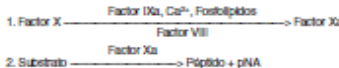


Aplicación

El reactivo Electrachrome FVIII está indicado para la determinación cromométrica de la actividad del FVIII en Plasma Humano,* (detección de deficiencias en dicho factor, seguimiento de pacientes sometidos a terapia de sustitución y para la determinación de actividad de FVIII en concentrados).

Principio

El FVIII es una proteína plasmática de alto peso molecular que actúa como cofactor del FIXa en la activación del FX en FIXa. Una deficiencia en el FVIII provoca una suave alteración hemostática, la Hemofilia A. El grado de la intensidad hemostática está inversamente relacionado con la concentración del FVIII. Los pacientes con Hemofilia A se clasifican en tres categorías en función de la actividad de su Factor VIII:
 < 0,01 UI/mL = severa,
 0,01-0,04 UI/mL = moderada y
 0,05-0,25 UI/mL = leve.
 En presencia de calcio y fibrinógeno, el FX es activado a FIXa por el FIXa. Esta activación está potenciada por el FVIII. El grado de activación y de liberación de calcio y fibrinógeno, el FX es activado a FIXa por el FIXa. Esta activación está potenciada por el FVIII. El grado de activación del FX está relacionada inversamente con la cantidad de FVIII. El sustrato cromométrico, liberándose un grupo cromométrico sintético, la pantoicarina (pH). El FXa generado, y la intensidad de color, es proporcional a la actividad del FVIII en la muestra. Un inhibidor sintético de la Trombina añadido al sustrato cromométrico evita la posible hidrólisis de éste por parte de la Trombina.^{1,2}

**Composición**

El **ELECTRACHROME Factor VIII** consta de:
[S] Cromógeno sustrato (Cat. No. 4973050310): 1 x 6 o 7 mL vial de sustrato cromométrico liofilizado S-2765, N-ac-2-D-Arg-Gly-Arg-pyMAWHCl (7,7 mg/mL) con inhibidor sintético de la Trombina I-25B1 (0,2 mg/mL) y mantil como estabilizante.
[E] Factor reagente (Cat. No. 4973050320): 2 x 3 o 3,5 mL viales de una preparación que contiene Factor IXa Bovino (0,5 UI/mL), Factor Xa (2,7 UI/mL) y la Trombina (1 NMI-UI/mL) liofilizado con CaCl₂ (40 µmoles/L) y Fostilipidos (0,2 µmoles/L).
[B] Buffer (Cat. No. 4973050330): 2 x 24 mL viales de un tampón Tris 0,025 mol/L (solución concentrada), pH 7,9, fuerza iónica 0,08 con Polietileno, NaCl y albúmina sérica bovina.

PRECAUCIÓN: Contiene material bovino. Todos los animales donantes provienen de rebaños libres de BSE. Se realizó un análisis de Inspección veterinaria pre y post mortem, y aparentemente, estaba libre de material infeccioso y contagioso. Sin embargo, este material deberá tratarse como potencialmente infeccioso.

Clase peligrosidad: ninguna.
Riesgo de infección: ninguna.
Riesgo de Seguridad: ninguna.

Este reactivo es para diagnóstico in vitro.

Preparación

Cromógeno sustrato: Dissolver el contenido del vial con 6 mL (Técnicas en microplacas y tubos de ensayo, ACL 8000900010000 y ACL Futura/ACL Advance) o 7 mL (Método ELECTRA) de agua destilada (tipo II de acuerdo a NCCLS).³ Correr el vial y homogeneizar suavemente. Asegurarse de la completa disolución del producto. Mantener el reactivo entre 15 y 25°C durante 10-30 minutos. Mezclar suavemente por inversión del vial antes de su uso.
Factor reagente: Dissolver el contenido de cada vial con 3 mL (Técnicas en microplacas y tubos de ensayo, ACL 8000900010000 y ACL Futura/ACL Advance) o 3,5 mL (Método ELECTRA) de agua destilada (tipo II de acuerdo a NCCLS).³ Correr el vial y homogeneizar suavemente. Asegurarse de la completa disolución del producto. Mantener el reactivo entre 15 y 25°C durante 10-30 minutos. Mezclar suavemente por inversión del vial antes de su uso.
Buffer: Solución concentrada. Diluir 1 volumen de solución concentrada con 9 volúmenes (Técnicas en microplacas y tubos de ensayo, ACL 8000900010000 y ACL Futura/ACL Advance) o con 7 volúmenes (Método ELECTRA) de agua destilada (tipo II de acuerdo a NCCLS).³ Nombrar como solución tampón de trabajo.

