








TECHNOZYM® vWF:CBA ELISA



REF	5450301	TECHNOZYM® vWF:CBA ELISA	
REF	5450310	TECHNOZYM® vWF:CBA Calibration Set	5 x 0.5 mL
REF	5450312	TECHNOZYM® vWF:CBA Control Set	2 x 0.5 mL

symbols key / Symbolschlüssel / interpretazione dei simboli / explicación de símbolos / explicação dos símbolos / clé des symboles / Symbolnyckel / symbolforklaring / Tegnforklaring / Κλειδί συμβόλων / Използвани символи / символы / Ključova slova / Značenje simbola

	manufacturer / Hersteller / fabbricante / fabricante / fabricant / fabricant / Tillverkaren / Fabrikanten / Produzent / Κατασκευαστής / Производител / Производитель / výrobce / Proizvođač		expiry date / Verfallsdatum / data di scadenza / fecha de caducidad / data de validade / date d'expiration / utgångsdatum / udløbsdato / Utløpsdato / Ημερομηνία λήξης / срок на годност / datum expirace / срок годности / datum expirace / Rok trajanja
	storage temperature / Lagertemperatur / temperatura di conservazione / temperatura de conservación / temperatura de conservação / température de stockage / lagringstemperatur / oppbevaringstemperatur / Oppbevaringstemperatur / θερμοκρασία αποθήκευσης / съхранение на / teplota skladování / температура хранения / teplota skladování / Temperatura lagerovanija		consult instructions for use / Gebrauchsanweisung beachten / consultare le istruzioni per l'uso / consulte las instrucciones de uso / consultar o manual de instruções / instruction d'utilisation / se användarinstruktioner / følg brugsvejledning / Følg bruksanvisningen / συμβουλευθείτε τις οδηγίες για τη χρήση / прочетете инструкцията за работа / potfeba fidiť se instrukciami / перед использованием читайте инструкцию / sledujte návod k použití / Pročitaj uputstvo pre upotrebe
	CE-mark / CE-Kennzeichnung / marchio CE / marca de CE / Simbolo da CE / marquage CE / CE-märkning / CE-mærket / CE-merke / CE-σημάδι / CE марка / CE-označeni / маркировка CE / značka CE / CE-marka		determinations / Bestimmungen / determinazioni / determinaciones / determinações / détermination / bestämmingar / bestemmelser / Bestemmelse / προσδιορισμοί / брой тестове / stanovení / определний / роčet stanovení / Definicija
AQUA	distilled water / destilliertes Wasser / acqua distillata / agua destilada / água destilada / eau distillée / destillerat vatten / destilleret vand / Destillert vann / απεσταγμένο νερό / децилирана вода / destilovaná voda / дистиллированная вода / destilovaná voda / Serija	LOT	lot / Charge / lotto / lote / lote / lot / sats / serie / Parti / παρτία / партида номер / šarže / лот / šarže / in vitro diagnostika
BUF	Reaction buffer / Reaktionspuffer / tampone di reazione / tampón de reacció / Tampão de reação / tampon de réaction / Reaktionsbuffert / Reaktionsbuffer / Reaktionsbuffer / διάλυμα αντίδρασης / Реакционен буфер / Рабочий буферный раствор / Reakční pufr / Reakcioni pufer	MTP	microtiter plate / Mikrotiterplatte / placa microtiter / microplaca / microplaca / microplaques sensibilisées / Mikrotiterplatta / Mikrotiterplade / mikrotiterplate / πλάκα μικροτιτλοδότησης / Микротитърна плака / Микропланшет / Mikrotitrační destička / Mikrotitracione ploče
CAL	Calibrator / Kalibrator / Calibratore / calibrador / calibrador / calibreur / Kalibrator / Kalibrator / Kalibrator / Βαθμονομητής / Калибратор / калибратор / kalibrátor / Kalibrator	REF	catalogue number / Katalognummer / numero di catalogo / número de catálogo / número de referência / réf. de catalogue / katalognummer / Katalognummer / αριθμός καταλόγων / каталожен номер / katalogové číslo / каталожный номер / katalogové číslo / Kataloški broj
CONJ	Conjugate / Konjugat / Coniugato / conjugado / conjugado / conjugaté / Konjugerad / Konjugat / Konjugat / συνδέτικό / Конюгат / Конъюгат / Konjugát / Konjugat	RTU	ready to use / gebrauchsfertig / pronto all'uso / listo para usar / pronto a usar / prêt à l'emploi / færdig att användas / færdig til brug / klar til bruk / έτοιμο προς χρήση / Готов за употреба / готов к использованию / k přímému použití / Razrediti ili rastvoriti
CONT	Control / Kontrolle / controllo / control / control / contrôle / Kontroll / Kontroll / Kontroll / διάλυμα ελέγχου / Контрол / Контрольный образец / Kontrola / Kontrola	STOP	stop solution / Stopplösung / Soluzione di arresto / solución de parada / solução de paragem / solution d'arrêt / Stoppløsning / Stop-opløsning / Stoppløsning / διάλυμα παύσης / Стоп разтвор / Стоп-разтвор / Zastavovací roztok / Stop solucija
DIL	dilute or dissolve in / verdünnen oder lösen in / diluire o dissolvere in / diluir o dissolver / diluir ou dissolver em / diluer ou dissoudre dans / späd eller upplös i / fortynnes eller oppløses i / Fortynnes eller oppløses i / αραιωση ή διάλυση σε / растворите или разрежете с / zředit anebo rozpustit v / разбавить или растворить в / nafedte nebo rozpustit v / razrediti ili rastvoriti u	SUB	substrate / Substrat / substrato / substrato / substrato / substrat / Substrat / Substrat / Substrat / υπόστρωμα / Субстрат / Субстрат / Substrát / Substrat
INC	incubation buffer / Inkubationspuffer / tampone di incubazione / tampón de incubación / incubación / tampão de incubação / tampon d'incubation / Inkubationsbuffert / Inkubationsbuffer / Inkubationsbuffer / διάλυμα επώασης / Инкубационен буфер / Буфер для инкубации / Inkubační pufr / Inkubacioni pufer	WASH	washing solution concentrate / Waschlösungskonzentrat / concentrado de solución de lavado / solución de lavado concentrada / tampão de lavagem concentrado / Tampon de lavage concentré / Vattenlösningkoncentrat / Vaskeopløsningskoncentrat / vaskeløsningskonsentrat / συμπυκνωμένο διάλυμα πλύσης / Концентриран миеш разтвор / Концентрат промывочного раствора / Koncentrat promývacieho roztoku / Koncentrat solucije za ispiranje
IVD	in vitro diagnostic use / in vitro Diagnostikum / diagnostico in vitro / diagnóstico en vitro / diagnóstico in vitro / diagnostic in vitro / för in vitro diagnostik / in vitro diagnostik / in vitro diagnostisk bruk / рηση διαγνωστικής εντόβ σωλήνα / за ин vitro диагностика / pro in vitro diagnostiku / использовать для диагностики in vitro / diagnostický prostředek in vitro / Destilísana Voda		



PRODUCT DESCRIPTION

INTENDED USE

The von Willebrand Factor (vWF) is a large, multifunctional glycoprotein, occupying a key position in primary haemostasis. It has a multiple structure with several functions:

- It is the carrier protein for Factor VIII in plasma; it forms a complex and thus protects Factor VIII from early proteolytic decomposition.
- It acts as a mediator for platelet aggregation by attaching itself to platelet membrane receptors (GP Ib and GP IIb/IIIa) following previous platelet activation.
- It plays a part in primary haemostasis by acting as a mediator between adhered platelets and the subendothelium (lesioned vascular wall).

In order to analyze the adhesive properties, as a rule the platelet aggregation is measured (measuring system = ristocetin-dependent platelet aggregation). However, this does not reflect the physiological setting nor the function of the vWF. For determining the adhesive properties of the vWF, its binding capacity to collagen serves as a parameter which corresponds to the physiological function of the vWF

COMPOSITION

1. ELISA test strips (12) with 8 wells each, coated with human collagen Typ III; the drying agent is supplied in an aluminium bag.
2. Washing buffer concentrate: (PBS; pH 7.3); containing detergent; 0.01% merthiolate; 1 bottle, 80 mL.
3. Incubation buffer: (PBS; pH 7.3); contains stabiliser protein; Proclin 300 and dye 1 bottle, 90 mL, ready for use.
4. Calibrators (Standards) numbered; lyophilised; 1 bottle each.
Concentrations are lot-dependent; consult label on the vial.
5. Control plasmas "low level" and "high level" for checking purposes, lyophilised; 1 bottle each.
Concentrations are lot-dependent; consult the label on the vial.
6. Conjugate polyclonal Anti-vWF-POX; dyed blue; 1 bottle, 0.3 mL.
7. Chromogen TMB (tetramethylbenzidine); 1 bottle, 12 mL; ready to use.
8. Stopping solution: sulphuric acid 1.9 mol/L; 1 bottle 12 mL; ready for use.
9. Adhesive film: for ELISA test strips (2).

MATERIAL REQUIRED (but not supplied with the kit)

1. Distilled water
2. Test tubes for diluting standard and samples
3. Measuring cylinder (1000 mL)
4. Precision pipettes (10, 100 and 1000 µL)
5. Variable pipette (1000 µl)
6. Multichannel and/or dispensing pipettes (100 and 200 µL)
7. ELISA washer or multichannel pipette
8. ELISA reader with 450 nm filter, with a 620 nm reference filter if available.

STABILITY AND STORAGE

All components contained in the kit may be used until the expiry date as indicated. The bench stability of the components after opening, reconstitution and/or dilution may be inferred from the table below. When necessary the samples, controls and calibrators can be frozen/thawed up to 5 times. But making aliquots is recommended.

Material/Reagent	State	Storage	Stability
Calibrators, control plasmas	after reconstitution	room temperature -20°C	8 hours 6 months
ELISA test strip	after opening	2 ... 8 °C with adhesive film in plastic bag with drying agent	expiry date
Washing buffer concentrate	after opening	2 ... 8°C	6 months
Washing buffer	1+11.5 dilution of concentrate	2 ... 8 °C	3 weeks
Incubation buffer	after opening	2 ... 8 °C	2 months
Conjugate	after opening	2 ... 8 °C	6 months
	working solution	room temperature	60 minutes
Chromogenic TMB	after opening	2 ... 8 °C	expiry date

TEST PROCEDURE

PREPARATION OF SAMPLES

Material: plasma
Obtaining plasma: mix 9 parts venous blood with 1 part sodium citrate solution (0.11 mol/L) and centrifuge for 15 minutes at a minimum of 2500 g (DIN 58905). The plasma sample may be stored for 3 hours at room temperature; otherwise the sample ought to be frozen immediately after centrifugation. Stable at -20°C for 6 months.

PREPARATION OF REAGENT

1. Before starting the test, all the required components are to be brought to room temperature.
2. Preparing the washing buffer: Dilute 1 part by volume washing buffer concentrate with 11.5 parts by volume distilled water (1+11.5). Mix well! (Diluted washing buffer concentrate = washing buffer). There may be crystalline precipitations which will dissolve at 37°C within 10 minutes.
3. Reconstituting calibrators and control plasmas: Calibrators and control plasmas are reconstituted with 500 µL distilled water and mixed for 10 seconds after a reconstitution time of 15 minutes (vortex mixer). Reconstituted components are clear to slightly turbid.
4. Diluting calibrators, control plasmas and samples (1+25): Dilute 20 µL samples, 20 µL calibrators and/or 20 µL controls with 500 µL each of incubation buffer. Mix for 10 seconds!
5. Preparing the conjugate working solution (1+50): Dilute 1 part by volume conjugate with 50 parts by volume incubation buffer.

