se obtienen valores de FVIII residual bajos continuar diluyendo la muestra

El título se obtendrá cuando se determinen concentraciones de FVIII residual cercanas al 50%.

Tabla de FVIII residual y UNB

%FVIII residual	UNB	%FVIII residual	UNB	%FVIII residual	UNB	%FVIII residual	UNB
5	4,32	29	1,79	53	0,92	77	0,38
6	4,06	30	1,74	54	0,89	78	0,36
7	3,84	31	1,69	55	0,86	79	0,34
8	3,64	32	1,64	56	0,84	80	0,32
9	3,47	33	1,60	57	0,81	81	0,30
10	3,32	34	1,56	58	0,79	82	0,29
11	3,18	35	1,51	59	0,76	83	0,27
12	3,06	36	1,47	60	0,74	84	0,25
13	2,94	37	1,43	61	0,71	85	0,23
14	2,84	38	1,40	62	0,69	86	0,22
15	2,74	39	1,36	63	0,67	87	0,20
16	2,64	40	1,32	64	0,64	88	0,18
17	2,56	41	1,29	65	0,62	89	0,17
18	2,47	42	1,25	66	0,60	90	0,15
19	2,40	43	1,22	67	0,58	91	0,14
20	2,32	44	1,18	68	0,56	92	0,12
21	2,25	45	1,15	69	0,54	93	0,10
22	2,18	46	1,12	70	0,51	94	0,09
23	2,12	47	1,09	71	0,49	95	0,07
24	2,06	48	1,06	72	0,47	96	0,06
25	2,00	49	1,03	73	0,45	97	0,04
26	1,94	50	1,00	74	0,43	98	0,03
27	1,89	51	0,97	75	0,42	99	0,01
28	1,84	52	0,94	76	0,40	100	0,00

Curva de FVIII residual y UNB



ANEXO 10. INFORME DE RESULTADOS

INFORME DE RESULTADOS DE LABORATORIO			
Nombre del paciente:			
Código asignado:		Edad:	
Tipo de muestra:		Sexo:	
Fecha y hora de toma de muestra:			
Fecha y hora de impresión de informe:			

ANALITO	TÍTULO	UNIDADES	RANGO DE REFERENCIA
FVIII residual		%	
Inhibidor de FVIII (*)		UNB	
Método: Coagulometría, *Modificación Nijmegen			
Validado por:			
Wendy Guerrero Vinueza		Karla Molina Maldonado	
Fecha y hora de validación			

ANEXO 11: MANUAL PARA EL MANEJO DE DESECHOS EN ESTABLECIMIENTOS DE SALUD

Por: Fundación Natura / Lcda. Marcia Zabala /

Comité Interinstitucional para el Manejo de Desechos Hospitalarios

Se clasifica a los desechos hospitalarios en los siguientes grupos de acuerdo a sus características

- Desechos comunes

No representan riesgos para la salud del individuo y el ambiente por lo que no requieren de un manejo especial. Poseen el mismo grado de contaminación que los desechos domiciliarios.

- Desechos infecciosos

Contienen agentes patógenos y/o contaminantes por lo que se los considera peligrosos para la salud del hombre. Forman parte del 10 al 15% de los desechos.

- Desechos sanguíneos

Sangre, suero, plasma o insumos que hayan tenido contacto con estos fluidos.

- Desechos cortopunzantes

Agujas, lancetas, bisturí, catéteres, pipetas entre otros objetos de vidrio y cortopunzantes desechados, que han estado en contacto con agentes infecciosos. Todo objeto cortopunzante debe ser agrupado como infeccioso. Constituye el 1% de todos los desechos.

- Desechos químicos

Sustancias o productos químicos tóxicos para el hombre y el medio ambiente; productos corrosivos, capaces de alterar la piel y mucosas de las personas así también como el instrumental y los materiales de las casas de salud; inflamables y/o explosivos, que puedan ocasionar incendios en contacto con el aire o con otras sustancias.

Separación

Los desechos deben ser clasificados y separados inmediatamente después de su generación.

Almacenamiento y Transporte

Los desechos correctamente clasificados se colocan en recipientes de color y rotulación adecuada que deben estar ubicados en los sitios de generación para evitar su movilización y por consiguiente la dispersión de los gérmenes contaminantes.

Debe existir al menos tres recipientes correctamente identificados y rotulados en cada área. Para los desechos comunes, para los infecciosos y para los cortopunzantes.

