



LIAPHEN™ vWF:Ag

REF 120206

R1 4 x 5 ml, R2 4 x 6 ml

Método inmunoturbidimétrico para vWF:Ag, con reactivos líquidos listos para utilizar



www.hyphen-biomed.com

155, rue d'Eragny
95000 NEUVILLE SUR OISE
FRANCE
Tel. : +33 (0)1 34 40 65 10
Fax : +33 (0)1 34 48 72 36
info@hyphen-biomed.com

Español, última revisión: 01-2021

USO PREVISTO:

El kit LIAPHEN™ vWF:Ag es un ensayo inmunoturbidimétrico para la determinación cuantitativa *in vitro* del antígeno de Von Willebrand (vWF:Ag) en plasma humano citratado, mediante un método automatizado. Los reactivos se suministran en forma líquida, listos para utilizar.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN:

Desde el punto de vista técnico:

El factor de Von Willebrand (vWF) es una proteína de estructura multimérica sintetizada en las células endoteliales y en los megacariocitos. Se encuentra circulando en la sangre en forma de multímeros con un peso molecular de entre 500 kDa y 20 000 kDa.

El vWF actúa como mediador de la adhesión plaquetaria al subendotelio del vaso sanguíneo dañado y, al formar complejos con el factor VIII, alarga su semivida en la corriente sanguínea.

Los multímeros ultragrandes son escindidos proteolíticamente por ADAMTS13 en formas de vWF menos activas. La función biológica del vWF depende en gran medida del tamaño de sus multímeros. Los de mayor tamaño tienen más probabilidades de unirse a las plaquetas y al colágeno y de favorecer la adhesión plaquetaria en la sangre circulante.^{1,2}

Desde el punto de vista clínico:

La deficiencia funcional o cuantitativa de vWF da lugar a la enfermedad de Von Willebrand (EVW), que se divide en 3 tipos:

- Tipo 1: se caracteriza por una deficiencia cuantitativa parcial de vWF (más frecuente).
- Tipo 2: se caracteriza por una actividad anormal de adhesión del vWF. Se distinguen 4 subtipos: 2A, 2B, 2M y 2N, dependiendo de la anomalía funcional de los multímeros.
- Tipo 3: se caracteriza por una deficiencia cuantitativa grave de vWF.

Las deficiencias de vWF se asocian a muchas otras patologías y constituyen lo que se conoce como enfermedad de von Willebrand adquirida.

Cuando el endotelio vascular se ve afectado, la concentración de vWF puede aumentar en respuesta a los procesos inflamatorios.^{3,4}

PRINCIPIO:

LIAPHEN™ vWF:Ag es un método inmunoturbidimétrico basado en la reacción antígeno-anticuerpo. El antígeno vWF de la muestra reacciona con las partículas de látex sensibilizadas con anticuerpos policlonales de conejo anti-vWF, dando lugar a la aglutinación de las partículas de látex. Esta aglutinación puede detectarse mediante un cambio de absorbancia. Dicho cambio de absorbancia es directamente proporcional a la cantidad de vWF:Ag en la muestra.

REACTIVOS:

R1 Tampón de reacción, forma líquida.

4 viales de 5 ml

R2 Látex, forma líquida.

4 viales de 6 ml

Los reactivos **R1** y **R2** contienen albúmina sérica bovina (BSA) y cantidades pequeñas de azida de sodio (0,9 g/l).

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES:

- Algunos reactivos incluidos en estos kits contienen material de origen animal. Los usuarios de reactivos de este tipo deben asegurarse de extremar las precauciones de seguridad y de manipular cualquier material biológico como si fuera infeccioso.
- En contacto con tuberías de plomo o de cobre, la azida de sodio puede generar compuestos explosivos.
- Los residuos se deben eliminar de acuerdo con la normativa local vigente.
- Solo se deben utilizar los reactivos del mismo lote de kits.
- Los estudios de envejecimiento demuestran que los reactivos se pueden transportar a temperatura ambiente sin degradarse.
- Este producto sanitario para diagnóstico *in vitro* está destinado al uso profesional en el laboratorio.

PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS:

R1 **R2** El reactivo está listo para ser utilizado; homogeneizar por inversión suave, evitando la formación de espuma, y cargarlo directamente en el analizador siguiendo las instrucciones de la guía de aplicación.

ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD:

Los reactivos sin abrir se deben conservar a una temperatura de 2-8 °C en su envase original. En estas condiciones, se pueden utilizar hasta la fecha de caducidad impresa en el kit.

R1 **R2** La estabilidad de los reactivos una vez abiertos, libres de cualquier contaminación o evaporación, y conservados cerrados, es de:

- 4 semanas a 2-8 °C.
- 2 semanas a temperatura ambiente (18-25 °C).
- No congelar.
- Estabilidad cargado en el analizador: ver la aplicación específica.

REACTIVOS Y MATERIAL NECESARIOS NO SUMINISTRADOS:

Reactivos:

- Agua destilada.
- Tampón imidazol (AR021B/AR021K/AR021L/AR021M/AR021N), como diluyente.
- Calibradores y controles específicos con titulación conocida de vWF:Ag, trazable al patrón internacional del NIBSC para vWF:Ag en plasma, como:

Nombre del producto	Referencia
BIOPHEN™ Plasma Calibrator	222101
BIOPHEN™ Normal Control Plasma	223201
BIOPHEN™ Abnormal Control Plasma	223301

Materiales:

- Espectrofotómetro o analizador automático para ensayos inmunoturbidimétricos.
- Pipetas calibradas; tubos de ensayo de plástico o vidrio silicónado.

OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS:

La sangre se debe recoger con cuidado en tubos con anticoagulante citrato trisódico (0,109 M, 3,2 %) (en proporción 9:1) mediante venopunción aséptica. Desechar el primer tubo.

Las muestras se deben preparar y conservar de acuerdo con las directrices locales aplicables (en Estados Unidos, ver las directrices CLSI H21-A5⁵ para obtener más información sobre la obtención, manipulación y conservación de las muestras).

Para la conservación del plasma, ver las referencias.^{5,6}

PROCEDIMIENTO:

El kit puede utilizarse para métodos cinéticos automatizados. Realizar la prueba a 37 °C y la turbidimetría a 575 nm (se pueden utilizar otras longitudes de onda, a ser posible entre 540 y 800 nm).

Método de ensayo:

1. Reconstituir la preparación de referencia o calibrador de plasma y los controles de plasma como se indica en las instrucciones específicas o según la práctica interna.

Programar las concentraciones de calibración del 0 % al 150 % de vWF:Ag (0-20-75-150 % de vWF:Ag en tampón imidazol), donde la dilución 4:15 corresponde a la concentración «C» de vWF:Ag indicada para el calibrador comercial.

2. Programar la dilución de las muestras y los controles en tampón imidazol, como se describe en la siguiente tabla:

Muestras	Referencias	Dilución
Controles	223201 / 223301	4:15
Muestras para analizar	n.d.	4:15

Establecer la curva de calibración y validarla con los controles de calidad. Si se conservan a temperatura ambiente (18-25 °C), analizar rápidamente las muestras diluidas. La concentración exacta de calibradores y controles para cada lote se indica en el folleto incluido en el kit.

3. A modo de ejemplo, en la siguiente tabla se muestra el esquema para la aplicación en los analizadores de la serie CS. Distribuir los siguientes reactivos en las cubetas de reacción incubadas a 37 °C (realizado directamente por el analizador):

Reactivos	Volumen
Calibradores, muestras o controles diluidos en tampón imidazol	30 µl
R1 Tampón de reacción	60 µl
Incubar a 37 °C durante 130 s	

R2 Látex	100 µl
Mezclar y medir la densidad óptica continuamente (entre 20 s y 50 s) a 575 nm, a una temperatura de 37 °C	

Si se requiere un volumen de reacción distinto del especificado anteriormente para el método utilizado, se debe respetar estrictamente la relación en volumen para garantizar el rendimiento adecuado del ensayo. El usuario es el responsable de validar cualquier cambio y su repercusión en los resultados.