For 8 test wells: Mix 20 µL conjugate with 1000 µL incubation buffer.

PERFORMANCE OF THE TEST

SAMPLE INCUBATION (reference 1, 2)	Pipette diluted calibrators, diluted control plasmas and diluted samples into test wells. cover test strips with film. incubate at room temperature	100 µL 45 minutes
WASHING (reference 1,3,4)	washing buffer	3 x 200 µL
CONJUGATE REACTION (reference 1,2)	pipette conjugate working solution into wells, cover test strip with film incubate at room temperature	100 µL 45 minutes
WASHING (reference 1,3,4)	washing buffer	3 x 200 µL
SUBSTRATE REACTION (reference 1,2)	pipette substrate solution into test wells cover test strips with film Incubate at room temperature	100 µL 15 minutes
STOP SOLUTION (reference 1,2)	pipette stopping solution into wells	100 µL
MEASURING (reference 5, 6)	ELISA-Reader, 450 nm	

References

1. Reagents of different lots must not be combined
2. Precision and performance, among others, essentially depend on the following factors:
 - Thorough mixing of all substances used for dilution
 - Test calibrators, controls and samples in duplicates.
 - Incubation to be done at correct temperatures (Room temperature is 20 ... 25°C)
 - Strict observance of the order of pipetting and of the time element as indicated:
 - The time for sample incubation, conjugate and substrate reaction as indicated starts after pipetting the last sample. Incubation times should not vary by more than ±10%.
 - During sample incubation and conjugate reaction, the time for pipetting the diluted calibrators/samples/control plasmas and/or conjugate solutions must not exceed 60 seconds per ELISA test strip (8 wells).
 - During substrate reaction and at stopping, the time needed for pipetting the substrate and/or the stopping solution must not exceed 10 seconds per ELISA test strip. Short pipetting times may be secured by using multichannel- and dispensing pipettes.
3. Label/number strips with a water resistant pen in case the strips accidentally fall out of the frame during testing.
4. After the last washing, wells must be aspirated thoroughly, turned upside down and positioned on a blotting paper; by gentle tapping, the last remnants must be removed.
5. Measuring the difference in wave lengths at 450 and 620 nm or at 450 and 690 nm, the precision of the test is increased.
6. Shake 10 sec., measure within 10 minutes

LIMITATION OF THE TEST

Reduced levels of vWF:CBA are associated with blood group 0. vWF:CBA is also affected by physical exercise, pregnancy, use of contraceptive pill, ethnic group and the antigen increases with age.

WARNING AND PRECAUTIONS

- All human blood or plasma products as well as samples must be considered as potentially infectious. They have to be handled with appropriate care and in strict observance of safety regulations. The rules pertaining to disposal are the same as applied to disposing hospital waste.
- Calibrators and control plasmas are made from human blood and any individual plasma involved in the procedure is HBsAg, HIV 1/2 Ab and HCV-Ab-negative (see labels on kit and/or bottles).
- Stopping solution (sulphuric acid) may irritate the skin. Should acid get into your eyes, wash out immediately with water and consult a doctor.
- The reagents sometimes contain preserving agents (merthiolate). Beware of swallowing! Avoid contact with skin or mucous membranes

ANALYSIS RESULTS

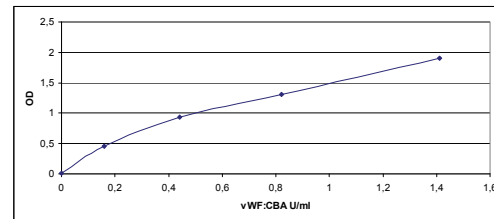
CALCULATION OF THE RESULTS

Setting up a reference curve: X axis: Concentration vWF:CBA U/ml (1U/ml = 100%)
Y axis: Extinction
Graph plot is linear-linear with a point to point or cubic spline

Assessment of reference curve

- The extinction coefficient of the highest calibrator should be between 1.0 and 2.5.
- The validity of the test may be checked on the basis of the calculated control values.

Example of standard curve.



Measuring concentration of samples

- Read off the concentration from the reference curve.
- If there are samples with extinction coefficients higher than that of the highest point on the curve, they have to be prediluted with incubation buffer (1+1). The measured concentration then has to be multiplied with the dilution factor 2.

REFERENCE RANGE

Normal range for vWF:CBA is between 0,4 – 2,5 U/ml (40-250%) (Fig 1)
It is recommended that individual laboratories establish their own normal range.

STANDARDIZATION

The calibration material used is the WHO International standard for Blood coagulation Factor VIII and von Willebrand factor in plasma (human)

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Performance data are given below. Results obtained in individual laboratories may differ.

PRECISION

Reproducibility was determined with different samples (in series and day to day). The following results were obtained:

	Intra assay		Inter assay	
	Sample 1	Sample 2	Sample 1	Sample 2
N	24	24	10	10
Mean (U/mL)	1,372	1,630	1,366	0,306
SD (U/mL)	0,020	0,029	0,074	0,013
CV (%)	1,47%	1,75%	5,39%	4,13%

COMPARISON OF METHODS OR CORRELATION

The TECHNOZYM vWF:CBA (Technoclone) was correlated with two assays measuring 113 samples (24 samples of normal individuals and 89 samples of patients with VWD classified as type 1 (n=26), type 2A/2B (n=11), type 2M (n=45), type 2N (n=4) and type 3 (n=3)). With the Asserachrom vWF:CB of Stago (using human collagen type III) a correlation of r=0,98, slope=0,90 was observed. With the Collagen Binding Assay of Life Diagnostics (using equine collagen 95% type I, 5% type III), a correlation of r=0,99, slope = 0,95 was observed.

ASSAY RANGE:

0.01 – 1.70 U/mL
However the effective range of each test run will depend on the assayed value of calibrator.1.

DETECTION LIMIT:

0.01 U/mL

LITERATURE

- 1) Blood 69: 1691 – 1695, 1987. The effect of ABO blood group on the diagnosis of vWD. Gill et al.
- 2) Thromb Haemost 2000; 83: 127 – 35. Collagen Binding Assay for von Willebrand Factor (vWF:CBA) Detection of vWD and discrimination of vWD Subtypes, Depends on Collagen Source. E J Favalaro
- 3) Haemophilia (Suppl. 3), 1998, 15 – 24. The determination of von Willebrand factor activity by collagen binding assay. Siekmann et al.

PRODUKTBESCHREIBUNG

ANWENDUNG

Von Willebrand Faktor (vWF) ist ein großes, multifunktionelles Glykoprotein mit einer Schlüsselstelle in der primären Hämostase. Er liegt in multimerer Struktur vor und hat mehrere Funktionen:

- Er ist das Trägerprotein für Faktor VIII im Plasma; er bildet einen Komplex und schützt so Faktor VIII vor vorzeitigem proteolytischem Abbau.
- Er vermittelt die Plättchenaggregation über die Anhaftung an Plättchen-membranrezeptoren (GP Ib GP IIb/IIIa) nach vorausgegangener Plättchenaktivierung.
- Er spielt eine Rolle bei der primären Hämostase durch Vermittlung der Plättchenadhäsion an das Subendothel (verletzte Gefäßwand).

Bei der Charakterisierung der adhesiven Eigenschaften wird üblicherweise die Plättchenaggregation untersucht (Meßsystem = Ristocetinabhängige Plättchenaggregation). Diese spiegelt jedoch nicht die physiologische Situation und Funktion des vWF wieder. Zur Erfassung der adhesiven Eigenschaften des vWF nutzt man die Bindung des vWF zu Collagen. Die Bestimmung einer vWF-Collagen Bindung entspricht der physiologischen Funktion des vWF.

ZUSAMMENSETZUNG

1. ELISA-Teststreifen (12): mit jeweils 8 Testvertiefungen; beschichtet mit humanem Collagen Typ III; mit Trockennmittel im Aluminiumbeutel verpackt.
 2. Waschpufferkonzentrat: (PBS; pH 7,3); detergentshaltig; 0,01% Merthiolat; 1 Flasche; 80 mL.
 3. Inkubationspuffer: (PBS; pH 7,3); gefärbt enthält Stabilisatorprotein; Proclin 300, 1 Flasche; 90 mL; gebrauchsfertig
 4. Kalibratoren (Standards): Nummeriert; lyophilisiert; jeweils eine Flasche.
- Die chargenabhängigen Konzentrationen entnehmen Sie bitte den Flaschenetiketten !**
5. Kontrollplasmen "high level" und "low level": zur Richtigkeitskontrolle; lyophilisiert; jeweils eine Flasche.
 6. Konjugat: Polyklonaler Anti-vWF-POX; blaufärbt; 1 Flasche; 0,3 mL
 7. Chromogenes Substrat: TMB (Tetramethylbenzidin) 1 Flasche, 12 mL, gebrauchsfertig
 8. Stopplösung: Schwefelsäure 1,9 mol/L; 1 Flasche; 12 mL, gebrauchsfertig
 9. Abklebefolie: für ELISA-Teststreifen, 2 Stück

BENÖTIGTES MATERIAL (nicht im Testkit enthalten)

1. Aqua dest
2. Röhrchen zur Verdünnung der Standards und Proben
3. Messzylinder (1000 mL)
4. Präzisionspipetten (10, 100 und 1000 µL)
5. Variable Pipette (1000µL)
6. Mehrkanal- bzw. Dispensierpipetten (100 und 200 µL)
7. ELISA-Waschgerät oder Mehrkanalpipette
8. ELISA-Reader mit 450 nm Filter (und 620 nm Referenzfilter falls verfügbar)

LAGERUNG UND STABILITÄT

Alle in der Packung enthaltenen Komponenten sind bis zum aufgedruckten Verfallsdatum haltbar. Die Haltbarkeit der Komponenten nach Öffnung, Rekonstitution bzw. Verdünnung können Sie der folgenden Tabelle entnehmen.

Falls nötig, können Proben, Kontrollen und Kalibratoren fünfmal eingefroren und wieder aufgetaut werden, das Herstellen von geeigneten Aliquots ist jedoch empfehlenswerter.

Material/Reagenz	Zustand	Lagerung	Stabilität
Kalibratoren, Kontrollplasmen	nach Rekonstitution	Raumtemperatur -20°C	8 Stunden 6 Monate
ELISA-Teststreifen	nach Öffnen	2 ... 8 °C mit Abklebefolie in Alubeutel mit Trockennmittel	Verfallsdatum
Waschpuffer- Konzentrat	nach Öffnen	2 ... 8°C	6 Monate
Waschpuffer	1+11,5 Verdünnung des Konzentrats	2 ... 8 °C	3 Wochen
Inkubationspuffer	nach Öffnen	2 ... 8 °C	2 Monate
Konjugat	nach Öffnen Gebrauchslösung	2 ... 8 °C Raumtemperatur	6 Monate 60 Minuten
Chromogenes Substrat	nach Öffnen	2 ... 8 °C	Verfallsdatum

TESTDURCHFÜHRUNG

VORBEREITUNG DER PLASMAPROBEN

Probenmaterial: Plasma
Plasmagewinnung: 9 Teile Venenblut mit 1 Teil Natriumcitratlösung (0,11 mol/L) mischen und 15 min bei einer RZB von mindestens 2500 zentrifugieren (DIN 58905). Die Plasmaprobe kann 3 Stunden bei Raumtemperatur aufbewahrt werden, andernfalls sollte die Probe sofort nach Zentrifugation eingefroren werden. Haltbarkeit -20°C: 6 Monate.

