

INSTRUCTIVO DE EXTRACCION Y DERIVACION DE MUESTRAS ESTUDIO DE ADAMTS13 y COMPLEMENTO

Léase el siguiente instructivo para la obtención de muestras que sean representativas de la patología que presenta el paciente, y que brinde información certera sobre su diagnóstico y seguimiento.

CONSIDERACIONES IMPORTANTES PARA LA EXTRACCION Y EL PROCESAMIENTO

- ❖ Las muestras deben ser extraídas antes de iniciar tratamiento inmunosupresor y/o transfusional.
- ❖ Para el análisis del sistema de complemento deben procesarse y almacenarse en frío, ya que puede existir activación *in vitro* de las proteínas involucradas en la vía cuando las muestras son mantenidas y procesadas a temperatura ambiente.
- ❖ Debe respetarse el tiempo entre la extracción de la muestra y el envío.
- ❖ Considerar que para varias determinaciones pueden utilizarse la misma muestra (teniendo en cuenta escaso volumen de muestra).
- ❖ Considerar que para algunas determinaciones, pueden optar por un procesamiento específico (teniendo en cuenta su infraestructura y equipamiento disponible, ver tabla más abajo y pagina 2).

DATOS IMPORTANTES PARA LA DERIVACION

- ❖ Efectuar consulta previa por trámites administrativos al Departamento de Hemostasia y Trombosis:
Tel: **+54 911 4803-9475/4809-1051/4809-1081**. Email: **trombosis@hematologia.anm.edu.ar**
- ❖ NO ENVIAR MUESTRAS SIN HABER CONTACTADO EL DEPARTAMENTO DE HEMOSTASIA Y TROMBOSIS.
- ❖ Las muestras no serán procesadas hasta que se reciba la planilla de resumen de historia clínica completa (ver formulario adjunto).
- ❖ Las extracciones de sangre pueden ser derivadas sin ser previamente fraccionadas, únicamente si pueden ser enviadas el mismo día de su extracción, sin cortar la cadena de frío (4°C), para ser procesadas directamente en nuestro departamento.
- ❖ Las muestras se reciben de **Lunes a Viernes, de 8 a 13 hs.**

DETERMINACIONES

Ensayos	Muestra	Anticoagulante	Volumen mínimo (adultos)	Procesamiento	Derivación
❖ Actividad ADAMTS13 ❖ Inhibidores de ADAMTS13	Plasma	Citrato	0,5 ml	TA	≤ -20°C
❖ Multímeros VWF	Plasma	EDTA	0,5 ml	TA	≤ -20°C
❖ C5b-9	Plasma	EDTA	0,25 ml	4°C	≤ -20°C
❖ CD46	Sangre entera	EDTA	1 ml	NA	TA
❖ Anti-CFH	Plasma / Suero	EDTA o Citrato / NA	0,25 ml	TA o 4°C	≤ -20°C
❖ C3Nef ❖ PDC	❖ Plasma ❖ Suero	❖ EDTA ❖ NA	❖ 0,5-1 ml ❖ 0,5 ml	4°C	≤ -20°C
❖ BM ADAMTS13 ❖ BM CFH, CFI, CD46, C3, CFB, THBD	Sangre entera	EDTA	1 ml	NA	TA o 4°C

ml: mililitros, TA: temperatura ambiente, NA: no aplica, BM: biología molecular

INSTRUCTIVO DE EXTRACCION Y DERIVACION DE MUESTRAS ESTUDIO DE ADAMTS13 y COMPLEMENTO

PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

- ❖ Las muestras obtenidas con anticoagulantes deben mantener una proporción 1:9; es decir, 1 vol. de anticoagulante y 9 vol. de sangre; mezclar por inversión. Controlar que no estén coaguladas.
- ❖ Seguir los pasos de centrifugación para cada tipo de muestra (ver más abajo). El rotulo deberá contemplar el anticoagulante utilizado, la fecha de extracción y nombre del paciente.

