

**- LIATEST® VWF:Ag**

Determinación inmunoturbidimétrica del factor von Willebrand

- Contenido del kit:
 - 4 viales de Reactivo 1 (Buffer)
 - 4 viales de Reactivo 2 (Latex)
 - 4 viales de Reactivo 3 (Latex Diluent)

(REF 00518)



Julio 2011

Español 6

1/ UTILIZACIÓN DEL KIT

Dosificación antigénica del factor von Willebrand (VWF:Ag) mediante un método inmunoturbidimétrico en los aparatos de la línea STA®, que pueden utilizar estos reactivos.

2/ INFORMACIÓN SOBRE EL FACTOR VON WILLEBRAND

- Bioquímica del factor von Willebrand**
El factor von Willebrand (VWF) es una glicoproteína multimérica con un peso molecular que puede alcanzar los 15 000 kDa. Está compuesta por la asociación de n protómeros idénticos, que a su vez están formados por dos subunidades similares, cada una con un peso molecular de unos 270 kDa (10). El VWF se sintetiza en las células endoteliales y en los megacariocitos (2). Una vez liberado a la circulación por las células endoteliales, puede sufrir la acción proteolítica de la plasmina o ser incluido por endocitosis en los gránulos α de las plaquetas.
- Funciones del factor von Willebrand**
El factor von Willebrand interviene en la hemostasia primaria y en la coagulación.
El VWF desempeña un papel determinante en la adhesión de las plaquetas al subendotelio vascular y en la formación de trombos por su unión a los complejos glucoprotéicos (GP) Ib/IX y IIb/IIIa (10).
En la coagulación, el VWF interviene como proteína portadora del factor VIII (factor antihemofílico A), al que protege contra la degradación (3).
- Enfermedad de Willebrand**
La enfermedad de Willebrand es la anomalía constitucional más frecuente de la hemostasia. Desde el punto de vista clínico, se caracteriza principalmente por hemorragias mucosas y cutáneas (8). Se diferencian tres grandes tipos de enfermedad de Willebrand (7, 10):
 - el tipo 1 corresponde a un déficit cuantitativo de VWF y su transmisión es autosómica dominante; es el tipo más frecuente (70 a 80 % de los casos de enfermedad de Willebrand);
 - el tipo 2 agrupa las anomalías cualitativas del VWF y normalmente la anomalías está relacionada con la estructura multimérica; en ese caso, la transmisión es autosómica dominante o recesiva;
 - el tipo 3 se caracteriza por la ausencia casi completa de VWF en el plasma y en los compartimentos celulares; su transmisión es autosómica recesiva.

Test	Tipo 1	Tipo 2A	Tipo 2B	Tipo 2N	Tipo 3
VWF:Ag	↓	↓	±↓	Normal	Ausente
VWF:Rco*	↓	↓↓↓	↓ o ↓↓	Normal	Ausente
Agregación con ristocetina					
Dosis alta	Normal o ↓	↓↓↓ o ausente	Normal	Normal	Ausente
Dosis baja**	Ausente	Ausente	Presente	Ausente	Ausente
Factor VIII	Normal o ±↓	Normal o ±↓	Normal o ±↓	↓↓	↓↓↓

* VWF:Rco: actividad cofactor de la ristocetina del factor von Willebrand
** En el sujeto normal no se produce agregación plaquetaria en presencia de una dosis baja de ristocetina

Principales tipos de enfermedad de Willebrand (8)

- Además, los déficits en VWF pueden estar asociados a diversos estados clínicos (mieloma, linfoma, lupus eritematoso diseminado, hipotiroidismo, etc.). En estos casos se habla de enfermedad de Willebrand adquirida (4).
El VWF es una proteína de la inflamación, por lo que sus valores aumentan cuando el endotelio vascular está afectado (período postoperatorio, infección, cáncer, afección hepática o renal, etc.) (5).
Así mismo, ciertos estudios demuestran que los niveles altos de VWF están asociados a alteraciones cardiovasculares, en especial a ciertos tipos de infarto de miocardio (9).