VORBEREITUNG DES REAGENZES

1. Vor Testbeginn alle benötigten Testkomponenten auf Raumtemperatur bringen.
2. Herstellen des Waschpuffers: 1 Volumenteil Waschpufferkonzentrat mit 11,5 Volumenteilen Aqua dest. verdünnen (1+11,5). Gut mischen! (Verdünntes Waschpufferkonzentrat = Waschpuffer). Eventuelle kristalline Niederschläge gehen bei 37°C innerhalb von 10 min in Lösung.
3. Rekonstituieren der Kalibratoren und Kontrollplasmen: Die Kalibratoren und Kontrollplasmen werden mit 500 µl Aqua dest. rekonstituiert und nach einer Rekonstitutionszeit von 15 Minuten 10 Sekunden gemischt (Probenmischer). Rekonstituierte Komponenten sind klar bis leicht trüb.
4. Verdünnen der Kalibratoren, Kontrollplasmen und der Proben (1+25): 20 µL Probe, 20 µL Kalibratoren bzw. 20 µL Kontrollen jeweils mit 500 µL Inkubationspuffer verdünnen. 10 Sekunden mischen!
5. Herstellen der Konjugatgebrauchslösung (1+50): 1 Volumenteil Konjugat mit 50 Volumenteilen Inkubationspuffer verdünnen.

Für 8 Testvertiefungen: 20 µL Konjugat mit 1000 µL Inkubationspuffer mischen.

TESTVERFAHREN

PROBENINKUBATION (Hinweise 1,2)	Verdünnte Kalibratoren, Kontrollplasmen, Proben in Testvertiefungen pipettieren. Teststreifen mit Folie abdecken	100 µL
	Bei Raumtemperatur inkubieren	45 Minuten
WASCHEN (Hinweise 1,3,4)	Waschpuffer	3x200 µL
KONJUGATREAKTION (Hinweise 1,2)	Konjugatgebrauchslösung in Testvertiefungen pipettieren. Teststreifen mit Folie abdecken	100 µL
	Bei Raumtemperatur inkubieren	45 Minuten
WASCHEN (Hinweise 1,3,4)	Waschpuffer	3x200 µL
SUBSTRATREAKTION (Hinweis 1,2)	Substratlösung in Testvertiefungen pipettieren, Teststreifen mit frischer Folie abdecken	100 µL
	Bei Raumtemperatur inkubieren	15 Minuten
STOPPEN (Hinweis 1,2)	Stopplösung in Testvertiefungen pipettieren	100 µL
MESSEN (Hinweis 5)	ELISA-Reader, 450nm	

Hinweise

1. Reagenzien verschiedener Chargen dürfen nicht kombiniert werden.
2. Präzision und Wiederfindung hängen u.a. von folgenden Faktoren entscheidend ab:
 - Gute Durchmischung aller Verdünnungsansätze, 10 Sek. Auf Probenmischer
 - Durchführung von Doppelbestimmungen
 - Inkubation bei der korrekten Temperatur (Raumtemperatur: 20...25 °C)
 - Genaue Einhaltung von Pipettierreihenfolge und Zeitakt:
- Die angegebene Zeit für die Probeninkubation, Konjugat- und Substratreaktion wird nach der Pipettierung der letzten Probe genommen. Inkubationszeiten sollten um nicht mehr als ± 10% variiert werden.
- Bei der Probeninkubation und Konjugatreaktion darf die Zeit für die Pipettierung der verdünnten Kalibratoren/ Proben/ Kontrollplasmen bzw. Konjugat-Lösung 60 Sek. pro ELISA-Teststreifen (8 Vertiefungen) nicht überschreiten.
- Bei der Substratreaktion und beim Stoppen darf die Pipettierzeit der Substrat- bzw. Stopplösung 10 Sek. pro ELISA-Teststreifen nicht überschreiten. Kurze Pipettierzeiten werden durch Verwendung von Mehrkanal- bzw. Dispensierpipetten erreicht.
3. Teststreifen mit wasserfestem Stift markieren, falls sie während des Testes versehentlich aus der Halterung fallen sollten.
4. Nach dem letzten Waschvorgang müssen die Testvertiefungen leer gesaugt und auf saugfähigem Papier ausgeklopft werden.
5. Durch Differenzwellenlängenmessung bei 450 nm und 620 nm (oder 690nm) wird die Präzision des Tests erhöht.
6. 10 Sek. Schütteln, Messung innerhalb von 10 Minuten

EINSCHRÄNKUNG DER TESTDURCHFÜHRUNG

Verminderte Spiegel von vWF:CBA sind mit der Blutgruppe 0 vergesellschaftet. vWF:CBA wird auch beeinflusst durch körperliche Arbeit, Schwangerschaft (durch orale Kontrazeptiva), ethnische Zugehörigkeit und durch den altersbedingten Antigen Anstieg.

WARNHINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN

- Alle humanen Blut- bzw. Plasmaprodukte und Proben müssen als potentiell infektiös angesehen werden. Sie sind mit der notwendigen Sorgfalt und entsprechend den Sicherheitsvorschriften zu behandeln und wie Krankenhausmüll zu entsorgen. Die Kalibratoren und Kontrollen, hergestellt aus humanem Blut, und jedes hierzu verwendete Einzelplasma ist HbsAg, HIV Ak und HCV-Ak negativ (siehe Außen- bzw. Flaschenetikett).
- Stopplösung (Schwefelsäure) kann zu Reizungen der Haut führen. Sollte Säure in die Augen gelangen, sofort mit viel Wasser auswaschen und einen Arzt aufsuchen!
- Die Reagenzien enthalten teilweise Konservierungsmittel (Merthiolat). Nicht schlucken! Haut- oder Schleimhautkontakt vermeiden !

ANALYSENERGEBNISSE

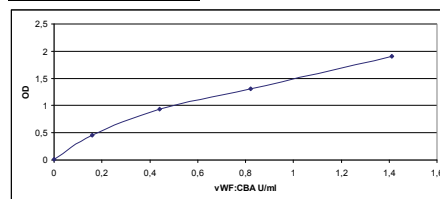
BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

Erstellung der Bezugskurve: X-Achse: Konzentration vWF:CBA U/ml (1 U/mL = 100%)
Y-Achse: Extinktion
Bezugskurve ist linear-linear, Werte sind punkt zu punkt oder mit „cubic spline“

Beurteilung der Bezugskurve

Die Extinktion des höchsten Kalibrators sollte zwischen 1,0 und 2,5 liegen. Die Auswertbarkeit des Tests kann anhand der ermittelten Kontrollwerte überprüft werden

Beispiel einer Standardkurve:



Konzentrationsbestimmungen der Proben

- Konzentrationen der Proben an der Bezugskurve ablesen.
- Sollte der Extinktionswert einer Probe höher als der des höchsten Standards liegen, so muss die Probe mit Inkubationspuffer vorverdünnt werden (1+1). Die ermittelte Konzentration wird in diesem Fall mit dem Verdünnungsfaktor 2 multipliziert.

REFERENZBEREICHE

Der Normalbereich von vWF:CBA liegt zwischen 0,4 – 2,5 U/ml (40-250%) (Fig 1)
Es wird empfohlen, dass jedes Labor einen eigenen Normalbereich bestimmt.

STANDARDISIERUNG

Das verwendete Kalibrationsmaterial ist der WHO International Standard für den Gerinnungsfaktor VIII und den vWF in humanem Plasma.

SPEZIFISCHE LEISTUNGSDATEN

Nachstehend werden repräsentative Leistungsdaten angezeigt. Die Ergebnisse des einzelnen Labors können davon abweichen.

PRÄZISION

Die reproduzierbarkeit wurde mit verschiedenen Proben (in der Serie und von Tag zu Tag) bestimmt. Die Resultate gehen aus nachstehender Tabelle hervor:

	Intra assay		Inter assay	
	Sample 1	Sample 2	Sample 1	Sample 2
N	24	24	10	10
Mean (U/mL)	1,372	1,630	1,366	0,306
SD (U/mL)	0,020	0,029	0,074	0,013
CV (%)	1,47%	1,75%	5,39%	4,13%

METHODENVERGLEICH ODER KORRELATION

Der Technozym vWF:CBA (Technoclon) wurde mit 2 tests verglichen. Es wurden 113 Proben (24 Proben von Normalspendern und 89 Proben von Patienten mit vWD, klassifiziert als Typ 1 (n=26), Typ 2A/2B (n=11), Typ 2M (n=45), Typ 2N (n=4) und Typ 3 (n=3)) gemessen. Mit dem Asserachrom vWF:CB von Stago (verwendet humanes Collagen Typ III) konnte eine Korrelation von r=0.98 mit einer Steigung=0.90 festgestellt werden. Mit dem Collagen Binding Assay von Life Diagnostics (verwendet equines Collagen mit 95% Typ I und 5% Typ III) konnte eine Korrelation von r=0.99 mit einer Steigung = 0.95 festgestellt werden,

MESSBEREICH

0.01 – 1.70 U/mL
Der Messbereich jedes Tests hängt vom tatsächlichen Wert des Kalibrators 1 ab.

BESTIMMUNGSGRENZE

0.01 U/mL

LITERATUR

- 1) Blood 69: 1691 – 1695, 1987. The effect of ABO blood group on the diagnosis of vWD. Gill et al.
- 2) Thromb Haemost 2000; 83: 127 – 35. Collagen Binding Assay for von Willebrand Factor (vWF:CBA) Detection of vWD and discrimination of vWD Subtypes. Depends on Collagen Source. E J Favalaro
- 3) Haemophilia (Suppl. 3), 1998, 15 – 24. The determination of von Willebrand factor activity by collagen binding assay. Siekmann et al.

DESCRIZIONE DEL PRODOTTO

IMPIEGO

Il fattore di Von Willebrand (vWF) è una grossa glicoproteina multifunzionale che gioca un ruolo chiave nella emostasi primaria. Si presenta a struttura multimerica e ricopre diverse funzioni:

- è la proteina vettore del fattore VIII nel plasma; forma un complesso proteggendo in questo modo il fattore VIII da una degradazione proteolitica precoce.
- fa da mediatore per l'aggregazione piastrinica attraverso l'adesione ai recettori di membrana (GP Ib GP IIb/IIIa) in seguito a precedente attivazione piastrinica.
- gioca un ruolo importante nell'emostasi primaria facendo da mediatore per l'adesione delle piastrine al sottotendotelio (parete vasale danneggiata).

Al fine di individuarne le proprietà adesive si testa comunemente l'aggregazione piastrinica (esame = test aggregometrico). Questa, tuttavia, non riflette la situazione fisiologica e la funzionalità del vWF. E' possibile determinare le proprietà adesive del vWF valutando la sua capacità di legarsi al collagene. La determinazione di un legame vWF-collagene rispecchia la funzione fisiologica del vWF.

