

TEMAS TRATADOS

- ✓ Ensayos de la actividad de fijación plaquetaria de FVW- Nitty S. Mathews
- ✓ Von Willebrand Antígeno - Tulasi Geevar
- ✓ Ensayo de fijación al colágeno del factor von Willebrand
- ✓ Tulasi Geevar
- ✓ Ensayo de fijación al factor VIII - Tulasi Geevar
- ✓ Von Willebrand Factor Multimers - Annette Bowyer
- ✓ Interpretación de las pruebas de von Willebrand - Tulasi Geevar
- ✓ Variables preanalíticas en el diagnóstico de la EVW - Tulasi Geevar
- ✓ Pruebas en el repertorio para el diagnóstico de la EVW - Tulasi Geevar
- ✓ Diagnóstico de la enfermedad de von Willebrand en un entorno de escasos recursos - Tulasi Geevar

Ensayos de la actividad de fijación plaquetaria del FVW (ensayos de actividad del FVW): Con todas las Guías que utilizan la relación FVW:RCo/antígeno del FVW para determinar si el paciente tiene una EVW de tipo 1 (cuantitativa) o de tipo 2 (cualitativa), el papel de la actividad de fijación al FVW:glicoproteína Ib (GPIb) es de suma importancia en la clasificación de la EVW. Un panel multidisciplinario de guías establecido por la Sociedad Americana de Hematología (ASH, por sus siglas en inglés), la Fundación Nacional de Hemofilia (NHF, ahora la Fundación Nacional de Trastornos Hemorrágicos, NBDF, por sus siglas en inglés) y la FMH, sugiere realizar ensayos más nuevos que midan la actividad de fijación plaquetaria del FVW (por ejemplo, FVW:GP1bM y FVW:GP1bR) en comparación con el ensayo convencional de cofactor de ristocetina del FVW (FVW:RCo) [Recomendación 4] (James et al, 2021). El panel consideró que había beneficios moderados de los ensayos más nuevos, lo que refleja el menor CV y la mayor reproducibilidad en comparación con el FVW:RCo. El ensayo FVW:GP1bR requiere que se añada ristocetina y, por lo tanto, puede estar sujeto a los mismos problemas que el ensayo FVW:RCo con respecto a los polimorfismos de fijación a ristocetina. Sin embargo, utiliza un fragmento recombinante de GP1b en lugar de plaquetas. Por el contrario, el ensayo FVW:GPIbM utiliza una molécula GPIba recombinante que contiene varias mutaciones de ganancia de función; en consecuencia, esta variante GP1b se une al dominio A1 del FVW incluso en ausencia de ristocetina (Laffan et al, 2014). En un estudio de EEC (evaluación externa de la calidad) de 2022 del programa de pruebas de aptitud del FVW del Colegio Americano de Patólogos (Salazar et al, 2022), el CV general para el FVW:RCo osciló entre el 14,6 % y el 23,5 % para los resultados en muestras normales y entre el 24,3 % y el 44,8 % para los resultados en muestras con baja actividad. Los CV fueron menores para el FVW:GP1bM y el FVW:Ab, oscilando entre el 8,0% y el 34,8%, incluyendo muestras normales y anormales. Un estudio en el que se compararon diferentes ensayos de actividad de fijación al FVW:GP1b reportó de que la sensibilidad y la especificidad para diferenciar la EVW de tipo 1 y de tipo 2, en función de las proporciones actividad/antígeno utilizando un punto de corte de 0,7, fueron del 92 % y del 72,4 % para el FVW:RCo, del 84 % y del 89,7 % para la GP1bR, y del 92 % y 85,1 % para la GP1 bM (Vangenechten et al, 2018).

Tabla 23. Resumen de los ensayos de actividad de FVW automatizados disponibles en el mercado

Actividad FVW- Nomenclatura ISTH	Principio	Ensayos	Método de detección
FVW:RCo	Agregación de plaquetas liofilizadas inducida por ristocetina	1 . Reactivo Siemens BC von Willebrand (Siemens, Marburgo, Alemania) 2. STA-FVW:Rco (Diagnostica Stago, Francia)	Aglutinación de plaquetas liofilizadas
FVW:GP1bR	Fijación de FVW inducida por ristocetina a un fragmento de GPIb recombinante	Actividad del cofactor de ristocetina HemosIL FVW Actividad del cofactor de ristocetina HemosIL AcuStar FVW (Laboratorio de Instrumentación, Bedford, MA, EE. UU.)	Aglutinación de perlas de látex 2. Quimioluminiscencia
FVW:GP1bM	Fijación de FVW a un fragmento de GPIb mutante de ganancia de función sin ristocetina	Siemens Innovance FVW Ac (Siemens, Marburgo, Alemania)	Aglutinación de perlas de látex
FVW:Ab	Fijación de un anticuerpo monoclonal a un epítipo de dominio A1 del FVW (sitio de fijación de plaquetas)	Actividad del FVW con HemosIL (Laboratorio de Instrumentación, Bedford, MA, EE. UU.)	Aglutinación de perlas de látex

Descargo de responsabilidad general: Los kits/protocolos de reactivos que se enumeran a continuación han sido validados en uno o más analizadores de coagulación por el fabricante para optimizar el rendimiento del producto y cumplir con sus especificaciones. Es posible que no se admitan las modificaciones definidas por el usuario, ya que pueden afectar el rendimiento del sistema y los resultados del ensayo. Es responsabilidad del usuario validar las modificaciones de estas instrucciones o el uso de los reactivos en analizadores distintos de los incluidos en las Hojas de Aplicación o las Instrucciones de Uso del fabricante específico.

Ensayos de actividad automatizados del FVW:

Ensayo de cofactor de ristocetina del FVW (FVW:RCo): Se realizan diluciones de un patrón (cuyo valor de cofactor de ristocetina se conoce) y se mezclan con plaquetas liofilizadas, por lo que se agrega una cantidad conocida de cofactor a las plaquetas. A continuación, se mide la agregación inducida por ristocetina y se dibuja una curva estándar. Las muestras de prueba se tratan de manera similar y el valor del cofactor de ristocetina se calcula a partir del gráfico estándar. Muestra primaria: plasma citrado.

Reactivos:

- ✓ Plaquetas fijas liofilizadas (BC von Willebrand Reagent⁵, Siemens Healthcare Diagnostics, Marburgo, Alemania)
- ✓ Solución salina normal
- ✓ Plasma de calibración
- ✓ Plasma del paciente y plasmas de control (control normal [p. ej., plasma de control N] y un control anormal de bajo nivel [p. ej., plasma de control P])
- ✓ Reactivo de ristocetina (p. ej., Revohem, 25 mg/ml; reconstituir con 0,625 ml de agua destilada y mezclar bien)
- ✓ Agua destilada

Preparación de reactivos:

- ✓ Reconstituya el reactivo de Von Willebrand con 4 ml de agua destilada primero y diluya con 7 ml de solución salina. Verifique el recuento de plaquetas, debe ser de -2,000,000 a 2,050,000 / cumm. Añadir 50,0 µl de reactivo de ristocetina por 950 µl de plaquetas.
- ✓ Reconstituya el plasma del calibrador con exactamente 1 ml de agua destilada. Deje reposar el material reconstituido a temperatura ambiente (18-25 °C) durante 30 minutos. Luego, agite el vial suavemente antes de usarlo. El material es estable durante 8 horas a 15-25°C. Se puede congelar y almacenar a -80 °C o menos.
- ✓ Plasma de control anormal (plasma de control P). Reconstituya el plasma de control P con exactamente 1 ml de agua destilada o desionizada. Agitar con cuidado para que se disuelva sin formación de espuma y dejar reposar a temperatura ambiente (18-25°C) durante 15 minutos. Antes de usar, agitar de nuevo con cuidado.
- ✓ Control normal (plasma de control N). Reconstituya el plasma de control N con exactamente 1 ml de agua destilada o desionizada. Agitar con cuidado para que se disuelva sin que se forme espuma y dejar reposar a temperatura ambiente (18-25°C) durante 30 minutos. Antes de usar, agitar de nuevo con cuidado.

Procedimiento:

- ✓ Los reactivos necesarios (plaquetas liofilizadas con ristocetina), solución salina normal y calibrador, se cargan en el analizador de coagulación.
- ✓ Se corre la curva estándar.
- ✓ Una vez completada la calibración, se debe revisar y validar la curva de calibración. La curva validada es la curva de calibración utilizada para la determinación del resultado.
- ✓ Corra la muestra de prueba.

Protocolo de control de calidad:

Corra el control normal (control de plasma N) y el control anormal de bajo nivel (control de plasma P).

Nota: Los controles y el plasma del calibrador deben comprarse por separado.

Posibles interferencias:

- ✓ Las plaquetas no se diluyen correctamente.
- ✓ Cambio en la concentración de ristocetina.

Interpretación de los resultados:

Los resultados se reportan en %.

Valores esperados (evaluados en el sistema BCS; Siemens, Marburgo, Alemania):

Grupo sanguíneo	% de normalidad
Todos (n = 185)	58-172
O	49-142
A+B+AB	66-183

Ensayo FVW:GPIbR (HemosIL® AcuStar, FVW Ristocetina Cofactor Activity⁶; Laboratorio de Instrumentación, MA, EE. UU.): Este ensayo es un inmunoensayo de dos pasos que cuantifica la actividad de FVW:RCo en plasma humano citratado utilizando partículas magnéticas como fase sólida y un sistema de detección quimioluminiscente. En el primer paso, la muestra se mezcla con la solución amortiguadora del ensayo

que contiene ristocetina y partículas magnéticas recubiertas con un fragmento recombinante de receptor plaquetario de glicoproteína de FVW (rGPIba) por medio de un anticuerpo monoclonal específico que orienta el fragmento de GPIba de la manera adecuada para interactuar con el FVW de la muestra del paciente en presencia de ristocetina. El FVW presente en la muestra se une a las partículas magnéticas proporcionalmente a su actividad como cofactor de ristocetina. Después de la separación magnética y el lavado, se añade un anticuerpo monoclonal anti-FVW marcado con isoluminol y se incuba en un segundo paso. Después de una nueva separación magnética y lavado, se agregan dos inductores y la reacción quimioluminiscente resultante se mide como unidades de luz relativa (RLU) mediante el sistema óptico ACL AcuStar. Esto es proporcional a la concentración de actividad de FVW:RCo en la muestra.

Muestra primaria: Plasma citrado.

Reactivos (composición del kit):

- ✓ Cartucho FVW:RCo para 25 determinaciones

Cada cartucho contiene 1 vial de suspensión de partículas magnéticas recubierta con un rGPIba por medio de un anticuerpo monoclonal de ratón específico, 1 vial de solución amortiguadora del ensayo que contiene sulfato de ristocetina, 1 vial de un trazador que contiene un anticuerpo monoclonal de ratón anti-FVW marcado con isoluminol y 1 vial de diluyente de muestra. Los reactivos se encuentran en una solución amortiguadora de citrato o HEPES que contiene BSA, IgG de ratón, estabilizantes y conservantes.

- ✓ Calibrador del FVW: RCo 1: Solución salina HEPES que contiene BSA, IgG de ratón, estabilizantes y conservantes.
- ✓ Calibrador del FVW:RCo 2: Plasma humano liofilizado que contiene solución amortiguadora, estabilizantes y conservantes.

Preparación/procedimiento:

- ✓ Invierta suavemente el cartucho 30 veces evitando la formación de espuma.
- ✓ Después de la resuspensión completa de las micropartículas, coloque el cartucho sobre una superficie sólida y retire suavemente la lengüeta de envío del cartucho.
- ✓ Presione las dos lengüetas en los lados de la tapa perforadora (color gris) y aplique presión en la parte superior del cartucho hasta que se bloquee.
- ✓ Una vez que el cartucho esté firme, cárguelo en el instrumento.
- ✓ Los viales diluidos del calibrador se transfieren a los respectivos tubos de plástico con código de barras y se cargan en el analizador (ACL AcuStar).
- ✓ Se corre la curva estándar.
- ✓ Una vez completada la calibración, se debe revisar y validar la curva de calibración. La curva validada es la curva de calibración utilizada para la determinación del resultado.
- ✓ Corra la muestra de prueba.

Control de calidad:

- ✓ Se recomiendan dos controles de nivel (se compran por separado).
- ✓ Cada laboratorio debe establecer su propia media y desviación estándar.

Trazabilidad de calibradores y controles:

Los valores reportados se determinaron en múltiples corridas en el sistema ACL AcuStar utilizando lotes específicos de reactivos y contra un estándar interno de la casa, que se ha asignado al valor contra el material de referencia internacional actual para FVW y FVIII.

Resultados:

Los resultados de FVW:RCo se reportan en %, lo que equivale a UI/dl.

Tabla 24. Valores esperados según FVW:RCo

Tipo ABO en sangre	Número de muestras analizadas	HemosIL AcuStar FVW:RCo (FVW:GP1bR)
Todos	287	45.6 – 176.3 %
O	163	43.8 – 161.5 %
A+B+AB	124	53.8 – 210.8 %

Nota: Se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios rangos normales de FVW:RCo en función de la población atendida y de la técnica, el método y el equipo utilizados. Linealidad: 0.5-200.0%. Límite de detección: 0,17%.

Ensayo FVW:GP1bM (Innovance® FVW Ac; Siemens Healthcare Diagnostics, Marburgo, Alemania): El principio de ensayo hace uso de la fijación del FVW a su receptor GP1b. Las partículas de poliestireno están recubiertas con un anticuerpo contra GP1b. Se añade GP1b recombinante (se incluyen dos mutaciones de ganancia de función) y se une al anticuerpo, así como al FVW de la muestra. Debido a las mutaciones de ganancia de función, la fijación del FVW a GP1b no requiere ristocetina. Esta fijación de FVW induce la aglutinación de partículas, que puede medirse como un aumento de la extinción mediante mediciones turbidimétricas.

Muestra primaria: plasma citrado.

Tabla 25. Reactivos (composición del kit) Innovance® FVW Ac

Innovación® FVW Ac	Ingredientes	Concentración	Fuente
REACTIVO I	Solución amortiguadora, sacarosa, partículas de poliestireno recubiertas con anticuerpos monoclonales anti-GP1b, anfotericina B, gentamicina	2.2 g/l	Ratón
REACTIVO II	Solución salina tamponada, reactivo bloqueante heterofílico, detergente, polivinilpirrolidona, azida sódica	<1 g/l	
REACTIVO III	Solución salina tamponada, GP1b recombinante, anfotericina B, gentamicina	≤80 mg/l	

Preparación/procedimiento:

- ✓ Los reactivos (RI, RII y RIII), la solución amortiguadora de imidazol y el calibrador se cargan en el analizador.
- ✓ Se corre la curva estándar.
- ✓ Una vez completada la calibración, se debe revisar y validar la curva de calibración. La curva validada es la curva de calibración utilizada para la determinación del resultado.
- ✓ Corra la muestra de prueba.

Calibración: Se genera una curva estándar mediante la determinación automática de diferentes diluciones de plasma humano estándar y solución amortiguadora Veronal de Owren. La curva estándar debe regenerarse si hay un cambio en el instrumento o en el lote de Innovance® FVW Ac utilizado, o si los resultados del control están fuera del rango aceptable. La calibración del ensayo se realiza con plasma humano estándar que se calibra con respecto al valor FVW:RCo del estándar internacional para la coagulación sanguínea FVIII y FVW en plasma.

Las muestras inicialmente por encima del rango de calibración son diluidas por el instrumento, lo que da como resultado un rango de medición de hasta el 600% de lo normal.

Control de calidad:

- ✓ Los controles (dos niveles) deben compararse por separado
- ✓ Rango normal: Plasma de control N
- ✓ Rango patológico: P plasmático de control

Resultados:

- ✓ Los resultados se reportan como % de normalidad
- ✓ 100% = 1 IU/ml

Valores esperados: Las muestras de plasma fresco obtenidas de donantes aparentemente sanos se analizaron utilizando el ensayo Innovance® del FVW Ac en el sistema BCS/® BCS® XP con resultados (percentil 2,5 a 97,5) como se muestra en la Tabla 26.

Tabla 26. Valores esperados para el ensayo Innovance® FVW Ac

Grupo sanguíneo	Número de muestras analizadas	% de normalidad
All	263	47.8–173.2
O	129	46.3–145.6
A+B+AB	134	61.4–179.1

Nota: Se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios rangos normales de FVW:RCo en función de la población atendida y de la técnica, el método y el equipo utilizados.

Linealidad: 4 a 150%

Límite de detección: 2,2%

FVW:Ensayo Ab (HemosIL®FVW Activity, Instrumentation Laboratory, Bedford, MA, EE. UU.): El kit de actividad FVW es un ensayo inmunturbidimétrico mejorado con partículas de látex para cuantificar la actividad de FVW en plasma. La actividad del FVW se determina midiendo el aumento de la turbidez producida por la aglutinación del reactivo de látex. Un anticuerpo monoclonal anti-FVW específico adsorbido en el reactivo de látex, dirigido contra el sitio de fijación plaquetaria del FVW (receptor GPIIb), reacciona con el FVW del plasma del paciente. El grado de aglutinación es directamente proporcional a la actividad del FVW en la muestra y se determina midiendo la disminución de la luz transmitida causada por los agregados.

