

**LIAPHEN™ vWF: Ag**

REF 120206

R1 4 x 5 mL, R2 4 x 6 mL

Méthode immuno-turbidimétrique pour vWF : Ag,
avec réactifs liquides prêts à l'emploi.

Français, dernière révision : 01-2021

UTILISATION:

Le coffret LIAPHEN™ vWF : Ag est une méthode immuno-turbidimétrique pour la détermination quantitative *in vitro* du Facteur von Willebrand Antigène (vWF : Ag) sur plasma humain citraté, en utilisant une méthode automatisée. L'ensemble des réactifs est sous forme liquide, prêt à l'emploi.

RESUME ET EXPLICATION:**Technique :**

Le vWF est une protéine multimérique produite par les cellules endothéliales et les mégacaryocytes. Il circule dans le sang sous forme de multimères allant de 500 à plus de 20 000 kDa.

Le vWF favorise l'adhésion des plaquettes au sous-endothélium des vaisseaux sanguins endommagés et, en se fixant au Facteur VIII, prolonge sa demi-vie dans la circulation sanguine.

Les multimères ultra-larges sont clivés par protéolyse par ADAMTS13 en formes moins actives du vWF. La fonction biologique du vWF dépend largement de la taille de ses multimères. Les multimères larges sont plus susceptibles de se lier aux plaquettes et au collagène, et de promouvoir l'adhésion des plaquettes dans la circulation sanguine^{1,2}.

Clinique :

Les défauts fonctionnels ou quantitatifs du vWF induisent la maladie de von Willebrand (vWD), qui peut être divisée en 3 groupes :

- Type 1 : vWD caractérisée par un déficit quantitatif partiel de vWF (le plus fréquent).
- Type 2 : vWD caractérisée par une activité anormale d'adhésion du vWF. Il est divisé en 4 sous-types : 2A, 2B, 2M et 2N, dépendant de l'anomalie fonctionnelle des multimères.
- Type 3 : vWD caractérisée par un sévère déficit quantitatif de vWF.

Des déficits en vWF peuvent être associés à diverses autres pathologies, constituant alors une maladie de von Willebrand acquise.

En cas d'atteinte de l'endothélium vasculaire, le taux de vWF peut être augmenté en lien avec les processus inflammatoires^{3,4}.

PRINCIPE:

LIAPHEN™ vWF : Ag est une méthode immuno-turbidimétrique, basée sur une réaction antigène-anticorps : l'antigène vWF de l'échantillon réagit avec les particules de latex sensibilisées avec des anticorps polyclonaux de lapin anti-vWF, conduisant à l'agglutination des particules de latex. Cette agglutination peut être directement détectée par un changement d'absorbance. Le changement d'absorbance est directement proportionnel à la quantité de vWF : Ag dans l'échantillon.

REACTIFS:**R1** Tampon réactionnel, sous forme liquide.

4 flacons de 5 mL.

R2 Latex, sous forme liquide.

4 flacons de 6 mL.

Les réactifs **R1** et **R2** contiennent de la BSA et de faibles quantités d'azide de sodium (0,9 g/L).

MISE EN GARDE ET AVERTISSEMENTS:

- Certains réactifs de ce coffret contiennent des produits d'origine animale. Ces réactifs d'origine biologique doivent être manipulés avec les précautions d'usage s'agissant de produits potentiellement infectieux.
- L'azide de sodium peut générer des composants explosifs au contact des canalisations en plomb ou en cuivre.
- L'élimination des déchets doit être effectuée conformément aux réglementations locales en vigueur.
- Utiliser uniquement les réactifs d'un même lot de coffret.
- Les études de vieillissement montrent que les réactifs peuvent être expédiés à température ambiante sans aucun dommage.
- Ce dispositif de diagnostic *in vitro* est destiné à une utilisation professionnelle en laboratoire.

PREPARATION DES REACTIFS:

R1 **R2** Réactif prêt à l'emploi, homogénéiser par inversion douce en évitant la formation de mousse et charger directement sur l'automate en suivant les instructions du guide d'application.

STOCKAGE ET STABILITE:

Les réactifs non ouverts doivent être conservés à 2-8°C dans leur emballage d'origine. Ils sont alors utilisables jusqu'à la date de péremption imprimée sur le coffret.

R1 **R2** La stabilité du réactif après ouverture, sous réserve de toute contamination ou d'évaporation, conservé fermé est de :

- 4 semaines à 2-8°C.
- 2 semaines à température ambiante (18-25°C).
- Ne pas congeler.
- Stabilité à bord de l'automate : se référer à l'application spécifique.