COMPONENTI

- 1.Strip ELISA (12); con 8 pozzetti ciascuno; ricoperti di collagene umano del tipo III; confezionati in bustine di alluminio con dissecante.
2. Tampone di lavaggio concentrato: (PBS; pH 7,3); contenente detergente; 0,01% meriolato; 1 bottiglia; 80 mL.
3. Tampone di incubazione: (PBS; pH 7,3); di colorante, contiene proteina stabilizzante; Proclin 300; 1 bottiglia; 90 mL; pronto all'uso.
4. Calibratori (Standards): numerati; liofilizzati; una bottiglia di ciascuno.
- Le concentrazioni dipendono dai lotti: fare riferimento all'etichetta sulla bottiglia!**
5. Plasmi di controllo "high level" e "low level": per il controllo di accuratezza; liofilizzati; una bottiglia di ciascuno.
- Le concentrazioni dipendono dai lotti: fare riferimento all'etichetta sulla bottiglia!**
6. Coniugato: anticorpi anti-vWF policlonali-POX (perossidasi); di colore azzurro; 1 bottiglia; 0,3 mL.
7. Substrato cromogeno: TMB (tetrametilbenzidina) 1 bottiglia; 12 mL, pronto all'uso
8. Soluzione di arresto: acido solforico 1,9 mol/L; 1 bottiglia; 12 mL, pronta all'uso
9. Pellicola adesiva: per strip ELISA, 2 pezzi

MATERIALE NECESSARIO (non incluso nel kit)

1. Acqua distillata
2. Provette per la diluizione dei calibratori e dei campioni
3. Cilindro graduato (1000 mL)
4. Pipette di precisione (10, 100 und 1000 µL)
5. Pipetta variabile (1000 µL)
6. Pipette multicanale e dispensatori multipli (100 und 200 µL)
7. Lavatore ELISA o pipetta multicanale
8. Lettore ELISA con filtro 450 nm (e filtro di riferimento a 620 nm se disponibile)

CONSERVAZIONE E STABILITA'

Tutti i componenti contenuti nella confezione sono utilizzabili fino alla data di scadenza indicata. Per la stabilità dei componenti dopo l'apertura, la ricostituzione e la diluizione consultare la tabella qui di seguito riportata.

Se necessario, i campioni, i controlli e i calibratori possono essere congelati e scongelati fino a cinque volte che. Si raccomanda tuttavia di suddividerli in adeguate aliquote.

Materiale/Reagente	Stato	Conservazione	Stabilità
Calibratori, plasmi di controllo	Dopo la ricostituzione	Temperatura ambiente -20°C	8 ore 6 mesi
Strip ELISA	Dopo l'apertura	2 ... 8 °C con pellicola adesiva in bustine di alluminio con dissecante	Fino alla data di scadenza
Tampone di lavaggio concentrato	Dopo l'apertura	2 ... 8°C	6 mesi
Tampone di lavaggio	Diluizione del concentrato 1+11,5	2 ... 8 °C	3 settimane
Tampone di incubazione	Dopo l'apertura	2 ... 8 °C	2 mesi
Coniugato	Dopo l'apertura	2 ... 8 °C	6 mesi
	Soluzione pronta all'uso	Temperatura ambiente	60 minuti
Substrato cromogeno	Dopo l'apertura	2 ... 8 °C	Fino alla data di scadenza

ESECUZIONE DEL TEST

PREPARAZIONE DEI CAMPIONI DI PLASMA

Materiale: plasma
Come ottenere il plasma: miscelare 9 volumi di sangue venoso con un volume di soluzione di citrato di sodio (0,11 mol/L) e centrifugare per 15 min. ad un'accelerazione minima relativa di almeno 2500xg (DIN 58905). Il campione di plasma può essere conservato per tre ore a temperatura ambiente, oppure congelato immediatamente dopo la centrifugazione. Conservazione a -20°C. Durata: 6 mesi.

PREPARAZIONE DEL REAGENTE

1. Prima di procedere al test portare a temperatura ambiente tutti i componenti necessari.
2. Preparazione del tampone di lavaggio: diluire 1 volume di tampone di lavaggio concentrato con 11,5 volumi di acqua distillata (1+11,5). Miscelare bene! (Tampone di lavaggio concentrato diluito = tampone di lavaggio). Disciogliere eventuali cristalli ad una temperatura di 37°C per 10 min.
3. Ricostituzione dei calibratori e dei plasmi di controllo: i calibratori e i plasmi di controllo vengono ricostituiti con 500 µl di acqua distillata e miscelati (agitatore per provette) per 10 secondi dopo un tempo di ricostituzione di 15 minuti. I componenti ricostituiti sono da trasparenti a leggermente torbidi.
4. Diluizione dei calibratori, dei plasmi di controllo e dei campioni (1+25): diluire 20 µL di campione, 20 µL di calibratori e 20 µL di plasmi di controllo rispettivamente con 500 µL di tampone di incubazione. Miscelare per 10 secondi!
5. Preparazione della soluzione d'uso del coniugato (1+50): diluire 1 volume di coniugato con 50 volumi di tampone di incubazione.

Per 8 pozzetti: miscelare 20 µL di coniugato con 1000 µL di tampone di incubazione.

PROCEDURA DEL TEST

INCUBAZIONE CAMPIONI (indicazioni 1,2)	Pipettare i calibratori, i plasmi di controllo e i campioni diluiti nei pozzetti. Coprire gli strip con pellicola	100 µL
	Incubare a temperatura ambiente	45 minuti
LAVAGGIO (indicazioni 1,3,4)	Tampone di lavaggio	3x200 µL
REAZIONE CONIUGATO (indicazioni 1,2)	Pipettare la soluzione d'uso del coniugato nei pozzetti. Coprire gli strip con pellicola	100 µL
	Incubare a temperatura ambiente	45 minuti
LAVAGGIO (indicazioni 1,3,4)	Tampone di lavaggio	3x200 µL
REAZIONE SUBSTRATO (indicazioni 1,2)	Pipettare la soluzione di substrato nei pozzetti; Coprire gli strip con pellicola nuova	100 µL
	Incubare a temperatura ambiente	15 minuti
ARRESTO (indicazioni 1,2)	Pipettare la soluzione di arresto nei pozzetti	100 µL
MISURAZIONE (indicazione 5 6)	Lettore ELISA, 450nm	

Indicazioni

1. Non miscelare reagenti di lotti diversi.
2. La precisione e il recupero dipendono fra l'altro in modo decisivo anche dai seguenti fattori:
 - Buona miscelazione di tutte le soluzioni diluite, 10 sec. nell'agitatore
 - Esecuzione in doppio delle determinazioni
 - Incubazione a temperatura corretta (Temperatura ambiente: 20... 25 °C)
 - Rispetto scrupoloso dell'ordine di pipettaggio e dei tempi indicati:
 - I tempi di incubazione dei campioni e della reazione del coniugato e del substrato indicati vengono presi a partire dal pipettaggio dell'ultimo campione. I tempi di incubazione non dovrebbero variare più del ± 10% .
 - Nell'incubazione dei campioni e nella reazione del coniugato, il tempo per il pipettaggio dei calibratori/campioni/plasmi di controllo e soluzione del coniugato non deve superare i 60 sec. per strip-ELISA (8 pozzetti).
 - Nella reazione del substrato e nell'arresto il tempo di pipettaggio della soluzione di substrato e di arresto non deve superare i 10 sec. per strip ELISA. L'utilizzo di pipette multicanale e di dispensatori multipli permette di ridurre i tempi di pipettaggio.
3. Contrassegnare gli strip con pennarello indelebile nell'evenienza che questi possano cadere per errore dal supporto nel corso del test.
4. Dopo l'ultimo lavaggio svuotare completamente i pozzetti e capovolverli su carta assorbente.
5. La precisione del test aumenta effettuando una misurazione della differenza nella lunghezza d'onda a 450 nm e 620 nm (oppure 690nm).
6. Agitare per 10 sec., misurazione entro 10 minuti

LIMITAZIONI DEL TEST

Il gruppo sanguigno 0 è associato a livelli bassi di vWF:CBA. vWF:CBA è anche condizionato da attività fisica, gravidanza (da contraccettivi orali), appartenenza a determinati gruppi etnici e dall'aumento dell'antigene legato all'età.

AVVERTENZE E NORME DI SICUREZZA

- Tutti gli emoderivati di origine umana, così come i campioni, devono essere considerati potenzialmente infetti. Devono essere maneggiati con la cura necessaria ed in conformità alle norme di sicurezza vigenti e smaltiti come rifiuti ospedalieri. I calibratori e i controlli, ricavati da sangue umano, ed ogni singolo plasma utilizzato nel test sono HbsAg, HIV Ak e HCV-Ak negativi (vedere etichetta esterna e sulla bottiglia).
- La soluzione di arresto (acido solforico) può irritare la pelle. In caso di contatto con gli occhi sciacquare abbondantemente con acqua e consultare un medico.
- I reagenti contengono una parte di conservante (meriolato). Non ingerire! Evitare il contatto con la pelle e le mucose!

RISULTATI DELL'ANALISI

LETTURA DEI RISULTATI

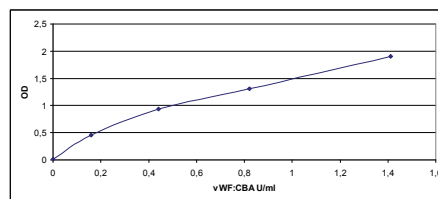
Costruzione di una curva di riferimento: asse X: concentrazione vWF:CBA U/mL (1 U/mL = 100%)
asse Y: estinzione

La curva di riferimento è lineare-lineare, i valori sono punto per punto o con „ spline cubica”

Valutazione della curva di riferimento

L'estinzione del calibratore più elevato dovrebbe posizionarsi fra 1,0 e 2,5. La validità del test potrà essere testata in base ai valori di controllo rilevati.

Esempio di curva standard:



Determinazioni della concentrazione dei campioni

- Ricavare le concentrazioni dei campioni dalla curva di riferimento.
- Nel caso in cui il coefficiente di estinzione di un campione dovesse essere più alto di quello dello standard più elevato, allora occorrerà diluire il campione (1+1). In tal caso la concentrazione ricavata verrà moltiplicata per il fattore di diluizione 2.

VALORI DI RIFERIMENTO

Il valore normale del vWF:CBA è compreso fra 0,4 – 2,5 U/mL (40-250%) (Fig 1)
Si raccomanda a ciascun laboratorio di stabilire i propri intervalli di riferimento.

STANDARDIZZAZIONE

Il materiale di calibrazione utilizzato rispetta lo standard internazionale previsto dall'Organizzazione mondiale della Sanità per il fattore VIII di coagulazione e il vWF nel plasma umano.

PERFORMANCE DEL TEST

Di seguito sono riportate le performance di riferimento del test. I risultati ottenuti possono differire da un laboratorio all'altro.

PRECISIONE

La riproducibilità è stata determinata analizzando diversi campioni (in serie e giorno per giorno). Sono stati ottenuti i seguenti risultati:

	Intra assay		Inter assay	
	Campione 1	Campione 2	Campione 1	Campione 2
N	24	24	10	10
Mean (U/mL)	1,372	1,630	1,366	0,306
SD (U/mL)	0,020	0,029	0,074	0,013
CV (%)	1,47%	1,75%	5,39%	4,13%

METODI A CONFRONTO E CORRELAZIONI

La correlazione tra TECHNOZYM vWF:CBA (Technoclone) e altri due dosaggi è stata effettuata analizzando 113 campioni [24 campioni da soggetti normali e 89 campioni su pazienti con VWD classificate come Tipo 1 (n=26), Tipo 2A/2B (n=11), Tipo 2M (n=45), Tipo 2N (n=4) e Tipo 3 (n=3)]. E' stata osservata una correlazione r=0,98, pendenza=0,90 con il kit Asserachrom vWF:CB (Stago) che utilizza Collagene Umano Tipo III. Una correlazione r=0,99, pendenza=0,95 è stata osservata con il kit Collagen Binding Assay (Life Diagnostic) che utilizza collagene Equino di Tipo I (95%) e di tipo III (5%).