Muestra primaria: plasma citrado.

Reactivos (composición del kit):

- ✓ Reactivo de Látex: Suspensión liofilizada de partículas de látex de poliestireno recubiertas con anticuerpo anti-FVW monoclonal de ratón purificado dirigido contra un epítipo funcional del FVW, que contiene albúmina sérica bovina, estabilizantes y conservantes.
- ✓ Solución amortiguadora: solución amortiguadora de Tris que contiene albúmina sérica bovina, estabilizantes y conservantes.

Preparación:

- ✓ Solución amortiguadora: Lista para usar
- ✓ Reactivo de látex: Disuelva el contenido de cada vial vertiendo todo el contenido de un vial de solución amortiguadora en un vial de reactivo de látex. Vuelva a colocar el tapón y revuelva suavemente durante un mínimo de 20 segundos para disolver completamente el látex liofilizado. Asegúrese de que el producto se reconstruya completamente. Debe aparecer como

una suspensión homogénea y ligeramente lechosa. Mantenga el reactivo a 15-25 °C durante 30 minutos e inviértalo para mezclar antes de usarlo. No agitar. Nota: Evite la formación de espuma al homogeneizar los reactivos reconstituidos. Las burbujas en la parte superior de los líquidos pueden interferir con los sensores de líquidos del instrumento.

Control de calidad: Se recomienda la calibración de controles de plasma, normales y anormales (que se compran por separado) para un programa de control de calidad completo. El Control Normal y el Control de Prueba Especial Nivel 1 están diseñados para este programa. Cada laboratorio debe establecer su propia media y desviación estándar.

Resultados: Los resultados de la actividad del FVW se reportan en % de normalidad.

Tabla 27. Valores esperados para Ensayo FVW: Ab HemosL®Actividad FVW

Grupo sanguíneo	Número de muestras analizadas	% de actividad de FVW
O	132	40.3–125.9
A+B+AB	134	48.8–163.4

Nota: Debido a muchas variables, que pueden afectar los resultados, cada laboratorio debe establecer su propio rango normal para la actividad de FVW.

- ✓ Linealidad: 19-130%
- ✓ Límite de detección: 3,2%

Antígeno de Von Willebrand (FVW:Ag): El ensayo antígeno del FVW es un ensayo cuantitativo que mide la cantidad total de proteína FVW presente en la muestra, que incluye formas funcionales y disfuncionales. Los niveles de antígeno del FVW se pueden cuantificar mediante métodos inmunológicos que incluyen ELISA, inmunoensayo de látex automatizado (LIA) y, más recientemente, inmunoensayo quimioluminiscente (CLIA). Los ensayos del antígeno del FVW suelen ser muy fiables y reproducibles. El límite inferior de detección varía entre ensayos, con el LIA tendiendo a tener un poco más alto y los ensayos CLIA tienen el límite más bajo de detección. El antígeno del FVW es una prueba esencial en el diagnóstico de la EVW, pero es limitada, ya que solo evalúa la presencia de FVW y no su función. Usado solo, el antígeno del FVW solo puede identificar el tipo 3 de EVW donde hay niveles indetectables del antígeno del FVW, generalmente menos de 3 UI/dl. De acuerdo con las Guías de la Sociedad Británica de Hematología (BSH) y de la Organización de Médicos del Centro de Hemofilia del Reino Unido (UKHCDO), el diagnóstico de la EVW tipo 3 requiere un ensayo de antígeno del FVW capaz de medir niveles de hasta <1 UI/dl. Se requieren ensayos funcionales o de actividad adicionales del FVW con el cálculo de las proporciones entre la actividad del FVW y los ensayos de antígeno para el diagnóstico y la diferenciación de la EVW de tipo 1 y tipo 2. El rango normal del valor de antígeno del FVW varía con cada laboratorio, pero generalmente se acepta que está entre 50 y 200 UI/dl. Los niveles inferiores a 50 UI/dl se consideran bajos, aunque esto debe correlacionarse con los antecedentes hemorrágicos y otras pruebas de actividad del FVW para el diagnóstico de la EVW. Es bien sabido que las personas con el tipo de sangre O exhiben una disminución del 25% en los niveles de FVW en comparación con las personas sin grupo sanguíneo O y, por lo tanto, tienen más probabilidades de ser diagnosticadas con EVW tipo 1. Sin embargo, el fenotipo hemorrágico de las personas con EVW es similar independientemente del grupo sanguíneo. Por lo tanto, no se requieren rangos de referencia específicos de ABO. A continuación, se enumera el protocolo para el ensayo ELISA antígeno del FVW mediante ELISA, LIA y CLIA.

Antígeno de Von Willebrand (FVW:Ag) por ELISA: Ensayo ELISA para la determinación cuantitativa del antígeno FVW (FVW:Ag) en plasma humano citratado. Un pocillo de microtitulación está recubierto con un anticuerpo (anticuerpo de captura) específico para el FVW. Se añaden e incuban diluciones de plasma estándar y de prueba, tiempo durante el cual el FVW se une al anticuerpo de captura en la placa. Después del lavado, se añade un segundo anticuerpo anti-FVW marcado con enzima (anticuerpo de detección) que se une al FVW unido a la placa. La cantidad de anticuerpo unido y, por lo tanto, de FVW presente

en la muestra, se cuantifica mediante la adición de sustrato enzimático seguido del desarrollo del color. Muestra primaria: 3,2% de sangre citratada.

Materiales y reactivos:

- ✓ Placa de microtitulación
- ✓ Anticuerpo de captura/recubrimiento: conejo policlonal anti-FVW humano (Dako, código n.º 0082)
- ✓ Detección/anticuerpo marcado: conejo policlonal anti-FVW/HRP (Dako, código n.º 0226)
- ✓ Solución amortiguadora de recubrimiento de bicarbonato
- ✓ Solución amortiguadora para dilución
- ✓ Solución amortiguadora para lavado
- ✓ Solución amortiguadora de sustrato
- ✓ Sustrato: Dihidrocloruro de O-fenilendiamina (OPD) (Sigma P8287)
- ✓ 1,5 M H₂SO₄
- ✓ Calibrador: PNP o plasma comercial estándar
- ✓ PPP citrado del paciente
- ✓ Plasma de control normal y anormal
- ✓ 30% de peróxido de hidrógeno
- ✓ Lavadora y lector de placas ELISA
- ✓ Pipetas y puntas
- ✓ Baño maría a 37°C
- ✓ Selladores de placas
- ✓ Mezclador de vórtice

Preparación de reactivos:

Solución amortiguadora de recubrimiento de bicarbonato:

- a. Carbonato de sodio (Na₂CO₃): 0,16 g
- b. Bicarbonato de sodio (NaHCO₃): 0,294 g
- c. Disolver en agua destilada y hacer hasta 100 ml. Ajuste el pH a 9.6.
- d. Añadir aproximadamente 100 µl de tinte rojo. La vida útil es de 2-3 semanas.

Solución amortiguadora madre concentrada:

- a. Ortofosfato de dihidrógeno sódico (NaH₂PO₄·2H₂O): 0,975 g
- b. Ortofosfato de hidrógeno disódico (Na₂HPO₄·12H₂O): 6,7 g
- c. Cloruro de sodio (NaCl): 70,55 g

Disolver en agua destilada, mezclar bien usando un agitador magnético en un matraz cónico de fondo plano y finalmente llenar hasta alcanzar 250 ml.

Solución amortiguadora para lavado: Diluir la solución amortiguadora de material concentrado 1:10 (es decir, 100 ml de solución amortiguadora de material concentrado por 900 ml de agua destilada). Añadir 2 ml de Tween 20. Mezclar bien y almacenar a 4°C. La vida útil es de 2 semanas.

Solución amortiguadora etiquetada y dilución: Disuelva 3 gramos de PEG en 100 ml de solución amortiguadora para lavado con alto contenido de sal. Agrega 100 µl de tinte verde. La vida útil es de 2 semanas.

Solución amortiguadora de sustrato: Disuelva 0,73 g de ácido cítrico y 2,4 g de ortofosfato de hidrógeno disódico en agua destilada y componga el volumen hasta 100 ml. Ajuste el pH a 5,0. La vida útil es de 2 meses.

Ácido sulfúrico 1,5 M: Añadir 16,5 ml de ácido sulfúrico concentrado a 180 ml de agua. Siempre agregue ácido al agua.

Procedimiento:

Recubrimiento de placas: Las placas deben recubrirse el día antes de que se requieran. Las placas se pueden recubrir durante 16-96 horas antes de su uso. Diluir el anticuerpo de recubrimiento 1:1000 en solución amortiguadora COAT, es decir, 12 µl en 12 ml de solución amortiguadora COAT. Mezclar suavemente y añadir 100 µl a cada pocillo. Selle con una tapa de plástico e incube a 40 ° C durante la noche.

Procedimientos de ensayo: Prepare las diluciones para la curva estándar como se muestra a continuación:

- ✓ Para hacer la solución madre: Diluir 50 µl del plasma normal combinado en 3,95 ml de solución amortiguadora para dilución (1,80). Prepare una serie de estándares a partir de esta solución madre como se muestra a continuación:
 - a. Solución madre 125% (S1)
 - b. 0,8 ml de solución madre + 0,2 ml de solución amortiguadora 100% (S2)
 - c. 0,6 ml de solución madre + 0,4 ml de solución amortiguadora 75% (S3)
 - d. 0,4 ml de solución madre + 0,6 ml de solución amortiguadora 50% (S4)
 - e. 0,2 ml de solución madre + 0,8 ml de solución amortiguadora 25% (S5)
 - f. 0,1 ml de solución madre + 0,9 ml de solución amortiguadora 12,5% (S6)
 - g. 0,05% de solución madre + 0,95 ml de solución amortiguadora 6,25% (S7)
 - h. 1,00 ml de Solución amortiguadora blanco
- ✓ Diluir las muestras de paciente y control en 2 diluciones, 1:100 y 1:200, en solución amortiguadora para dilución (es decir, 10 µl en 990 µl y 500 µl de 1:100 diluido + 500 µl de solución amortiguadora).
- ✓ Lavar tres veces con una solución amortiguadora para lavado utilizando el lavador de placas, dejando remojar por tres minutos entre cada lavado. Después de la aspiración final, elimine el exceso de líquido y verifique que no haya burbujas.
- ✓ Agregue 100 µl de los estándares, pruebas y blancos, por duplicado, a los pocillos de la placa recubierta utilizando el siguiente formato:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S1	S1	T1	T1	T5	T5	T9	T9	T13	T13	T17	T17
B	S2	S2	T1	T1	T5	T5	T9	T9	T13	T13	T17	T17
C	S3	S3	T2	T2	T6	T6	T10	T10	T14	T14	T18	T18
D	S4	S4	T2	T2	T6	T6	T10	T10	T14	T14	T18	T18
E	S5	S5	T3	T3	T7	T7	T11	T11	T15	T15	Q1	Q1
F	S6	S6	T3	T3	T7	T7	T11	T11	T15	T15	Q1	Q1
G	S7	S7	T4	T4	T8	T8	T12	T12	T16	T16	Q2	Q2
H	BK	BK	T4	T4	T8	T8	T12	T12	T16	T16	Q2	Q2

S1-S7-Diluciones del patrón; T -Plasma de prueba; BK - Blanco

- ✓ Cubra con sellador de placas. Incube durante 1 hora en un baño maría a 37°C.
- ✓ Lave tres veces con solución amortiguadora para lavado usando el lavador de placas, dejando en remojo tres minutos entre cada lavado. Después de la aspiración final, retire el exceso de líquido y verifique que no haya burbujas.
- ✓ Detección de FVW diluido/anticuerpo etiquetado 1:4000 (es decir, 5 µl en 20 ml de solución amortiguadora etiquetada).

- ✓ Mezclar suavemente y añadir 100 µl de anticuerpo tag diluido a cada pocillo. Cubra con sellador de placas. Incubar durante 1 hora en un baño maría a 37°C.
- ✓ Lavar tres veces con la solución amortiguadora para lavado con el lavador de placas, dejando un remojo de tres minutos entre cada lavado. Después de la aspiración final, retire el exceso de líquido y verifique que no haya burbujas.
- ✓ Durante el lavado, prepare la solución de sustrato de la siguiente manera: Disuelva un comprimido de OPD de 10 mg en 15 ml de solución amortiguadora de sustrato. Lleve la solución preparada a temperatura ambiente. Justo antes de usar, agregue 7 µl de peróxido de hidrógeno al 30%.
- ✓ Usando un cronómetro, agregue 100 µl de solución de sustrato a cada pocillo. Incubar durante 8-10 minutos en el banco.
- ✓ Detenga la reacción añadiendo 100 µl de H₂SO₄ 1,5 M a cada pocillo EXACTAMENTE en el mismo intervalo de tiempo en que se añadió el sustrato. Agite el plato para mezclar.
- ✓ Seleccione el programa apropiado (492 nm) en el lector de placas de Lab Systems y trace la curva de calibración utilizando papel cuadrulado lineal. Las placas deben leerse dentro de los 30 minutos posteriores a su finalización. Si hay un retraso, guarde los platos en un armario oscuro hasta por 4 horas.
- ✓ Para calcular los resultados: lea la dilución 1:100 directamente de la calibración, multiplique 1:200 por dos y promedie los resultados. Incluya solo los resultados que se encuentren dentro de la curva estándar.

Protocolo de control de calidad: Corra el control normal y el control anormal (nivel bajo) junto con cada lote. Si está disponible, incluya una muestra de EVW tipo 3 como control.

Interpretación de los resultados: Los resultados se reportan como % o UI/dl.

Antígeno de Von Willebrand por LIA: El LIA automatizado se utiliza para la determinación cuantitativa del antígeno del FVW en plasma humano citrato. Este es el método más utilizado para estimar los niveles del antígeno del FVW. El kit automatizado antígeno del FVW es un ensayo inmunturbidométrico mejorado con partículas de látex para cuantificar el antígeno del FVW en plasma. Cuando un plasma que contiene antígeno del FVW se mezcla con el reactivo de látex y la solución amortiguadora de reacción incluidos en el kit, las partículas de látex recubiertas se aglutinan. El grado de aglutinación es directamente proporcional a la concentración de antígeno del FVW en la muestra y se determina midiendo la disminución de la luz transmitida causada por los agregados. Hay varios kits de ensayo antígeno del FVW basados en LIA disponibles en el mercado. El protocolo a continuación es para el kit HemosIL antígeno del FVW de *Instrumentation Laboratories*, pero también se pueden usar otros ensayos. La inclusión de este método no es una aprobación del producto de una empresa en particular. Si utiliza una fuente comercial diferente, es importante seguir las instrucciones del fabricante.

Reactivos y materiales:

- ✓ Reactivo de látex: 2 viales x 3 ml de una suspensión de partículas de látex de poliestireno recubiertas con un anticuerpo policlonal de conejo dirigido contra el FVW que contiene albúmina sérica bovina, solución amortiguadora, estabilizador y conservante
- ✓ Solución amortiguadora de reacción: 2 viales x 4 ml de solución amortiguadora HEPES que contiene albúmina sérica bovina, estabilizantes y conservante
- ✓ Diluyente de factor (solución amortiguadora de imidazol)
- ✓ Calibrador de plasma (11 calibradores de plasma)
- ✓ PPP citrado del paciente
- ✓ Plasma de control normal y anormal (nivel bajo)
- ✓ Agua destilada para la reconstitución de reactivos

Preparación de los reactivos, almacenamiento y estabilidad de los mismos:

- ✓ Reconstituya el plasma del calibrador con exactamente 1 ml de agua destilada. Deje reposar el material reconstituido a temperatura ambiente (18-25 °C) durante 30 minutos. Luego, agite el vial suavemente antes de usarlo. La preparación es estable durante 8 horas a 15-25°C. Se puede congelar y almacenar a -80 °C o menos.
- ✓ Plasma de control anormal (Dade P): Reconstituya el control P con exactamente 1 ml de agua destilada o desionizada. Agitar con cuidado para que se disuelva sin formación de espuma y dejar reposar a temperatura ambiente (18-25°C) durante 15 minutos. Antes de usar, agitar de nuevo con cuidado.
- ✓ Control normal/plasma normal combinado: Mantenga el PNP a 37 °C en baño maría durante 5 minutos, mezcle suavemente antes de usar.
- ✓ Reactivo de látex: Añadir 2 ml de solución amortiguadora de reacción y mezclar bien sin burbujas de aire. Una vez abierto, es estable durante 3 meses a 2-8°C en el vial original o 1 semana a 15°C en la ACL Family Top. No congelar.
- ✓ Solución amortiguadora de reacción: Una vez abierto, es estable durante 3 meses a 2-8°C en el vial original o 1 semana a 15°C en la ACL Family Top. No congelar.

Detalles de calibración: Cargue los reactivos adecuados (látex FWW:Ag, solución amortiguadora FWW:Ag, calibrador y diluyente de factor) en el analizador automatizado. Seleccione el programa de calibración y córralo. Una vez completada la calibración, revise los resultados. Si no hay errores/fallos y la calibración es aceptable, valide la curva de calibración. La calibración se realiza cuando hay un cambio en los números de lote de los reactivos o en los componentes principales del instrumento, según los requisitos reglamentarios locales o a discreción del laboratorio.