PLASMA – CITRATO 3,2% o 3,8% - Actividad y Inhibidores ADAMTS13 / Anti-FH

- 1- Centrifugar a 1500g (3500-4000 rpm), 15-20 minutos a temperatura ambiente.
- 2- Trasvasar el plasma (sin tocar la interfase) a un nuevo tubo de plástico y centrifugarlo a las mismas condiciones mencionadas en el paso 1-.
- 3- Trasvasar a nuevo tubo de plástico, rotular y congelar la muestra a -20°C o -80°C hasta su derivación.

PLASMA – EDTA – Multímeros VWF / C3Nef / PDC / Anti-FH

- 1- Centrifugar a 1500g (3500-4000 rpm), 15-20 minutos a temperatura ambiente para la determinación de multímeros o a 4°C para la determinación de C3Nef y PDC.
- 2- Trasvasar el plasma (sin tocar la interfase) a un nuevo tubo de plástico y centrifugarlo a las mismas condiciones mencionadas en el paso 1-.
- 3- Trasvasar a nuevo tubo de plástico, rotular y congelar la muestra a -20°C o -80°C hasta su derivación.

PLASMA – EDTA – C5b-9 / C3Nef / PDC / Anti-FH

- 1- Conservar rápidamente la sangre entera –sin centrifugar– a 4°C y mantenerla en frío hasta 24hs máximo. Derivar la muestra refrigerada dentro de las 24hs sin cortar la cadena de frío.
- 2- En caso de que el tiempo de derivación fuese mayor a 24hs: si disponen de una centrifuga refrigerada, deberán centrifugar la muestra a 4°C, a 1000g durante 10 minutos, trasvasar el plasma a nuevo tubo de plástico y volver a centrifugar a 4°C a 12.000g durante 4 minutos.
- 3- Trasvasar a nuevo tubo de plástico, rotular y congelar la muestra a -20°C o -80°C hasta su derivación.

SUERO – PDC / Anti-FH

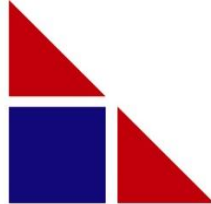
- 1- Dejar reposar la sangre al menos 30 minutos a temperatura ambiente después de la extracción.
- 2- Centrifugar a 1500g (3500-4000 rpm) durante 15-20 minutos a 4°C de preferencia (para determinación de PDC) o a temperatura ambiente.
- 3- Trasvasar a nuevo tubo de plástico, rotular y congelar la muestra a -20°C o -80°C hasta su derivación.

SANGRE ENTERA – EDTA – CD46 / BIOLOGIA MOLECULAR

- 1- Para la determinación de CD46: mantener la sangre entera a temperatura ambiente y derivar la muestra dentro de 24 hasta 48hs. **NO** congelar la muestra de sangre entera.
- 2- Para el estudio de BM: mantener la sangre entera a 4°C hasta la derivación. **NO** congelar la muestra de sangre entera.

DERIVACION DE LAS MUESTRAS

- ❖ Rotular los tubos con nombre completo, fecha de extracción y tipo de muestra (citrato, EDTA, suero).
- ❖ Enviar las muestras congeladas sin cortar la cadena de frío (usar hielo seco).
- ❖ Enviar las muestras de sangre entera (EDTA) para determinación de C5b-9 dentro de las 24hs de la extracción sin cortar la cadena de frío (4°C). Asegurarse que los tubos de sangre entera no estén en contacto directo con el frío/hielo para evitar la hemólisis.
- ❖ Enviar las muestras de sangre entera (EDTA) para BIOLOGIA MOLECULAR con o sin hielo.
- ❖ Enviar las muestras de sangre entera (EDTA) para la determinación de CD46 a temperatura ambiente.
- ❖ Informar a nuestro departamento las condiciones de procesamiento y de conservación de la muestra utilizadas (temperatura de centrifugación, conservada a 4°C o -20°C, otro dato relevante).