3/ PRINCIPIO DEL TEST

Esta determinación se basa en el aumento de la turbidez de una suspensión de micropartículas de látex medida mediante fotometría. Cuando las microesferas de látex, sobre cuya superficie se han fijado por covalentemente anticuerpos específicos del VWF, se mezcla con el plasma, cuyo nivel de VWF se desea estudiar, la reacción antígenoanticuerpo que ocurre provoca la aglutinación de las microesferas. Este fenómeno conduce al aumento de la turbidez de la mezcla de reacción y por lo tanto a un aumento de la absorbancia del medio. La magnitud de este aumento es función de la cantidad del VWF contenida en el plasma en estudio.

4/ COMPOSICIÓN DEL KIT

Cada estuche de STA® - Liatest® VWF:Ag contiene una hoja con código de barras. Este código de barras contiene las siguientes informaciones: número de lote, referencia del kit, referencia del reactivo, fecha de caducidad.

- Reactivo 1:** frasco con 5 ml de tampón de glicina.
- Reactivo 2:** frasco con 2 ml de suspensión de micropartículas de látex recubiertas con anticuerpos de conejo anti-VWF y posteriormente estabilizadas (con albúmina bovina).
- Reactivo 3:** frasco con 4 ml. La solución contiene glicina para la dilución del reactivo de látex (Reactivo 2).

Estos reactivos contienen azida sódica (< 1 g/l) como conservante.
Es preciso eliminar con precaución los reactivos que contienen azida sódica. Si estas soluciones se vierten en el desagüe del lavabo, enjuagar con abundante agua para evitar la formación de azidas metálicas que, si están concentradas, pueden provocar explosiones.
Algunos reactivos de este kit contienen productos de origen humano y/o animal. Cuando se ha utilizado plasma humano en la preparación de estos reactivos, se excluye previamente la presencia del antígeno HBs, de los anticuerpos anti-HCV, anti-HIV 1 y anti-HIV 2 con los correspondientes análisis. Sin embargo, ningún test puede garantizar de manera absoluta la ausencia de agentes infecciosos. Por eso, estos reactivos de origen biológico han de ser manipulados con las precauciones habituales, ya que se trata de productos potencialmente infecciosos.

5/ PRECAUCIONES

El estuche intacto se debe conservar a 2-8 °C. Estos reactivos se destinan exclusivamente a un uso *in vitro* y deben ser manipulados por personal autorizado del laboratorio. Utilizar únicamente reactivos de un mismo kit o de un mismo lote. Los residuos se eliminarán con arreglo a la reglamentación local vigente.
El estuche STA® - Liatest® VWF:Ag esta diseñado especialmente para los aparatos de la línea STA® que pueden utilizar estos reactivos. Antes de cualquier utilización, leer con atención el "Manual del Operador" del instrumento utilizado. Tener cuidado en el manejo de estos reactivos y las muestras.

6/ OBTENCIÓN Y TRATAMIENTO DE LA MUESTRA

- La obtención de la muestra debe ajustarse a las recomendaciones para las pruebas de hemostasia.
- Obtención de sangre en solución de citrato trisódico 0,109 M: 1 vol. de citrato por 9 vol. de sangre.
 - Centrifugación: 15 minutos a 2000-2500 g.
 - Conservación del plasma: 8 horas a 20 ± 5 °C
24 horas a 2-8 °C
1 mes a -20 °C. Atemperar la muestra a 37 °C el tiempo necesario y suficiente para que la descongelación sea completa.
No congelar nuevamente.

7/ CONSERVACIÓN Y PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

Conservados a 2-8 °C en su embalaje original, los reactivos son estables hasta la fecha de caducidad indicada en el estuche.