Protocolo de control de calidad: Corra al menos dos niveles de control (control normal y control anormal) junto con cada corrida. Cada laboratorio debe establecer su propia media y desviación estándar y establecer un programa de control de calidad.

Procedimiento: Seleccione el programa apropiado en el instrumento y conserve los reactivos necesarios (látex FWW:Ag, solución amortiguadora antígeno del FWW y diluyente de factor). Cargue las muestras y córralas según las instrucciones del fabricante.

Resultados: Los resultados se reportan en % o UI/dl.

Rango normal:

- ✓ Grupo sanguíneo O: 42,0-140,8 UI/dl
- ✓ Grupos sanguíneos A, B y AB: 66,1-176,3 UI/dl

Límite de detección:

- ✓ ACL Family: 3.5 UI/dl
- ✓ ACL Top Family/ACL Top Family 5 series: 2,2 UI/dl

Linealidad:

- ✓ ACL Family: 10-150 UI/dl
- ✓ ACL Top Family/ACL Top Family 5 series: 8,5-250 UI/dl
- ✓ Si se excede el rango lineal, las muestras deben diluirse 1:4 con diluyente de factor (100 µl de muestra + 300 µl de diluyente). Si es necesario, se puede realizar una dilución adicional de hasta 1:16. Multiplique los resultados por el factor de dilución respectivo.

Antígeno de Von Willebrand automatizado por CLIA: El CLIA automatizado se utiliza para la determinación cuantitativa de antígeno del FVW en plasma humano citratado. El ensayo antígeno del FVWCLIA es un inmunoensayo de dos pasos para cuantificar antígeno del FVW en plasma citrato humano utilizando perlas magnéticas como fase sólida y un sistema de detección quimioluminiscente. En el primer paso, la muestra se mezcla con partículas magnéticas recubiertas de anticuerpos policlonales anti-FVW y solución amortiguadora del ensayo. El FVW presente en la muestra se une a las partículas magnéticas recubiertas anti-FVW. En el segundo paso, después de la separación magnética y el lavado, se añade un anticuerpo policlonal anti-FVW marcado con isoluminol. La reacción quimioluminiscente se mide como unidades de luz reactiva, que son directamente proporcionales a la concentración de antígeno del FVW en la muestra. Los estudios a partir de datos de AEC han demostrado que el método antígeno del FVW CLIA tiene el CV más bajo y el límite de detección más bajo. Actualmente, el antígeno del FVW por el método CLIA solo es ofrecido por HemosIL Acustar antígeno del FVW y solo se puede correr en el instrumento ACL Acustar.

Composición de los reactivos:

El kit antígeno del FVW se compone de:

- a. Cartucho antígeno del FVW para 25 determinaciones: Cada cartucho contiene 1 vial de suspensión de partículas magnéticas liofilizadas recubierta con un anticuerpo policlonal anti-FVW de conejo, 1 vial de solución amortiguadora del ensayo, 1 vial de trazador compuesto por un anticuerpo policlonal anti-FVW de conejo marcado con isoluminol y 1 vial de diluyente de muestra. Los reactivos se encuentran en una solución amortiguadora de fosfato que contiene albúmina sérica bovina, IgG policlonal de conejo, estabilizantes y conservantes.
- b. Calibrador del antígeno del FVW1: Contiene solución salina con conservantes.
- c. Calibrador del antígeno del FVW2: 2 viales de plasma humano liofilizado que contiene solución amortiguadora, estabilizantes y conservante

Preparación y procedimiento:

FVW: Cartucho del Ag: La primera vez que se use el cartucho, invierta suavemente el cartucho 30 veces evitando la formación de espuma y verifique la resuspensión completa del vial de micropartículas. Si las micropartículas no están totalmente suspendidas, continúe invirtiendo el cartucho hasta que se vuelva a suspender por completo. Siga las instrucciones suministradas para abrir el cartucho y cargarlo en el sistema ACL AcuStar.

Calibrador del antígeno del FVW1: Es líquido y debe mezclarse mediante una inversión suave varias veces antes de su uso para asegurar la homogeneidad del calibrador.

Calibrador del antígeno del FVW2: Disuelva el contenido del vial con 1 ml de agua tipo reactivo de laboratorio clínico (CLR) o equivalente. Vuelva a colocar el tapón y gírelo suavemente. Asegúrese de la reconstitución completa del producto. Mantenga el calibrador a 15-25 °C durante 30 minutos e inviértalo suavemente para mezclar antes de usarlo. No agitar. Una vez reconstituido, vierta todo el contenido del vial del calibrador en el tubo de plástico vacío con código de barras debidamente etiquetado para su uso en el sistema ACL AcuStar.

Almacenamiento y estabilidad de reactivos:

Los reactivos y calibradores sin abrir son estables hasta la fecha de caducidad que se muestra en las etiquetas de los cartuchos y viales cuando se almacenan a 2-8 °C.

Cartucho del antígeno del FVW: La estabilidad después de la apertura a 2-8 °C a bordo del ACL AcuStar es de 8 semanas. Los cartuchos abiertos deben permanecer a bordo del ACL Acustar.

Calibrador del antígeno del FVW1 & 2: La estabilidad después de la apertura y/o reconstitución a bordo del ACL AcuStar es de 4 horas. Para una estabilidad óptima, retire los calibradores del sistema y guárdelos a 2-8 °C en tubos de plástico con código de barras tapados.

Protocolo de control de calidad: Corra al menos dos niveles de control (control normal y control anormal) junto con cada corrida. Cada laboratorio debe establecer su propia media y desviación estándar y establecer un programa de control de calidad.

Procedimiento: Seleccione el programa apropiado en el instrumento y conserve los reactivos requeridos. Cargue las muestras y córralas según las instrucciones del fabricante.

Resultados: Los resultados se reportan en % o UI/dl.

Rango normal:

Todos los grupos sanguíneos: 52,2-177,9 UI/dl

Grupo sanguíneo O: 48,2-157,2 UI/dl

Grupos sanguíneos A, B y AB: 59,6-210,5 UI/dl

Límite de detección:

ACL AcuStar: 0,13 UI/dl

Linealidad:

ACL Family: 0,3-400 UI/dl

Cuando se activa la capacidad de repetición del instrumento, el instrumento realiza una dilución automática y corrige el resultado final del factor de dilución (20x), ampliando así el rango de 8000 UI/dl. El ensayo no se ve afectado por el efecto de la prozona.

Ensayo de fijación al colágeno del factor de von Willebrand (FVW:CB): El FVW es una proteína plasmática con múltiples funciones y actividades. El FVW actúa como un puente adhesivo entre las plaquetas y la pared de los vasos. Se une a las plaquetas, principalmente a través del receptor GPIIb que utiliza su dominio AI, y al colágeno subendotelial, principalmente a través del dominio A3, lo que provoca la adhesión plaquetaria. La capacidad de fijación plaquetaria del FVW puede evaluarse mediante el ensayo de cofactor de ristocetina (FVW:RCo) u otros ensayos de fijación al GPIIb más recientes, y es el ensayo de actividad del FVW más utilizado. Sin embargo, FVW:RCo y FVW:CB evalúan diferentes funciones de FVW. FVW:CB se basa en la capacidad de FVW para adherirse al colágeno y depende de la presencia de multímeros de alto peso molecular (HMW) y un sitio de fijación al colágeno intacto. El colágeno tiene baja afinidad por los dominios de fijación de FVW individuales y requiere un FVW multimérico grande para una asociación estrecha con el colágeno. Esta propiedad de FVW:CB se utiliza para detectar la pérdida de multímeros HMW, que puede diferenciar entre el tipo 2A/2B (pérdida de multímero HMW) y el tipo 2M (distribución normal de multímeros). Las recientes Guías sobre la EVW de 2021 sugieren el uso del análisis de multímeros o del FVW:CB para diferenciar el tipo 2M del tipo 2A/2B de la EVW. FVW:CB se realiza más comúnmente utilizando un método basado en ELISA. En el mercado existen varios ensayos ELISA comerciales. Se debe tener cuidado al elegir el ensayo optimizado para detectar preferentemente HMW FVW. Más recientemente, también se puede realizar en el analizador automatizado, Acustar, que utiliza un CLIA. El ensayo Acustar FVW:CB es un inmunoensayo de dos pasos, en el que las partículas magnéticas actúan como fase sólida y están recubiertas con péptido helicoidal triple de colágeno tipo III. El FVW presente en la muestra se une a las partículas magnéticas en proporción a su capacidad de fijación al colágeno, que se mide mediante un sistema de detección quimioluminiscente.

A continuación, describimos un método interno basado en ELISA para FVW:CB: Este ensayo prueba la capacidad del FVW derivado del plasma del paciente para unirse al colágeno que ha sido previamente recubierto en placas de microtitulación de 96 pocillos. El FVW adsorbido al colágeno inmovilizado se detecta mediante un anticuerpo policlonal marcado con enzima y la posterior reacción del sustrato, que se monitoriza fotométricamente con un lector ELISA. Lo mejor es utilizar una mezcla de -95% de colágeno tipo I (mala fijación al FVW) y -5% de colágeno tipo III (buena fijación al FVW) para obtener una buena selectividad para el FVW de alto peso molecular (HMW). Alternativamente, también se puede utilizar una concentración más baja de colágeno tipo III (1-5 ug/ml). FVW reducido: Los niveles de CBA estarán presentes en individuos con defectos cuantitativos o cualitativos. Dado que este ensayo por sí solo no permitirá la clasificación de la EVW, es importante que este ensayo funcional se realice junto con el ensayo del antígeno del FVW y el FVW:RCo.

Muestra primaria: Sangre citratada.

Materiales y reactivos:

- ✓ Colágeno con una mezcla de -95% de colágeno tipo I/~5% de colágeno tipo III (Horm Collagen, ICN collagen)
- ✓ Solución amortiguadora para dilución y solución amortiguadora para lavado (PBS con Tween 20)
- ✓ Solución amortiguadora de sustrato: 0,1 M de acetato de sodio/solución amortiguadora de ácido cítrico
- ✓ 30% peróxido de hidrógeno H₂O₂
- ✓ Antígeno policlonal conjugado con HRP de conejo anti-FVW humano (Dako)
- ✓ Placas de microtitulación EIA de 96 pocillos
- ✓ PPP citado por paciente, PNP y plasmas de control anormales
- ✓ 2 M H₂SO₄
- ✓ Sustrato: diclorhidrato de O-fenilendiamina (OPD)

Preparación de reactivos:

PBS (pH 7,4) con Tween 20:

- a. Cloruro de sodio (NaCl): 8,0 g
- b. Cloruro de potasio (KCl): 0,20 g
- c. Ortofosfato de hidrógeno disódico (Na₂HPO₄·12H₂O): 2,90 g
- d. Dihidrógeno fosfato de potasio (KH₂PO₄·H₂O): 0,20 g
- e. Haga hasta 1.0 l y ajuste el pH a 7.4. Añadir 500 µl de Tween 20.

Solución amortiguadora del sustrato:

0,1 M de acetato de sodio/solución amortiguadora de ácido cítrico

Disolver 13,6 g de acetato de sodio en 100 ml de agua destilada, ajustar el PH a 6,0 utilizando ácido cítrico 1 M (52,14 g por 250 ml de agua destilada).

2 M H₂SO₄:

Añadir 10,65 ml de H₂SO₄ concentrado a 89,35 ml de agua destilada.

Procedimiento:

- ✓ Recubrir las placas de ELISA con colágeno. Mezcle suavemente el colágeno por inversión antes de usar. Diluir 200 µl de colágeno en 20 ml de PBS, mezclar bien y luego añadir 200 µl a cada pocillo. Séllelo y guárdelo en una caja húmeda durante 24-48 horas.

- ✓ Lave la placa con PBS tres veces. (Intervalo de tres minutos para cada lavado). Retire el exceso de solución amortiguadora y compruebe que no haya burbujas de aire.
- ✓ Realice una predilución 1:10 de cada muestra de ensayo (es decir, añada 20 µl de muestra a 180 µl de PBS en los tubos de ensayo). Incluya también controles en la corrida.
- ✓ La curva de calibración va del 400% al 0%. Etiquete los tubos de la A a la H. Tome 180 µl de solución amortiguadora en un tubo de ensayo y agregue 120 µl de PNP (este es el tubo A). Agregue 150 µl de solución amortiguadora de los tubos B a G. Diluya en serie los tubos tomando 150 µl del tubo A al B y hasta el tubo G.
- ✓ El tubo H sirve como pieza en bruto. Agregue solo 200 µl de solución amortiguadora.
- ✓ Añadir 180 µl de solución amortiguadora en todos los pocillos después de lavar las placas recubiertas de colágeno tres veces (como se describe en el paso 2).
- ✓ Añadir 20 µl de patrón diluido en serie de la A a la G.
- ✓ Añadir 20 µl de muestra prediluida y controles por triplicado.
- ✓ Sellar e incubar a 22 °C (temperatura ambiente en una caja húmeda) durante 2 horas.
- ✓ Lavar la placa tres veces con PBS y añadir anticuerpo conjugado peroxidasa prediluido (dilución 1:1000, es decir, 22 µl de anticuerpo FVW HRP-TAG por 22 ml de PBS). Agregue 200 µl a cada pozo.
- ✓ Incubar durante 2 horas a temperatura ambiente.
- ✓ Lave el plato tres veces con PBS.
- ✓ Añadir 200 µl de sustrato. Para ello, disuelva un comprimido de OPD de 10 mg en 22,5 ml de agua destilada y 2,5 ml de solución amortiguadora de la solución madre. Añadir 15,0 µl de H₂O₂ al 30% justo antes de usar al sustrato.
- ✓ Espere 15-20 minutos para el desarrollo del color y agregue 50 µl de 2M H₂SO₄ para detener la reacción. Lectura mediante un lector ELISA con filtro de longitud de onda de 492 nm.

Protocolo de control de calidad: Corra el control normal (PNP) y el control anormal de bajo nivel (Dade P) con cada corrida. Si está disponible, también se puede incluir una muestra de paciente conocido con EVW. Límite de detección: 0-400%.

Interpretación de los resultados: El FVW:CB permite un diagnóstico más preciso de la EVW y reduce los errores de clasificación errónea y la posible falta de diagnóstico. Los estudios han demostrado que las tasas de error de diagnóstico de la EVW se reducen en un 50% mediante la adición de FVW:CB en un panel de cuatro pruebas (es decir, ensayos basados en FVIII, FVW:RCo o GPIb, antígeno del FVW y FVW:CB) en comparación con el panel de tres pruebas más utilizado (ensayos basados en FVIII, FVW:RCo o GPIb, y el antígeno del FVW).

- ✓ Enfermedad de Von Willebrand tipo 1 versus EVW tipo 2: La enfermedad de Von Willebrand tipo 1 muestra niveles reducidos de antígeno del FVW sin discrepancias entre los ensayos de actividad y antígeno. Por lo tanto, la relación FVW:CB a antígeno del FVW y la relación FVW:RCo a antígeno del FVW son normales. Se puede utilizar una relación de 0,6 o 0,7 para determinar la discrepancia entre los distintos ensayos de actividad y antígeno del FVW. Los estudios han demostrado que el FVW:CB puede diferenciar el tipo 1 frente al tipo 2A/2B mejor que el ensayo FVW:RCo.
- ✓ Tipo 2A/2B frente a 2M EVW: FVW:CB puede utilizarse como sustituto del análisis de multímeros para diferenciar entre el tipo 2A/2B frente a 2M EVW según las últimas Guías de EVW de 2021. La reducción de la relación FVW:CB a antígeno del FVW sugiere una pérdida de multímeros de HMW que se puede observar en los tipos 2A y 2B de EVW. Estos pacientes también tendrán una relación reducida entre FVW:RCo y FVW:Ag. El tipo 2M EVW mostrará una relación normal de FVW:CB a FVW:Ag, pero tendrá una relación reducida de FVW:RCo a FVW:Ag. Un subconjunto de tipo 2M con un defecto en el sitio de fijación del colágeno puede tener una proporción normal de FVW:CB a FVW:Ag. Aunque el FVW:CB basado en GLIA puede discriminar con precisión el tipo 1 frente al tipo 2 de EVW, tiene menos utilidad para discriminar el tipo 2M de la EVW tipo

2A según estudios preliminares. Se necesitan más estudios para confirmar estos hallazgos. Para ello, se debe utilizar un FVW:CB optimizado basado en ELISA.

- ✓ Tipo 3 frente a EVW tipo 1 grave: FVW:CB tiene un límite inferior de detección mejor que FVW:RCo. FVW:CB puede detectar mejor la ausencia de FVW en la EVW tipo 3 y la presencia de niveles muy bajos de FVW en la EVW tipo 1 grave.
- ✓ FVW: La CB es una herramienta importante en el diagnóstico de la EVW. Sin embargo, se debe utilizar un Ensayo de fijación al colágeno adecuado y optimizado. La fuente y concentración de colágeno pueden afectar los resultados. Cuando se utilizan ensayos internos, es mejor utilizar una mezcla de tipo I/III (~95%/~5%), o bien un colágeno de tipo III a bajas concentraciones. Rentabilidad: FVW:CB se puede realizar mediante ensayos internos basados en ELISA, lo que lo convierte en un ensayo de actividad FVW rentable. En combinación con un ensayo ELISA propio del laboratorio del antígeno del FVW, resulta ser un método barato y eficiente para identificar subtipos de EVW (excepto el tipo 2M y el tipo 2NEVW) en un entorno de recursos limitados.