FORMULARIO MICROANGIOPATÍA TROMBÓTICA (PTT-SUHa)

PACIENTE

Apellido: _____ Nombre: _____
DNI: _____ Fecha de nacimiento: _____

ESTADO INICIAL

Embarazo: si ☐ no ☐ Nro. total: _____ Aborto: _____ Parto vaginal: _____ Cesárea: _____
Complicaciones embarazo: si ☐ no ☐ Cuales: _____
Presencia de otras enfermedades: _____

PRESENTACION DEL EPISODIO

SÍNTOMAS

Diarrea: si ☐ no ☐ c/sangre ☐ Manifestaciones gastrointestinales: si ☐ no ☐
Manifestaciones neurológicas: si ☐ no ☐ Otros: _____

DATOS DE LABORATORIO

Shiga toxina: _____ Hemoglobina: _____ Hematocrito: _____
Plaquetas: _____ Reticulocitos: _____ Esquitocitos: _____
LDH: _____ Creatinina: _____ Urea: _____
Bilirubina total: _____ Bilirubina fraccionada: _____
Prueba de Coombs directa: _____
Proteinuria: _____ Hematuria: _____
Descripción de alguna complicación ocurrida durante la admisión del paciente: _____

TRATAMIENTO

Diálisis: si ☐ no ☐ Trasplante: si ☐ no ☐ plan ☐
Transfusión: Plasma ☐ G.R. ☐ Plaquetas ☐ Inmunosupresores: si ☐ no ☐
Plasmaféresis: si ☐ no ☐ # sesiones: _____ Cortic: ☐ Ciclofos: ☐ Ciclospo: ☐ Ritux: ☐
Eculizumab: si ☐ no ☐ Otros: _____
Otra medicación: _____

ESTADO POST-EPISODIO

IRC: si ☐ no ☐ Plan de trasplante: si ☐ no ☐
Diálisis: si ☐ no ☐ Observaciones: _____
Medicación actual: _____



ACADEMIA NACIONAL DE MEDICINA
(BUENOS AIRES)
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES HEMATOLÓGICAS
"MARIANO R. CASTEX"

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Este es un formulario de consentimiento informado cuyo objetivo es entregar toda la información necesaria para que Ud. decida si desea o no participar en la investigación. El personal correspondiente hablará con usted acerca de esta información y usted es libre de hacer preguntas en cualquier momento. Si usted está de acuerdo en participar, se le pedirá que firme este formulario de consentimiento y se le dará una copia para que la guarde.

PARTE I. Información al paciente con respecto al estudio: "Rol relativo de las anomalías del complemento implicadas en las microangiopatías trombóticas y su impacto en el fenotipo clínico"

Investigador responsable del estudio: Dra Analía Sánchez-Luceros

1. Información general sobre el estudio

Las microangiopatías trombóticas (abreviado como MAT) son enfermedades raras causadas por la aparición de coágulos de sangre (también llamados trombos de plaquetas) en pequeños vasos sanguíneos y en la microvasculatura. La obstrucción de los vasos lleva a lesiones en los órganos afectados, lo cual puede provocar un infarto cardíaco, accidente cerebrovascular, disfunción renal, etc. Las MAT son enfermedades que amenazan la vida, por lo que un cuidado rápido del paciente es necesario. Las formas principales de MAT son la Púrpura Trombótica Trombocitopénica (PTT) y el Síndrome Urémico Hemolítico atípico (SUHa). La PTT se caracteriza por hemólisis microangiopática asociada a severa deficiencia de la actividad de ADAMTS13 (acrónimo por *A Disintegrin And Metalloproteinase with a ThromboSpondin type 1 motif, member 13*). La PTT adquirida, que representa casi el 90% de los casos de PTT en adultos, es debida al desarrollo de autoanticuerpos dirigidos a ADAMTS13. La PTT congénita resulta de mutaciones genéticas en ADAMTS13 y representa solo aproximadamente 5-10% de los casos.