Para concentraciones elevadas (entre 150 % y 1600 %), se recomienda realizar una predilución en tampón imidazol (en tal caso, la concentración medida debe multiplicarse por el factor de «predilución»).

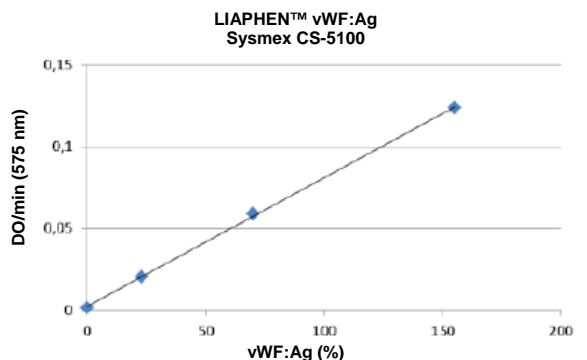
Para los métodos automatizados, las guías de aplicación se encuentran a disposición de los interesados. Consultar la guía de aplicación y las precauciones específicas de cada analizador.

CALIBRACIÓN:

El ensayo LIAPHEN™ vWF:Ag se puede calibrar para la determinación del antígeno vWF en plasma humano. El calibrador que cubre el intervalo de calibración puede obtenerse de HYPHEN BioMed (ver el apartado REACTIVOS Y MATERIAL NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS) y utilizarse para establecer la curva de calibración.

- El intervalo de calibración es aproximadamente del 0 % al 150 % (en el analizador Sysmex CS-5100).

La curva de calibración que se muestra a continuación solo es a modo de ejemplo. Se debe emplear la curva de calibración establecida para la serie de ensayos.



CONTROL DE CALIDAD:

El uso de controles de calidad sirve para validar el cumplimiento del método, junto con la homogeneidad interserial del ensayo para un determinado lote de reactivos.

Hay que incluir los controles de calidad con cada serie, de acuerdo con las buenas prácticas de laboratorio, con el fin de validar la prueba. Se debe establecer una nueva curva de calibración, preferiblemente para cada serie analítica y, como mínimo, para cada nuevo lote de reactivos, o tras una operación de mantenimiento del analizador, o cuando los valores de control de calidad medidos se sitúen fuera del intervalo de aceptación del método.

Cada laboratorio debe definir su intervalo de aceptación y verificar el rendimiento previsto en su sistema analítico.

RESULTADOS:

- En los analizadores de la serie CS de Sysmex, la curva de calibración se obtiene en una escala lin-lin, donde la DO 575 nm se sitúa a lo largo del eje de las ordenadas y la concentración de vWF:Ag, expresada en porcentaje, a lo largo del eje de las abscisas.
- La concentración de vWF:Ag (%) en la muestra problema se deduce directamente de la curva de calibración cuando se utiliza la dilución estándar.
- Si se utilizan otras diluciones, el nivel obtenido debe multiplicarse por el factor de dilución adicional utilizado.
- Los resultados deben interpretarse de acuerdo con el estado clínico y biológico del paciente.

LIMITACIONES:

- Para garantizar el rendimiento óptimo de la prueba y cumplir las especificaciones, se deben seguir cuidadosamente las instrucciones técnicas validadas por HYPHEN BioMed.
- Se deben descartar los reactivos que presenten un aspecto atípico o que muestren signos de contaminación.
- Se deben descartar las muestras sospechosas o que muestren signos de activación.
- Los anticuerpos heterófilos pueden interferir en el ensayo y arrojar valores de vWF:Ag anormalmente elevados.
- En cuanto a la posible influencia del efecto gancho, consultar la guía de aplicación específica del analizador utilizado (no se observa ningún efecto significativo en el analizador Sysmex CS-5100 para concentraciones de vWF de hasta 1600 %).