Ensayo de fijación al factor VIII para el diagnóstico de la enfermedad de von Willebrand Normandía:

La variante Normandía (tipo 2N) de la EVW es un trastorno autosómico recesivo poco frecuente, identificado por primera vez en 1989. La enfermedad se caracteriza por un defecto en el FVW que da lugar a una reducción de la capacidad para unirse al FVIII, lo que conduce a un aumento del aclaramiento del FVIII no fijado de la circulación. Las manifestaciones clínicas y de laboratorio de los pacientes con tipo 2N pueden parecerse a las de los pacientes con hemofilia A leve/moderada o a las de los portadores de hemofilia A. Es probable que algunos de los pacientes con tipo 2N sean diagnosticados erróneamente a menos que se lleve a cabo un ensayo de fijación al FVIII (FVW:FVIII) para su confirmación. La distinción es importante, ya que la terapia de reemplazo con FVW purificado será mucho más efectiva que el reemplazo de FVIII en estos pacientes. Los patrones de herencia de las dos enfermedades también son bastante diferentes: autosómica recesiva en la EVW tipo 2N y recesiva ligada al cromosoma X de la hemofilia A. Los pacientes tipo 2N son homocigotos (mutaciones del mismo tipo 2N) o heterocigotos compuestos (dos mutaciones diferentes del tipo 2N o una combinación de 2N y otras mutaciones de la EVW). Las mutaciones se observan comúnmente en el dominio D'D3 de FVW. Los niveles de FVIII están levemente a moderadamente reducidos, generalmente en el rango de 5 a 40 UI/dl. Los niveles de FVIII a antígeno del FVW se reducen, generalmente $<0,7$. Los parámetros de FVW (FVW:Ag, FVW:RCo, FVW:CB y análisis de multímeros) suelen ser normales, a menos que sean heterocigotos compuestos para otras mutaciones de la EVW. Estos últimos pacientes suelen ser más sintomáticos. Los heterocigotos para el tipo 2N son generalmente asintomáticos y tienen niveles normales o solo ligeramente reducidos de FVIII. Se han descrito dos ensayos internos para FVW:FVIII (Nesbitt et al, 1996; y Casonato et al, 1998). Ambos ensayos muestran una buena concordancia y difieren en función de la detección del punto final del FVIII residual. En ambos ensayos, la placa de microtitulación está recubierta con anticuerpos contra el FVW. El complejo FVW-FVIII en la muestra del paciente se inmoviliza en la placa y el FVIII endógeno se elimina con cloruro de calcio. Se añade un preparado recombinante de FVIII puro (rFVIII) a una concentración de 100 UI/dl. La cantidad de rFVIII unida al FVW inmovilizado se mide mediante un ensayo cromogénico (Nesbitt et al, 1996) o utilizando un anticuerpo policlonal anti-FVIII conjugado (Casonato et al, 1998). Solo se dispone de un ensayo comercial de fijación al FVIII (Asserachrom:FVIII, Diagnostica Stago). Aquí describimos el método desarrollado internamente basado en ELISA similar al descrito por Casonato et al (1998).

Muestra primaria: Sangre citratada.

Materiales y reactivos:

- ✓ Anticuerpo de recubrimiento: anticuerpo policlonal anti-humano de conejo contra el factor de von Willebrand (FVW) (Dako)
- ✓ Anticuerpo primario: IgG purificada anti-humano de oveja contra el FVIII, 10 mg/ml
- ✓ Tag anticuerpo: AffiniPure peroxidasa conjugada de burro con IgG anti-ovejas (Jackson ImmunoResearch)

Alternativamente, si está disponible, el anticuerpo anti-FVIII conjugado con HRP se puede usar directamente en reemplazo del anticuerpo primario y de marcado.

- ✓ Cloruro de calcio 0,4 M
- ✓ Solución amortiguadora de recubrimiento de bicarbonato
- ✓ Solución amortiguadora TBS y solución amortiguadora para dilución
- ✓ Solución amortiguadora para lavado
- ✓ Solución amortiguadora de sustrato
- ✓ Sustrato: diclorhidrato de O-fenilendiamina (OPD)
- ✓ Ácido sulfúrico 2 M (H_2SO_4)
- ✓ Ácido clorhídrico
- ✓ Concentrado de FVIII (recombinante)
- ✓ Plasma de prueba de plaquetas deficientes en citrato
- ✓ Plasma normal combinado, controles

Preparación de reactivos:

Solución amortiguadora de recubrimiento de bicarbonato:

- a. Carbonato de sodio (Na_2CO_3): 0,16 g
- b. Bicarbonato de sodio ($NaHCO_3$): 0,294 g
- c. Envasar hasta 100 ml. Ajuste el pH a 9.6. La vida útil es de 2-3 semanas.
- d. Añadir aproximadamente 200 μ l de tinte rojo.

Constituya una solución amortiguadora TBS de 150 mM como se muestra:

- a. Cloruro de sodio, NaCl: 11,68 g
- b. TRIZMA-base: 12,12 g
- c. Disolver en 1800 ml de agua. Hacer hasta 2000 ml. Ajuste el pH a 7.4 con ácido clorhídrico.

Solución amortiguadora para dilución: Disolver 1 g de albúmina sérica bovina (BSA) en 100 ml del Solución amortiguadora TBS y Tween 20 a 0,2%. Se necesitan unos 100 ml por plato.

Solución amortiguadora para lavado: Añadir Tween 20 a 0,2% a TBS. Añadir 2 ml de Tween 20 a 1000 ml TBS.

Cloruro cálcico 0,4 M: Disolver 0,588 g de $CaCl_2$ en 10 ml de solución amortiguadora para dilución.

Solución amortiguadora de sustrato:

- a. Ácido cítrico. H_2O : 0,73 g
- b. Ortofosfato de hidrógeno disódico ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$): 2,4 g
- c. Preparar hasta 100 ml con agua destilada. Ajusta el pH a 5.0. La vida útil es de 2 meses.

Sustrato: Disolver un comprimido de OPD de 10 mg en 15 ml de solución amortiguadora de sustrato.

Ácido sulfúrico 2 M: Añadir 10,65 ml de H_2SO_4 concentrado a 89,35 ml de agua destilada.

Concentrado de FVIII diluido (recombinado): Reconstituya el recombinante en 1 ml de agua desionizada y coloque alícuotas de 500 μ l en viales y almacene congelado a $-80^\circ C$.

Procedimiento:

Recubrimiento de placas:

- ✓ Diluir el anticuerpo de recubrimiento 1:1000

- ✓ Añadir 100 ml/pocillo. Incubar a 4°C durante la noche. Las placas se pueden recubrir de 16 a 96 horas antes de su uso.

Dilución de estándares:

- ✓ Para hacer la solución madre, diluir 50 µl de PNP en 3,95 ml de solución amortiguadora para dilución (1:80).
- ✓ Prepare una serie de estándares a partir de esta solución madre

a.	Solución madre	125 % (S1)
b.	0,8 ml de solución madre + 0,2 ml de solución amortiguadora	100 % (S2)
c.	0,6 ml de solución madre + 0,4 ml de solución amortiguadora	75 % (S3)
d.	0,4 ml de solución madre + 0,6 ml de solución amortiguadora	50 % (S4)
e.	0,2 ml de solución madre + 0,8 ml de solución amortiguadora	25 % (S5)
f.	0,1 ml de solución madre + 0,9 ml de solución amortiguadora	12.5 % (S6)
g.	0,05 ml de solución madre + 0,95 ml de Solución amortiguadora	0.25 % (S7)
h.	1,00 ml de solución amortiguadora	Blanco

Dilución de muestras de pacientes y controles: Diluir muestras de pacientes y controles 1:100 en solución amortiguadora para dilución (10 µl de muestra + 990 µl de solución amortiguadora).

Procedimiento de ensayo:

- ✓ Lave la placa tres veces con la solución amortiguadora para lavado. Retire el exceso de solución amortiguadora y compruebe que no haya burbujas de aire.
- ✓ Añadir 100 µl de los patrones y blancos por duplicado y ensayos por triplicado, a los pocillos de las placas, utilizando el siguiente formato.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S1	S1	T1	T1	T1	T9	T9	T9	T17	T17	T17	-
B	S2	S2	T2	T2	T2	T10	T10	T10	T18	T18	T18	-
C	S3	S3	T3	T3	T3	T11	T11	T11	T19	T19	T19	-
D	S4	S4	T4	T4	T4	T12	T12	T12	T20	T20	T20	-
E	S5	S5	T5	T5	T5	T13	T13	T13	T21	T21	T21	-
F	S6	S6	T6	T6	T6	T14	T14	T14	T22	T22	T22	-
G	S7	S7	T7	T7	T7	T15	T15	T15	T23	T23	T23	-
H	BK	BK	T8	T8	T8	T16	T16	T16	T24	T24	T24	-

S1-S7-Diluciones del patrón; T -Plasma de prueba; BK - Blanco

- ✓ Selle la placa. Incubar durante 1 hora en un baño maría a exactamente 37 °C.
- ✓ Lave la placa tres veces con la solución amortiguadora para lavado. Retire el exceso de solución amortiguadora y compruebe que no haya burbujas de aire.
- ✓ Para eliminar el FVIII endógeno, incube con 100pl/pocillo de CaCl₂ 0,4M durante 1 hora a 37°C en baño maría. No es necesario agitar.
- ✓ Vuelva a lavar la placa con solución amortiguadora para lavado tres veces. Elimina el exceso de solución amortiguadora.
- ✓ Descongelar uno de los viales congelados de concentrado de FVIII (recombinado). Añadir 400 µl de concentrado de FVIII a 9,6 ml de solución amortiguadora para dilución (concentración de -100 UI/dl).
- ✓ Añadir 100 µl de FVIII diluido a cada pocillo. Incubar durante 1 hora a 37°C.
- ✓ Lave la placa con solución amortiguadora para lavado tres veces. Elimina el exceso de solución amortiguadora.

- ✓ El anticuerpo primario se alícuota en cantidades de 25 µl y se almacena a -80 °C. Hacer una dilución 1:2000 del anticuerpo primario en solución amortiguadora para dilución (5 µl en 10 ml). Reemplace la alícuota de anticuerpos inmediatamente en el congelador para su uso futuro.
- ✓ Añadir 100 µl de anticuerpo primario diluido a cada pocillo. Incubar durante 1 hora a 37°C.
- ✓ Lave la placa con solución amortiguadora para lavado tres veces. Elimina el exceso de solución amortiguadora.
- ✓ El anticuerpo Tag se alícuota en cantidades de 10 µl y se almacena a -80 °C. Hacer una dilución 1:5000 del anticuerpo tag en solución amortiguadora para dilución (2 µl en 10 ml). Reemplace la alícuota de anticuerpos inmediatamente en el congelador para su uso futuro.
- ✓ Añadir 100 µl de anticuerpo tag diluido a cada pocillo. Incubar durante 1 hora a 37°C.
- ✓ Lave la placa con solución amortiguadora para lavado tres veces. Elimine el exceso de solución amortiguadora.
- ✓ La solución de sustrato se prepara solo durante el último paso de lavado. Justo antes de usar, agregue 7 µl de 30% de H₂O₂ a esta solución.
- ✓ Agregue 100 µl de la solución anterior a cada pocillo. Inicie el cronómetro. Incube durante 8-10 minutos.
- ✓ Detener la reacción acidificando 50 µl de 2M H₂SO₄ en cada pocillo exactamente en el mismo intervalo de tiempo en que se agregó el sustrato.
- ✓ Seleccione el programa adecuado (492 nm) en el lector de placas ELISA. Tome las lecturas de OD.

Protocolo de calidad: Corra el control normal (PNP) y el control anormal de bajo nivel (Dade P). Si se dispone de controles conocidos de EVW Normandía, añada una muestra como control con cada lote.

Interpretación de los resultados: Los resultados se expresan en términos de inglés y de teclado. Límites de detección: de menos del 6,25% a más del 175%.

- ✓ Homocigotos o heterocigotos compuestos para el tipo 2N: FVW:FVIII B ausente o marcadamente reducido (<15%) y proporciones muy bajas de FVW:FVIII B a relación antígeno del FVW (<0,3). Los niveles de FVIII C son leves a moderadamente reducidos, por lo general oscilando entre 5 y 40 UI/dl. Las proporciones de FVIII C a antígeno del FVW también se reducen, generalmente <0,7. Esta proporción puede ser normal, especialmente en heterocigotos compuestos con tipo 2N y mutaciones cuantitativas/nulas en el FVW. Por lo tanto, puede ser necesario un ensayo FVW:FVIII B o una prueba genética si la sospecha clínica es alta.
- ✓ Heterocigotos para el tipo 2N: FVW:FVIII B está moderadamente reducido o incluso normal, pero la relación FVW:FVIII B a antígeno del FVW está reducida (<0,7). Los niveles de FVIII:C suelen ser normales o ligeramente reducidos.
- ✓ Hemofilia leve A o mujeres portadoras de hemofilia: niveles de FVIII:C reducidos o normales. Ensayo normal de FVW:FVIII B y relación normal de FVW:FVIII B a antígeno del FVW(>0,7).

Multímeros del factor de von Willebrand: El FVW es una glicoproteína multimérica de gran tamaño que circula en el plasma como una serie de subunidades poliméricas idénticas llamadas multímeros. Los multímeros pueden ser liberados constantemente de las células endoteliales o almacenados en cuerpos de Weibel-Palade en las plaquetas. Los multímeros comprenden un número variable de subunidades (de 500 kDa a más de 10.000 kDa de peso molecular) unidas por enlaces de disulfuro. Los multímeros se clasifican según su tamaño en multímeros de bajo peso molecular (1-5 multímeros), intermedios (6-10 multímeros), altos (11-20 multímeros) y ultragrandes (>20 multímeros) (LMWM, IMWM, HMWM y ULMWM por sus siglas en inglés) (Stockschlaeder et al, 2014; James et al, 2021). Los multímeros de alto peso molecular o HMWM son importantes para unirse a los receptores de colágeno y plaquetas durante la hemostasia primaria para facilitar la agregación plaquetaria. Las anomalías en el ensamblaje o el número de multímeros pueden provocar problemas hemostáticos. El análisis de multímeros es útil para la clasificación de la EVW que, a su vez, puede usarse para guiar el tratamiento del paciente. La EVW tipo 1 es un trastorno cuantitativo parcial que presenta una reducción cuantitativa de los multímeros normales. El

subtipo 1C tiene reducida la supervivencia del FVW o aumentado su aclaramiento, lo que provoca una hemorragia prolongada (Flatton et al, 2024).

La EVW de tipo 2 es causada por deficiencias cualitativas del FVW, y la EVW de tipo 3 es una ausencia total de FVW. La EVW tipo 2 se subdivide en 4 subtipos:

- Tipo 2A en el que hay un ensamblaje de multímero defectuoso, una mayor sensibilidad a la escisión de ADAMTS13 o una disminución de la síntesis que conduce a una HMWM reducida o ausente
- El tipo 2B es causado por una mutación de ganancia de función que aumenta la fijación del FVW a las plaquetas. En la mayoría de los casos, pero no en todos, se reporta una pérdida de HMWM.
- El tipo 2M tiene una disminución de la adhesión de plaquetas o colágeno dependiente del FVW con un patrón de multímero del FVW normal.
- El tipo 2N es causado por una afinidad de fijación reducida al FVIII debido a mutaciones en el sitio de fijación al FVIII del FWF; se reporta un patrón normal de multímero FVW.

Hay algunas excepciones; Se han descrito patrones normales de multímero en algunos casos de tipo 2B y, por el contrario, se ha reportado de cierta pérdida de HMWM en algunos casos de variante de tipo 2M. Se pueden observar multímeros de FVW ultragrandes en la EVW de tipo IL, en la TPT y, ocasionalmente, en casos de EVW de tipo 2M.

Los métodos tradicionales de visualización de multímeros son complejos, laboriosos y requieren mucho tiempo, ya que implican electroforesis en gel de agarosa con dodecil sulfato de sodio (DES) seguida de visualización usando Western blot, inmunodetección colorimétrica, autorradiografía, quimioluminiscencia o fluorescencia. La evaluación de los multímeros puede realizarse mediante inspección visual o mediante cuantificación mediante densitometría (Flatton et al, 2024).

En el momento de escribir este artículo, la técnica más utilizada basada en la participación en programas externos de evaluación de la calidad es un ensayo semiautomático disponible en el mercado que es sustancialmente más rápido que los métodos manuales de gel de agarosa DES. A continuación, se describe este método para la detección y análisis de la distribución de multímeros de FVW en plasma humano mediante electroforesis e inmunofijación en gel de agarosa con el instrumento semiautomático Sebia Hydrasys 2 (Bowyer et al, 2018).