NOTA: Los reactivos de distintos lotes no son intercambiables.

Conservación y estabilidad de los reactivos

Los reactivos que no hayan sido abiertos son estables hasta la fecha de caducidad indicada en el vial si se mantienen a 2-8°C.

Sustrato Cromométrico: Estabilidad después de la reconstitución: 1 mes a 2-8°C en el vial original.

Reactivo Factor: Estabilidad después de la reconstitución: 12 horas a 2-8°C, 2 semanas a -30°C a 1 mes a -70°C en el vial original. Evitar congelar a -20°C.

Solución tampón de trabajo: Estabilidad después de su preparación: 1 mes a 2-8°C.

Para obtener una estabilidad óptima de los reactivos, sugéramos que acabado el trabajo, conserve los reactivos en su vial original almacenado en helado entre 2 y 8°C.

NOTA: Dissolver la solución de sustrato e presentar un color amarillo.

Calibración

Para cada lote nuevo de ELECTRACHROME Factor VIII se requiere una curva estándar. Para la preparación de los estándares, diluya el Plasma Referencia Normal con la Solución Tampón de Trabajo. Mezclar cada dilución por inversión antes de realizar la siguiente.

Para los niveles de FVIII inferiores a 0,05 UI/mL (pacientes de Hemofilia A), debe usarse el rango de calibración bajo.

NOTA: La dosificación debe efectuarse dentro de los 30 minutos que siguen la forma de muestra o la descongelación de las muestras de plasma.

a. Preparación de los estándares

Factor VIII UI/mL Plasma Calibrador Producción Solución tampón de trabajo (µL)

Rango Normal (µL)

1,00 25 0
 1,00 100 0
 0,50 200 0
 0,25 400 0

Rango Bajo (µL)

0,050 100 1500
 0,025 200 3000
 0,012 400 6000
 0,006 800 12000
 0 1600 24000

Dilución final

Factor VIII UI/mL Producción de Plasma Calibrador Solución tampón de trabajo (µL)

Rango Normal (µL)

1,42 25 2000
 1,00 100 2000
 0,50 200 2000
 0,25 400 2000

Rango Bajo (µL)

25 2000
 0,050 100 2000
 0,024 200 2000
 0,012 400 2000
 0,006 800 2000

Método de Ensayo

Técnicas en microplacas y tubos de ensayo

a. Dilución de las muestras y controles

Muestras/controles 25 µL
 Solución tampón de trabajo 200 µL
 Mezclar bien

b. Método de microplacas

Añadir en los pocillos de la microplaca:

Curva rango estándar

Muestras/controles/estándares diluidos

Mezclar e Incubar a 37°C durante 30 min

Factor Reactivo (precalentado a 37°C) 3,4 µL
 50 µL

Mezclar e Incubar a 37°C durante 2 minutos

Sustrato cromométrico (precalentado a 37°C) 4 minutos
 50 µL

A. Método óptico: leer A405 nm a 405 nm durante 30 - 120 segundos.

B. Método de punto final: procesar como se describe a continuación.

Mezclar e Incubar a 37°C durante 2 minutos

Activo ascítico 20% o ácido cítrico 2% 50 µL

Mezclar

Leer la absorbancia, utilizando solución tampón de trabajo como blanco, a 405 nm.