INTERVALLO:

0,01 – 1,70 U/mL
In ogni caso l'intervallo effettivo di ogni dosaggio dipenderà dai valori ottenuti per il calibratore 1.

LIMITE DI RILEVAZIONE:

0,01 U/mL

BIBLIOGRAFIA

- 1) Blood 69; 1691 – 1695, 1987. The effect of ABO blood group on the diagnosis of vWD. Gill et al.
- 2) Thromb Haemost 2000; 83: 127 – 35. Collagen Binding Assay for von Willebrand Factor (vWF:CBA) Detection of vWD and discrimination of vWD Subtypes. Depends on Collagen Source. E J Favaloro
- 3) Haemophilia (Suppl. 3), 1998, 15 – 24. The determination of von Willebrand factor activity by collagen binding assay. Siekmann et al.

DESCRIPCIÓN DEL PRODUCTO

APLICACIÓN

El factor von Willebrand (vWF) es una gran glicoproteína multifuncional. Ocupa un lugar clave en la hemostasis primaria. Tiene una estructura múltiple con varias funciones:

- Es proteína de transporte para el factor VIII en el plasma; forma un complejo y protege por tanto al factor VIII de una temprana descomposición proteolítica.
- Actúa como mediador de agregación de plaquetas adhiriéndose a los receptores de las membranas de las plaquetas (GP Ib by GP lib/IIIa) tras una activación previa de las plaquetas
- Desempeña una función en la hemostasis primaria actuando como mediador entre las plaquetas adheridas y el subendotelio (pared vascular lesionada).

El síndrome von Willebrand (vWS) es la enfermedad hemorrágica que se da con más frecuencia; puede ser hereditaria o adquirida, causada por defectos cuantitativos o cualitativos del vWF. La determinación del antígeno de vWF es parte esencial del diagnóstico.

Para determinar las propiedades adhesivas del vWF, (su capacidad de adhesión a colágenos). Ayuda en la diferenciación de las clases de la enfermedad de von Willebrand y la bioactividad de concentrados.

COMPOSICION

1. Las tiras de pruebas ELISA (12) con 8 pocillos cada una, recubiertas con colágeno humano de tipo III; el agente deshidratante se facilita en una bolsa de aluminio.
2. El concentrado de tampón de lavado: (PBS; pH 7,3); contiene detergente; 0,01% mertiolato; 1 frasco, 80 ml.
3. Tampón de incubación: (PBS; pH 7,3); contiene proteína estabilizadora, Proclin 300; y 1 frasco de colorante, 90 ml, listo para usarse.
4. Calibradores (estándares) numerados; liofilizados; 1 frasco de cada uno.
5. Las concentraciones dependen del lote; consultar la etiqueta en el vial.
6. Plasmás de control "nivel bajo" y "nivel alto" con fines de comprobación, liofilizados; 1 frasco de cada uno.
7. Las concentraciones dependen del lote; consultar la etiqueta en el vial.
8. Conjugado policlonal (Anti-vWF-POX; tinte de azul; 1 frasco, 0,3 mL.
9. Cromógeno TMB (tetrametilbenzidina); 1 frasco, 12 mL; listo para usarse.
10. Solución parada: ácido sulfúrico 1,9 mol/l; 1 frasco, 12 mL; listo para usarse.
11. Película adhesiva para las tiras de pruebas ELISA (2).

MATERIAL NECESARIO (no se suministra con el kit)

1. Agua destilada
2. Tubos de ensayo para diluir estándares y muestras
3. Probeta graduada (1000 mL)
4. Pipetas de precisión (10, 100 und 1000 µL)
5. Pipeta variable (1000 µL)
6. Pipetas multicanal y/o dispensadoras (100 und 200 µL)
7. Lavador ELISA o pipeta multicanal
8. Lector ELISA con filtro de 450 nm (filtro de referencia de 620 nm si resulta disponible.)

ESTABILIDAD Y CONSERVACION

Todos los componentes que contiene el kit se pueden usar hasta la fecha de caducidad indicada. La estabilidad de referencia de los componentes después de su apertura, reconstitución y/o dilución se puede apreciar en la tabla siguiente:

Cuando sea necesario se pueden congelar y descongelar las muestras, controles y calibradores hasta 5 veces. Sin embargo, se recomienda hacer alcuotas.

Material/Reactivo	Situación	Conservación	Estabilidad
Calibradores, plasma de control	después de la reconstitución	temperatura ambiente -20°C	8 horas 6 meses
Tiras de pruebas	después de su apertura	2...8 °C con película adhesiva en una bolsa de plástico con deshidratante	fecha de caducidad
Concentrado de tampón de lavado	después de su apertura	2...8°C	6 meses
Tampón de lavado	1+11,5 dilución de concentrado	2...8°C	3 semanas
Tampón de incubación	después de su apertura	2...8°C	2 meses
Conjugado	después de su apertura	2...8°C	6 meses
	solución de empleo	temperatura ambiente	60 minutos
Cromógeno TMB	después de su apertura	2...8°C	fecha de caducidad

MÉTODO DE LA PRUEBA

PREPERACIÓN DE LAS MUESTRAS

Material: plasma
Obtención del plasma: mézclense 9 partes de sangre venosa con 1 parte de solución de citrato sódico (0,11 mol/L) y centrifúguese durante 15 minutos a (RCF) de al menos 2500 (DIN 58905). La muestra de plasma se puede conservar durante 3 horas a temperatura ambiente; de otra forma, la muestra se debe congelar inmediatamente después de proceder a su centrifugación. Estable a -20°C durante 6 meses.

PREPERACIÓN DEL REACTIVO

1. Antes de iniciar la prueba, deberán ponerse a temperatura ambiente todos los componentes necesarios.
2. Preparar el tampón de lavado: Diluir una parte de volumen de concentrado de tampón de lavado con 11,5 partes de volumen de agua destilada (1+11,5). ¡Mézclense bien! (concentrado de tampón de lavado diluido = tampón de lavado). Pueden producirse precipitaciones cristalinas que se disolverán a 37°C en 10 minutos.
3. Calibradores de reconstitución y plasmás de control: Los calibradores y los plasmás de control se reconstituyen con 500 µL de agua destilada y se mezclan durante 10 segundos después de un tiempo de reconstitución de 15 minutos (mezclador Vortex). Los componentes reconstituídos resultan claros o ligeramente turbios.
4. Diluir los calibradores, plasmás de control y muestras (1+25): Diluir muestras de 20 µL, calibradores de 20 µL y/o controles de 20 µL respectivamente con 500 µL de tampón de incubación. ¡Mézclense durante 10 segundos!
5. Preparar la solución de empleo de conjugado (1+50): Diluir 1 parte de volumen de conjugado con 50 partes de volumen de tampón de incubación.

Para 8 pocillos: Mezclar 20 µL de conjugado con 1000 µL de tampón de incubación.

MÉTODO DE LA PRUEBA

INCUBACIÓN DE LA MUESTRA (referencia 1, 2)	DE LA MUESTRA	calibradores diluidos pipetear los plasmás de control y muestras en pocillos de pruebas. Cubrir las tiras de pruebas con una película.	100 µL
		incubar a temperatura ambiente	45 minutos
LAVADO (referencia 1,3,4)		tampón de lavado	3 x 200 µL
REACCIÓN CONJUGADO (referencia 1, 2)	DE	pipetear la solución de empleo de conjugado en pocillos, cubrir las tiras de pruebas con una película	100 µL
		incubar a temperatura ambiente	45 minutos
LAVADO (referencia 1,3,4)		tampón de lavado	3 x 200 µL
REACCIÓN SUBSTRATO (referencia 1, 2)	DE	pipetear la solución de sustrato en pocillos. Cubrir las tiras de pruebas con una película.	100 µL
		Incubar a temperatura ambiente	15 minutos
SOLUCIÓN PARADA (referencia 1, 2)		pipetear la solución de parada en los pocillos	100 µL
MEDICIÓN (referencia 5, 6)		Lector ELISA, 450 nm	

Advertencias

1. No se deben combinar los reactivos de diferentes lotes
2. La precisión y reproducibilidad dependen principalmente, entre otras cosas, de los siguientes factores:
 - La mezcla a fondo todas las sustancias empleadas en la dilución
 - Deben probarse los calibradores de pruebas, controles y muestras en duplicado
 - La incubación debe llevarse a cabo a temperaturas adecuadas (La temperatura ambiente es de entre 20...25°C)
 - La estricta observancia del orden en que se llevan las pruebas con la pipeta y el elemento de tiempo indicado
 - El tiempo indicado para la incubación de la muestra, la reacción de conjugado y de sustrato se inicia tras efectuar la prueba de la última muestra con la pipeta. Los tiempos de incubación no deberán variar en más de ±10%.
 - Durante la incubación de la muestra y la reacción de conjugado, el tiempo para pipetear los calibradores/muestras/plasmás de control y/o soluciones de conjugado diluidos, no debe exceder de 60 segundos para la tira de prueba ELISA (8 pocillos).
 - Durante la reacción de sustrato y el stop, el tiempo necesario para pipetear el sustrato y/o la solución parada no debe exceder de 10 segundos por cada tira de prueba ELISA. Se podrán lograr tiempos breves en las pruebas usando pipetas multicanal y dispensadoras.
3. Indicar el número en las tiras con un lápiz resistente al agua para el caso en que se desprendan accidentalmente de su sitio durante la realización de la prueba.
4. Después del último lavado, los pocillos deben ser aspirados a fondo, darlos la vuelta y colocarlos sobre un papel absorbente; los últimos residuos se deben eliminar golpeando suavemente.
5. Mediante la medición de la diferencia en longitudes de onda a 450 y 620 nm o a 450 y 690 nm, se incrementa la precisión de la prueba.
6. Agitar durante 10 seg. Medir en 10 min.

LIMITACIONES DE LA PRUEBA

Los niveles reducidos de vWF:CBA están asociados con el grupo sanguíneo O. El vWF:CBA se ve asimismo afectado por el ejercicio físico, el embarazo (el uso de la píldora anticonceptiva), el grupo étnico y el aumento del antígeno I con la edad.

ADVERTENCIA Y PRECAUCIONES

- Todos los productos sanguíneos o plasmáticos, así como las muestras se deben considerar potencialmente infecciosos. Se deben tratar con las debidas precauciones de conformidad con los reglamentos de seguridad biológica vigentes. Los desechos se deberán eliminar como en los hospitales. Los calibradores y plasmás de control son fabricados con sangre humana y cada plasma empleado en el procedimiento es HBsAg, HIV 1/2 Ac y HCV-Ac-negativo (véanse las etiquetas en el kit y/o en los frascos).
- La solución de parada (ácido sulfúrico) puede irritar la piel. En caso de que el ácido alcanzase sus ojos, láveselos inmediatamente y acuda a un médico
- Los reactivos contienen en ocasiones agentes conservantes (mertiolato). ¡NO DEBE SER INGERIDO! Evítese el contacto con la piel o membranas mucosas

RESULTADOS DE LOS ANÁLISIS

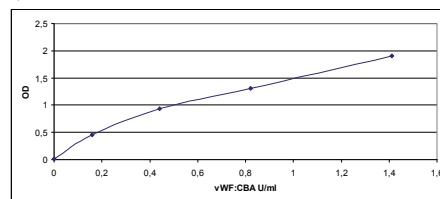
CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

Trazado de una curva de referencia: Eje X: Concentración vWF:CBA U/mL (1 U/mL = 100%)
Eje Y: Extinción

La curva de referencia es lineal-lineal, únanse los valores ranhura punto al punto o cóbica
Evaluación de la curva de referencia:

La extinción del coeficiente del calibrador más alto deberá estar de entre 1,0 y 2,5. La validez de la prueba se puede comprobar sobre la base de los valores de control calculados.