Análisis de multímeros Sebia Hydrasys FVW: H5VWM y H11VWM son ensayos basados en gel de agarosa usados para la separación de proteínas plasmáticas según su peso molecular. La separación electroforética de los multímeros FVW se lleva a cabo después del tratamiento de la muestra con un detergente aniónico. En un exceso de este detergente aniónico, las proteínas se convierten en complejos de proteínas y detergente aniónicos. En estos complejos, la conformación nativa de las proteínas se interrumpe, y todas asumen la misma conformación y la misma carga negativa por unidad de masa. Cuando estas proteínas detergentes aniónicas se electroforizan en un medio con propiedades de tamizado adecuadas, como los geles H5VWM o H11VWM, se separan según su peso molecular. En los geles H5VWM o H11VWM, los multímeros del FVW se separan y se inmunoprecipitan con un antisuero anti-FVW específico. A continuación, las diferentes bandas se visualizan en el gel con un anticuerpo marcado con peroxidasa y un sustrato específico. El ensayo se lleva a cabo en dos etapas: 1) electroforesis en un gel de agarosa para separar las proteínas contenidas en las muestras de plasma, y 2) inmunofijación con un antisuero anti-FVW para visualizar los diferentes multímeros.

Equipo necesario:

- Pipetas y puntas de 10 ml, 100 µl, 10 µpl
- Tubos Eppendorf
- Baño maría
- Temporizador

- Mezclador de vórtice
- Pañuelos de papel
- Toallitas con alcohol
- Analizador Hydrasys (Sebia, Lisses, Francia)

Tabla 28. Reactivos para el análisis de multímeros FVW de Sebia Hydrasys

Reactivo	Nº de catálogo.	Estabilidad
Sebia Hydragel 5 or 11 VW multimers kit	4359	Hasta la fecha de caducidad indicada
Sebia Hydragel VW multimers Visualization kit	4747	Hasta la fecha de caducidad indicada
Hydrogen Peroxide 30%	Sigma-Aldrich 216763 100ml	Hasta la fecha de caducidad indicada
Destaining solution Dilute 5ml in 5L water	4540 (10 viales de 100 ml)	Solución de trabajo: 1 semana a temperatura ambiente
Solución de lavado Hydrasys Diluir 1 vial en 5L de agua (8mls en 500ml)	4541 (10 viales de 80 ml)	La solución de trabajo es estable hasta la fecha de caducidad indicada
Control de calidad normal		

El método para Hydragel 5 y Hydragel 11 varía solo en los volúmenes de reactivo y el tamaño de las mascarillas/papel de transferencia

Preparación de la muestra:

- ✓ Calentar el baño maría a 45°C.
- ✓ Descongele el plasma de la prueba y el control de calidad a 37 °C. El Hydragel 5 tendrá capacidad para 4 pacientes y 1 control de calidad. El Hydragel 11 tendrá capacidad para 9 pacientes y 2 controles de calidad (pero solo se requiere 1 vial de control de calidad).
- ✓ Asegúrese de que se conozca el resultado de antígeno del FVW antes de comenzar.
- ✓ Etiquete los tubos Eppendorf para pacientes y control de calidad.
- ✓ Muestras de prueba de vórtice antes de su uso. Diluir las muestras con el diluyente de muestra del kit de multímero en los tubos Eppendorf de acuerdo con el antígeno del FVW de la muestra. El límite de detección de multímeros FVW es de 0,05 UI/ml, el límite de interpretación es de 0,11 UI/ml).

antígeno del FVW (UI/ml)	Dilución	Diluyente de muestra (µl)	Plasma (µl)
<0.20	1/4	30	10
0.20–1.50	1/6	50	10
1.50–3.00	1/10	90	10
>3.00	1/20	95	5

- ✓ Agitar con vórtice durante 5 segundos.
- ✓ Incube durante exactamente 20 minutos a 45°C en el baño maría.
- ✓ Retire los tubos Eppendorf del baño maría, **agite con vórtice**, y déjelos a temperatura ambiente durante 10 minutos. Durante estos 10 minutos, configure la migración.

Configuración de la migración

- 1) Encienda el Hydrasys 2 y el VDU. Seleccione el programa de foresis: u/n adm p/w sebia.
- 2) Complete una hoja de trabajo. Registre los números de lote de los kits, las mechas y el gel.
- 3) Seleccione "5 FVW" (programa de migración #57) o 11 FVW (programa #58) en el menú de instrumentos (pantalla LHS).

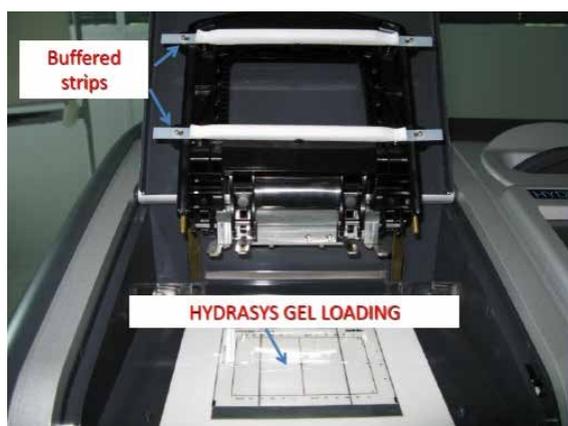


Figura 10. Analizador Hydrasys

- 4) Abra la tapa del módulo de migración, retire el soporte del aplicador y levante el portador de electrodos. *****Nunca cierre la tapa cuando el transportador esté levantado***.**
- 5) Con los extremos de plástico, retire las tiras de mecha tamponadas de su paquete (verifique si hay exceso de agua). Fíjelo a través de los orificios al portador, con un respaldo de plástico tocando el soporte (Figura 11).

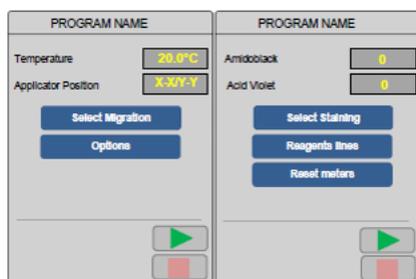


Figura 11. Analizador Hydrasys

- 6) Hydragel 5: Añadir 100 µl de agua destilada al tercio inferior del fotograma impreso en el módulo de migración.
- 7) Hydragel 11: Añadir 200 µl de agua destilada al tercio inferior del fotograma impreso en el módulo de migración.
- 8) Abra el gel y limpie el soporte de gel de plástico con un pañuelo de papel para eliminar el exceso de agua.
- 9) Coloque el gel con el lado hacia arriba en el marco impreso (Figura 12) con los pocillos en el borde más cercano.
- 10) Enrolle una mascarilla de plástico sobre el gel (diferentes tamaños para Hydragel 5 y 11), alineada con los marcadores del gel (Figura 12). Evite las burbujas de aire, retírelas y vuelva a aplicarlas inmediatamente si las hay.

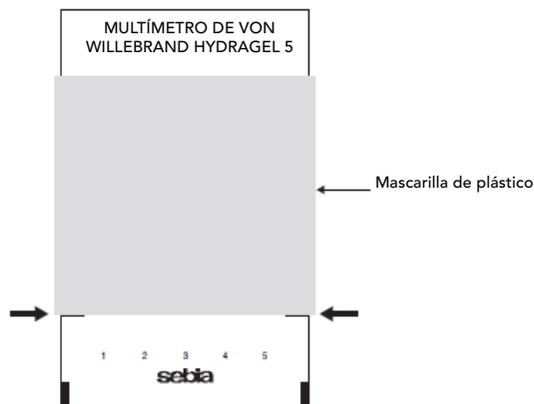


Figura 12. Analizador Hydrasys

- 11) Baje suavemente el portaelectrodos sobre el gel y cierre el módulo de migración.
- 12) Pulse inicio (▶) en la pantalla y, a continuación, confirme. Esto tarda 5 minutos.
- 13) El pitido señala el final. Abra el módulo de migración, levante el portador.
- 14) Usando una pipeta de 10 μ l con puntas finas, sin tocar el costado o el fondo del pocillo, retroplique la muestra de 5 μ l a cada pocillo. Hydragel 5: agregue el control de calidad normal al pozo 5. Hydragel 11: agregue el control de control de calidad normal a los pozos 1 y 11.
****Evite la formación de burbujas**.** Esto debería completarse en 2 minutos.
- 15) Baje suavemente el portaelectrodos y cierre el módulo de migración.
- 16) Presione inicio (▶) en la pantalla. Esto tarda aproximadamente 100 minutos.
- 17) Retire el TTF1 y TTF2 de la nevera y déjalos a temperatura ambiente para que se licúen.

Inmunofijación 1 (60 minutos)

- 18) En el pitido, se muestra el siguiente mensaje J.ANTISERUM FVW.
- 19) Abra el módulo y levante, luego retire el portador de electrodos. Deseche las mechas y limpie los electrodos con un pañuelo suave y húmedo.
- 20) Hydragel 5: En un Z5, mezclar 2,5 ml de diluyente antisuero con 60 μ l de antisuero anti-FVW.
- 21) Hydragel 11: En un Z5, mezclar 5 ml de diluyente antisueros con 135 μ l de anti-FVW antiserum.
- 22) Quítese la mascarilla y deséchela. Coloque la mascarilla amarilla AS FVW sobre el gel.
- 23) Sujete la pipeta verticalmente. Aplicar gradual y cuidadosamente la mezcla antisérum en un solo disparo ****evitar burbujas****.
- 24) Cierre el módulo de migración y presione iniciar (60 minutos).
- 25) Con el pitido, abra la tapa y retire el antisuero.
- 26) Sostenga la pipeta verticalmente, presione ligeramente y retire el antisuero y luego deséchelo.
- 27) Retire la mascarilla y limpie con agua, se recomienda un cepillo pequeño. Deje secar.

Transferencia en gel 1 (10 minutos)

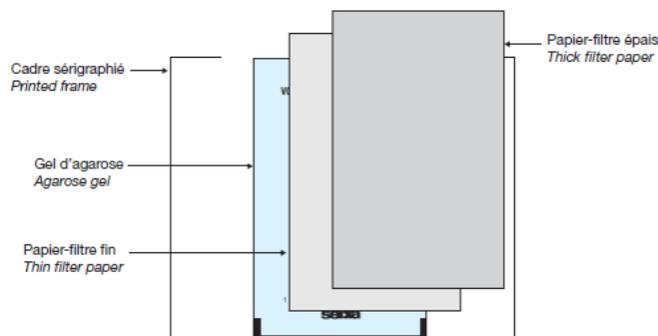


Figura 13. Analizador Hydrasys

- 28) Aplique un papel de filtro fino y otro grueso (con el lado liso hacia abajo) sobre el gel (Figura 13). Agregue el vaso y luego el peso.
- 29) Cierre la tapa y presione inicio.

Lavado en gel 1 (20 minutos)

- 30) Retire los papeles de filtro y añada la mascarilla de lavado/rehidratación naranja.
- 31) Hydrigel 5: Añada 4,5 ml de solución de lavado **roja** a la mascarilla. ****Evite la formación de burbujas****.
- 32) Hydrigel 11: Añada 9,0 ml de solución de lavado **roja** a la mascarilla. ****Evite la formación de burbujas****.
- 33) Cierre la tapa y presione inicio

Transferencia en gel 2 (10 minutos)

- 34) Retire la solución de lavado **roja**, luego la mascarilla y agregue papeles de filtro gruesos y delgados, vidrio y peso.
- 35) Cierre la tapa y presione inicio.
- 36) Lave la mascarilla.

Lavado de gel intermedio Q y luego seca de papel fino (10 minutos + 5 segundos)

- 37) Abra la tapa. Retira los papeles de filtro y añada una mascarilla de lavado/rehidratación de color naranja.
- 38) Hydrigel 5: Añada 4,5 ml de solución de lavado intermedia **verde**.
- 39) Hydrigel 11: Añada 4,5 ml de solución de lavado intermedia **verde**.
- 40) Cierre la tapa y presione inicio.
- 41) Abra la tapa y retire el lavado intermedio verde. Aplique solo un papel de **filtro fino**. Presione inicio. Después de 5 segundos, retire el papel fino.

Inmunofijación 2 (30 minutos)

- 42) Hydrigel 5: Mezcle 4 ml de diluyente antisuero con 2 µl de anti-IgG-PER en un z5.
- 43) Hydrigel 11: Mezcle 8 ml de diluyente antisuero con 4 µl de anti-IgG-PER en un z5.
- 44) Aplique la mascarilla IgG-PER naranja y luego agregue la mezcla anti-IgG-PER.
- 45) Cierre la tapa y presione inicio.

Transferencia en gel 3 (10 minutos)

- 46) Abra la tapa, retire el anti-IgG-PER y deséchelo. Quítese y lave la mascarilla. Agregue papeles de filtro finos y gruesos, vidrio y peso.
- 47) Cierre la tapa y presione inicio.

Lavado en gel 2 (20 minutos)

- 48) Retire los papeles de filtro y añada la mascarilla de lavado naranja.
- 49) Hydragel 5: Añada 4,5 ml de solución de lavado rojo a la mascarilla. ****Evite la formación de burbujas****.
- 50) Hydragel 11: Añada 9,0 ml de solución de lavado rojo a la mascarilla. ****Evite la formación de burbujas****.
- 51) Cierre la tapa y presione inicio.

Papel de transferencia en gel 4 (10 minutos)

- 52) Retire la solución de rehidratación, luego la mascarilla y agregue papeles de filtro gruesos y delgados, vidrio y peso.
- 53) Cierre la tapa y presione inicio.
- 54) Lavar la mascarilla.

Gel de rehidratación 1 (10 minutos)

- 55) Retira los papeles de filtro y añada la mascarilla de lavado/rehidratación naranja.
- 56) Hydragel 5: Añadir 4,5 ml de solución **rehidratante** a la mascarilla. ****Evite la formación de burbujas****.
- 57) Hydragel 11: Añadir 9,0 ml de solución **rehidratante** a la mascarilla. ****Evite la formación de burbujas****.
- 58) Cierre la tapa y presione inicio.

Transferencia en gel 5 (10 minutos)

- 59) Retire la solución de rehidratación, luego la mascarilla y agregue papeles de filtro gruesos y delgados, vidrio y peso.
- 60) Cierre la tapa y presione inicio.
- 61) Lave la mascarilla.

Gel de rehidratación 2 (10 minutos)

- 62) Retire los papeles de filtro y añada la mascarilla de lavado/rehidratación naranja.
- 63) Hydragel 5: Añada 4,5 ml de solución **rehidratante** a la mascarilla. ****Evite la formación de burbujas****.
- 64) Hydragel 11: Añada 9,0 ml de solución **rehidratante** a la mascarilla. ****Evite la formación de burbujas****.
- 65) Cierre la tapa y presione inicio.
- 66) Vórtice TTF 1 y TTF2.
- 67) Hydragel 5: Añada 75 µl de TTF1 a 3,0 ml de disolvente TTF en un z5. Invertir para mezclar. Añadir 75 µl de TTF2, invertir para mezclar. Agregue 3 µl de peróxido de hidrógeno (30%), invertir para mezclar.
- 68) Hydragel 11: Añada 150 µl de TTF1 a 6,0 ml de disolvente de visualización TTF en un z5. Invertir para mezclar. Añada 150 µl de TTF2, invertir para mezclar. Agregue 6 µl de peróxido de hidrógeno (30%), invierta para mezclar.

Visualización (10 minutos)

- 69) Retire la solución rehidratante de la mascarilla. Coloque la mascarilla naranja TTF1/TTF2 sobre el gel.
- 70) Hydragel 5: Aplique 2,5 ml de mezcla TTF. ****Evite la formación de burbujas****.
- 71) Hydragel 11: Aplique 5 ml de mezcla TTF. ****Evite la formación de burbujas****.
- 72) Cierre la tapa y presione inicio.

Transferencia en gel 6 (5 minutos)

- 73) Retire la solución TTF, luego la mascarilla y agregue papeles de filtro gruesos y delgados, vidrio y peso.
- 74) Cierre la tapa y presione inicio.
- 75) Lave la mascarilla con agua y una toallita con alcohol.

Gel de rehidratación 3 (5 minutos)

- 76) Retire los papeles de filtro y añada la mascarilla de lavado/rehidratación naranja.
- 77) Hydragel 5: Añada 4,5 ml de solución **rehidratante** a la mascarilla. ****Evite la formación de burbujas****.
- 78) Hydragel 11: Añada 9,0 ml de solución **rehidratante** a la mascarilla. ****Evite la formación de burbujas****.
- 79) Cierre la tapa y presione inicio.

Transferencia en gel 7 (5 minutos)

- 80) Retire la solución de rehidratación, luego la mascarilla y agregue papeles de filtro gruesos y delgados, vidrio y peso.
- 81) Cierre la tapa y presione inicio.
- 82) Lave la mascarilla.

Secado en gel (10 minutos)

- 83) Abra la tapa y retire los papeles de filtro.
- 84) Cierre la tapa y presione inicio.

Lavado y procesamiento final (25 minutos)

- 85) Abra la tapa y retire el gel.
- 86) El gel debe lavarse inmediatamente en el compartimento de tinción.
- 87) Abra el soporte de gel y coloque el gel como se muestra en la Figura 14.