Las contenedores de almacenamiento temporal y final deben cumplir con las siguientes especificaciones técnicas:

- Herméticos
- Resistentes a cortes, a la torsión, a los golpes y a la oxidación.
- Impermeables
- De tamaño adecuado, para su fácil transporte y manejo.
- De superficies lisas
- Claramente identificados con los colores establecidos.
- Compatibles con los detergentes y desinfectantes.

Identificación

- Rojo: Para desechos infecciosos (de preferencia marcados con el signo de riesgo biológico)
- Negro: Para desechos comunes
- Gris: Para desechos reciclables: papel, cartón, plástico, vidrio, etc.
- Amarillo: Para desechos radiactivos.

Si se dispone de fundas plásticas de estos colores, pueden usarse de un solo color pero claramente identificadas con los símbolos o con rótulos de cinta adhesiva.

Recipientes para cortopunzantes

Después de utilizar cualquier objeto cortopunzante deben ser depositados en recipientes de plástico duro o metal con tapa, con una abertura angosta, que impida la introducción de las manos. El contenedor debe tener una capacidad no mayor de 2 litros y debe llenarse hasta las $\frac{3}{4}$ partes, después serán enviados para su tratamiento en autoclave o incinerador. Los contenedores deben estar rotulados como: Peligro: desechos cortopunzantes

ANEXO 12: CHECK LIST PARA VERIFICACIÓN DE CONDICIONES PRE ANALÍTICA

Código de identificación

Parámetro	SÍ	NO
Ayuno mínimo de 8 horas		
Descanso mínimo de 8 horas		
Actividad física en las últimas 24 horas		
Administración de factor en los últimos 3 días		
¿Fumó en las últimas 24 horas?		
¿Ingirió bebidas alcohólicas en las últimas 24 horas?		
¿Ingirió alguno de estos fármacos: Acido valproico, ciprofloxacina y levotiroxina?		

**ANEXO 13: CHECKLIST PARA CONTROL DE LA TOMA DE MUESTRA Y
MUESTRA OBTENIDA
Toma de muestra**

Código de identificación

--

Punción:

Brazo:

Izquierdo	Derecho

Única	Doble	Mayor a dos

Técnica utilizada

Calibre de aguja utilizada

Al vacío	Por Goteo	Jeringuilla

21 G	23G

Número de tubo utilizados:

Tipo de tubo	Numero de tubos
Tubo con citrato de sodio al 3,4% x 5mL	
Tubo con citrato de sodio al 3,4% x 1mL	

Operador:

Parámetro	Cumple	No cumple
¿Uso de guantes?		
¿Desinfecta el área de punción en forma circular de adentro hacia a fuera?		
¿Uso de torniquete 10 cm arriba del área de punción?		
¿El uso de torniquete no excede el 1 min?		
¿Mantiene presionada la zona de punción después de la extracción?		

Otros:

Parámetro	SI	NO
Relación sangre /anticoagulante 9:1		
Muestra lipemia		
Muestra hemolizada		
Muestra icterica		

ANEXO 14: ACUERDO DE CONFIDENCIALIDAD

Quito, 27 de septiembre del 2018

Licenciado

Yan Arévalo

Asistente Comité de Ética de la Investigación en Seres Humanos

Pontificia Universidad Católica del Ecuador

Acuerdo de Confidencialidad Participantes en el Proyecto de Investigación

Nosotras, Wendy Lizeth Guerrero Vinueza con C.C. 1724220502 y Karla Vanessa Molina Maldonado con CC. 0504391053 y en calidad de _investigadoras del proyecto “Frecuencia del inhibidor del factor VIII mediante metodología Nijmegen en pacientes con hemofilia “A” que reciben tratamiento con factor VIII liofilizado, inscritos en la FUNDHEC –Núcleo Pichincha, 2019” presentado a Comité De Ética De La Investigación en Seres Humanos de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Sede Quito, manifestamos, que:

- Entendemos que información confidencial son aquellos datos proporcionados por el paciente antes y durante el estudio; los datos que se obtengan en el transcurso de la investigación y los resultados que se obtengan después de esta.
- Nos comprometemos a restringir el acceso a la información sólo a aquellas personas relacionadas al proyecto en calidad de investigadores o tutor de la investigación, por lo tanto, se mantendrá una estricta confidencialidad al no revelar a otras personas tanto físicas o jurídicas cualquier información que se obtenga en el proyecto de investigación, en cualquier formato ni con otros fines distintos al proyecto.
- El intercambio de información, se dará de manera documentada y con firma de recibo por la parte del receptor.
- La confidencialidad de la información se mantendrá desde la recepción hasta la entrega de resultados.