- Reactivo 1**
Antes de abrir, dejar que el Reactivo (R1) se establezca durante 15 minutos a temperatura ambiente (18-25 °C). Homogeneizar, luego añadir un STA® - mini Reducer nuevo (REF 00797) y el tapón perforado. Estabilidad tras la reconstitución con STA® - mini Reducer y el tapón perforado: 15 días en STA Compact® y STA-R®.
- Reactivo 2**
Vierta todo el contenido de un vial de Reactivo 3 (R3) en un vial de Reactivo 2 (R2) del mismo kit. Asegúrese de que se vierte todo el Reactivo 3. Agite el frasco de Reactivo 2 para mezclar bien sin crear burbujas. Dejar que el Reactivo se establezca durante 15 minutos a temperatura ambiente (18-25 °C). Homogeneizar, luego añadir un STA® - mini Reducer nuevo (REF 00797) y el tapón perforado. Estabilidad tras la reconstitución con STA® - mini Reducer y el tapón perforado: 15 días en STA Compact® y STA-R®.
- Reactivo 3**
Reactivo 3 listo para emplear.

8/ REACTIVOS Y MATERIALES AUXILIARES

- STA® - Owren-Koller** (REF 00360).
- STA® - VWF:Ag Calibrator** (REF 00520).
- STA® - Liatest® Control [N] + [P]** (REF 00526): controles normal y anormal.
- Instrumento de la línea STA® que puede utilizar estos reactivos.
- STA® - mini Reducer (REF 00797).
- Equipamiento habitual en los laboratorios de análisis clínicos.

9/ PROCEDIMIENTO

9.1. Calibración

La calibración se lleva a cabo con la ayuda del estuche STA® - VWF:Ag Calibrator. Preparar STA® - VWF:Ag Calibrator y transferir al aparato las informaciones contenidas en los códigos de barras de la hoja. Los estándares son preparados automáticamente por el analizador, diluyendo con tampón Owren-Koller de acuerdo a los parámetros ingresados en el instrumento para la disifilación. El tampón Owren-Koller solo representa 0 % de los puntos.
La curva de calibración se puede ver en la pantalla del instrumento con la ayuda del menú "Calibración" (ver el "Manual del Operador").

9.2. Plasmas a analizar

Los plasmas a testar han de estar sin diluir. Introducirlos en el instrumento (ver el "Manual del Operador" del instrumento utilizado). El instrumento realizará automáticamente las diluciones en tampón Owren-Koller.
Seleccionar el(los) test(s) a efectuar en los plasma de pacientes.

9.3. Controles

Los controles son necesarios para verificar la exactitud y la reproducibilidad de los resultados. Utilizar el estuche STA® - Liatest® Control [N] + [P]. Preparar estos reactivos de control y transferir la información contenida en los códigos de barras impreso en su respectivo inserto al instrumento. Estos controles se utilizan han de estar sin diluir; el instrumento realizará automáticamente la dilución en tampón Owren-Koller.

9.4. Dosificación

Para la realización de la dosificación, seguir los protocolos descritos en los "Standardized Operating Procedures" del instrumento.
La determinación del VWF:Ag en el plasma por valorar se procesa automáticamente por el analizador a 540 nm tan pronto se cargan las muestras. Si cualquiera de los resultados del paciente queda fuera del rango de trabajo de la dosificación, el instrumento revalora automáticamente la muestra en según una dilución apropiada, siempre que esta opción haya sido introducida en la configuración de la prueba (ver el "Manual del Operador").

10/ RESULTADOS

El nivel de VWF:Ag (%) de las muestras analizadas aparece en tiempo real en la pantalla del aparato (ver el "Manual del Operador"). El resultado debe interpretarse en función del estado clínico y biológico del paciente.
Si el aparato señala que los resultados obtenidos para los controles se sitúan fuera del intervalo de valores indicado en la hoja incluida en el estuche, es preciso asegurarse del buen funcionamiento de todo el sistema: condiciones de ensayo, reactivos, plasmas en los que se efectúa el test, etc. Si es necesario, repetir las muestras.