Si es posible, leer y restar la absorbancia a 490 nm con el fin de compensar las diferencias de material de los pocillos de las microplacas.

c. Método de tubos de ensayo

Utilizar 200 µL en lugar de 50 µL en todos los pasos de pipeteo.

d. Determinaciones/lot

Técnicas en microplacas: 120 Técnicas de tubos de ensayo: 30

e. Cálculos

Restar las actividades de blanco respectivas de los estándares de sus absorbancias (A) a 405 nm.

Trazar la curva del cambio de absorbancia por minuto (mAbs/min) o la absorbancia (A) de las soluciones patrón referidas a su concentración de factor VII en un papel milimetrado lineal. Indicar A405 nm en el eje Y y el factor VIII en el eje X. Conectar los puntos con el mejor ajuste de recta. Las muestras se valorarán de acuerdo con ésta curva estándar.

Curva estándar

A continuación se muestra un ejemplo de una curva estándar típica (método de microplacas).

1. Resultados

Normal range. End-point method in microplate

Low range. End-point method in microplate

Los valores de la Absorbancia por la curva estándar, deben mantenerse dentro de los siguientes límites:

Estándar Método de microplacas Absorbancia Método de tubos de ensayo Absorbancia

Rango Normal (0,1-5 UI/mL) Método de punto final Método de punto final

0,1 UI/mL <= 0,02 <= 0,02

0,5 UI/mL 0,16-0,32 0,33-0,63 0,38-0,74 0,58-1,11

Rango Bajo (0-0,05 UI/mL) <= 0,01 <= 0,01 <= 0,04 <= 0,07

0,05 UI/mL 0,02-0,05 0,17-0,44 0,04-0,11 0,29-0,76

II. Procedimiento de prueba -Método ELECTRA®

Preparación de los estándares y del los reactivos

1. Preparar el plasma de referencia y los controles tal como indica su fabricante. El instrumento realiza las diluciones de la curva automáticamente.

2. Posicionar los reactivos y plasma de referencia como se indica a continuación.

a. Valores del instrumento ELECTRA referidos por el usuario

Instrumento Método de muestra No de canales Tipo de reactivo No de botas Añ. de bomba Bomba I.R.E. Vol. reactivo (µL) Tipo de reagente de sustrato Posición PR1 Volumen muestra (µL)

E1800C 4 4 Sustrato 1 B Claro 75 Solución de Inhibidor A 50

E1800C Factor Reactivo 5 F Claro 75 Plasma B 50

E1800C 4 4 Sustrato 1 B Claro 75 Solución de Inhibidor A 50

E1800C Factor Reactivo 4 F Claro 75 Plasma B 50

NOTA: Referirse al manual del modelo específico del instrumento ELECTRA para seguir sus instrucciones.

Cálculos: Los valores del paciente se calculan automáticamente por comparación con la curva estándar. Los resultados de FVIII se indican en UI/mL.

b. Curva estándar ELECTRA

A continuación se muestra un ejemplo de una curva estándar típica (método ELECTRA).

Tipo de gráfico: Lineal (ln)

Tipo de curva: Lineal

Dilución de la muestra: 1:62

c. Determinaciones/lot en los sistemas ELECTRA

Factor VIII hasta 60
 III. Procedimiento de prueba -método en los Sistemas de Coagulación de IL

Para las instrucciones de las aplicaciones, contacte con su distribuidor local de IL.

a. Determinaciones/lot en los sistemas ACL 8000900010000

Factor VIII 110 tests (approx.)

b. Determinaciones/lot en los sistemas ACL Futura y ACL Advance

Factor VIII 120 tests (approx.)

Recolección y Preparación de las Muestras

Las muestras se coleccionan cuando el paciente está en reposo y relajado.

Recoger nuevo porción de sangre recién extraída por punción venosa y una parte de anticoagulante citrato trisódico.⁴

El plasma debe ser separado de las células tan pronto como sea posible y se debe guardar en un refrigerador antes de los 30 minutos.