VALORES PREVISTOS:

El intervalo de referencia, medido en pacientes adultos sanos (n = 120) en el analizador Sysmex CS-5100 (90 % central, percentil 95), fue de entre el 62 % y el 169 % de vWF:Ag.

Sin embargo, cada laboratorio debe establecer su propio intervalo normal.

El grupo sanguíneo del donante, especialmente el tipo O, al igual que otros factores como la edad, el sexo y el embarazo, puede influir en la concentración de vWF:Ag en plasma.⁷

RENDIMIENTO:

- El límite inferior de detección del analizador depende del sistema analítico utilizado (<1 % en el analizador Sysmex CS-5100).
- El intervalo de medición depende del sistema analítico utilizado (aproximadamente del 3 % al 1600 % de vWF:Ag en analizadores de la serie CS de Sysmex con redilución; la prueba es lineal del 10 % al 170% sin redilución).
- Los estudios de rendimiento se llevaron a cabo internamente en el analizador Sysmex CS-5100. El rendimiento se evaluó utilizando controles del laboratorio durante un período de 5 días, 2 series por día y 3 repeticiones en cada serie para un nivel de control. Se obtuvieron los siguientes resultados:

Control	Intraensayo				Interensayo			
	n	Media	%	DE	n	Media	% CV	DE
Normal	40	102,8	2,2	2,3	30	103,4	2,2	2,3
Patológico	40	39,8	4,6	1,8	30	39,2	2,6	1,0

- Correlación con el método de referencia (vWF:Ag [Siemens] frente a LIAPHEN™ vWF:Ag en el analizador Sysmex CS-5100):
n = 73 y = 1,032x + 0,49 r = 0,998

- Interferencias:**
En el analizador Sysmex CS-5100, no se observaron interferencias de las moléculas en las siguientes concentraciones:

Hemoglobina	1000 mg/dl	Heparina (HNF/HBPM)	2/2 UI/ml
Bilirrubina (libre)	60 mg/dl	Rivaroxabán	400 ng/ml
Bilirrubina (conjugada)	60 mg/dl	Apixabán	400 ng/ml
Intralípidos	1000 mg/dl	Dabigatrán	400 ng/ml
Factor reumatoide	750 UI/ml		

Consultar también la guía de aplicación específica del analizador utilizado.

REFERENCIAS:

- Luo GP. *et al.* von Willebrand Factor: more than a regulator of hemostasis and thrombosis. *Acta Haematol.* 2012.
- Peyvandi F. *et al.* Role of von Willebrand Factor in the haemostasis. *Blood Transfus.* 2011.
- Schwameis M. *et al.* vWF excess and ADAMTS13 deficiency: a unifying pathomechanism linking inflammation to thrombosis in DIC, malaria, and TTP. *Thrombosis and Haemostasis.* 2015.
- Farkas P. *et al.* Complement activation, inflammation and relative ADAMTS13 deficiency in secondary thrombotic microangiopathies. *Immunobiology.* 2017.
- CLSI Document H21-A5: "Collection, transport, and processing of blood specimens for testing plasma-based coagulation assays and molecular hemostasis assays; approved guideline". Fifth Edition, 28, 5, 2008.
- Woodhams B. *et al.* Stability of coagulation proteins in frozen plasma. *Blood coagulation and Fibrinolysis.* 2001.
- Gill JC. *et al.* The Effect of ABO group on the diagnosis of von Willebrand disease. *Blood.* 1987.

SÍMBOLOS:

Símbolos utilizados y signos enumerados en la norma ISO 15223-1; ver el documento de definiciones de los símbolos.

■ Cambios respecto a la versión anterior.