Firma

Wendy Lizeth Guerrero Vinueza

Investigador

1724220502

Firma

Karla Vanessa Molina Maldonado

Investigador

050439105

ANEXO 15: PROCESO DE ESTUDIO



Ilustración 1. Toma de muestras en FUNDHEC



Ilustración 2. Extracción de muestras sanguíneas en FUNDHEC



Ilustración 3. Toma de muestra sanguínea a paciente hemofílico tipo A



Ilustración 4. Estudiantes Wendy Guerrero y Karla Molina; autoras de la investigación



Ilustración 5. Equipo CA 660; donde se procesaron las muestras del presente estudio

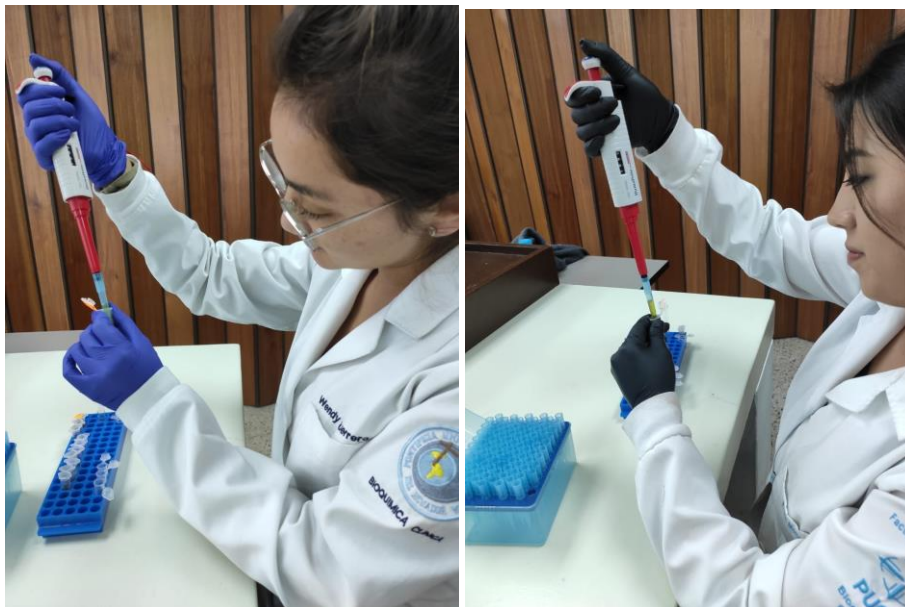


Ilustración 6. Estudiantes realizando el proceso manual de la técnica Nijmegen.

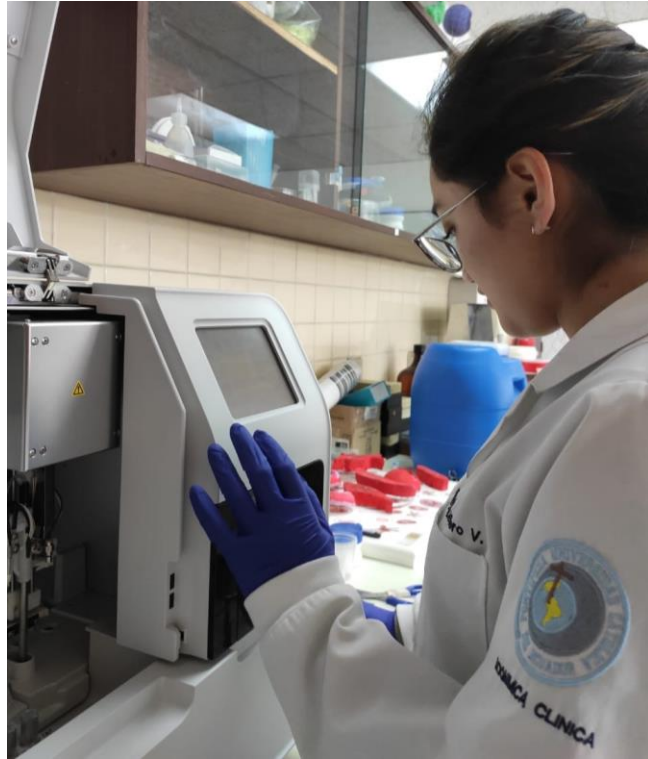


Ilustración 7. Estudiante procesando muestra en el equipo, para la cuantificación de FVIII