REACTIFS ET MATERIELS REQUIS MAIS NON FOURNIS:**Réactifs:**

- Eau distillée.
- Imidazole Buffer (AR021B/AR021K/AR021L/AR021M/AR021N), comme diluant.
- Etalon et contrôles spécifiques avec titration de vWF : Ag connue, dont la traçabilité est raccordée au Standard International du NIBSC pour vWF :Ag en plasma, tels que :

Nom du produit	Reference
BIOPHEN™ Plasma Calibrator	222101
BIOPHEN™ Normal Control Plasma	223201
BIOPHEN™ Abnormal Control Plasma	223301

Matériels:

- Spectrophotomètre, automates pour dosage immuno-turbidimétrique.
- Pipettes calibrées, tubes pour tests en plastique ou en verre silicé.

PRELEVEMENTS ET PREPARATION DES ECHANTILLONS:

Le sang (9 volumes) doit être collecté sur l'anticoagulant citrate trisodique (1 volume) (0,109M, 3,2%) avec précautions, par ponction veineuse franche. Le premier tube doit être éliminé.

La préparation et la conservation des échantillons doivent être réalisées selon les recommandations locales en vigueur (pour les Etats-Unis, se référer aux recommandations du CLSI H21-A5⁵ pour plus d'informations concernant le prélèvement, la manipulation et la conservation).

Pour la conservation des plasmas, se référer aux références^{5,6}.

PROCEDURE:

Le coffret peut être utilisé en méthode cinétique, automatisée. Le test est réalisé à 37°C et la turbidimétrie est mesurée à 575nm (d'autres longueurs d'onde sont utilisables, de préférence entre 540 et 800nm).

Méthode de dosage:

1. Reconstituer la préparation de référence ou l'étalon plasmatique, et les contrôles plasmatiques, comme indiqué dans les notices spécifiques ou selon la pratique interne.

Programmer les points de calibration sur la zone 0 à 150% de vWF :Ag (0-20-75-150% vWF :Ag en tampon Imidazole), la dilution au 4/15 correspondant à la concentration « C » de vWF :Ag indiquée pour l'étalon commercial.

2. Programmer la dilution des échantillons et contrôles dans du tampon Imidazole comme décrit dans le tableau ci-dessous :

Echantillons	Références	Dilution
Contrôles	223201 / 223301	4/15
Echantillons à tester	NA	4/15

Réaliser la gamme d'étalonnage et la tester avec les contrôles de qualité. Les échantillons dilués doivent être testés rapidement, s'ils sont conservés à température ambiante (18-25°C). Les concentrations exactes des étalons et des contrôles sont indiquées pour chaque lot sur le papillon fourni avec le coffret.

3. A titre d'exemple, le tableau ci-dessous montre le schéma pour l'application sur CS-series. Introduire dans les cuvettes réactionnelles incubées à 37°C (directement géré par l'instrument) :

Réactifs	Volume
Etalons, échantillons ou contrôles dilués en tampon Imidazole	30 µL
R1 Tampon réactionnel	60 µL
Incuber à 37°C pendant 130 sec.	
R2 Latex	100 µL
Mélanger et mesurer l'absorbance en continu (entre 20 et 50 sec) à 575 nm, à 37°C.	

Si un volume réactionnel différent de celui indiqué ci-dessus est requis pour la méthode utilisée, le rapport des volumes doit être strictement respecté afin de

garantir les performances du dosage. L'utilisateur est responsable de la validation des modifications et de leur impact sur tous les résultats. Pour des concentrations élevées (entre 150% et 1600%), il est recommandé d'effectuer une pré-dilution en Imidazole (la concentration mesurée doit ensuite être multipliée par le facteur de « pré-dilution »).

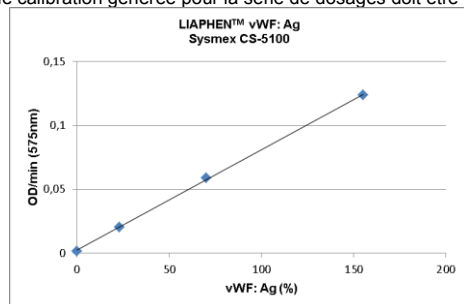
Pour une méthode automatisée, les guides d'applications sont disponibles sur demande. Se référer aux guides d'application et aux précautions spécifiques pour chaque automate.

CALIBRATION:

Le test LIAPHEN™ vWF :Ag peut être calibré pour le dosage de l'antigène vWF en plasma humain. L'étalon couvrant la zone calibration est disponible chez HYPHEN BioMed (Voir paragraphe REACTIFS ET MATERIEL REQUIS MAIS NON FOURNIS) et peut être utilisé pour générer la courbe de calibration.

- La zone de calibration est environ de 0 à 150% (sur Sysmex CS-5100).

La courbe de calibration ci-dessous est indiquée à titre d'exemple uniquement. La courbe de calibration générée pour la série de dosages doit être utilisée.



CONTRÔLE QUALITE:

L'utilisation de contrôles de qualité permet de valider la conformité de la méthode ainsi que l'homogénéité des dosages entre les différents essais pour un même lot de réactifs.