Tanto PTT como el SUH son definidas por una concentración baja de glóbulos rojos (o anemia) y de plaquetas (o trombocitopenia), además del compromiso de órganos. La afectación renal aguda es típica del SUH, que se clasifica en típico y atípico. Las formas típicas, que constituyen un 90% de los casos, son secundarias a infección por microorganismos productores de Shiga toxina (Stx) (*Escherichia coli*, *Shigella*). El 10% restante está constituido por las formas atípicas (SUHa), una forma extremadamente rara de enfermedad (1 a 2 casos/millón/año). Consiste de una MAT causada por la desregulación de la activación de la vía alternativa del complemento. En la última década, la identificación de mutaciones en los genes de componentes de la vía del complemento ha sido clave en el entendimiento de los mecanismos de enfermedad. En la actualidad, como parte del diagnóstico de SUHa se recomienda el estudio funcional y la caracterización genética del complemento incluyendo la C3 convertasa (C3 y Factor B [CFB]) y sus reguladores (Factor H [CFH], Factor I [CFI], membrane protein cofactor [MCP] y trombosmodulina [THBD]). Se ha descrito activación del complemento como un factor patogénico que conduce a daño endotelial y trombosis microvascular, no sólo en SUHa sino también en PTT.

El estudio inicial indicado en las guías internacionales en PTT y en SUH atípico es el dosaje de la actividad de ADAMTS13 y la detección del inhibidor de ADAMTS13, tanto para confirmar el



ACADEMIA NACIONAL DE MEDICINA
(BUENOS AIRES)
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES HEMATOLÓGICAS
"MARIANO R. CASTEX"

diagnóstico de PTT, como para excluirla en el caso de que se esté considerando el diagnóstico de SUH atípico. Por este motivo su médico nos ha solicitado que realicemos esta determinación en una muestra de sangre suya.

2. Objetivos del estudio

El objetivo general será ampliar nuestra investigación con el desarrollo de estudios de complemento que ofrezcan medios para lograr un diagnóstico más apropiado para los pacientes con MAT, tanto PTT como SUHa. Se podrá establecer un registro institucional de los pacientes con MAT permitiendo caracterizar y describir a la población afectada por estas enfermedades. Un registro institucional podría facilitar la investigación y el desarrollo de ensayos clínicos proveyendo a los investigadores y médicos la información necesaria para elaborar recomendaciones y normas de cuidado.

3. Selección de los participantes del estudio

Usted fue invitado a participar en este estudio debido a ser diagnosticado con una forma de microangiopatía trombótica. Por este motivo, su médico tratante ha solicitado que realicemos la determinación de la actividad de ADAMTS13 y el inhibidor de ADAMTS13, como parte del estudio habitual de pacientes con PTT/SUH atípico. Miembros de su familia podrán también ser llamados a participar en el estudio. A diferencia de usted, ellos solo serán entrevistados y examinados una sola vez.

4. Participación voluntaria

Su participación en este estudio es voluntaria. Si usted se niega a participar en este estudio, no habrá ningún efecto negativo en la atención médica que recibe. Lo mismo sucede si usted retira su consentimiento para participar más adelante en el estudio. Ésa posibilidad queda abierta en cualquier momento. No necesita dar ninguna razón para retirar su consentimiento o abandonar el estudio.

5. Procedimientos del estudio

Su participación en el estudio implica la extracción de muestra de sangre (~10 mL) que será procesada en el Instituto de Investigaciones Hematológicas "Mariano R. Castex" de la Academia Nacional de Medicina para la medición de parámetros de ADAMTS13 (actividad y/o inhibidor); y para el estudio genético de ADAMTS13 y/o del complemento, en caso de que sean necesarios. Si usted experimenta un episodio de su enfermedad y, si fuese necesario, su doctor volverá a tomar una muestra de sangre por la cual se le pedirá una nueva autorización. El plan a largo plazo es documentar el curso de su enfermedad durante varios años y almacenar los datos en el registro.