Ejemplo de curva estándar:



Medición de las muestras de concentración:

- Léase la concentración en la curva de referencia.
- En caso de haber muestras con mayores coeficientes de extinción que el punto estándar más elevado en la curva, tendrán que ser diluidos previamente con tampón de incubación (1+1). La concentración medida tiene que multiplicarse por el factor 2 de dilución.

RANGO DE REFERENCIA

Rango normal con respecto al vWF:CBA se encuentra entre 0,4 – 2,5 U/mL (40-250%) (Fig 1) Se recomienda que los distintos laboratorios establezcan su propio rango normal.

ESTANDARDIZACIÓN

El material de calibración empleado es el estándar internacional de la OMS para el factor VIII de coagulación de la sangre y el factor von Willebrand en plasma humano.

CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMIENTO

Los datos de funcionamiento del kit se presentan abajo. Los resultados obtenidos en laboratorios independientes pueden diferir.

PRECISIÓN

La reproducibilidad se determinó con diferentes muestras (en series y día a día). Se obtuvieron los siguientes resultados:

	Intra assay		Inter assay	
	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 1	Muestra 2
N	24	24	10	10
Mean (U/mL)	1,372	1,630	1,366	0,306
SD (U/mL)	0,020	0,029	0,074	0,013
CV (%)	1,47%	1,75%	5,39%	4,13%

COMPARACIÓN DE MÉTODOS O CORRELACIÓN

El TECHNOZYM vWF:CBA (Technoclone) se correlacionó con dos ensayos que media 113 muestras (24 muestras de individuos normales y 89 muestras de pacientes con VWD clasificadas como tipo 1 (n=26), tipo 2A/2B (n=11), tipo 2M (n=45), tipo 2N (n=4) y tipo 3 (n=3). Con el Asserachrom vWF:CB de Stago (utilizando colágeno humano tipo III) se observó una correlación de r=0,98, inclinación=0,90. Con el test Collagen Binding Assay de Life Diagnostics (utilizando 95% de colágeno equino tipo I, 5% tipo III), se observó una correlación de r=0,99, inclinación= 0,95.

RANGO DEL TEST:

0,01– 1,70 U/mL
Sin embargo, el rango efectivo de cada test realizado dependerá del valor testado del calibrador 1.

LÍMITE DE DETECCIÓN:

0,01 U/mL

LITERATURA

- 1) Blood 69: 1691 – 1695, 1987. The effect of ABO blood group on the diagnosis of vWD. Gill et al.
- 2) Thromb Haemost 2000; 83: 127 – 35. Collagen Binding Assay for von Willebrand Factor (vWF:CBA) Detection of VWD and discrimination of VWD Subtypes, Depends on Collagen Source. E J Favalaro
- 3) Haemophilia (Suppl. 3), 1998, 15 – 24. The determination of von Willebrand factor activity by collagen binding assay. Siekmann et al.

DESCRIÇÃO DO PRODUTO

USO

O factor von Willebrand (vWF) é uma glicoproteína multifuncional grande que ocupa uma posição-chave na hemostase primária. Apresenta-se como estrutura múltipla e tem várias funções:

- É a proteína transportadora do factor VIII no plasma e forma um complexo, protegendo, desta maneira, o factor VIII de uma degradação proteolítica precoce.
- Age como um mediador da agregação plaquetária através da adesão aos receptores nas membranas das plaquetas (GP Ib GP IIb/IIIa) após prévia activação das plaquetas.
- Ele ocupa um papel na hemostase primária, agindo como um mediador na adesão das plaquetas ao subendotélio (parede danificada dos vasos).

Para caracterizar as propriedades de adesão, é analisada normalmente a agregação plaquetária (sistema de medição = agregação plaquetária em dependência de ristocetina. Esta, entretanto, não reflete a situação fisiológica e a função do vWF. Para determinar as propriedades de adesão do vWF, é utilizada a ligação do vWF ao colágeno. A determinação de uma ligação de vWF-colágeno corresponde à função fisiológica do vWF.

COMPOSIÇÃO

1. Tiras de teste ELISA (12): com 8 poços de teste cada; revestidas com colágeno humano tipo III; embaladas em saco de alumínio com agente secante.
2. Tampão de lavagem concentrado: (PBS; pH 7,3); contém detergente; 0,01% mertiolato; 1 frasco; 80 mL.
3. Tampão de incubação: (PBS; pH 7,3); contém estabilizador de proteína; Proclin 300, e corante; 1 frasco; 90 ml; pronto a usar
4. Calibradores (padrões): Numerados; liofilizados, um frasco de cada.
As concentrações são dependentes do lote, consultar as etiquetas do frasco!
5. Plasmas de controlo "nível alto" e nível baixo": para verificação; liofilizados, um frasco de cada.
As concentrações são dependentes do lote, consultar as etiquetas do frasco!
6. Conjugado: POX anti-vWF policlonal; coloração azul; 1 frasco; 0,3 mL
7. Substrato cromogénico: TMB (tetrametilbenzidina) 1 frasco; 12 mL; pronto a usar
8. Solução de paragem: ácido sulfúrico 1,9 mol/l; 1 frasco; 12 mL, pronto a usar
9. Películas adesivas: para tiras de teste ELISA, 2 unidades

MATERIAL NECESSÁRIO (não incluído no conjunto de teste)

1. Água destilada
2. Tubos para diluição das soluções-padrão e das amostras
3. Proveta (1000 mL)
4. Pipetas de precisão (10, 100 e 1000 µL)
5. Pipeta variável (1000 µL)
6. Pipetas multicanal ou de dispensação (100 e 200 µL)
7. Dispositivo de lavagem ELISA ou pipeta multicanal
8. Equipamento de leitura ELISA com filtro de 450 nm (e filtro de referência de 620 nm, caso disponível)

CONSERVAÇÃO E ESTABILIDADE

Todos os componentes da embalagem têm validade até a data impressa. A validade dos componentes, após abrir a embalagem, reconstituição ou diluição pode ser consultada na tabela a seguir.

Se necessário, as amostras, controlos e calibradores podem ser congelados e novamente descongelados cinco vezes, mas é recomendada a armazenagem em alíquotas adequadas.

Material/reagente	Estado	Armazenagem	Estabilidade
Calibradores, plasmas de controlo	após reconstituição	Temperatura ambiente -20°C	8 horas 6 meses
Tiras de teste ELISA	depois de aberto	2 ... 8 °C com filme adesivo em saco de alumínio, com agente secante	Data de validade
Tampão de lavagem concentrado	depois de aberto	2 ... 8°C	6 meses
Tampão de lavagem	1+11,5 diluição do concentrado	2 ... 8 °C	3 semanas
Tampão de incubação	depois de aberto	2 ... 8 °C	2 meses
Conjugado	depois de aberto	2 ... 8 °C	6 meses
	Solução de trabalho	Temperatura ambiente	60 minutos
Substrato cromogénico	depois de aberto	2 ... 8 °C	Data de validade

EXECUÇÃO DO TESTE

PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE PLASMA

Materiais das amostras: Plasma
Separação do plasma: Misturar 9 partes de sangue venoso com 1 parte de solução de citrato de sódio (0,11 mol/L) e centrifugar durante 15 min com pelo menos 2500 de FCR (força centrífuga radial conforme DIN 58905). A amostra de plasma pode ser conservada em temperatura ambiente durante 3 horas. Caso contrário, a amostra deve ser congelada imediatamente após a centrifugação. Validade – 20°C: 6 meses.

PREPARAÇÃO DO REAGENTE

1. Antes de iniciar o teste, levar todos os componentes do teste à temperatura ambiente.
2. Preparação do Tampão de Lavagem: diluir uma parte de tampão de lavagem concentrado em 11,5 partes de água destilada (1+11,5). Misturar bem (tampão de lavagem concentrado diluído = tampão de lavagem). Eventuais formações cristalinas entram em solução a 37°C dentro de 10 min.
3. Reconstituição dos calibradores e plasmas de controlo: Os calibradores e plasmas de controlo são reconstituídos com 500 µL de água destilada e, depois de um tempo de reconstituição de 15 minutos, misturados durante 10 segundos (misturador de amostras). Os componentes reconstituídos são transparentes a levemente turvos.
4. Diluição dos calibradores, plasmas de controlo e amostras (1+25): Misturar 20 µL de amostra, 20 µL de calibradores ou 20 µL de agentes de controlo com 500 µL de tampão de incubação. Misturar durante 10 segundos!
5. Preparação da solução de trabalho do conjugado (1+50): Diluir 1 parte de conjugado com 50 partes de tampão de incubação

Para 8 poços de teste: misturar 20 µL de conjugado com 1000 µL de Tampão de incubação.

PROCEDIMENTO DO TESTE

INCUBAÇÃO DAS AMOSTRAS (Orientações 1,2)	Pipetar os calibradores diluídos, plasmas de controlo e amostras para os poços de teste. Cobrir as tiras de teste com película	100 µL
	Incubar a temperatura ambiente	45 minutos
LAVAR (Orientações 1,3,4)	Tampão de lavagem	3x200 µL
REAÇÃO DO CONJUGADO (Orientações 1,2)	Pipetar a solução de trabalho de conjugado para os poços de teste. Cobrir as tiras de teste com película	100 µL
	Incubar a temperatura ambiente	45 minutos
LAVAR (Orientações 1,3,4)	Tampão de lavagem	3x200 µL
REAÇÃO DO SUBSTRATO (Orientação 1,2)	Pipetar a solução de substrato para os poços de teste. Cobrir as tiras de teste com película nova	100 µL
	Incubar a temperatura ambiente	15 minutos
PARAR (Orientação 1,2)	Pipetar a solução de paragem para os poços de teste	100 µL
MEDIÇÃO (Orientação 5)	Instrumento de leitura ELISA, 450nm	

Orientações

1. Reagentes de lotes diferentes não podem ser misturados.
2. A precisão e o desempenho dependem, entre outros, dos seguintes factores:
 - Misturar bem todas as soluções de diluição, 10 segundos no vortex.
 - Execução de testes em duplicado
 - Incubação na temperatura correcta (Temperatura ambiente: 20...25 °C)
 - Observação exacta da sequência de pipetagem e cronometragem.
3. O tempo indicado para a incubação da amostra, reacção do conjugado e do substrato é contado depois de pipetar a última amostra. Os tempos de incubação não devem variar em mais do que ± 10%.
4. Na incubação da amostra e reacção do conjugado, o tempo para pipetar os calibradores/amostras/plasmas de controlo ou solução de conjugado não devem ultrapassar 60 segundos para cada tira de teste ELISA (8 poços).
5. Na reacção do substrato e na paragem, o tempo para pipetar o substrato ou a solução de paragem não deve ultrapassar 10 segundos para cada tira de teste ELISA. O uso de pipetas multicanal ou pipetas de dispensação permite reduzir o tempo de pipetagem.
6. Marcar as tiras de teste com caneta à prova de água, para o caso de acidentalmente saírem do seu lugar durante o teste.
7. Após o último procedimento de lavagem, os poços de teste devem ser aspirados completamente e batidos sobre papel absorvente.
8. Através da medição em comprimentos de ondas diferentes a 450 nm e 620 nm (ou 690nm), a precisão do teste será aumentada.
9. Agitar 10 segundos, medição dentro de 10 minutos

LIMITAÇÃO DA EXECUÇÃO DO TESTE

Níveis reduzidos de vWF:CBA são associados ao grupo sanguíneo O.
O vWF:CBA também é influenciado pelo trabalho físico, gravidez (anticoncepcionais via oral) e raça. Os antígenos aumentam com a idade.