Si el test no se puede realizar inmediatamente, congelar el plasma a -20°C durante una semana como máximo o añadir un año a -70°C. Las muestras no deben almacenarse en un congelador de autoservicio, ni deben descongelarse y recongelarse antes de la realización del análisis. Si es necesario al transportar, congelar el plasma con hielo seco. Para la recolección, manipulación y conservación de la muestra seguir las recomendaciones del Documento H21-A3 de la NCCLS.⁵

NOTA: Debe tenerse en cuenta que pueden producirse pérdidas de hasta un 20% de la actividad del FVIII durante la congelación y descongelación, especialmente si el plasma se congela lentamente.

Materiales requeridos pero no suministrados

Los siguientes productos no se suministran con el kit y deberán pedirse por separado:

1. Plasma Referencia Normal (ELECTRA) o equivalente. Use números de lote diferentes para el control y curva estándar.
2. Plasma de Calibración (Sistemas de Coagulación L).
3. Plasma Referencia Anormal (ELECTRA) o equivalente.
4. Control Normal (Sistemas de Coagulación L), código 0030003120 / 0030003110.
5. Controles adecuados calibrados respecto a un Estándar Internacional para el FVIII (Sistemas de Coagulación L).
6. Ácido ascítico 20% o ácido cítrico 2% (método del punto final).
7. Agente de Limpieza (ACL 8000900010000), código 0006831700.
8. Espectrofotómetro a 405 nm (y 490 nm con los procedimientos con microplacas).
9. Microplacas* de semi-micro cubetas (1 cm).
10. Corchillos, 2000 x 9.
11. Dispositivo de calibración, 37°C ± 0,2°C.
12. Pipetas calibradas con una exactitud mínima del 1%.
13. Tubos de ensayo de plástico.
14. Agitador.
15. Cronómetro.
16. Agitador vórtice.
17. Papel milimetrado lineal.

*Nota: no utilizar microplacas para recubrimiento.

Control de Calidad

Se recomienda el uso de los controles de plasma normales y anormales de IL para realizar un completo programa de Control de Calidad. Se deberán usar plasma de control apropiados con valores conocidos para el Factor VIII en el margen de la curva estándar. Tanto el Control Normal (Sistemas de Coagulación L) y el Plasma Referencia Normal y Anormal (ELECTRA) están diseñados específicamente para estos propósitos. Cada laboratorio debe establecer su propia media y desviación estándar, así mismo establecer un programa de Control de Calidad para monitorizar los resultados de su laboratorio. Los controles deben ser usados como mínimo una vez dentro del turno de 8 horas, de acuerdo a la normativa de Buenas Prácticas de Laboratorio. Referirse al Manual del Operador para instrucciones adicionales, consultar la publicación Westgard y col. para una identificación y resolución de situaciones anormales del Control de Calidad.¹¹

Resultados

Los resultados de FVIII se indican en UI/mL. 1,0 UI/mL de FVIII equivale al 100% de FVIII. Referirse al Manual del Operador para información adicional.

Limitaciones/interferencias

Los resultados del Factor VIII no se modifican con niveles de heparina hasta 1 UI/mL.

No se ha informado ninguna interferencia farmacológica.

No existe interferencia en los Sistemas ACL Futura/ACL Advance hasta los valores siguientes:

	Hemoglobina	Tiglicéridos	Bilirrubina
Rango Normal y Rango Alto	275 mg/dL	923 mg/dL	30 mg/dL
Rango Bajo	27 mg/dL	400 mg/dL	8 mg/dL

Valores esperados

Se ha realizado un estudio del rango de normalidad utilizando el kit ELECTRACHROME Factor VIII.

Método de microplacas 61 50-200 actividad % (H=28, M=35; edad comprendida entre 21 y 55 años)

Debido a las variaciones que puedan afectar los resultados, cada laboratorio debe establecer su propio rango de normalidad.

Características técnicas

Principio: Lineales datos muestran el coeficiente de variación (%CV) a tres niveles de actividad de Factor VIII determinados con el método de microplacas. Cada laboratorio debe establecer sus propios datos de precisión.

