

Aplicación

Inmunoensayo automatizado para la determinación cuantitativa de la actividad del Factor von Willebrand (FVW Actividad) en plasma humano citratado por turbidimetría de partículas de látex, en los Sistemas de Coagulación de IL.

Principio

El diagnóstico de la enfermedad de von Willebrand (EVW), probablemente el más común de los desórdenes hemorrágicos congénitos, requiere un número elevado de pruebas especiales de laboratorio. La medida y comparación de los niveles en plasma de Factor von Willebrand Antigénico (FVW:Ag), FVW Actividad y Factor VIII (FVIII), ayuda en la diferenciación de deficiencias cuantitativas de FVW (tipo 1 o tipo 3) o cualitativas (tipo 2) y por tanto en el diagnóstico de los diferentes tipos de la EVW.^{1,2}

Cuando el nivel obtenido de FVW:Ag es extremadamente bajo o indetectable, puede esperarse una EVW del tipo 3. Si el nivel obtenido es moderado o incluso normal, se deberán realizar los ensayos de FVW Actividad y FVIII y compararlos con el resultado de FVW:Ag. Si los tres valores se encuentran dentro del rango de normalidad, podrá adquirirse la EVW y la Hemofilia A.

Si al menos uno de ellos está por debajo de la normalidad, será necesario calcular las relaciones FVW Actividad/FVW:Ag y FVIII/FVW:Ag. Si ambas relaciones están cerca de 1 (algunos autores sugieren 0,7 como valor umbral), puede ser diagnosticada una EVW del tipo 1.^{1,2}

Cuando la relación FVW Actividad/FVW:Ag es baja (0,7 es también el valor umbral sugerido), podrán diagnosticarse los tipos 2A, 2B, o 2M. Estos subtipos se caracterizan por un patrón de multímeros anómalo y/o una afinidad por las plaquetas alterada.^{1,2} Para poder distinguir los diferentes subtipos, se necesitarán otras pruebas complementarias tales como el RIPA (aglutinación plaquetar inducida ristocetina), el análisis multímero y los ensayos de unión.² Cuando la relación FVIII/FVW:Ag es baja (0,7 es también el valor umbral sugerido), podrá diagnosticarse un tipo 2N o una Hemofilia A y para poder diferenciarlas se necesitará la prueba de la capacidad de unión al FVIII.

El ensayo FVW Actividad es una inmunturbidimetría amplificada con partículas de látex que permite cuantificar la actividad del FVW en plasma. La actividad del FVW se determina midiendo el incremento de turbidez debido a la aglutinación del reactivo látex. Un monoclonal anti-FVW unido al reactivo látex, dirigido específicamente contra el lugar de unión de las plaquetas en el FVW (receptor de la Glicoproteína IIb), reacciona con el FVW presente en el plasma del paciente. El grado de aglutinación es directamente proporcional a la actividad del FVW en la muestra y se determina midiendo el desvanecimiento de la luz transmitida causado por los agregados.

Composición

El kit von Willebrand Factor Activity consiste en:

- [R] Latex Reagent** (Núm. Cat. 0020004710): 2 viales de 4,5 mL de una suspensión liofilizada de partículas de látex de poliestireno a las que se les ha unido un anticuerpo monoclonal de ratón purificado, específico contra un epítopo funcional del FVW. Contiene albúmina de suero bovino, estabilizantes y conservantes.
- [B] Buffer** (Núm. Cat. 0020004720): 2 viales de 4,5 mL de tampón Tris que contiene albúmina de suero bovino, estabilizantes y conservantes.

MEDIDAS DE PRECAUCIÓN Y ADVERTENCIAS:

Indicaciones de peligro: **ninguna**

Frases de riesgo: **ninguna**

Frases de seguridad: **ninguna**

El tampón contiene menos de un 0,1% de azida sódica, que puede reaccionar con las tuberías metálicas dando lugar a azidas altamente explosivas. Tomar las precauciones adecuadas para su desecho.

Este producto es para diagnóstico *in vitro*.

Preparación

Buffer: El reactivo está listo para su uso.

Latex Reagent: Reconstituir cada vial de reactivo látex añadiéndole todo el contenido de un vial de tampón. Tapar el vial y homogeneizar suavemente un mínimo de 20 segundos. Asegurarse de la completa disolución del producto. Debe aparecer como una suspensión homogénea y ligeramente lechosa. Mantener el reactivo entre 15-25°C durante 30 minutos. Mezclar por inversión del vial antes de su uso. No agitar.