ADVERTÊNCIAS E PRECAUÇÕES

- Todos os produtos de sangue humano, plasma e amostras devem ser considerados como potencialmente infecciosos. Devem ser manuseados com os cuidados necessários e conforme os regulamentos de segurança e devem ser removidos como lixo hospitalar. Os calibradores e controlos, produzidos com sangue humano e cada plasma individual utilizado acusaram um resultado negativo nos testes referentes aos HBsAg, HIV Ac e HCV Ac (ver etiqueta externa ou no frasco).
- A solução de paragem (ácido sulfúrico) pode ocasionar irritações da pele. No caso do ácido atingir os olhos, lavar imediatamente com bastante água e consultar um médico!
- Alguns reagentes contêm conservantes (mertiolato). Não ingerir! Evitar contacto com a pele ou mucosas!

RESULTADOS DAS ANÁLISES

CÁLCULO DOS RESULTADOS

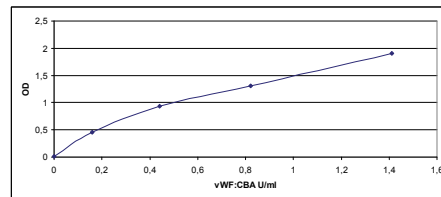
Elaboração da curva de calibração: Eixo X: Concentração vWF:CBA U/mL (1 U/mL = 100%)
Eixo Y: Extinção (OD)

A curva de calibração é linear-linear, com ajuste ponto ao ponto ou cúbico ("cubic spline")

Avaliação da curva de calibração

A extinção do calibrador mais alto deve situar-se entre 1,0 e 2,5.
A validade do teste pode ser verificada com base nos valores de controlo determinados.

Exemplo de uma curva-padrão:



Determinação das concentrações das amostras

- Fazer a leitura das concentrações das amostras na curva de calibração.
- Caso o valor de extinção de uma amostra se situe acima do valor do padrão mais alto, então a amostra deve ser previamente diluída com tampão de incubação (1+1). Neste caso, a concentração determinada é multiplicada pelo factor de diluição 2.

VALORES DE REFERÊNCIA

Os valores normais de vWF:CBA situam-se entre 0,4 – 2,5 U/mL (40-250%) (Fig 1)
Recomenda-se que cada laboratório determine o seu próprio intervalo normal.

ESTANDARDIZAÇÃO

O material de calibração utilizado é o padrão internacional da WHO (Organização Mundial da Saúde) para o factor de coagulação VIII e para o vWF no plasma humano.

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

Os dados do desempenho são mostrados abaixo. Os resultados obtidos em laboratórios individuais podem ser diferentes.

PRECISÃO

A reprodutibilidade foi determinada com amostras diferentes (em séries e dia a dia). Foram obtidos os seguintes resultados:

	Intra assay		Inter assay	
	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 1	Amostra 2
N	24	24	10	10
Mean (U/mL)	1,372	1,630	1,366	0,306
SD (U/mL)	0,020	0,029	0,074	0,013
CV (%)	1,47%	1,75%	5,39%	4,13%

COMPARAÇÃO DE MÉTODOS OU CORRELAÇÃO

O TECHNOZYM vWF:CBA (Technoclone) foi correlacionado com dois ensaios medindo 113 amostras (24 amostras de indivíduos normais e 89 amostras de pacientes com VWD, classificados como tipo 1 (n=26), tipo 2A/2B (n=11), tipo 2M (n=45), tipo 2N (n=4) e tipo 3 (n=3)). Com o Asserachrom vWF:CB da Stago (usa colágeno humano tipo III) foi observada uma correlação de r=0,98, declive=0,90. Com o Collagen Binding Assay da Life Diagnostics (usa colágeno de cavalo, 95% tipo I, 5% tipo III) foi observada uma correlação de r=0,99, declive=0,95.

INTERVALO DO ENSAIO:

0,01 – 1,70 U/mL
No entanto o intervalo efectivo de cada corrida de teste vai depender do valor do calibrador testado.

LIMITE DE DETECÇÃO:

0,01 U/ml

LITERATURA

- 1) Blood 69: 1691 – 1695, 1987. The effect of ABO blood group on the diagnosis of vWD. Gill et al.
- 2) Thromb Haemost 2000; 83: 127 – 35. Collagen Binding Assay for von Willebrand Factor (vWF:CBA) Detection of vWD and discrimination of vWD Subtypes, Depends on Collagen Source. E J Favalaro
- 3) Haemophilia (Suppl. 3), 1998, 15 – 24. The determination of von Willebrand factor activity by collagen binding assay. Siekmann et al.

DESCRIPTION DU PRODUIT

UTILISATION PRÉVUE

Le Facteur de von Willibrand (vWF) est une grande protéine multifonctionnelle, qui occupe une position clé au cours de l'hémostase primaire. Elle a une structure multimérique et remplit plusieurs fonctions:

- C'est la protéine de transport du Facteur VIII dans le plasma; un complexe se forme, protégeant ainsi le Facteur VIII d'une dégradation protéolytique précoce.
- Il agit en tant que médiateur de l'aggrégation plaquettaire en s'attachant aux récepteurs de la membrane plaquettaire (GP Ib et GP IIb/IIIa) après une première activation des plaquettes.
- Il joue un rôle dans l'hémostase primaire en agissant en tant que médiateur lors de l'adhésion des plaquettes au sous endothélium lors de lésion(s) vasculaire(s).

Le syndrome de Willibrand est une maladie hémorragique qui se transmet très fréquemment, elle peut être héréditaire ou acquise, et est à l'origine de l'absence ou de défaut de fonctionnement du vWF. Afin d'analyser les propriétés adhésives, l'aggrégation plaquettaire est mesurée en routine. Cependant, cela ne reflète ni les propriétés physiologiques du vWF ni ses propriétés fonctionnelles. La capacité de liaison du vWF au collagène sert de paramètre pour déterminer les propriétés adhésives du vWF car elle reflète ses propriétés physiologiques

CONTENU

- 12 bandelettes de test ELISA contenant 8 puits chacune avec du collagène humain de type III, et un agent détersant ; emballés dans un sac d'aluminium.
- Tampon de lavage concentré: (PBS; pH 7,3) ; contenant du détergent; 0,01% de merthiolate; 1 bouteille 80 mL.
- Tampon d'incubation: (PBS ; pH 7,3) ; 1 bouteille 90 mL prêt à l'emploi, Proclin 300, et colorant.
- Calibrateur numérotés; chacun dans une fiole.
- Les concentrations sont dépendant du lot; consulter les étiquettes sur les fioles.
- 2 Contrôles plasmatiques "high level" et "low level" ; lyophilisés; une bouteille de chaque. Les concentrations sont dépendant du lot; consulter les étiquettes sur les fioles.
- Conjugué concentré (anticorps polyclonal dirigé contre le vWF marqué à la peroxydase de Raifort) de couleur bleu, une fiole, 0,3 mL.
- Chromogène TMB (tétraméthylbenzidine): 1 bouteille, 12 mL ; prêt à l'emploi.
- Solution d'arrêt: acide sulfurique 1,9 mol/L; 1 bouteille 12 mL; prêt à l'emploi.
- 2 films adhésives pour les bandes de tests ELISA.

MATÉRIEL REQUIS (non fourni avec le kit)

1. Eau distillée
2. Tubes de dilution pour les calibrateurs et les échantillons
3. Epruvette graduée de 1000 mL
4. Pipettes de précision (10, 100, 1000 µL)
5. Pipette variable (1000 µL)
6. Pipettes multi canal (100, 200 µL)
7. Automate de lavage ELISA ou pipette multi canal.
8. Lecteur de plaque ELISA équipée d'un filtre à 450 nm et si possible d'un filtre de référence à 620 nm.

STABILITÉ ET STOCKAGE

Tous les composants de ce kit doivent être utilisés avant la date de péremption indiquée. La stabilité des composants après ouverture, reconstitution et/ou dilution est documentée dans le tableau ci-dessous:

Si nécessaire, les échantillons, contrôles et standards peuvent être congelés et décongelés jusqu'à 5 fois, cependant effectuer des aliquots est le plus recommandé.

Matériel/Réactif	État	Stockage	Stabilité
calibrateur et contrôles	après reconstitution	Température ambiante -20°C	8 heures 6 mois
ELISA test strip	Après ouverture	2 ... 8 °C sous film adhésif avec agent détersant dans un sac en plastique	Date de péremption
tampon de lavage concentré	Après ouverture	2 ... 8 °C	6 mois
tampon de lavage	1+11,5 dilution du concentré	2 ... 8 °C	3 semaines
tampon d'incubation	Après ouverture	2 ... 8 °C	2 mois
Conjugué	Après ouverture	2 ... 8 °C	6 mois
	Solution conjugué prête à l'emploi	Température ambiante	60 minutes
substrat TMB	Après ouverture	2 ... 8 °C	Date de péremption

PROCÉDURE DU TEST

PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

Matériel : Plasma
 Obtention des plasmas : Mélanger 9 volume de sang veineux avec 1 volume de solution Sodium Citrate (0,11mol/L) et centrifuger pendant 15 minutes à une vitesse minimum de 2500 g (DIN 58905). Les échantillons de plasmas doivent être stockés pendant 3 heures à température ambiante, ou doivent être immédiatement congelés après centrifugation. Les plasmas ainsi obtenus sont stables à -20°C pendant 6 mois.

PRÉPARATION DES RÉACTIFS

1. Tous les composants doivent être amenés à la température ambiante avant de commencer le test.
2. Préparation du tampon de lavage: Diluer 1 vol de tampon de lavage concentré avec 11,5 vol d'eau distillée (1+11,5). Bien mélanger! Il se peut qu'il y ait des précipitation cristallines: celles-ci se dissolvent à 37°C en 10 minutes à température ambiante.
3. Reconstitution des calibrateurs et des contrôles plasmatiques: Les calibrateurs et les contrôles plasmatiques sont reconstitués avec 500 µL d'eau distillée et mélangés pendant 10 secondes après 15 minutes de temps de reconstitution. Les composants ainsi reconstitués sont claires ou très légèrement troubles.
4. Dilution des calibrateurs, contrôles plasmatiques et des échantillons (1+25): Diluer 20 µL d'échantillon, 20 µL de calibrateurs, et/ou 20 µL de contrôle plasmatique avec 500 µL de tampon d'incubation chacun. Mélanger pendant 10 sec.
5. Préparer la solution conjugué prête à l'emploi (1+50): Diluer 1 vol de solution de conjugué concentré avec 50 vol de tampon d'incubation.

Pour 8 puits de test: Mélanger 20 µL de conjugué concentré avec 1000 µL de tampon d'incubation.