11/ LIMITACIONES

- Es posible que se subestime el nivel de VWF:Ag de los plasmas especialmente turbios (el valor de la absorbancia a 540 nm del plasma diluido al 1/10 en STA® - Owren-Koller debe ser inferior a 0,80).
- La presencia del factor reumatoide lleva a una sobreestimación del nivel de VWF:Ag.
- La presencia de anticuerpos anti-albúmina bovina y/o anti-conejo en ciertos sujetos puede hacer que se sobrestime el nivel de VWF:Ag.
- Como todos los tests antígenos, el análisis de VWF:Ag llevado a cabo con el kit STA® - Liatest® VWF:Ag no puede detectar las variantes inusuales de tipo 2 cuyo nivel de VWF:Ag sea normal.
- Se ha demostrado que la hemoglobina, la bilirrubina, las heparinas no fraccionadas y las heparinas de bajo peso molecular no interfieren con la determinación si sus concentraciones son inferiores, respectivamente, a 5 g/l, 150 mg/l, 2 U/ml y 2 U anti-Xa/ml.

12/ VALORES NORMALES

El valor del VWF:Ag en el plasma humano generalmente está comprendido en el adulto entre 50 y 160 % (1, 3).
Con la edad (6) y en ciertas situaciones (embarazo, uso de la píldora anticonceptiva, esfuerzo físico, estrés) (8) se observa un aumento de los niveles del factor von Willebrand. Por contrario, en los sujetos del grupo O (8) se observa una disminución de los niveles de VWF:Ag.

13/ CARACTERÍSTICAS DEL MÉTODO

• Umbral de detección - Intervalo de linealidad

El umbral de detección del STA® - Liatest® VWF:Ag en el STA® es de 3 %. El procedimiento STA® - Liatest® VWF:Ag en el STA® es lineal hasta el 105 %.

• Efecto Hook

Se ha de tener en cuenta la configuración de test si hay efecto hook.

• Reproducibilidad

Se han realizado estudios de reproducibilidad, a partir de diferentes plasmas normales y anormales; los resultados obtenidos en STA® están indicados en las tablas siguientes:

	Reproducibilidad intra-serie		Reproducibilidad inter-serie	
Muestra	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4
n	21	21	10	10
X (%)	89	33	87	40
SD (%)	1,7	0,9	2,5	1,8
CV (%)	1,9	2,7	2,9	4,4

BIBLIOGRAFÍA

- HOLMBERG L., BERNTORP E., DONNER M., NILSSON I.M.: "Von Willebrand's disease characterized by increased ristocetin sensitivity and the presence of all von Willebrand factor multimers in plasma". Blood, **68**, 3, 668-672, 1986.
- VERWEIJ C.L.: "Biosynthesis of human von Willebrand factor". Haemostasis, **18**, 224-245, 1988.
- NISHINO M., GIRMA J.P., ROTHSCCHILD C., FRESSINAUD E., MEYER D.: "New variant of von Willebrand disease with defective binding to factor VIII". Blood, **74**, 5, 1591-1599, 1989.
- JAKWAY J.L.: "Acquired von Willebrand's disease". Hematol. Oncol. Clin. Nort. Am., **6**, 6, 1409-1419, 1992.
- BLANN A.: "Von Willebrand factor and the endothelium in vascular disease". Br. J. Biomed. Sci., **50**, 125-134, 1993.
- CONLAN M.G., FOLSOM A.R., FINCH A., DAVIS C.E., SORLIE P., MARCUCCI G., WU K.K.: "Associations of factor VIII and von Willebrand factor with age, race, sex, and risk factors for atherosclerosis". Thromb. Haemostasis, **70**, 3, 380-385, 1993.
- SADLER J.E.: "A revised classification of von Willebrand disease". Thromb. Haemostasis, **71**, 4, 520-525, 1994.
- FRESSINAUD E., MEYER D.: "La maladie de Willebrand : du diagnostic au traitement". Hématologie, **3**, 199-208, 1995.
- LIP G.Y.H., BLANN A.D.: "Von Willebrand factor and its relevance to cardiovascular disorders". Br. Heart J., **74**, 580-583, 1995.
- RIBBA A.S., LAVERGNE J.M., GIRMA J.P., MEYER D.: "Bases moléculaires de la maladie de Willebrand". Hématologie, **3**, 191-198, 1995.