Nota: Evitar la formación de espuma al homogeneizar los reactivos reconstituidos. Las burbujas en la superficie del líquido pueden interferir con los sensores de nivel de líquido de los instrumentos.

Conservación y estabilidad de los reactivos

Los viales que no hayan sido abiertos y se hayan conservado a 2-8°C son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.

Latex Reagent - Estabilidad una vez reconstituido: 1 mes a 2-8°C en el vial original, 3 días a 15°C en los Sistemas ACL* ELITE/ELITE PRO/9/10000, 1 día a 15°C en los Sistemas ACL Futura/ACL Advance o 5 días a 15°C en el ACL TOP™. No congelar. Para una óptima estabilidad, sacar los reactivos de los instrumentos y conservarlos a 2-8°C en sus viales originales bien tapados.

Método de ensayo

Las Instrucciones completas del ensayo se encuentran en el correspondiente Manual del Usuario del Instrumento y/o en el Manual de Aplicaciones.

Recolección y preparación de las muestras

Recoger nueva porción de sangre recién extraída por punción venosa sobre una parte de anticoagulante citrato trisódico. Para la recolección, manejo y conservación del plasma seguir las recomendaciones del Documento H21-A4 de la CLSI.³

Los plasmas congelados deben descongelarse rápidamente a 37°C y agitarse bien antes de su análisis. Se debe realizar el ensayo de los mismos antes de transcurridas 2 horas de su descongelación.

Reactivos y plasmas de control adicionales

Los siguientes materiales no se suministran con el kit y deberán pedirse por separado.

	América y Área del Pacífico	Europa
	Núm. Cat.	Núm. Cat.
Plasma de calibración	0020003700	0020003700
Control Normal	0020003120/0020003110	0020003110
Control de Técnicas Especiales Nivel 1	0020010100	0020010100
Diluyente de factores	0009757600	0009757600

Control de Calidad

Para realizar un programa completo de control de calidad, se recomienda el uso de dos niveles de control, normal y patológico.⁴ El Control Normal y el Control de Técnicas Especiales Nivel 1 cumplen con los requisitos del programa. Cada laboratorio debe establecer su propia media y desviación estándar, y debe realizar un programa de control de calidad para monitorizar sus resultados. Los controles deben ser analizados como mínimo una vez por cada turno de 8 horas, de acuerdo con la normativa de Buenas Prácticas del Laboratorio. El Manual del Usuario contiene información adicional. Consultar la publicación de Westgard et al para la identificación y resolución de situaciones anormales del control de calidad.⁵

Resultados

Los resultados de FVW Actividad se informan en % de normalidad. Consultar el Manual del Usuario para información adicional. Para establecer un diagnóstico, los resultados del análisis deben ser usados conjuntamente con el resto de información, incluyendo el contexto clínico.

Limitaciones/Interferencias

Concentraciones de bilirrubina hasta 3,8 mg/dL y de lípidos hasta 265 mg/dL no afectan los resultados de FVW Actividad en los ACL ELITE/ELITE PRO/9/10000.

Concentraciones de bilirrubina hasta 3,6 mg/dL y de lípidos hasta 929 mg/dL no afectan los resultados de FVW Actividad en los ACL Futura/ACL Advance. La presencia de factor reumatoide en la muestra puede producir resultados falsamente positivos.

No se deben usar muestras turbias o hemolizadas.

Concentraciones de hemoglobina hasta 70 mg/dL, de bilirrubina hasta 4,2 mg/dL, de triglicéridos hasta 1020 mg/dL y de factor reumatoide hasta 200 UI/ml no afectan los resultados de FVW Actividad en el ACL TOP.

- Las muestras de pacientes que han recibido preparados de anticuerpos monoclonales con fines diagnósticos o terapéuticos pueden contener anticuerpos humanos anti-ratón (HAMA). La presencia de HAMA puede causar una sobreevaluación de los resultados en inmunoensayos que utilicen anticuerpos monoclonales de ratón. El HemosIL von Willebrand Factor Activity Buffer contiene un agente bloqueante de los HAMA para minimizar su interferencia en los resultados del análisis.
- La presencia de niveles elevados de anticuerpos humanos anti-IgG bovina (HABIA) en algunos pacientes puede dar lugar a una sobreevaluación de los resultados.⁶

Por tanto, para establecer el diagnóstico, los resultados de este ensayo deben ser usados conjuntamente con el resto de información, incluyendo el contexto clínico. No utilizar este ensayo como la única base para la toma de decisiones terapéuticas.