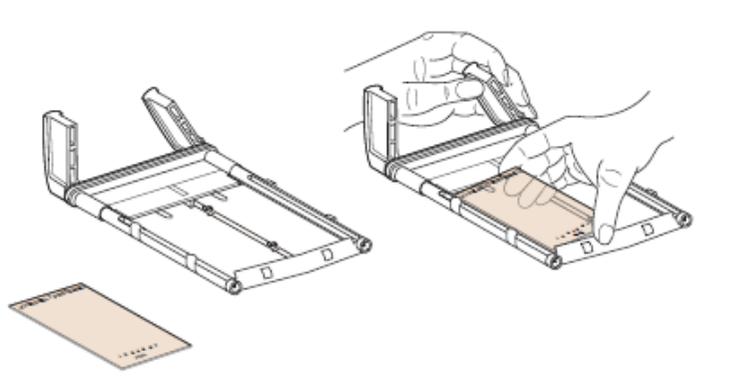


Figura 14. Analizador Hydrasys

- 88) Cierre el soporte y colóquelo en el módulo de procesamiento de gel / tinción.
- 89) Asegúrese de que haya al menos 400 ml de solución eliminadora y que el contenedor de residuos esté vacío.
- 90) Seleccione el programa de lavado del FWW en el menú del instrumento (pantalla RHS) y pulse "start" (inicio).

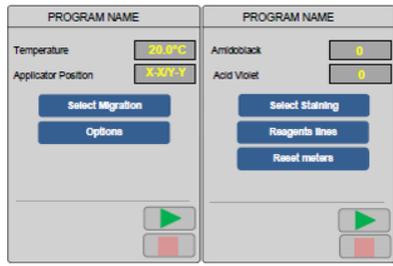


Figura 15. Analizador Hydrasys

Escaneo en gel

- 91) Retire el gel y el soporte del módulo de procesamiento/tinción de gel y colóquelos en el módulo de escaneo.
- 92) En el programa Phoresis, cree una lista de trabajo usando el icono de la tabla . Comience en el número 1 y agregue los detalles del paciente, incluido el SID, el nombre, la fecha de nacimiento, la fecha de la muestra, el número de hospital y el hospital solicitante (para RH agregue al consultor).
- 93) Hidrogel 5: La muestra 5 es el control normal (CC).
- 94) Hidrogel 11: las muestras 1 y 11 son el control normal (CC).
- 95) Haga clic en para abrir la ventana de escaneo de geles y muestras.
- 96) Se abrirá la siguiente ventana:

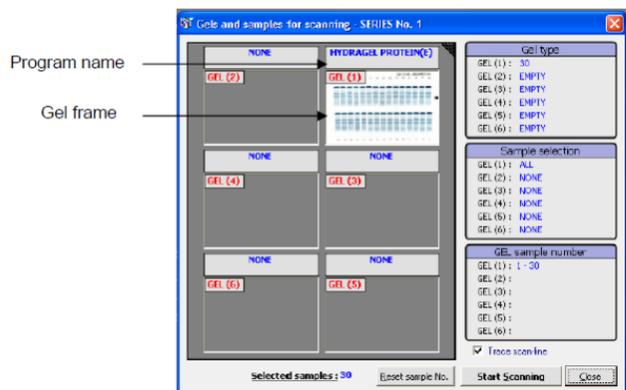


Figura 16. Analizador Hydrasys

- 97) Seleccione el programa del primer gel escaneado en la posición 1. Presione el cuadro de imagen RHS superior una vez para Hydrigel 5 y dos veces para Hydrigel 11 (con una tercera pulsación se restablece a 5).
- 98) Presione iniciar escaneo.
- 99) Compruebe que el escáner ha identificado correctamente todas las bandas. En algunas ocasiones, se pierde la primera banda LMWM. En este caso, elija "modo de localización de gel conservador para volver a escanear la imagen" y, a continuación, vuelva a escanear.
- 100) Cuando aparezcan las imágenes, haga clic en escaneo de vista, luego en mosaico de curvas para acceder a la densitometría.

101) Los gráficos de densitometría individuales aparecerán en cuadros:

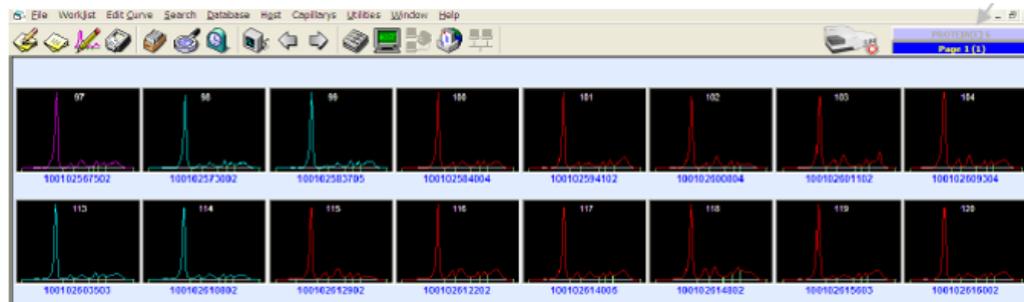


Figura 17. Analizador Hydrasys

Haga clic en el primero para abrir. **Comience con** el pocillo de CC 5 para Hydrigel 5 o 1/11 para Hydrigel 11. Aparecen los resultados del control de calidad:

Nota: Si los resultados no se pueden evaluar el día de la prueba, los resultados aún se pueden obtener retrospectivamente. Abra el programa Phoresis y seleccione la fecha de la prueba donde está la flecha negra en la Figura 18, luego siga los pasos como se muestra a continuación.

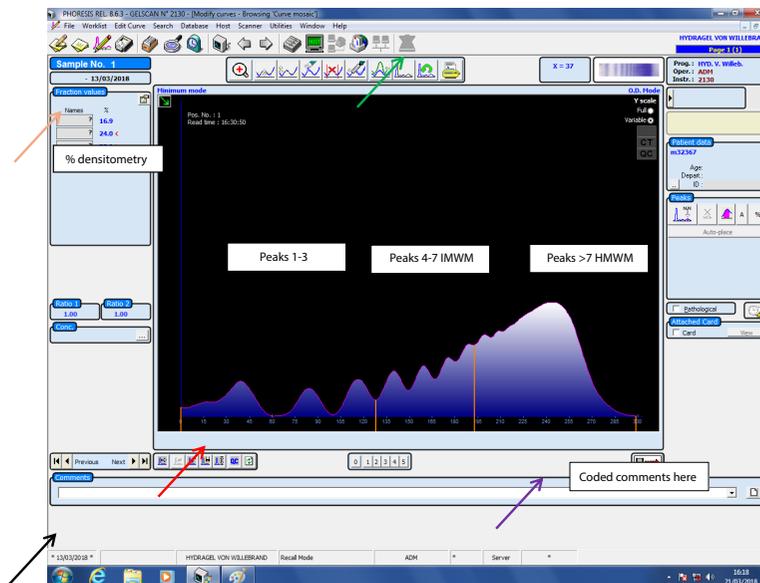


Figura 18. Analizador Hydrasys

Establezca el patrón de referencia haciendo clic en el 4° icono debajo de la flecha **roja** de densitometría. Establezca la curva actual como patrón de referencia. Nota: solo elija uno de los resultados de control de calidad para Hydrigel 11.

- 102) Haga clic en la curva de densitometría para establecer LMWM (picos 1-3), IMWM (picos 4-7) y HMWM (picos >7).
- 103) El porcentaje de los picos aparecerá y requerirá etiquetado: flecha **naranja**.
- 104) Compruebe si los resultados de control de calidad están dentro de los rangos esperados. De lo contrario, no reporte los resultados del paciente y hable con un experto en ensayos. Guarde los resultados (icono de disquete) y muévalos a la carpeta de pacientes.
- 105) Repita 111 + 112 con cada paciente y para ver los resultados del paciente, haga clic para superponer la flecha verde del patrón de control de calidad de referencia.

- 106) Usando los rangos de referencia para adultos, decida si la densitometría es normal o anormal, y elija los comentarios apropiados en el cuadro desplegable de comentarios (flecha morada).
Nota: Solo se puede agregar 1 comentario a cada resultado. El nivel de HMWM es el más relevante desde el punto de vista clínico.

Tabla 29. Nivel de HMWM y comentario que se puede agregar a los resultados

Comentario	Valor
SRHMWM (multímeros de alto peso molecular de ligera reducción)	HMWM 30%-por debajo del rango normal
RHMWM (multímeros de alto peso molecular de reducción)	HMWM 15-30%
GRHMW (multímeros de alto peso molecular de reducción bruta)	HMWM <15%
SIHMWM (multímeros de alto peso molecular con ligero aumento)	HMWM > parte superior del rango normal
SILMWM (multímeros de bajo peso molecular con ligero aumento)	LMWM por encima del rango normal al 26%
ILMWM (aumentar multímeros de bajo peso molecular)	LMWM >26%
QNORM/QNORM con cantidades reducidas	LMWM y HMWM están dentro de los rangos normales

- 107) Es posible que sea necesario repetir la prueba para muestras con multímeros muy altos o bajos. Hable con un BMS sénior capacitado en este ensayo.
- 108) Cuando todos los pacientes estén completos, haga clic en la pestaña editar curva y, a continuación, imprima los reportes en un archivo PDF a través del creador de PDF.
- 109) Esto exportará todos los resultados a una carpeta en el escritorio (acceso directo a PDF). Busque la fecha actual y cópiela (o envíela) a la memoria USB.
- 110) También se guarda una copia JPEG del gel en las imágenes. Copie (o envíe) a una memoria USB.
- 111) Asegúrese de que el gel esté etiquetado con la fecha de la prueba, se adjunte a la hoja de trabajo y archive en la carpeta de resultados.
- 112) Asegúrese de que los resultados normales de control de calidad se encuentren dentro de los límites aceptables,
- 113) Realice y registre la limpieza mensual según sea necesario.

Tabla 30. Rango de referencia para adultos según LMWM, IMWM y HMWM

	N	Media (%)	Rango en % (95% CI)
LMWM	51	17.3	11.8–23.6
IMWM	51	33.0	24.6–42.0
HMWM	51	49.9	35.0–58.5

Interpretación de las pruebas de Von Willebrand: La EVW es el trastorno hemorrágico hereditario más común, con una prevalencia estimada de hasta el 1%. Solo el 10% de estos individuos son sintomáticos, y el 10% de los individuos sintomáticos acuden al hospital. Una estimación conservadora de la prevalencia es de 100 por millón de personas, y alrededor del 80% de ellas se encuentran en países en vías de desarrollo. La EVW es causada por una deficiencia cuantitativa y/o cualitativa de la proteína plasmática FWW. A diferencia de la mayoría de los otros factores de coagulación, el FWW funciona en la hemostasia como una proteína adhesiva que se une a varios ligandos que son componentes críticos del proceso hemostático. Se une al receptor GPIb de las plaquetas y al colágeno subendotelial, provocando la adhesión plaquetaria. También agrega plaquetas uniéndose al receptor GPIIb/IIIa. La otra función importante del FWW es actuar como proteína transportadora del FVIII y prevenir la degradación proteolítica del FVIII. En

ausencia de FVW, la vida media del FVIII se reduce de 8-12 horas a 2 horas. La EVW se puede clasificar en tres subtipos principales, según los defectos cuantitativos (EVW tipo 1 y 3) y cualitativos (EVW tipo 2). La EVW de tipo 2 se subdivide a su vez en 4 subtipos: 2A, 2B, 2M y 2N. Los fenotipos de laboratorio de los diferentes subtipos se resumen en la Tabla 31.

- 1) EVW tipo 1: Deficiencia cuantitativa parcial de FVW.
- 2) EVW Tipo 2: Defecto cualitativo. Una o más funciones del FVW son anormales según lo evaluado por el ensayo de actividad del FVW (descrito a continuación).
 - c. EVW Tipo 2A: Pérdida selectiva o deficiencia de HMWM. Los multímeros más grandes son las formas funcionalmente más activas. La pérdida selectiva de estos multímeros conduce a una disminución de la adhesión plaquetaria dependiente del FVW y de la capacidad de fijación al colágeno.
 - d. EVW tipo 2B: aumento de la afinidad del FVW a la GPIb plaquetaria que conduce a la fijación espontánea del FVW a las plaquetas que se eliminan de la circulación, lo que conduce a la pérdida de HMWM y trombocitopenia. El frotis periférico también puede mostrar plaquetas grandes y grupos de plaquetas. La EVW por tipo de plaquetas (pseudoev) también puede mostrar un fenotipo similar.
 - e. EVW Tipo 2M: Disminución de la adhesión plaquetaria dependiente de FVW sin pérdida de HMWM. Distribución normal del multímero.
 - f. EVW tipo 2N: disminución de la afinidad de fijación del FVW para el FVIII.
- 3) EVW tipo 3: Ausencia total/niveles indetectables de FVW, generalmente el antígeno del FVW < 3 UI/dl.

Variables preanalíticas en el diagnóstico de la EVW: Los problemas preanalíticos pueden influir significativamente en el diagnóstico de la EVW. El FVW y el FVIII son reactantes de fase aguda que pueden aumentar después de la inflamación, el traumatismo, el estrés, el embarazo y el ejercicio, lo que podría enmascarar un diagnóstico de EVW. Se debe evitar la recolección de muestras en esos momentos, o se deben repetir las pruebas en un momento diferente, antes de descartar un diagnóstico de EVW. La recolección, el transporte y el procesamiento inadecuados de las muestras (p. ej., tubos con llenado insuficiente, muestras o suero coagulados, demora en el transporte de las muestras, transporte de muestras de sangre completa refrigeradas o en hielo, y descongelación ineficaz o ciclos repetidos de congelación y descongelación) pueden comprometer el diagnóstico de la EVW. Lo ideal es que las muestras de FVW se recojan y procesen en el mismo lugar para evitar este tipo de errores.

Pruebas en el repertorio para el diagnóstico de VW:

Pruebas de cribado

Historial hemorrágico y herramienta de evaluación de hemorragias (BAT): Los antecedentes hemorrágicos pueden considerarse como la primera prueba de cribado en la evaluación de un paciente con síntomas hemorrágicos. Una anamnesis cuidadosa relacionada con la naturaleza y la frecuencia de las hemorragias, combinada con los antecedentes familiares, puede dar pistas importantes para el diagnóstico. Las hemorragias mucocutáneas (p. ej., hemorragias cutáneas, sangrado de encías, epistaxis, sangrado de heridas menores, hemorragias gastrointestinales y menorragia) son el patrón típico de sangrado que se observa en la EVW. La hemartrosis es poco frecuente y, por lo general, solo se observa en la EVW tipo 3 cuando el FVIII se reduce significativamente. Las nuevas Guías enfatizan la importancia de los antecedentes hemorrágicos y el uso de las herramientas para la evaluación de hemorragias o BATs. Hay muchas BATs disponibles, como Vicenza, MCMDM-1, gráfico pictórico de evaluación de sangrado (PBAC) y el cuestionario de sangrado pediátrico. En 2010, la ISTH propuso un nuevo BAT que incluía 14 síntomas hemorrágicos, cada uno clasificado de 0 a 4. El rango de referencia para el BAT del ISTH, derivado de 1040 adultos sanos y 330 niños, fue de < 3 para los niños, < 4 para los hombres adultos y < 6 para las mujeres adultas. El principal valor clínico del BAT es excluir un trastorno hemorrágico. En un entorno de baja prevalencia, Tosetto et al encontraron que una puntuación de < 3 tenía un valor predictivo negativo del 99,2%, lo que

esencialmente descarta un trastorno hemorrágico. La ISTH recomienda el uso de un BAT validado para el cribado de pacientes con una baja probabilidad de EVW (por ejemplo, en el ámbito de la atención primaria). Sin embargo, no es fiable utilizar un BAT cuando la probabilidad de EVW es intermedia (p. ej., derivada a un hematólogo) o alta (p. ej., en primer grado relativa con la EVW).

Tiempo de sangrado cutáneo (SBT): La SBT es una prueba in vivo para la hemostasia primaria que fue descrita por primera vez por el médico francés Milian en 1901 y luego modificada por Duke en 1910. La sensibilidad general de la SBT para el diagnóstico de la EVW es de alrededor del 60% (oscilando entre el 21% y el 72%), pero tiene muy buena sensibilidad para la EVW grave (100% para la EVW tipo 3). Por lo tanto, sigue siendo una prueba útil en un entorno de recursos limitados para diferenciar la hemofilia A de la EVW grave.

Analizador de función plaquetaria 200: El analizador de función plaquetaria (PFA100/200, Siemens, Dade Behring, Alemania) es un dispositivo diseñado para medir la hemostasia primaria en condiciones de alto cizallamiento. Registra el tiempo que tarda la sangre entera de un paciente en formar un tapón plaquetario estable en la apertura del dispositivo, ocluyéndolo, y lo registra como el "tiempo de cierre (TC)". El PFA100/200 mostró una sensibilidad general de alrededor del 85-90%, con una sensibilidad de casi el 100% a la EVW tipo 3 y tipo 2. La sensibilidad de la EVW tipo 1 varió en función de los niveles de FVW. El PFA 100/200 es un instrumento caro, que no está disponible en la mayoría de los países de renta baja y media.