6. Responsabilidades de los participantes en el estudio

Como participante en el estudio, usted tiene la obligación de adherirse al plan de estudio y a entregar a su médico la información exacta sobre el desarrollo de su enfermedad, cualquier tratamiento concomitante de otro doctor, cualquier medicamento que esté tomando (ya sea con receta médica o sin ella), y cualquier efecto secundario que experimente.



ACADEMIA NACIONAL DE MEDICINA
(BUENOS AIRES)
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES HEMATOLÓGICAS
"MARIANO R. CASTEX"

7. Beneficios para los participantes

La participación en este estudio le beneficiará en que, con el paso del tiempo, las recomendaciones basadas en la evidencia podrán estar disponibles con respecto a su tratamiento, a las medidas específicas en situaciones de riesgo, la profilaxis con plasma y otras sugerencias que surjan del estudio. Gracias a su participación en el estudio, los resultados también beneficiarán a otras personas afectadas por esta patología.

8. Riesgos y malestares

La única incomodidad por el hecho de participar en este estudio se asocia a las extracciones de sangre que de normal se realizarán una vez al año (y, en caso de miembro de la familia, sólo una vez en todo el estudio). La extracción de sangre no está exenta de dolor ya que se efectúa con aguja. Los problemas asociados con la extracción de sangre pueden incluir hematomas en el punto de punción, así como cabe la posibilidad de infección de dicho punto aunque sería extremadamente raro.

Las muestras de sangre son examinadas y posteriormente congeladas. Se mantendrán congeladas por la posibilidad de un examen posterior, incluyendo análisis genéticos, conectados con la investigación las microangiopatías trombóticas. Si su participación en el estudio finalizó, las muestras congeladas serán destruidas. Sin embargo, los datos e información recogidos hasta ese momento no serán borrados.

En la práctica de la medicina pueden presentarse complicaciones imprevistas que requieran tratamientos adicionales. Por ejemplo con transfusiones de derivados de la sangre que pueden producir reacciones colaterales y enfermedades infecciosas. Faculto a los profesionales y a sus colaboradores a administrarme anestesia, a realizar estudios, exámenes y demás prácticas que a su juicio consideren necesarias, incluyendo estudios serológicos para HIV, HCV, HBV, Chagas, VDRL y Huddleson.

9. Datos confidenciales

El manejo de la información médica obtenida durante la entrevista clínica en nuestro país es controlado (Ley de protección de datos, Ley N° 25.326). La información médica obtenida será transferida a la base de datos clínicos y procesada para permitir que los resultados sean analizados y publicados/reportados con propósitos científicos; en todos los casos siempre se hará manteniendo estricta confidencialidad. Los datos evaluados potencialmente para ser reportados no contendrán información sobre filiación (nombre, DNI, dirección, edad, etc).

10. Persona de contacto

Si hay algo que usted no tiene claro o si tiene alguna pregunta sobre el desarrollo del estudio, por favor, póngase en contacto con su médico tratante o bien con los jefes de investigación que se muestran a continuación.

Dra Analía Sánchez Luceros

Lugar de trabajo: Dto de Hemostasia y Trombosis, Instituto de Investigaciones Hematológicas Mariano R Castex, Academia Nacional de Medicina.

Tel: 4805 5759. Internos 251-281 Mail: trombosis@hematologia.anm.edu.ar



ACADEMIA NACIONAL DE MEDICINA
(BUENOS AIRES)
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES HEMATOLÓGICAS
"MARIANO R. CASTEX"

PARTE II. Formulario de consentimiento "Rol relativo de las anomalías del complemento implicadas en las microangiopatías trombóticas y su impacto en el fenotipo clínico"

Investigador Responsable: Dra Analía Sánchez Luceros

Lugar de trabajo: Dto de Hemostasia y Trombosis, Instituto de Investigaciones Hematológicas Mariano R. Castex, Academia Nacional de Medicina.