Valores esperados

Se ha realizado un estudio del rango de normalidad utilizando el kit FVW Actividad.

Grupo Sanguíneo ^a	N	ACL ELITE/ELITE PRO/9/10000	N	ACL Futura/ACL Advance
O	122	38,0 - 125,2 (% VWF Actividad)	120	40,8 - 138,8 (% VWF Actividad)
A + B + AB	126	40,2 - 180,7 (% VWF Actividad)	123	58,1 - 175,5 (% VWF Actividad)

En otro estudio realizado utilizando 266 muestras individuales de donantes de banco de sangre, se obtuvieron los siguientes resultados:

Grupo Sanguíneo ^a	N	ACL TOP
O	132	40,3 - 125,0 (% VWF Actividad)
A + B + AB	134	48,8 - 183,4 (% VWF Actividad)

Nota: El FVW es un agente de fase aguda cuya concentración en plasma puede verse afectada en situaciones como el estrés, el embarazo y otras, por lo que se aconseja

repetir el análisis con otra muestra extraída otro día distinto.¹

Los rangos han sido calculados tal como recomienda la Federación Internacional de Química Clínica (IFCC).⁷ Estos resultados se han obtenido utilizando un lote específico de reactivo. Debido a las muchas variables que pueden afectar a los resultados, cada laboratorio debe establecer su propio rango de normalidad de FVW Actividad.

Características técnicas

Precisión:

El estudio de precisión intraserial y total (serie a serie y día a día) fue realizado en diferentes series.

ACL ELITE/ELITE PRO/9/10000	Media (% VWF Actividad)	CV% (IntraSerie)	CV% (Total)
Normal Control	79,6	2,7	4,9
Control de Técnicas Especiales Nivel 1	49,8	4,6	9,0
Control de Técnicas Especiales Nivel 2	27,7	7,5	8,7

ACL Futura/ACL Advance	Media (% VWF Actividad)	CV% (IntraSerie)	CV% (Total)
Normal Control	92,1	4,1	5,6
Control de Técnicas Especiales Nivel 1	64,1	4,8	6,5
Control de Técnicas Especiales Nivel 2	36,6	6,5	8,3

ACL TOP	Media (% VWF Actividad)	CV% (IntraSerie)	CV% (Total)
Normal Control	102,4	2,6	3,4
Control de Técnicas Especiales Nivel 1	68,4	3,5	6,3
Control de Técnicas Especiales Nivel 2	30,3	6,5	8,0

Correlación:

Sistema	Pendiente	Intersección	r	Método de referencia
ACL ELITE/ELITE PRO/9/10000	0,832	4,782	0,972	FVW Actividad EIA
ACL Futura/ACL Advance	0,954	3,854	0,968	FVW Actividad EIA
ACL TOP	0,988	2,288	0,995	FVW Actividad en ACL Advance

En un estudio clínico adicional (n=114) en el que se comparó el kit VWF Activity en el ACL 9000 con el ensayo automatizado de la actividad del FVW como cofactor de la ristocetina (FVW:RCo) en un coagulómetro óptico, se obtuvo una r de 0,950 y una pendiente de 0,841.

La precisión y los datos de correlación se han obtenido usando lotes específicos de reactivos y de controles.

Límite de detección:

Sistema	Test Regular (% VWF Actividad)	Test Reun (% VWF Actividad)
ACL ELITE/ELITE PRO/9/10000	12	-
ACL Futura/ACL Advance	1,3	-
ACL TOP	3,2	-

Linealidad:

Sistema	Test Regular (% VWF Actividad)	Test Reun (% VWF Actividad)
ACL ELITE/ELITE PRO/9/10000	21 - 200	-
ACL Futura/ACL Advance	10 - 120	40 - 240
ACL TOP	10 - 130	57 - 390

Si se excede el rango de linealidad (Test Reun), las muestras deben diluirse manualmente 1:4 con el Diluyente de factores (100 µL de muestra + 300 µL de Diluyente de factores) en los ACL ELITE/ELITE PRO/9/10000 y en los ACL Futura/ACL Advance o 1:10 con el Diluyente de factores (50 µL de muestra + 450 µL de Diluyente de factores) en el ACL TOP y reanalizarse. Los resultados obtenidos deben multiplicarse por el factor de dilución 4 o 10.

El ensayo no presenta efecto de prozona hasta 700% en los ACL ELITE/ELITE PRO/9/10000, hasta 350% en los ACL Futura/ACL Advance o hasta 1000% en el ACL TOP.