Inclure des contrôles qualité dans chaque série, selon les bonnes pratiques de laboratoire, afin de valider le test. Une nouvelle courbe de calibration doit être établie, de préférence, pour chaque série d'essai, et au moins pour chaque nouveau lot de réactif ou après chaque maintenance de l'automate, ou quand les valeurs des contrôles de qualité sont mesurées en dehors de la zone d'acceptation définie pour la méthode.

Chaque laboratoire doit établir les zones d'acceptation et vérifier les performances attendues dans son système analytique.

RESULTATS:

- Sur instrument Sysmex CS-series, la droite de calibration lin-lin est obtenue en portant en ordonnées la DO à 575 nm et en abscisses la concentration de vWF : Ag en %.
- La concentration de vWF : Ag (%) dans l'échantillon à doser est déduite directement de la courbe de calibration, lorsque la dilution standard est utilisée.
- Si d'autres dilutions sont utilisées le taux obtenu doit être multiplié par le facteur de dilution complémentaire utilisé.
- Les résultats doivent être interprétés selon l'état clinique et biologique du patient.

LIMITATIONS:

- Pour obtenir les performances optimales du test et répondre aux spécifications, suivre scrupuleusement les instructions techniques validées par HYPHEN BioMed.
- Tout réactif présentant un aspect inhabituel ou des signes de contamination doit être rejeté.
- Tout échantillon suspect ou présentant des signes d'activation doit être rejeté.
- Les anticorps hétérophiles sont susceptibles d'interférer dans le dosage en donnant une valeur anormalement élevée de vWF: Ag.
- Pour l'influence possible d'effet crochet, se reporter à l'application spécifique pour l'instrument utilisé (aucun effet significatif n'est observé sur Sysmex CS-5100 pour des taux de vWF jusqu'à 1600%).

VALEURS ATTENDUES:

Le domaine de référence a été mesuré sur des sujets sains adultes (n=120) sur Sysmex CS-5100 (Central 90%, 95th percentile) entre 62 et 169% de vWF : Ag. Cependant, chaque laboratoire doit établir son propre intervalle normal.

Le groupe sanguin du donneur, notamment le type O, comme les autres facteurs comme l'âge, le sexe et la grossesse, peuvent influencer la concentration en vWF: Ag dans le plasma.⁷

PERFORMANCES:

- La limite basse de détection dépend du système analytique utilisé (<1% sur Sysmex CS-5100).
- La zone de mesure dépend du système analytique utilisé (environ de 3 à 1600% de vWF :Ag sur Sysmex CS-series avec redilution, le test étant linéaire de 10 à 170% sans redilution).

- Les études de performances ont été réalisées en interne sur Sysmex CS-5100. Les performances ont été évaluées avec les contrôles du laboratoire sur 5 jours, 2 séries par jour et 3 répétitions à chaque série pour un niveau de contrôle. Les résultats suivants ont été obtenus :

Contrôle	Intra-essai				Inter-essais			
	N	Moy.	CV%	SD	n	Moy.	CV%	SD
Normal	40	102,8	2,2	2,3	30	103,4	2,2	2,3
Pathologique	40	39,8	4,6	1,8	30	39,2	2,6	1,0

- Corrélation avec une autre méthode (vWF :Ag (Siemens) vs LIAPHEN™ vWF:Ag sur Sysmex CS-5100) :
n = 73 y = 1,032x+0,49 r = 0,998

Interférences:

Aucune interférence, sur l'automate Sysmex CS-5100 n'a été observée avec les molécules et jusqu'aux concentrations suivantes:

Hémoglobine	1000 mg/dL	Héparine (HNF/HBPM)	2/2 UI/mL
Bilirubine (Libre)	60 mg/dL	Rivaroxaban	400 ng/mL
Bilirubine (Conjuguée)	60 mg/dL	Apixaban	400 ng/mL
Intralipides	1000 mg/dL	Dabigatran	400 ng/mL
Facteur Rhumatoïde	750 UI/mL		

Se référer également au guide d'application spécifique de l'automate utilisé.

REFERENCES:

1. Luo GP. *et al.* von Willebrand Factor: more than a regulator of hemostasis and thrombosis. *Acta Haematol*, 2012.
2. Peyvandi F. *et al.* Role of von Willebrand Factor in the haemostasis. *Blood Transfus.* 2011.
3. 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.
4. Farkas P. *et al.* Complement activation, inflammation and relative ADAMTS13 deficiency in secondary thrombotic microangiopathies. *Immunobiology.* 2017.
5. 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.
6. Woodhams B. *et al.*, Stability of coagulation proteins in frozen plasma. *Blood coagulation and Fibrinolysis.* 2001.
7. Gill JC. *et al.* The Effect of ABO group on the diagnosis of von Willebrand disease. *Blood.* 1987.

SYMBOLES:

Symboles utilisés et signes énumérés dans la norme ISO 15223-1, se référer au document Définition des symboles.

Changements par rapport à la précédente version.