Método de microplacas Media Factor VIII serie a serie día a día CV % n=42 CV % n=7

Concentración 1,0 UI/mL 2,4% 5,9%

0,25 UI/mL 2,8% 5,9%

0,05 UI/mL 3,0% 3,9%

En estudio adicional de precisión intraserial y total (serie a serie y día a día) del reactivo ELECTRACHROME Factor VIII, se obtuvieron los siguientes datos:

ACL 8000900010000

Método Factor VIII (UI/mL) 0,00 0,39 0,77 1,15

CV (%) 5,15 6,06 6,57 4,57

ACL Futura/ACL Advance

Método (UI/mL) 0,00 0,39 0,77 1,15

CV (%) 5,15 6,06 6,57 4,57

Rango Alto 1,07 1,73 3,07

Rango Normal 0,99 1,62 3,32

Rango Normal 0,42 3,59 5,41

Rango Bajo 0,26 2,51 2,88

Rango Bajo 0,01 2,84 4,55

ELECTRA

Método (UI/mL) 0,80 2,72 2,68

CV (%) 2,15 2,15 2,43

Plasma Referencia Normal

Plasma Referencia Anormal

Los tests muestran una gran correlación con el Coatest Factor FVIII.

ELECTRACHROME FVIII (Método de tubos de ensayo)

ELECTRACHROME FVIII (Método de tubos de ensayo)

ELECTRACHROME FVIII (Método de microplacas)

ELECTRACHROME FVIII (Método de microplacas)

ELECTRACHROME FVIII (ACL 100-7000)

ELECTRACHROME FVIII (ELECTRA MIA 900)

ELECTRACHROME FVIII (ELECTRA MIA 900)

UI/mL FVIII (ELECTRACHROME) = -0,06 + 1,08 x UI/mL FVIII (Coatest)

UI/mL FVIII (ELECTRACHROME) = -0,06 + 1,08 x UI/mL FVIII (Coatest)

En un estudio clínico adicional se han comparado los resultados obtenidos con el test ELECTRACHROME Factor VIII entre ACL 8000 y ELECTRA 1400C. El coeficiente de correlación obtenido fue de 0,96.

UI/mL FVIII (ACL 8000) = -2,36 + 1,14 x UI/mL FVIII (ELECTRA 1400C)

En un estudio clínico adicional se han comparado los resultados obtenidos con el test ELECTRACHROME Factor VIII en ACL Futura versus el test Factor VIII con reactivo APPT-SP. El coeficiente de correlación obtenido fue de 0,99.

UI/mL FVIII (ACL Futura) = -0,26 + 1,08 x UI/mL FVIII (IL Test FVIII con reactivo APPT-SP)

Estos resultados de precisión y correlación se obtuvieron utilizando lotes específicos de reactivos y controles.

Linealidad

La curva estándar se lineal entre el rango normal 0,05-1,5 UI/mL y en el rango bajo entre 0,005-0,05 UI/mL (método en microplacas y tubos de ensayo).

La curva estándar se lineal entre el rango normal 0,10-1,2 UI/mL y en el rango bajo entre 0,00-0,10 UI/mL (ACL 8000900010000).

La curva estándar de rango alto se lineal entre el 0,38-3,82 UI/mL, entre el rango normal 0,06-1,5 UI/mL y en el rango bajo entre 0,011-0,136 UI/mL (ACL Futura/ACL Advance).

La curva estándar se lineal entre el rango 0,10-1,2 UI/mL (ELECTRA).

Sensibilidad:

Método de microplacas Rango Alto Rango Normal Rango Bajo

(mAbs/min por 1 UI/mL de actividad FVIII)

ACL Futura/ACL Advance 0,035 0,035 0,306

(mAbs/min por 1 UI/mL de actividad FVIII)

Límite de detección:

Sistemas Rango Alto Rango Normal Rango Bajo

Método de microplacas N/A 0,05 0,005

y de tubos de ensayo UI/mL

ACL Futura/ACL Advance UI/mL 0,09 0,09 0,005