TTPA: El TTPA se prolonga solo en casos graves de EVW cuando el FVIII también está reducido, generalmente en la EVW tipo 3, la EVW tipo 2N y algunos subtipos de las tipo 1 y 2, dependiendo de los niveles del antígeno del FVW.

Ensayos específicos de FVW para el diagnóstico de la EVW: La clasificación de la EVW requiere pruebas para cuantificar la proteína del FVW y pruebas para evaluar la función del FVW. El FVW se une a 1) las plaquetas y el colágeno subendotelial para promover la adhesión plaquetaria, 2) las plaquetas activadas para promover la agregación plaquetaria y 3) el FVIII para prevenir su degradación prematura. Los ensayos funcionales para la EVW evalúan una o más de estas funciones del FVW. Una discrepancia entre el ensayo funcional y el ensayo de antígenos sugiere un defecto cualitativo determinado mediante el cálculo de la relación entre el ensayo de actividad de FVW y el antígeno. Se puede utilizar una relación $<0,6$ o $<0,7$ dependiendo de la preferencia del laboratorio.

Antígeno de Von Willebrand (FVW:Ag): El ensayo mide la cantidad total de proteína del FVW presente en la muestra, tanto funcional como no funcional. La metodología más utilizada es la LIA automatizada. También se pueden utilizar métodos basados en ELISA y, más recientemente, CLIA en el instrumento HemosIL Acustar.

Ensayos de actividad del FVW dependiente de plaquetas o GP1b: estos ensayos miden específicamente la capacidad del FVW para unirse a las plaquetas y, por lo tanto, se utilizan para diferenciar entre la EVW de tipo 1 y la EVW de tipo 2A/2B/2M.

- 1) *Ensayo de cofactor de ristocetina (FVW:RCo):* En ausencia de cualquier esfuerzo de cizallamiento, la ristocetina actúa como sustituto para inducir alteraciones en el FVW y causar aglutinación entre las plaquetas y el FVW. El grado de aglutinación es proporcional a la cantidad de FVW funcional presente en el plasma, que puede medirse mediante el uso de un agregador o el aumento de la turbidez mediante métodos automatizados. El ensayo automatizado FVW:RCo ha demostrado una mayor precisión y un mejor límite de detección en comparación con los métodos basados en agregometría.

El ensayo FVW:RCo tiene limitaciones significativas. El ensayo tiene un CV alto inter e intralaboratorio, con el potencial de obtener resultados falsamente altos o falsamente bajos. Además, el límite inferior de detección es alto, generalmente 8-20 UI/dl, lo que plantea un problema

- en la identificación de variantes de tipo 2 cuando los niveles de antígeno del FVW son bajos. Ciertos polimorfismos comúnmente observados en la población africana pueden conducir a niveles falsamente bajos de FVW:RCo incluso en ausencia de EVW.
- 2) **FVW:GP1R:** Este ensayo es similar al FVW:RCo, en el que las plaquetas se sustituyen por micropartículas (perlas de látex en LIA [HemosIL] y partículas magnéticas en CLIA [AcuStar]), recubiertas con fragmentos recombinantes de GP1b de tipo silvestre o no mutado. El ensayo tiene un CV reducido y límites de detección más bajos que el ensayo FVW:RCo original. Su utilidad clínica en la EVW ha sido demostrada en diversos estudios.
 - 3) **FVW:GP1M:** A diferencia de los otros ensayos de FVW dependientes de plaquetas, este ensayo no utiliza ristocetina. Las plaquetas son reemplazadas por fragmentos recombinantes de GP1b con mutaciones de ganancia de función a los que el FVW se unirá “espontáneamente”. FVW:GP1bM puede medirse mediante LIA (ensayo FVW Ac de Siemens Innovance) o incluso mediante algunos métodos no comerciales basados en ELISA. La prueba tiene buena reproducibilidad, un límite de detección bajo y da información comparable a los ensayos FVW:RCo y FVW:GP1bR para el diagnóstico de la EVW tipo 2.
 - 4) **FVW:Ab:** Este ensayo se basa en anticuerpos monoclonales dirigidos contra el sitio de fijación de las plaquetas (es decir, GP1b) del FVW. Aunque no es un verdadero ensayo funcional, puede considerarse como un sustituto de la actividad de fijación plaquetaria. Varios estudios han demostrado la utilidad del ensayo automatizado FVW:Ab (HemosIL FVW Activity, IL, Bedford, Massachusetts) en la evaluación inicial y la subclasificación de la EVW.

Las nuevas Guías recomiendan el uso de ensayos más nuevos de la actividad del FVW dependiente de plaquetas, como el FVW:GP1bR y el FVW:GP1bM en lugar del FVW:RCo (automatizado o no automatizado).

Ensayo de fijación al colágeno (FVW:CB): El FVW:CB evalúa la capacidad del FVW para unirse al colágeno y depende de la presencia de HMW y de un sitio de fijación al colágeno intacto. Se puede utilizar como sustituto del análisis de multímeros para diferenciar el tipo 2A del tipo 2M. La relación entre el FVW:CB y el antígeno es normal en el tipo 2M y reducida en el tipo 2A/2B. Se ha demostrado que el ensayo FVW:CB es más eficaz para distinguir el EVW tipo 1 del tipo 2 (excepto 2M) que el ensayo FVW:RCo. Se puede utilizar para distinguir la EVW grave de tipo 1 de la tipo 3 debido a su mejor límite de detección. El FVW:CB puede medirse mediante varios ensayos ELISA comerciales y no comerciales y, más recientemente, mediante el método CLIA.

Aglutinación plaquetaria inducida por ristocetina (RIPA): La respuesta de aglutinación a la ristocetina en dosis normales (>1 mg/ml) y bajas (<1 mg/ml) es una de las pruebas utilizadas en el diagnóstico de la EVW. Si bien se puede observar una respuesta ausente en los subtipos de EVW tipo 3 y grave, su principal utilidad radica en la identificación de la EVW tipo 2B y tipo plaqueta, donde la respuesta se observa incluso a dosis bajas de ristocetina. La diferenciación de la EVW de tipo 2B y de tipo plaquetario puede lograrse mediante estudios de provocación con crioprecipitado o de mezcla con plasma normal y/o plaquetas de control. Si están disponibles, se deben utilizar pruebas genéticas.

Ensayo de fijación a FVIII: Esta prueba evalúa la capacidad del FVW para unirse al FVIII. El ensayo reducido de FVW:FVIII B y la relación reducida de FVW:FVIII B a antígeno del FVW sugiere EVW tipo 2 N.

Análisis de multímeros: La evaluación de multímeros FVW es una prueba establecida en la evaluación de la EVW, principalmente para diferenciar entre el tipo 2A y el tipo 2M. Sin embargo, la prueba es muy laboriosa, técnicamente exigente y está desapareciendo rápidamente de la mayoría de los laboratorios.

Ensayo de desmopresina: El Vicensa tipo 1C es un subtipo de EVW tipo 1 asociado con un aumento del aclaramiento de FVW. Estos pacientes muestran una respuesta exagerada a la desmopresina, pero con una esperanza de vida más corta. En estos pacientes también se observa una relación más alta de lo normal entre la propéptido del FVW al antígeno del FVW.

Tabla 31. Fenotipo de laboratorio de diferentes subtipos de EVW

Tipo de EVW	FVIII	Antígeno de Von Willebrand (FVW:Ag)	Ensayos de actividad del FVW dependiente de plaquetas*	Ensayo de fijación al colágeno (FVW:CB)	Ensayo de fijación al factor VIII (FVW:FVIII B)	Ensayo de FVW plaquetario/relación Ag*	Relación FVW:CB/Ag*	Análisis de multímeros	Aglutinación plaquetaria inducida por ristocetina (RIPA)	Comentarios
Tipo 1 EVW	Reducido o normal	reducido	reducido	reducido	Normal	Normal	Normal	Normal	Reducido o normal	Los niveles de FVW <30 UI/dl o los niveles de FVW 30-50 IUZ dl con sangrado anormal son EVW tipo 1 según las nuevas Guías. Alternativamente, los niveles de FVW de 30 a 50 UI/dl pueden clasificarse como FVW bajo con riesgo leve de sangrado.
Tipo 2A EVW	Reducido o normal	Reducido o normal	reducido	reducido	Normal	Reducido	Reducido	High to intermediate multimers lost	Por lo general, reducido	Los tipos 2A y 2B se pueden distinguir mediante RIPA.
Tipo 2B EVW	Reducido o normal	Reducido o normal	reducido	Reducido	Normal	Reducido	Reducido	Pérdida de multímeros HMW	Respuesta observada a dosis bajas de ristocetina	Tipo 2B vs plaquetas distinguidas por estudios de mezcla RIPA o pruebas genéticas
Tipo 2M EVW	Reducido o normal	Reducido o normal	reducido	reducido	Normal	Reducido	Usually normal	Normal	Reducido o normal	La EVW de tipo 2M con defecto en la fijación del colágeno puede tener una relación FVW:-CBA/ag reducida
Tipo 2N EVW	reducida (relación FVIII/antígeno del FVW generalmente <0,7)	Por lo general, normal*	Por lo general, normal*	Por lo general, normal*	Reducido FVW: Se reduce la relación de AG FVIII BZ «0.7)	Normal	Normal	Normal	Normal	La EVW de tipo 2M con defecto en la fijación del colágeno puede tener una relación FVW:-CBA/ag reducida
Tipo 3 EVW	Reducido, generalmente 1-10 UI/dl	Notablemente reducido <2 UI/dl	Notablemente reducido	Notablemente reducido	NA	NA	NA	Ausente	Ausencia de respuesta que se corrija con la adición de crioprecipitado	No se deben calcular las proporciones de actividad de FVW a antígeno

*Los ensayos de FVW dependientes de plaquetas incluyen FVW:RCo, FVW:GP1 M, FVW:GP1 R o FVW:Ab.

#FVW: Los ensayos de Ag o de actividad pueden reducirse en la EVW de tipo 2N, cuando se observa en un estado heterocigoto compuesto con mutaciones nulas/cuantitativas asociadas en el FVW

Para determinar un defecto cualitativo, se calcula la relación entre el ensayo de actividad de FVW y el ensayo de antígenos. Se puede utilizar una proporción inferior a 0,6 o 0,7 (dependiendo de la preferencia del laboratorio) para clasificar la EVW tipo 2.

Diagnóstico de la enfermedad de von Willebrand en un entorno de escasos recursos: La EVW es el trastorno hemorrágico hereditario más común, con una prevalencia estimada del 1%. Una estimación conservadora de la prevalencia es de 100 por millón de personas, y alrededor del 80% de ellas se encuentran en el mundo en desarrollo. Solo el 2,6% del total de casos de EVW notificados proceden de Asia meridional y África subsahariana, aunque contribuyen con ~40% de la población total del mundo. La enfermedad de Von Willebrand se divide en tres subtipos principales. La EVW de tipo 3 se debe a una deficiencia cuantitativa grave de FVW debido a niveles indetectables de FVW. La EVW tipo 1 se debe a una deficiencia cuantitativa parcial. La EVW tipo 2 es una deficiencia cualitativa y se subdivide a su vez en cuatro tipos: 2A, 2B, 2M y 2N. Existe una gran disparidad en la distribución de los subtipos de EVW en diferentes partes del mundo. En la mayoría de los países de renta alto y media alta (PRA y PRMA), el tipo 1 es el subtipo más común (60-80%), seguido del tipo 2. La enfermedad de Von Willebrand tipo 3 es poco frecuente y suele constituir menos del 5% de los casos. Por el contrario, la frecuencia de la EVW tipo 3 es mayor en muchos países de renta bajos y media baja (PRB y PRMB), llegando al 64% en algunas partes, lo que se resume muy bien en un artículo de revisión de Favalaro et al. Esta sorprendente diferencia en el patrón de distribución puede atribuirse al hecho de que la mayoría de los datos de los países de renta baja y media proceden de registros hospitalarios, en los que sólo los pacientes más graves pueden presentarse y los más leves no se detectan. Otro factor que contribuye es el aumento de la consanguinidad y los matrimonios dentro de comunidades pequeñas, lo que aumenta la incidencia de la EVW tipo 3, una enfermedad hereditaria autosómica recesiva. Hay un considerable subregistro de la EVW, en particular en los países de renta baja y media. Stonebraker et al reportaron que la prevalencia media de la EVW en HIC, UMIC, LMIC y LIC fue de 60,3, 12,6, 2,5 y 1,1 por millón, respectivamente, lo que fue significativamente diferente en relación con la clasificación de ingresos, a menudo <1 por millón en muchos países de LIC. Sin embargo, la variabilidad en la prevalencia de la EVW tipo 3 es menos marcada, lo que sugiere que los pacientes con EVW tipo 3 fueron diagnosticados con más frecuencia que otros subtipos en estos países.

Obstáculos en el diagnóstico de la enfermedad de Von Willebrand en entornos de escasos recursos

Baja prioridad para la atención de la salud y los trastornos de la coagulación: A la atención de la salud se le asigna una prioridad baja, social y políticamente, en la mayoría de los países en desarrollo, donde solo se asigna del 1 al 2% del producto interno bruto a la atención médica. De este presupuesto limitado, las cuestiones más apremiantes de importancia para la salud pública, como las enfermedades infecciosas, la mortalidad infantil y materna y la malnutrición, tienen prioridad sobre afecciones relativamente más raras, como los trastornos hemorrágicos hereditarios, incluida la EVW.

Escaso acceso a los servicios de salud y altos costos de la atención de salud: En muchos países en desarrollo, la infraestructura de atención de salud está poco desarrollada, con menos hospitales que no son fácilmente accesibles para todos. Esta podría ser la razón de la mayor incidencia de EVW grave en los países en desarrollo, donde solo las hemorragias más graves acuden al hospital. El alto costo de las investigaciones, la imposibilidad de pagar las distancias de viaje involucradas, la necesidad de dejar de trabajar para las investigaciones y la cobertura mínima del seguro médico contribuyen al diagnóstico insuficiente de los casos leves de EVW.

Falta de disponibilidad de reactivos para la FVW y falta de infraestructura de laboratorio: Las nuevas Guías sobre la EVW de 2021 sugieren el uso de nuevos ensayos de actividad dependiente de plaquetas, como FVW:GP1 R y FVW:GP1 M, para el diagnóstico de la EVW. Sin embargo, estos kits de ensayo no están disponibles ni se utilizan en la mayoría de los países de renta media baja y baja. Otros problemas, como el retraso en el suministro de reactivos, el mantenimiento inadecuado de las condiciones de transporte, la baja remisión de muestras, la baja vida útil de los reactivos y el menor número de centros de referencia, también contribuyen a la escasez de instalaciones de prueba de FVW.

Superar los obstáculos en el diagnóstico de la enfermedad de Von Willebrand en entornos de escasos recursos

Mejorar la identificación de los casos de EVW mediante un BAT y el uso de pruebas de detección baratas y de fácil acceso: Las pruebas de detección de la EVW incluyen el tiempo de sangrado cutáneo (SBT) y el tiempo de cierre en el analizador de función plaquetaria (PFA-200). En nuestro centro, analizamos una gran cohorte de pacientes (n = 444) con FVW reducido <50 UI/dl entre los pacientes evaluados por sospecha de trastorno hemorrágico durante un período de 7 años, desde enero de 2012 hasta marzo de 2019. La mayoría de los pacientes pertenecían al fenotipo tipo 3 (48,3%) de acuerdo con otros estudios publicados en la India. Los pacientes también fueron subclasificados según la gravedad en función de los niveles de FVW:RCO como severos (<10%), moderados (10-30%) y leves (>30%), según la clasificación propuesta por Federici et al (2014). La sensibilidad general del SBT y el PFA-200 fue del 72% y del 95%, como se muestra en la Figura 19. Es importante destacar que el SBT tuvo una sensibilidad del 100% en la identificación de la EVW tipo 3 y una sensibilidad muy alta del 92% en la EVW grave, que incluyó casos graves de tipo 1 y tipo 2. El SBT fue comparable al PFA-200 en ambas categorías. En general, se observó una puntuación ISTH BAT anormal en el 75% de los casos de EVW.

Desde la llegada del PFA-200 en 1995, numerosas publicaciones apoyan su uso para el diagnóstico y seguimiento de la EVW, y ha reemplazado al tiempo de sangrado como prueba de detección de la EVW en la mayoría de los países desarrollados. Todas las Guías también desaconsejan el uso del SBT en el diagnóstico de la EVW. La sensibilidad de SBT y PFA-100/200 es similar para los trastornos de la función plaquetaria y para la EVW grave. Aunque el PFA-100/200 tiene una buena sensibilidad a la EVW, es un instrumento caro que la mayoría de los laboratorios de los países en desarrollo no pueden utilizar y, por lo tanto, no puede ser un sustituto del SBT en este contexto. La mayoría de los casos de EVW en los países de renta baja y media baja presentan una enfermedad de Von Willebrand grave, en la que a menudo se pasa por alto el diagnóstico o las personas son diagnosticadas erróneamente como hemofilia A. En entornos con recursos limitados, donde la infraestructura de laboratorio, las instalaciones y la disponibilidad de reactivos son limitados, el tiempo de sangrado es una prueba de detección rentable para identificar la EVW grave en pacientes con antecedentes hemorrágicos o familiares significativos. Los casos potenciales deben identificarse preferiblemente utilizando un BAT, como el ISTH BAT. Es importante tener en cuenta que la SBT solo debe usarse en pacientes con sospecha de un trastorno hemorrágico y no como prueba de detección preoperatoria o para evaluar la respuesta a los fármacos antiplaquetarios. Además, los casos más leves de EVW pueden tener un SBT normal y pueden pasarse por alto.