El doctor.....ha analizado conmigo las prácticas de diagnóstico y terapéutica que mi estado de salud requiere. Ese análisis ha sido realizado con la finalidad de asegurar que he tenido la oportunidad de recibir información que me permita otorgar un consentimiento razonado e informado respecto a las prácticas que se llevarán a cabo. El doctor me ha explicado las características y el valor de mi participación en el proyecto que se realiza en esta institución, precisando que:

1) He recibido la información para el paciente sobre dicho estudio, la he leído y entendido. Así mismo se me han contestado satisfactoriamente todas las preguntas en relación a la participación en el estudio que he formulado.

2) He tenido el suficiente tiempo para tomar la decisión de participar en este estudio voluntariamente. Recibiré una copia de la información del paciente así como una copia de la declaración de consentimiento informado.

3) He sido informado sobre las investigaciones científicas sobre los genes, proteínas, u otros factores, que van a ser parte del estudio en cuestión.

4) Como parte de este estudio, doy mi consentimiento para que la muestra de sangre que es tomada para el estudio pueda ser almacenada por un periodo de tiempo indeterminado, probablemente varios años, en el centro de estudios (Dto de Hemostasia y Trombosis, Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina) y pueda ser usada para investigaciones científicas adicionales. Estas investigaciones servirán para conocer mejor las deficiencias congénitas o adquiridas de ADAMTS13 y/o del complemento en el estudio de la PTT y del SUHa, y/o para mejorar el diagnóstico y tratamiento de futuros pacientes que tengan éstas o patologías similares.

5) En el caso de la eventual necesidad de una nueva extracción de sangre, se me explicarán los motivos y se me pedirá una nueva autorización.

6) Como parte de este estudio, doy mi consentimiento para que mis datos personales, tales como el nombre, fecha de nacimiento, género y datos médicos se recojan en relación con las MAT y se almacenen en el centro de estudios (Dto de Hemostasia y Trombosis, Instituto de Investigaciones Hematológicas Mariano R. Castex, Academia Nacional de Medicina).

7) En el caso de publicación (en revistas profesionales o congresos nacionales y internacionales), todos los datos serán anónimos y se codificarán de forma que mi identidad personal no pueda ser deducida.

8) La participación en este estudio me beneficiará en que, con el tiempo, las recomendaciones basadas en la evidencia estarán disponibles con respecto a mi tratamiento, a las medidas específicas en situaciones de riesgo, o en relación a una profilaxis con plasma.

9) Puedo retirar mi consentimiento de participación en cualquier momento sin dar ninguna razón y sin que comporte ningún impacto negativo sobre mí o los miembros de mi familia.

10) En el caso de que mi participación en el estudio finalice, las muestras de sangre que me hayan sido tomadas y todavía permanezcan almacenadas, serán destruidas. Sin embargo, los datos ya recogidos, no serán suprimidos.



ACADEMIA NACIONAL DE MEDICINA
(BUENOS AIRES)
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES HEMATOLÓGICAS
"MARIANO R. CASTEX"

11) Ni yo ni los miembros de mi familia incurrirán en ningún coste adicional por consentir con la participación en el estudio. Sin embargo, yo tampoco tengo derecho a una compensación económica.

12) El seguimiento clínico de mi condición será realizado por mi nefrólogo/pediatra/clínico/hematólogo de acuerdo a los planes de control habituales. Mi especialista recibirá los resultados de las investigaciones realizadas y las discutirá conmigo.

13) Dejo constancia que no se me han efectuado promesas o dado garantías respecto a los resultados que se obtengan, tengo claro que los mismos contribuirán a la obtención de nuevos conocimientos y los datos registrados no trascenderán más allá de los marcos de la investigación correspondiente.

Apellido y nombre del paciente

.....DNI.....

Firma del paciente.....

Si no firma el paciente por ser incapaz o ser menor de 21 años:

Apellido, nombre y vínculo con el paciente del firmante:

.....DNI.....

Firma del autorizante.....**Fecha**.....