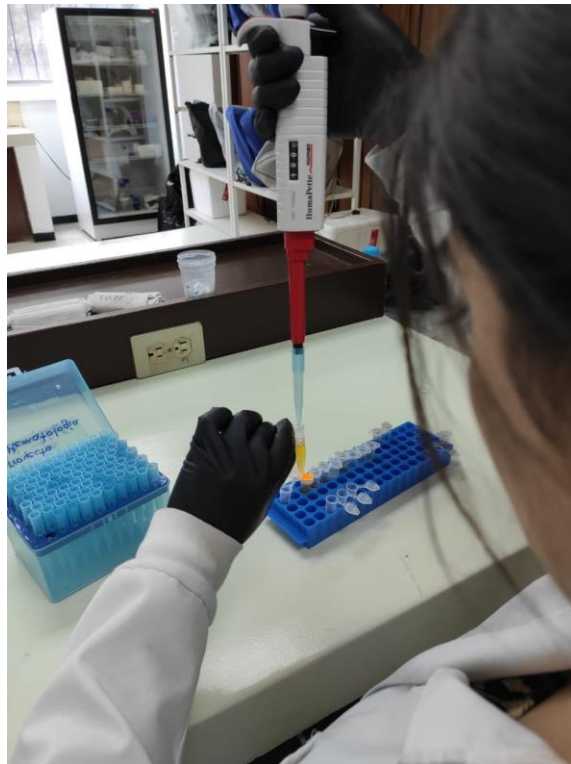


Ilustración 8. Estudiante realizando las diluciones correspondientes



Ilustración 9. Pacientes con hemofilia A junto a sus familiares que concurren a la FUNDHEC

ANEXO 16: PRESUPUESTO

Rubros	Presupuesto		
	Cantidad	Valor unitario	Valor total
Impresión a color de afiches informativos sobre las condiciones pre-analíticas	100	0,25	25,00
Paquete de tubos con citrato de sodio 3.2% , vol. 5 ml (x 100 unidades)	2	13,20	26,40
Paquete de tubos con citrato de sodio pediátricos 3.2% (volumen 1ml)	1	15,00	15,00
Guantes de nitrilo marca Supermax (x100 unidades)	1	11,00	11,00
Paquete puntas para pipetas automatizadas	1	22,00	22,00
Caja jeringas NIPRO 5 cc G21	1	12,50	12,50
Caja curitas CureBand	2	5,00	10,00
Caja swaps x 100 unidades	2	10,50	21,00
Caja de agujas toma múltiple vacutainer calibre 21	2	11,00	22,00
Hielo seco para preservación de muestras	5 (kg)	4,00	20,00
Transporte de muestras			20,00
Reactivos TTPA marca Siemens	400	0,60	240,00
Reactivos Factor VIII marca Siemens	2	270,00	540,00
Control normal marca Siemens	1	296,00	296,00
Calibrador marca Siemens	1	95,00	95,00
Agua desionizada	10	0,50	5,00
Paquete puntas para pipetas automatizadas 100 ul	1	22,00	22,00
Paquete puntas para pipetas automatizadas 1000 ul	1	22,00	22,00
Solución salina para diluciones del plasma	1	5,00	5,00
Equipo SIEMENS CA-660			
Fundas basura rojas (paquete x10 unidades)	2	2,00	4,00
Fundas basura negras (paquete x10 unidades)	2	2,00	4,00
Pago por retiro a EMASEO por retiro de desecho biopeligroso			
Asesoría estadística			150,00
Impresión de informes de resultados para médicos	134	0,05	6,7
Sobres para informes de resultados para médicos	134	0,15	20,10
Impresión de informes de resultados para pacientes	134	0,05	6,7
Sobres para informes de resultados para pacientes	134	0,15	20,10
Transporte para entrega de resultados			20,00
Impresión del anillado para evaluación por lectores	1	6,00	6,00
Impresión del documento con las correcciones solicitadas.	1	6,00	6,00
Impresión del documento final empastado y CD con la información del documento de disertación.	1	20,00	20,00
		Total	1 693, 50

ANEXO 17: CRONOGRAMA

Actividades	Mayo				Junio				Julio				Agosto				Septiembre				Octubre				Noviembre				Diciembre				Enero			
	Semanas				Semanas				Semanas				Semanas				Semanas				Semanas				Semanas				Semanas							
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Convocatoria a los pacientes por parte de la FUNDHEC																																				
Reunión con los pacientes de la FUNDHEC																																				
Toma de muestras sanguíneas																																				
Procesamiento de muestras																																				
Análisis de datos																																				
Informe de resultados y entrega a FUNDHEC																																				
Desarrollo de introducción, antecedentes, problema																																				
Desarrollo de marco teórico																																				
Desarrollo del marco metodológico																																				
Desarrollo de resultados																																				
Desarrollo de conclusiones y recomendaciones																																				
Presentación de anillado para evaluación cualitativa por lectores																																				
Revisión y correcciones																																				
Presentación del documento final en formato electrónico para calificación por lectores																																				