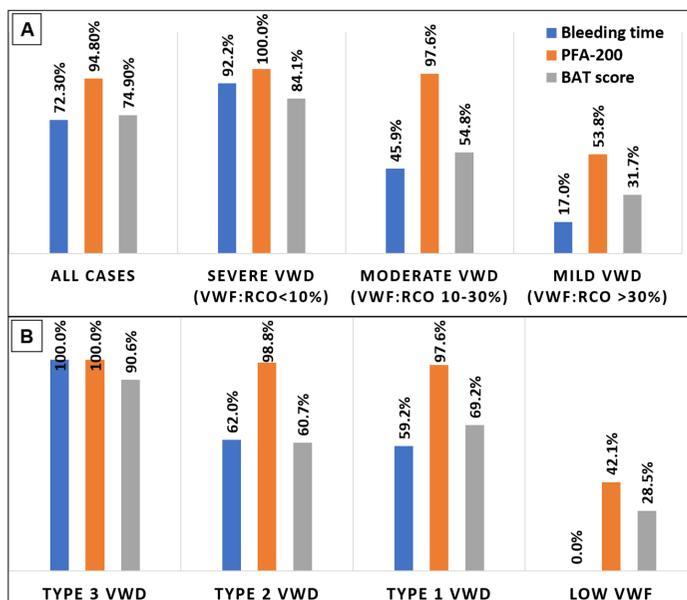


Figura 19. La sensibilidad general del SBT y el PFA-200

Enfoque rentable para realizar ensayos de FVW: Uno de los principales contratiempos en la realización de pruebas de EVW es que la mayoría de los kits comerciales son caros y no son accesibles para la mayoría de los laboratorios de los países de renta baja y media. Sin embargo, muchas de las pruebas para la EVW, como el antígeno FVW, el Ensayo de fijación al colágeno y los ensayos de fijación al FVIII, también se pueden realizar mediante métodos manuales internos basados en ELISA que disminuyen considerablemente el costo. El uso de un panel minimalista que comprende SBT, TTPA, FVIII, antígeno del FVW y FVW:CBA, puede identificar la mayoría de los subtipos de EVW (excepto el tipo 2M de EVW) y se puede hacer un diagnóstico provisional de la EVW con una confianza razonable. El diagnóstico del tipo 2M requiere un ensayo de actividad dependiente de plaquetas, como el ensayo del cofactor de la ristocetina, y es posible que se pase por alto si se utiliza este panel solo.

El ensayo manual de cofactor de ristocetina por agregometría es una prueba muy laboriosa y que requiere mucho tiempo, con un alto CV y un límite de detección muy alto. La automatización de FVW:RCo ha mejorado notablemente su CV y su límite inferior de detección. Otra ventaja de la automatización es el uso de volúmenes más bajos de muestras y reactivos (la ristocetina es un reactivo caro), lo que reduce el costo por prueba. Sin embargo, el uso continuado de esta prueba requiere suficientes derivaciones de pacientes y solicitudes de pruebas. Se han publicado pocos estudios sobre el uso de métodos no comerciales basados en ELISA para FVW:GP1 bR y FVW:GP1 bM, que también son opciones que se pueden explorar. Sin embargo, esto requiere experiencia técnica, disponibilidad de reactivos y personal motivado.

Dado que las pruebas manuales pueden estar asociadas con errores, es necesario seguir estrictas medidas de control de calidad, como la corrida de pruebas duplicadas o triplicadas en las corridas de ELISA, la corrida de muestras normales (PNP) y anormales en paralelo con cada corrida, y la participación en el programa EGAS para garantizar la precisión de los resultados.

Recientemente, el Consejo Indio de Investigación Médica (ICMR)-Instituto Nacional de Inmunohematología (NIIH) de Mumbai ha desarrollado un dispositivo basado en tarjeta de punto de atención para el diagnóstico de EVW grave y hemofilia grave/moderada con niveles de FVIII y FVW inferiores a 5 UI/dl. Esta es una prueba rápida y rentable que se puede utilizar en áreas de divulgación para un diagnóstico provisional de hemofilia A grave/moderada y EVW tipo 3. Actualmente, el dispositivo está a la espera de estudios de validación antes de su uso en el mercado.

Conclusión: Se estima que el 80% de los casos de EVW provienen de países en desarrollo. En muchos países de renta baja y media baja, más del 99% de los casos de EVW no se identifican ni se notifican. Es posible que las Guías aplicables para el resto del mundo no sean apropiadas en este entorno debido a la falta de reactivos, centros de capacitación e infraestructura de laboratorio. El primer paso para mejorar la notificación de casos es aumentar la concienciación sobre el uso de herramientas sencillas, desde el uso de BATs para identificar a los pacientes con posibles trastornos hemorrágicos, hasta el cribado de pacientes sospechosos mediante pruebas fácilmente disponibles como la SBT y la TTPA. Se pueden realizar pruebas adicionales utilizando pruebas de antígenos FVW y/o CBA basadas en ELISA, o derivarlas a un centro terciario para pruebas más especializadas siempre que sea posible.

Referencias

- Appel IM, Grimminck B, Geerts J, Stigter R, Cnossen MH, Beishuizen A. Dependencia de la edad de los parámetros de coagulación durante la infancia y la pubertad. *J Thromb Haemost* 2012; 10(11): 2254-2263.
- Attard C, van der Straaten T, Karlaftis V, Monagle P, Ignjatovic V. Hemostasia del desarrollo: diferencias específicas de la edad en los niveles de proteínas hemostáticas. *J Thromb Haemost* 2013; 11(10): 1850-1854.
- Baker P, Platton S, Gibson C, Gray E, Jennings I, Murphy P, Laffan M. Guías sobre los aspectos de laboratorio de los ensayos utilizados en la hemostasia y la trombosis. *BrJ Haematol* 2020; 191(3): 347-362.
- Balluet R, Bourguignon A, Geay-Baillat MO, Le Quellec S. [Discrepancias en los niveles de FVII:C en función de la tromboplastina: sobre un caso]. *Ann Biol Clin (Paris)* 2020; 78(2): 198-200.

Bowyer AE, Goodfellow KJ, Seidel H, Westhofen P, Stufano F, Goodeve A, Kitchen S, Makris M. Evaluación de un ensayo semiautomatizado de multímero factorial de von Willebrand, el multímero Hydragel 5 von Willebrand, por dos centros europeos. *Res Pract Thromb Haemost* 2018; 2(4): 790-799.

Casonato A, Galletta E, Sarolo L, Daidone V. Enfermedad de von Willebrand tipo 2N: caracterización y dificultades diagnósticas. *Hemofilia* 2018; 24(1): 134-140.

Casonato A, Pontara E, Zerbinati P, Zucchetto A, Girolami A. La evaluación de la actividad de fijación al factor VIII del factor de von Willebrand mediante un método ELISA: Significación e implicaciones prácticas. *Am J Clin Pathol* 1998; 109(3): 347-352.

Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio. Determinación de las actividades de los factores de coagulación mediante el ensayo de coagulación en una etapa, 2ª edición. Norma CLSI H48. 2016. <https://clsi.org/standards/products/hematology/documents/h48/>.

Di Felice G, Vidali M, Parisi G, Pezzi S, Di Pede A, Deidda G, D'Agostini M, Carletti M, Ceccarelli S, Porzio O. Intervalos de referencia para los parámetros de coagulación en la hemostasia del desarrollo desde la infancia hasta la adolescencia. *Diagnóstico (Basilea)* 2022; 12(10): 2552.

Durda MA, Wo l berg AS, Kerlin BA. Estado del arte en la evaluación de laboratorio del factor XIII. *Transfus Apher Sci* 2018; 57(6): 700-704.

Favaloro EJ. Ensayo de fijación al colágeno para el factor de von Willebrand (FVW:CBA): La detección de la enfermedad de von Willebrands (EVW) y la discriminación de los subtipos de EVW dependen de la fuente de colágeno. *Thromb Haemost* 2000; 83(1): 127-135.

Favaloro EJ. Utilidad clínica del PFA-100. *Semin Thromb Hemost* 2008; 34(8): 709-733.

Favaloro EJ. Enfermedad de Von Willebrand: diagnóstico local y tratamiento de un trastorno hemorrágico distribuido globalmente. *Semin Thromb Hemost* 2011; 37(5): 440-455.

Favaloro EJ. Utilidad del Ensayo de fijación al colágeno del factor de von Willebrand en el diagnóstico de la enfermedad de von Willebrand. *Am J Hematol* 2017; 92(1): 114-118.

Favaloro EJ. El papel del Ensayo de fijación al colágeno del factor de von Willebrand (FVW:CB) en el diagnóstico y tratamiento de la enfermedad de von Willebrand (EVW) y mucho más: una historia completa de 36 años. *Semin Thromb Hemost* 2024; 50(1): 43-80.

Favaloro EJ, Dean E, Arunachalam S. Evaluación del rendimiento de los ensayos contemporáneos e históricos del factor de von Willebrand (FVW) en la identificación de laboratorio de la enfermedad de von Willebrand (EVW): la experiencia de Australasia. *Semin Thromb Hemost* 2022; 48(6): 711 -731.

Favaloro EJ, Pasalic L. Diagnóstico de laboratorio de la enfermedad de von Willebrand en la era de las nuevas Guías: Consideraciones basadas en la geografía y los recursos. *Res Pract Thromb Haemost* 2023; 7(5): 102143.

Federici AB, Bucciarelli P, Castaman G, Mazzucconi MG, Morfini M, Rocino A, Schiavoni M, Peyvandi F, Rodeghiero F, Mannucci PM. La puntuación de sangrado predice los resultados clínicos y la terapia de reemplazo en adultos con enfermedad de von Willebrand. *Sangre* 2014; 123(26): 4037-4044.

Flood VH, Gill JC, Friedman KD, Christopherson PA, Jacobi PM, Hoffmann RG, Montgomery RR, Haberichter SL. La fijación del colágeno proporciona una detección sensible para la variante de la enfermedad de von Willebrand. *Clin Chem* 2013; 59(4): 684-691.

Fogarty H, Doherty D, O'Donnell JS. Nuevos avances en la enfermedad de von Willebrand. *BrJ Haematol* 2020; 191(3): 329-339.

Fu M, Liu J, Xing J, Dai Y, Ding Y, Dong K, Zhang X, Yuan E. Intervalos de referencia para los parámetros de coagulación en mujeres embarazadas y no embarazadas. *Sci Rep* 2022; 12(1): 1519.

James PD, Connell NT, Ameer B, Di Paola J, Eikenboom J, Giraud N et al. ASH I STH NHF WFH 2021 Guías sobre el diagnóstico de la enfermedad de von Willebrand. *Sangre Adv* 2021; 5(1): 280-300.

Karimi M, Peyvandi F, Naderi M, Shapiro A. Diagnóstico de la deficiencia del factor XIII: desafíos y herramientas. *IntJ Lab Hematol* 2018; 40(1): 3-11.

Kohler HP, Ichinose A, Seitz R, Ariens RA, Muszbek L. Diagnóstico y clasificación de las deficiencias del factor XIII. *J Thromb Haemost* 2011; 9(7): 1404-1406.

Kujovich JL. Coagulopatía en la enfermedad hepática: un acto de equilibrio. *Hematología Am Soc Hematol Educ Program* 2015; 2015: 243-249.

Laffan MA, Lester W, O'Donnell JS, Will A, Tait RC, Goodeve A, Millar CM, Keeling DM. El diagnóstico y el tratamiento de la enfermedad de von Willebrand: una guía de la Organización de Médicos del Centro de Hemofilia del Reino Unido aprobada por el Comité Británico de Estándares en Hematología. *British J Haematol* 2014; 167(4): 453-465.

Maas C, Renne T. Factor XII de coagulación en trombosis e inflamación. *Sangre* 2018; 131(17): 1903-1909.

Mumford AD, Ackroyd S, Alikhan R, Bowles L, Chowdary P, Grainger J, Mainwaring J, Mathias M, O'Connell N. Guía para el diagnóstico y tratamiento de los trastornos raros de la coagulación: una guía de la Organización de Médicos del Centro de Hemofilia del Reino Unido en nombre del Comité Británico de Estándares en Hematología. *Br J Haematol* 2014; 167(3): 304-326.

Nair SC, Viswabandya A, Srivastava A. Diagnóstico y tratamiento de la enfermedad de von Willebrand: una perspectiva de país en desarrollo. *Semin Thromb Hemost* 2011; 37(5): 587-594.

Nesbitt IM, Goodeve AC, Guilliatt AM, Makris M, Preston FE, Peake IR. Caracterización de la enfermedad de von Willebrand tipo 2N mediante técnicas fenotípicas y moleculares. *Thromb Haemost* 1996; 75(6): 959-964.

Palla R, Peyvandi F, Shapiro AD. Trastornos hemorrágicos raros: diagnóstico y tratamiento. *Sangre* 2015; 125(13): 2052-2061.

Platton S, Baker P, Bowyer A, Keenan C, Lawrence C, Lester W, Riddell A, Sutherland M. Guía para el diagnóstico de laboratorio y el seguimiento de la enfermedad de von Willebrand: una guía conjunta de la Organización de Médicos del Centro de Hemofilia del Reino Unido y la Sociedad Británica de Hematología. *Br J Haematol* 2024; 204(5): 1714-1731.

Rodgers SE, Lerda NV, Favalaro EJ, Duncan EM, Casey GJ, Quinn DM, Hertzberg M, Lloyd JV. Identificación de la enfermedad de von Willebrand tipo 2N (Normandía) en Australia: una investigación interlaboratorios utilizando diferentes métodos. *Am J Clin Pathol* 2002; 118(2): 269-276.

Sadler JE, Mannucci PM, Berntorp E, Bochkov N, Boulyjenkov V, Ginsburg D, Meyer D, Peake I, Rodeghiero F, Srivastava A. Impacto, diagnóstico y tratamiento de la enfermedad de von Willebrand. *Thromb Haemost* 2000; 84(2): 160-174.

Salazar E, Long TA, Smock KJ, Wool GD, Rollins-Raval M, Chen D et al. Análisis del Programa de Pruebas de Aptitud Factorial del Colegio de Patólogos Americanos von Willebrand. *Semin Thromb Hemost* 2022; 48(6): 690-699.

Seidzadeh O, Peyvandi F, Mannucci PM. Enfermedad de Von Willebrand tipo 2N: una actualización. *J Thromb Haemost* 2021; 19(4): 909-916.

Sevenet PO, Kaczor DA, Depasse F. Deficiencia del factor VII: desde lo básico hasta el diagnóstico de laboratorio clínico y el manejo del paciente. *Clin Appl Thromb Hemost* 2017; 23(7): 703-710.

Srivastava A, Rodeghiero F. Epidemiología de la enfermedad de von Willebrand en los países en desarrollo. *Semin Thromb Hemost* 2005; 31(5): 569-576.

Stonebraker JS, Iorio A, Lavin M, Rezende SM, Srivastava A, Pierce GF, Coffin D, Tootoonchian E, Makris M. Prevalencia reportada de la enfermedad de von Willebrand en todo el mundo en relación con la clasificación de ingresos. *Hemofilia* 2023; 29(4): 975-986.

Toulon P, Berruyer M, Brionne-François M, Grand F, Lasne D, Telion C, Arcizet J, Giacomello R, De Footer N. Dependencia de la edad para los parámetros de coagulación en poblaciones pediátricas. Resultados de un estudio multicéntrico destinado a definir los rangos de referencia específicos por edad. *Thromb Haemost* 2016; 116(1): 9-16.

Vangenechten I, Mayger K, Smejkal P, Zapletal O, Michiels JJ, Moore GW, Gadisseur A. Un análisis comparativo de diferentes ensayos automatizados de actividad de fijación al factor Ib del factor de von Willebrand en pacientes con enfermedad de von Willebrand bien tipificados. *J Thromb Haemost* 2018; 16(7): 1268-1277.

Wakeman L, Munro R, Dorward N, Benton A, Gibb A, Al-Ismael S. Nuevos rangos de referencia de ensayos de coagulación para adultos sanos utilizando el moderno coagulómetro Sysmex CA-1500. *Sangre* 2005; 106(11): 4025.

Woodhams B, Girardot O, Blanco MJ, Coles G, Gourmelin Y. Estabilidad de las proteínas de coagulación en plasma congelado. *Fibrinólisis de coágulos sanguíneos* 2001; 12(4): 229-236.

Zheng C, Zhang B. Deficiencia combinada de los factores de coagulación V y VIII: una actualización. *Semin Thromb Hemost* 2013; 39(6): 613-620.

Zhao Y, Feng G, Feng L. Efectos del tiempo de almacenamiento preanalítico, la temperatura y los tiempos de congelación-descongelación en las actividades de los factores de coagulación en plasma anticoagulado con citrato. *Ann Transl Med* 2018; 6(23): 456.