PERFORMANCE DU TEST

INCUBATION L'ÉCHANTILLON (références 1, 2)	DE	Calibrateurs dilués, Contrôles plasmatiques dilués, Échantillons dilués dans chaque puit. Couvrir les bandelettes avec un film.	100 µL
		Incuber à température ambiante	45 minutes
LAVAGE (référence 1,3,4)	TAMPON DE LAVAGE		3 x 200 µL
RÉACTION DU CONJUGAT (référence 1,2)		Pipeter la solution de conjugué prête à l'emploi dans les puits, couvrir les bandelettes de test avec un film.	100 µL
		Incuber à température ambiante	45 minutes
LAVAGE (référence 1,3,4)	TAMPON DE LAVAGE		3 x 200 µL
RÉACTION DU SUBSTRAT (référence 1,2)		pipeter la solution de substrat dans chaque puit. Couvrir les bandelettes avec un film.	100 µL
		Incuber à température ambiante	15 minutes
SOLUTION D'ARRÊT (référence 1,2)		pipeter la solution d'arrêt dans les puits	100 µL
MEASURE (référence 5, 6)		Lecteur de plaque ELISA, 450 nm	

Température ambiante: 20...25°C

Références:

1. Ne pas utiliser ensemble des réactifs provenant de différents lots.
2. Le bon déroulement et la précision du test dépendent des facteurs suivants:
 - Bien mélanger les substances utilisées lors des dilutions
 - Les standards, les contrôles et les échantillons doivent être testés en dupliqué.
 - Les incubations doivent être effectuées à la bonne température.
 - Respecter strictement l'ordre de pipetage et le temps pour chaque élément comme indiqué: le temps d'incubation des échantillons, conjugués, et substrat démarre après le pipetage du dernier échantillon. Les temps d'incubation ne doivent pas varier de +/- 10%.
 - Durant l'incubation de l'échantillon et la réaction du conjugué, le temps nécessaire au pipetage du calibrateur/échantillon/contrôle plasmatique dilué et/ou des solutions de conjugué, ne doivent pas excéder 60 secondes par bandelette de test ELISA (8 puits).
 - Durant la réaction du substrat et lors de l'arrêt de la réaction, le temps nécessaire au pipetage du substrat ne doit pas excéder 10 secondes par bandelette. Pour cela utiliser de préférence une pipette multi canal.
3. Numéroté les bandelettes avec un feutre résistant à l'eau au cas où les bandes tombent accidentellement de la plaque durant le test.
4. Après le dernier lavage, les puits doivent être rigoureusement secs : Pour cela positionner la plaque d'analyse sur du papier absorbant et taper doucement la plaque d'analyse
5. Mesurer l'absorbance à 450 et 620 nm ou à 450 et 690 nm, la précision du test est alors Augmentée
6. Secouer 10 sec., Mesurer dans un intervalle de 10 minutes

LIMITES DU TEST

Les faibles niveaux de vWF:CBA sont associés au groupe sanguin O. Les niveaux d'antigènes vWF:CBA dépendent de l'exercice physique, la grossesse, l'utilisation de pilules contraceptives, du groupe ethnique, le niveau de l'antigène augmente aussi avec l'âge.

AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS

- Tous les produits élaborés à partir de sang humain et de plasma doivent être considérés comme étant potentiellement infectieux. Ils doivent être manipulés avec une attention particulière, et ceci dans la stricte observance des règles de sécurité. Les règles concernant le stockage des déchets sont identiques à celles appliquées à l'hôpital.
- Les standards et contrôles plasmatiques sont élaborés à partir de sang humain, et tout plasma utilisé lors du test est HBS Ag, HIV 1/2 et HCV-Ag-négatif (voir les étiquettes sur le kit et/ou sur les bouteilles).
- a solution d'arrêt (acide sulphurique) peut être irritante pour la peau. En cas de contact avec les yeux, rincer immédiatement avec de l'eau distillée et consulter un docteur.
- Les réactifs contiennent des agents préservant (merthiolate). Ne pas avaler! Eviter tout contact avec la peau ou les muqueuses.

RÉSULTATS DU TEST

CALCUL DES RÉSULTATS

Établissement de la courbe de référence:

Axe X : Concentration de vWF:CBA U/ml (1 U/mL=100%)

Axe Y : Absorbance

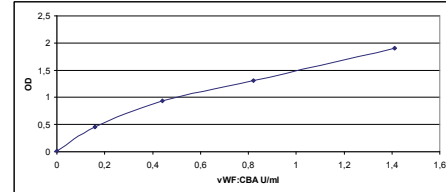
La courbe de référence est linéaire linéaire en point au point ou cubic spline.

Évaluation de la courbe de référence:

• Le coefficient de la courbe d'extinction du calibrateur le plus grand devrait se situer entre 1,0 et 2,5.

• La validité du test doit être vérifiée sur la base des valeurs calculées des contrôles

Exemple de courbe de référence :



Mesure des concentrations des échantillons:

• Lire la concentration à partir de la courbe de référence.

• Si des échantillons présentent un coefficient d'extinction supérieur à celui du plus haut point de la courbe de référence, il doit alors être pré dilué avec le tampon d'incubation (1+1), et la concentration mesurée doit alors être multipliée par 2.

GAMME DE RÉFÉRENCE

La gamme normale de référence est comprise entre 0,4 et 2,5 U/mL (40-250%) (Fig 1)

Il est recommandé que les différents laboratoires établissent leur propre gamme.

STANDARDISATION

Le matériel utilisé pour la standardisation est le calibrateur international pour le facteur VIII de la coagulation sanguine et le facteur plasmatique de von Willebrand homologué par l'OMS.

PERFORMANCES

Les performances sont établies à partir des données ci-dessous. Les résultats obtenus peuvent varier selon les Laboratoires.

PRÉCISION

La reproductibilité a été déterminée avec différents échantillons (en séries et sur plusieurs jours) Les résultats suivants ont été obtenus:

	Intra assay		Inter assay	
	échantillon 1	échantillon 2	échantillon 1	échantillon 2
N	24	24	10	10
Mean (U/mL)	1,372	1,630	1,366	0,306
SD (U/mL)	0,020	0,029	0,074	0,013
CV (%)	1,47%	1,75%	5,39%	4,13%

COMPARAISON DES METHODES OU CORRELATION

Le coffret TECHNOZYM vWF:CBA (Technoclone) a été corrélié à deux méthodes comprenant 113 échantillons (24 échantillons de patients normaux et 89 échantillons de patients ayant une maladie de Willebrand de type 1 (n=26), de type 2A/2B (n=11), de type 2M (n=45), de type 2N (n=4) et de type 3 (n=3). Une corrélation a été faite avec le coffret Asserachrom vWF:CB de Stago avec pour résultat une pente = 0,90 et r = 0,98. Une corrélation a été faite avec le coffret Collagen Binding Assay de Life Diagnostics (utilisant du collagène de cheval 95% type I, 5% type III) avec pour résultat une pente = 0,95 et r = 0,99.

ZONE DE MESURE:

0.01 – 1.70 U/mL

La zone de mesure effective pour chaque série de tests dépendra évidemment de la valeur du calibrateur 1.

LIMITE DE DETECTION:

0.01 U/mL

LITTÉRATURE

- 1) Blood 69; 1691 – 1695, 1987. The effect of ABO blood group on the diagnosis of vWD. Gill et al.
- 2) Thromb Haemost 2000; 83: 127 – 35. Collagen Binding Assay for von Willebrand Factor (vWF:CBA) Detection of vWD and discrimination of vWD Subtypes. Depends on Collagen Source. E J Favalaro
- 3) Haemophilia (Suppl. 3), 1998, 15 – 24. The determination of von Willebrand factor activity by collagen binding assay. Siekmann et al.

normal distribution of normal plasma (Fig 1) and patient plasma (Fig 2 – 5) / Normalverteilung von Normalplasmen (Fig 1) und Patientenplasmen (Fig 2 – 5) / distribuzione normale de plasma normale (Fig 1) ed plasma paziente (Fig 2 – 5) / distribución normal de plasmas normal (Fig 1) y plasmas paciente (Fig 2 – 5) / distribuição normal de plasmas normal (Fig 1) e plasmas paciente (Fig 2 – 5) / distribution normale de plasmas normale (Fig 1) et de plasmas patient (Fig 2 – 5)

Fig 1:

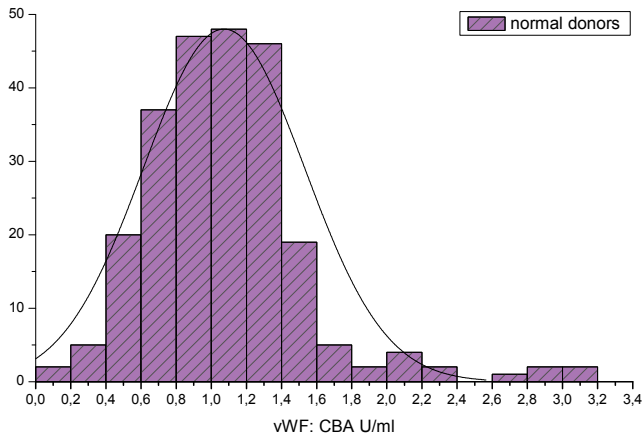


Fig 2:

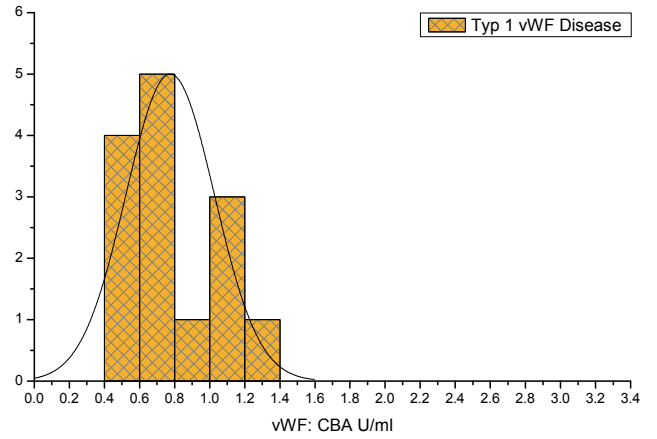


Fig 3:

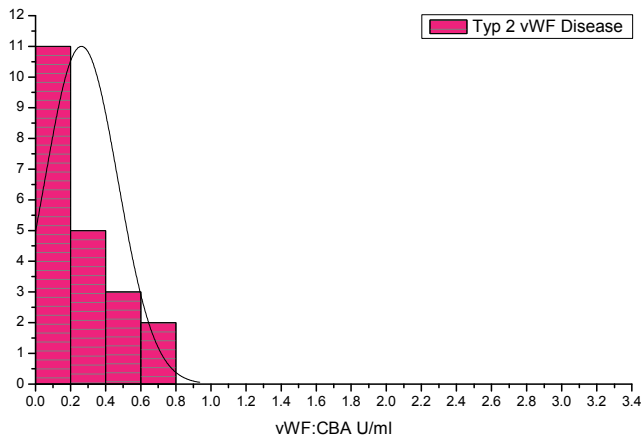


Fig 4:

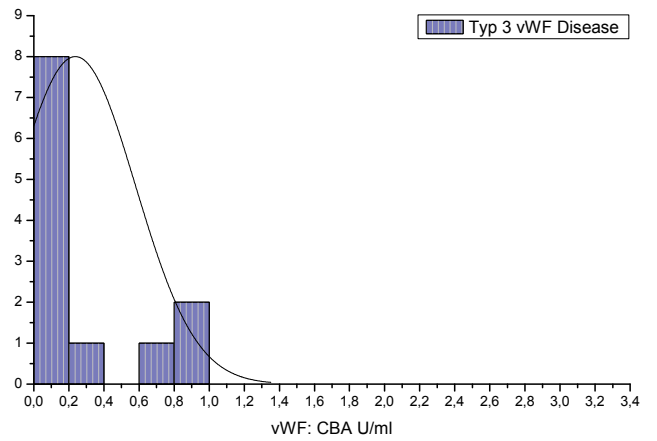


Fig 5:

