LifeDiagnostics

Collagen Binding Assay

For the determination of VWF function

INTENDED USE
This document is only for use in the United States of America.
Enzyme immunoassay for the determination of von Willebrand Factor (VWF) function in human plasma. The Collagen Binding Assay (CBA) can be used to differentiate between von Willebrand Disorder (VWD) Type I and Type II when used in conjunction with the VWF antigen (VWF:Ag) [1] assay.

SUMMARY AND EXPLANATION
VWF is an important blood clotting protein, involved in both assisting platelet adhesion and stabilization of clotting factor VIII.

In von Willebrand Disease (VWD) there is typically a partial quantitative deficiency (classified as VWD Type 1) or a qualitative deficiency (classified as VWD type 2). VWD Type 3 is rare and characterised by virtually complete deficiency of VWF.

The incidence of VWD worldwide is estimated at 1% to 3% but may be more common as mild cases may remain undetected. The CBA is an ELISA procedure that quantitates the collagen binding capacity (VWF:CB) [1] of VWF to collagen coated microtitre wells [3] . Collagen binding of VWF is associated with the higher molecular weight (HMW) forms of VWF, believed to be functionally more important in haemostasis than lower molecular weight forms (LMW). Therefore CBA may correlate more closely with VWF function and bleeding problems than regular ELISAs for VWF [4,5] which measures total (LMW + HMW) VWF.

TEST PRINCIPLE
During the first incubation step the VWF multimers present in the sample bind to the collagen which is attached to the surface of the microwell plate. Unbound plasma proteins are then removed by washing and in a second reaction, peroxidase conjugated anti-VWF antibodies bind to the captured VWF multimers. Excess antibody is washed off and the bound activity is determined by the addition of substrate. The colour development of the substrate is stopped by the addition of acid. The resulting colour intensity, which is proportional to high molecular weight VWF multimers present in the sample, is determined photometrically. The supplied calibrated standards can be used to quantify the high molecular weight VWF multimers.

REAGENTS
Composition
Microwell plate (1 x 96 well, 6 x 16 well strips); coated with collagen. 40x Wash buffer concentrate: Tris buffer solution, preservatives and dye. Normal standard / Cryoprecipitate / Cryosupernatant controls: Lyophilized human plasma, sodium azide and dye.
Conjugate: Horseradish peroxidase (HRP) conjugated anti-human VWF and dye.
Substrate: TMB and solvent
Stopping Solution: 2M H_2S0_4

Warnings and precautions
For investigational use - the performance characteristics of this product have not been established.
Treat as potentially infectious. All human plasmas prepared for lyophilization have been tested and confirmed as negative for HBsAg and antibodies to HIV-1, HIV-2 and HCV using FDA approved assays.
When disposing of azide, always flush with large volumes of water to avoid the possibility of an explosive residue forming in metal plumbing.
Avoid skin and eye contact with stopping solution and concentrated wash buffer.

Preparation for use
Bring all kit components to room temperature prior to use.
40x Wash Buffer concentrate: Prepare a wash buffer solution by diluting the concentrate 1 in 40 with purified water. Ensure sufficient wash buffer solution is prepared for dilution of samples, controls and standard in addition to washing the plate. (ie. For a full plate assay, dilute 22 ml of concentrate to 880 ml with distilled water). Wash buffer should be brought to room temperature and mixed well before use.

Note: If particles are present in the 40X Wash Buffer Concentrate, mix solution well before dilution.

Normal Standard: Reconstitute the normal standard with 2ml of wash buffer solution. (This is now equivalent to a 200% standard). Allow to stand at room temperature for 10-15 minutes before use.
Using the wash buffer solution, prepare 100%, 50%, 25% and 12.5% standards. (ie. Make 1/2, 1/4, 1/8 and 1/16 dilutions of the reconstituted 200% standard).

Cryoprecipitate and Cryosupernatant controls: Reconstitute the cryoprecipitate and cryosupernatant controls with 2ml of wash buffer solution. Allow to stand at room temperature for at least 15 minutes before use.

Conjugate: Reconstitute conjugate with 11ml of wash buffer solution at least 5 minutes before it is required for use. It is important that the conjugate is protected from light exposure.

Substrate: Ready for use.

Storage and stability
All components are stable until the expiry date shown on the vial when stored unopened at 2-8°C.

Reconstituted standard and control plasmas may be stored in aliquots at -20°C for 1 month or -80°C for 3 months. Do not freeze-thaw more than once. Do not freeze standards and controls after further dilution with wash buffer solution. Samples should be thawed at 37°C then equilibrated to room temperature before use.

Unused conjugate is stable for 3 months at -20°C or 6 months at -80°C.
Wash buffer solution may be stored for 1 month at 2-8°C.
Replace unused microwell strips in foil pouch provided and seal with tape until use.
Reagents should not be interchanged between different kit lots.

Indications of instability/deterioration
If there is no evidence of vacuum when the vials are opened and/or the reagent does not appear dry, or if the liquid substrate solution appears blue before use, the kit should be returned to the manufacturer or local distributor.

SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION
Sample collection
Caution: Treat all plasmas as potentially infectious.
Collect and process blood in accordance with NCCLS Standard H21-A3: Collection, Transport and Processing of Blood Specimens for Coagulation Testing and General Performance of Coagulation Assays; Approved Guideline
- Third Edition (1998).
Mix 9 parts of freshly collected blood with 1 part 3.2% (0.109M) trisodium citrate. Centrifuge as soon as possible after collection at > 1500g for 15 minutes. Sample filtration is not recommended for VWF assays.

Sample preparation
Dilute all samples to 1 in 40 with wash buffer solution.
Cryoprecipitate and cryosupernatant do not require further dilution.

Sample stability
Separated plasma should be stored at 2-8°C and tested within 4 hours of collection, or may be frozen at < - 20°C for up to 2 weeks. Samples should be thawed at 37°C then equilibrated to room temperature before use.

Materials provided
Each pack of the Collagen Binding assay - Order code CBAE-1 contains
1 x 96 well collagen coated microwell plate (6 x 16 well strips)
2 x 2ml VWF antigen standard
4 x 2ml VWF antigen controls
1 x 11 ml anti-VWF:HRP Conjugate
2 x 11 ml Wash Buffer concentrate
1 x 11 ml Substrate solution
1 x 11 ml Stop solution

Materials required but not provided
Micropipettes
Pipettes: 1ml and 10ml
Purified water, USP or equivalent
Microwell plate reader capable of reading at 450nm (optional dual measurement at 450nm & 650 ± 50nm)
Test tubes or blank microwell plate for sample dilution.

PROCEDURE
1. Remove required number of microwell strips from foil pouch.
2. Add 100µl of diluted standards and controls to duplicate wells.
3. Add 100µl of diluted samples to duplicate wells.
4. Add 100µl of wash buffer solution to duplicate wells for use as a zero point on the standard curve.
5. Ensure that all samples are added within 5 minutes to minimize variation in incubation times. Mix by tapping gently on all 4 sides or using a mechanical mixer.
6. Cover plate (or place in moist chamber) and incubate for 60 minutes at 20-25 ° C.
7. Reconstitute Conjugate at least 5 minutes prior to use (see reagent preparation).
8. Thoroughly aspirate contents of all wells.
9. Wash plate 3 times by filling all wells with 300µl of wash buffer solution, then aspirating. Tap upside down on blotting paper after final aspiration.
10. Add 100µl of conjugate to each well. Mix by tapping gently on all 4 sides or using a mechanical mixer. It is important that sequential reagents are added quickly and that the period of sample incubation is consistent.
11. Cover (or place in moisture chamber) and incubate for 60 minutes at 20-25 ° C.
12. Wash plate 4 times (see step 9).
13. Add 100µl/ well of substrate solution.
14. Incubate uncovered for 5 minutes at 20-25 ° C.
15. Add 100µl stop solution to each well, adding at the same rate and in the same sequence as the substrate.
16. Within 15 minutes, read the absorbance at 450nm, or at 450nm with a 650 ± 50nm reference if dual wavelength plate reader available.

QUALITY CONTROL
The results for the cryosupernatant and cryoprecipitate plasmas supplied in the kit should be within the limits stated on the enclosed lot specific data sheet.

RESULTS
After calculating the mean absorbance of duplicate values for the standards prepare the standard curve by plotting VWF concentration (X-axis) against absorbance (Y-axis) for each dilution of normal standard. Draw a smooth curve of best fit. Patient sample result can be read from the standard curve.

LIMITATIONS AND INTERFERENCES
Avoid using lipemic, hemolyzed or icteric plasmas. Repeated freeze-thawing of patient samples is not recommended.

EXPECTED VALUES
Normal Range; 50-400%. Note that each laboratory should establish its own normal range for this assay.

When used in conjunction with the VWF:Ag assay, the VWF:CB assay can be used to differentiate between VWD Types I and II by calculating a ratio of the two assay results as follows;

$$\text{Ratio} = \frac{\text{VWF:CB\%}}{\text{VWF:Ag\%}}$$

Type 1 VWD usually gives low results in both VWF:Ag and VWF:CB assays. Ratio ≈ 1 indicates a total decrease in VWF production, but production of essentially normal VWF, which forms multimers.
Type II VWD usually exhibits low results in the VWF:Ag assay and very low ratios in the VWF:CB assay.
Ratio < 0.5 indicates while VWF is being produced, it is genetically abnormal so the VWF does not complex into functionally high molecular weight multimer forms.
Note: Blood group 0 is associated with reduced levels of VWF though the significance of this is not yet known[6].

SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS
Intra assay precision: 11%

BIBLIOGRAPHY

1. Mazurier, C and Rodegherio, F (on behalf of the von Willebrand Factor Subcommittee of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostas). Recommended Abbreviations for von Willebrand Factors and Its Activities. Thromb Haemost, 86, 712, 2001.
2. Moroose R, Hoyer LW. von Willebrand factor and platelet function. Annual Reviews of Medicine. 37, 157-163, 1986
3. Brown JE, Bosak JO. An ELISA test for the binding of von Willebrand antigen to collagen. Thrombosis Research. 43, 303-311, 1986
4. Favaloro EJ, Grispo L, Exner T, Koutts J. Development of a simple collagenbased ELISA aids in the diagnosis of, and permits sensitive discrimination between type I and type II von Willebrand's disease. Blood Coagulation and Fibrinolysis. 2, 285-291, 1991
5. Favaloro EJ, Grispo L. Dinale A, Berndt M, Koutts J. Von Willebrand's Disease: Laboratory investigation using an improved assay for von Willebrand factor. Pathology. 25, 152-158, 1993
6. Gill JC, Endres-Brooks J, Bauerm PJ et al. The effect of ABO blood group on the diagnosis of von Willebrand disease. Blood. 69; 1691-1695, 1987

DSRV, Inc.
330 Waterloo Valley Rd.
Suite 200
Mount Olive, NJ 07828 USA
Email – dsrv@stago.com

CE

Dosage de la liaison du FvW au collagène

pour une détermination qualitative de la fonction VWF

UTILISATION PREVUE
Ce document est réservé aux Etats-Unis d'Amérique.
Dosage immuno-enzymatique pour détermination qualitative de la fonction VWF dans le plasma humain. Utilisé conjointement avec le dosage vWF:Ag, le dosage de la liaison du FvW au collagène (CBA) peut permettre de différencier la maladie de von Willebrand (vWD) de type I de celle de type II.

SOMMAIRE ET EXPLICATION
Le facteur von Willebrand (vWF) est une protéine importante de la coagulation du sang, qui joue un rôle à la fois dans l'adhésion des plaquettes et dans la stabilisation du facteur VIII nécessaire à la coagulation.

La maladie de von Willebrand (vWD) se caractérise par un déficit quantitatif partiel en vWF (classifié comme vWD de type 1), ou par une anomalie qualitative ou fonctionnelle du vWF (classifié comme vWD de type 2). Le vWD de type 3, rare, se caractérise par un déficit quasi-total en vWF.

La prévalence de la vWD est estimée entre 1% à 3 % dans le monde entier. Toutefois, elle est peut-être plus élevée, dans la mesure où de nombreux cas bénins peuvent passer inaperçus. La liaison du FvW au collagène (CBA) est une procédure ELISA qui quantifie la liaison (VWF:CB)[1] du vWF au collagène de type III recouvrant les puits d'une plaque de microtitrage[3]. La liaison du vWF au collagène (CBA) est associée aux formes du vWF de haut poids moléculaire (HMW), dont on estime que la fonction dans l'hémostase est plus importante que celle des formes de faible poids (LMW). C'est pourquoi il est possible que le CBA soit plus étroitement lié à la fonction vWF et à l'hémorragie que les tests ELISA classiques pour le vWF[4,5] qui mesurent le vWF (LMW + HMW) total.

PRINCIPE DU TEST
Au cours de la première étape d'incubation, les multimères du facteur de von Willebrand présents dans l'échantillon se lient au collagène attaché à la surface de la microplaque à puits. Les protéines plasmiques non liées sont alors retirées par lavage et, dans une seconde réaction, des anticorps conjugués à la peroxydase sont liés à des multimères vWF anti-humains. L'excès d'anticorps est retiré par lavage et l'activité enzymatique liée est déterminée. La modulation chromatique du substrat est terminée par l'ajout d'acide sulfurique. L'intensité de coloration obtenue, proportionnelle à la concentration de multimères vWF de haut poids moléculaire présents dans l'échantillon, est déterminée par la méthode photométrique. Les normes fournies peuvent être utilisées pour quantifier l'activité des multimères vWF de haut poids moléculaire.

REACTIFS
Composition
Microplaque à puits (96 puits, 6 x 16 bandes) ; recouverte de collagène. Tampon de lavage concentré : Solution tampon Tris, conservateurs et colorant. Etalon normal et contrôles de cryoprécipités/cryosurnageants : plasma humain lyophilisé, azide de sodium et colorant.
Conjugué : Peroxydase de raifort (HRP) conjuguée à anti-humain vWF et colorant.
Substrat : TMB et solvant
Solution d'arrêt : 2M H_2SO_4

Mis en garde et précautions d'emploi
Pour utilisation à des fins de recherche – les caractéristiques des performances de ce procédé n'ont pas été déterminées.
A manipuler comme étant potentiellement infectieux. Tous les plasmas humains préparés pour lyophilisation ont été testés et confirmés négatifs pour les anticorps HBsAg, VIH et VHC à l'aide des dosages approuvés par la FDA. Lors de l'élimination de l'azide de sodium, toujours rincer abondamment avec de l'eau, pour parer à une formation explosive des résidus d'azide de sodium dans les canalisations métalliques.
Eviter le contact de la solution d'arrêt et la solution tampon avec les yeux et avec l'épiderme.

Préparation pour utilisation
Amener tous les composants du kit à température ambiante avant utilisation.
Dilution 40X du concentré du tampon de lavage : Préparer une solution tampon en diluant le tampon de lavage au 1/40 e avec de l'eau distillée. Veiller à préparer un volume suffisant pour la dilution des échantillons, des contrôles, des étalons, etc., en plus du lavage de la plaque (à savoir, pour une plaque complète, diluer 22 ml de concentré avec de l'eau distillée jusqu'à obtention de 880 ml). Le tampon de lavage doit être amené à température ambiante et bien mélangé avant utilisation.

Remarque : Si des particules sont présentes dans le tampon de rinçage de concentration 40X, bien le mélanger avant de le diluer.

Etalon normal : Reconstituer l'étalon normal dans 2 ml de solution tampon (on obtient ainsi 200 % de l'étalon). Amener à température ambiante pendant 10 à 15 minutes avant utilisation. Utiliser la solution tampon pour préparer des étalons à 100 %, 50 %, 25 % et 12,5 %. (c.-à d. préparer des dilutions aux 1/2, 1/4, 1/8 et 1/16 de l'étalon reconstitué à 200 %).

Contrôles de cryoprécipité et de cryosurnageant : Reconstituer les contrôles de cryoprécipité et de cryosurnageant dans 2 ml de solution tampon. Amener à température ambiante pendant au minimum 15 minutes avant utilisation.

Conjugué : Reconstituer le conjugué dans 11 ml de solution tampon au moins 5 minutes avant utilisation. Il est important de protéger le conjugué de toute exposition à la lumière.

Substrat : Prêt à l'emploi.

Conservation et stabilité
Tous les composants sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur le flacon, s'ils sont conservés fermés entre 2 et 8 °C.

Les étalons et plasmas de contrôle reconstitués peuvent être stockés en aliquotes à -20° C pendant 1 mois ou à -80 ºC. Ne pas congeler - décongeler plusieurs fois. Ne pas congeler les standards et les contrôles après d'autres dilutions à la solution tampon de lavage. Les échantillons doivent être décongelés à 37 °C puis amenés à température ambiante avant utilisation.

Le conjugué non utilisé reste stable pendant 3 mois à -20 °C ou 6 mois à -80 °C.
Le tampon de lavage dilué peut être conservé pendant un mois entre 2° et 8 °C.
Replacer les bandes inutilisées des micropuits dans la pochette en aluminium et fermer au ruban adhésif jusqu'à utilisation.
Les réactifs ne sont pas interchangeables d'un kit à l'autre.

Indications d'instabilité ou de détérioration
Lors de l'ouverture des flacons, s'ils ne semblent pas avoir été sous vide, si le réactif ne paraît pas sec ou si la solution liquide du substrat paraît bleutée avant utilisation, retourner le kit au fabricant ou au distributeur local.

PRELEVEMENT ET PREPARATION DES SPECIMENS
Prélèvement des échantillons
Attention : Tous les plasmas doivent être manipulés comme étant potentiellement infectieux.
Le prélèvement et le traitement du sang doivent être effectués conformément à la norme NCCLS H21-A3 sur le prélèvement, le transport et le traitement des spécimens sanguins pour les tests de coagulation et la performance générale des dosages de coagulation ; directives approuvées – troisième édition (1998).
Mélanger 9 parts de sang fraîchement prélevé avec 1 part de citrate trisodique à 3,2 % (0,109M). Centrifuger le plus tôt possible après le prélèvement à >1500 g. pendant 15 minutes. La filtration des échantillons est déconseillée pour les dosages vWF.

Préparation des échantillons
Diluez tous les échantillons dans une proportion de 1/40e avec la solution tampon.
Le cryoprécipitéet le cryosupernatant ne nécessitent pas d'autre dilution.

Stabilité des échantillons
Le plasma séparé doit être conservé entre 2 et 8 ºC et testé dans les 4 heures suivant le prélèvement, ou congelé à une température inférieure à – 20 ºC pendant un maximum de 2 semaines. Les échantillons doivent être décongelés à 37 ºC puis amenés à température ambiante avant utilisation.

Matériel fourni
Chaque coffret destiné à la mesure de la liaison du vWF au collagène (code de commande CBAE-1) contient :
1 microplaque 96 puits recouverte de collagène (6 x 16 bandes)
2 x 2 ml d'antigène étalon vWF lyoph.
4 x 2 ml contrôles d'antigène vWF lyoph.
1 x 11 ml conjugué HRP: vWF
2 x 11 ml solution de lavage concentrée
1 x 11 ml substrat TMB
1 x 11 ml solution d'arrêt

Matériel nécessaire non fourni
Micropipettes
Pipettes : 1 ml et 10 ml
Eau purifiée, USP ou équivalent
Lecteur de plaque à micropuits susceptible de lire à 450 nm (facultatif : mesures doubles à 450 nm et 650 ± 50 nm)
Tubes à essais ou plaque de micropuits vierge pour dilution des échantillons.

REALISATION DU TEST
1. Sortir le nombre nécessaire de bandes de la pochette en aluminium.
2. Ajouter 100 µ l d'étalons et de contrôles dilués aux puits en duplicata.
3. Ajouter 100 µ l d'échantillons dilués aux puits en duplicata.
4. Ajouter 100 µ l de solution tampon aux puits en duplicata, à utiliser comme point zéro sur la courbe étalon.
5. Veiller à ce que tous les échantillons soient prêts en 5 minutes au maximum afin de minimiser les variations des temps d'incubation. Mélanger en tapotant doucement sur les 4 côtés ou à l'aide d'un agitateur mécanique.
6. Couvrir la plaque (ou placer dans une chambre humide) et incuber pendant 60 minutes à 20-25 ºC.
7. Reconstituer le conjugué au minimum 5 minutes avant utilisation (voir la préparation des réactifs).
8. Aspirer complètement le contenu de tous les puits.
9. Procéder à 3 lavages de la plaque en remplissant tous les puits de 300 µl de solution tampon, puis par aspiration. Retourner sur papier filtre après la dernière aspiration.
10. Ajouter 100µl de conjugué à chaque puits. Mélanger en tapotant douce ment sur les 4 côtés ou à l'aide d'un agitateur mécanique.
11. Couvrir (ou placer dans une chambre humide) et incuber pendant 60 minutes à 20-25 ºC.
12. Procéder à 4 lavages de la plaque (voir étape 9)
13. Ajouter 100 µl de solution de substrat TMB à chaque puits.
14. Incuber sans couvrir pendant 5 minutes à 20-25 ºC.
15. Ajouter 100 µl de solution d'arrêt à chaque puits, à la même cadence et suivant la même séquence que le substrat.
16. Dans les 15 minutes suivantes, lire l'absorbance à 450 nm, ou, si un lecteur de plaque double longueur d'onde est disponible, à 450 nm avec une longueur d'onde de référence 650 ± 50 nm.

CONTROLE QUALITE
Les résultats pour les plasmas cryosurnageants et cryoprécipités fournis dans le kit doivent être compris dans les limites indiquées sur la fiche technique spécifique jointe au lot.

RESULTATS
Après avoir calculé l'absorbance moyenne des valeurs dupliquées pour les étalons, préparer la courbe étalon en traçant la concentration vWF (axe X) par rapport à l'absorbance (axe Y) pour chaque dilution d'étalon normal. Dessiner une courbe lisse du meilleur ajustement. Les résultats des échantillons de patients peuvent être lus sur la courbe étalon.

LIMITATIONS ET INTERFERENCES
Eviter l'utilisation de plasmas lipémiques, hémolysés ou ictériques. Il est déconseillé de recongeler des échantillons de patients.

VALEURS ESCOMPTEES
Fourchette normale : 50-400 %. Il appartient à chaque laboratoire d'établir sa propre fourchette normale pour ce dosage.
Utilisée conjointement avec le dosage vWF:Ag, le CBA peut permettre de différencier la vWD de type I et de type II en calculant le ratio des résultats des deux dosages comme suit :

$$\text{Ratio} = \frac{\text{VWF:CB\%}}{\text{VWF:Ag\%}}$$

Le vWD de type I donne généralement des résultats faibles aux deux dosages: vWF et CBA.
Ratio = 1 indique une réduction totale en production de vWF mais la production de vWF principalement normale, qui forme les multimètres.
Le vWD de type II présente en principe de faibles résultats dans le dosage vWF :Ag et des ratios très faibles dans le dosage cWF :CB.
Ratio < 0,5 indique que, bien qu'il existe une production de vWF, le vWF présente une anomalie génétique caractérisée par l'absence d'interaction avec des formes fonctionnelles de multimères de haut poids moléculaire.
Remarque **:** Le groupe O est associé à des niveaux réduits de vWF, dont la signification n'est pas encore connue[6].

PERFORMANCE SPECIFIQUE
Précision intra-test - coefficient de variation : 11 %

BIBLIOGRAPHIE

1. Mazurier, C and Rodegherio, F (on behalf of the von Willebrand Factor Subcommittee of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostas). Recommended Abbreviations for von Willebrand Factors and Its Activities. Thromb Haemost, 86, 712, 2001.
2. Moroose R, Hoyer LW. von Willebrand factor and platelet function. Annual Reviews of Medicine. 37, 157-163, 1986
3. Brown JE, Bosak JO. An ELISA test for the binding of von Willebrand antigen to collagen. Thrombosis Research. 43, 303-311, 1986
4. Favaloro EJ, Grispo L, Exner T, Koutts J. Development of a simple collagen based ELISA aids in the diagnosis of, and permits sensitive discrimination between type I and type II von Willebrand's disease. Blood Coagulation and Fibrinolysis. 2, 285-291, 1991
5. Favaloro EJ, Grispo L. Dinale A, Berndt M, Koutts J. Von Willebrand's Disease: Laboratory investigation using an improved assay for von Willebrand factor. Pathology. 25, 152-158, 1993
6. Gill JC, Endres-Brooks J, Bauerm PJ et al. The effect of ABO blood group on the diagnosis of von Willebrand disease. Blood. 69; 1691-1695, 1987

DSRV, Inc.
330 Waterloo Valley Rd.
Suite 200
Mount Olive, NJ 07828 USA
Email – dsrv@stago.com

CE

Untersuchung der Kollagenbindungsaktivität

zur Bestimmung der vWF-Funktion

VERWENDUNGSZWECK
Dieses Dokument ist nur zur Verwendung in den USA vorgesehen. Enzym-Immunoassay zur Bestimmung der von-Willebrand-Faktor (vWF)-Funktion in menschlichem Plasma. Der Test zur Kollagenbindungsaktivität (CBA) lässt sich bei Verwendung mit dem vWFAntigen-Assay [1] (vWF:Ag) zur Differenzierung zwischen Willebrand-Jürgens-Syndrom (vWD) Typ I und Typ II einsetzen.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERLÄUTERUNG
Der von-Willebrand-Faktor (vWF) ist ein wichtiges Protein der Blutgerinnung, das sowohl an der Adhäsion der Blutplättchen als auch an der Stabilisierung des Gerinnungsfaktors VIII beteiligt ist.

Beim Willebrand-Jürgens-Syndrom (WJS) besteht entweder ein teilweiser quantitativer Mangel (klassifiziert als WJS Typ I) oder ein qualitativer Mangel (klassifiziert als WJS Typ II). Der seltene WJS Typ III ist durch fast völliges Fehlen von vWF gekennzeichnet.

Die Häufigkeit des WJS wird weltweit auf 1-3 % geschätzt, könnte aber höher sein, da milde Fälle häufig unerkannt bleiben. Der Kollagenbindungstest (CBA) ist ein ELISA-Verfahren, das die Kollagenbindungskapazität (vWF:CB) [1] von vWF an mit Kollagen Typ III beschichtete Mikrotiter-Wells [3] quantifiziert. Die Fähigkeit Kollagen zu binden wird mit vWF-Formen assoziiert die ein höheres Molekulargewicht (HMW) aufweisen, von denen angenommen wird, dass sie für die Hämostase funktionell eine höhere Bedeutung haben als Formen mit geringerem Molekulargewicht (LMW). Aus diesem Grund kann der CBA enger mit vWF-Funktion und Blutungsproblemen korrelieren als übliche ELISA-Verfahren [4,5], da er den gesamten (LMH +HMW) vWF misst.

TESTPRINZIP
Während des ersten Inkubationsschritts binden die in der Probe vorhandenen vWF-Multimere das auf die Mikrotiterplatte aufgetragene Kollagen. Nicht gebundene Plasmaproteine werden in einem Waschschritt entfernt; und in einer zweiten Reaktion werden peroxidase-konjugierte anti-vWF Antikörper an erfasste vWF-Multimere gebunden. Nach dem Auswaschen überschüssiger Antikörper wird die Bindungsaktivität durch Zugabe des Substrats bestimmt. Die Farbentwicklung des Substrats wird durch Zugabe von Säure beendet. Die fotometrisch bestimmte Intensität der entstehenden Farbe ist proportional zum Anteil der hochmoleklaren vWF-Multimere der Probe. Die gelieferten kalibrierten Standards können zur Quantifizierung der hochmolekularen vWF-Multimere verwendet werden.

REAGENZIEN
Zusammensetzung
Mikrotiterplatte (1 x 96 Wells, 6 x 16 Mikrotiterstreifen), kollagenbeschichtet. 40x Waschpufferkonzentrat: Tris-Pufferlösung, Konservierungsstoffe und Farbstoff. Standard-/ Kryopräzipitat-/ Kryosupernatantkontrollen: Lyophilisiertes Humanplasma, Natriumazid und Farbstoff.
Konjugat: Meerrettichperoxidase (HRP) konjugierter Anti-Human-vWF und Farbstoff.
Substrat: TMB und Lösungsmittel.
Stopplösung: 2M H_2SO_4

Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen
Nur zu Analysezwecken – die Leistungscharakteristika dieses Produkts wurden noch nicht ermittelt.
Als potenziell infektiös behandeln. Alle für die Lyophilisierung präparierten Humanplasmen wurden FDA-konform auf Antikörper gegen HBsAg, HIV-1, HIV-2 und HCV getestet und für negativ befunden.
Bei der Entsorgung von Aziden stets mit reichlich Wasser nachspülen, um den möglichen Aufbau eines explosiven Rückstands in Metallrohren zu verhindern.
Haut- und Augenkontakt mit Stopplösung und Waschpuffer-Konzentrat vermeiden.

Vorbereitung zum Gebrauch
Alle Komponenten der Testpackung vor Gebrauch auf Zimmertemperatur bringen.
40x Waschpufferlösung: Präparieren Sie eine Waschpufferlösung indem Sie das Konzentrat 1:40 mit gereinigtem Wasser verdünnen. Genügend Waschpufferlösung herstellen zur Verdünnung von Proben, Kontrollen und Standard sowie zum Waschen der Platte (d.h. für einen Assay mit voller Platte 22 ml Konzentrat mit 880 ml destilliertem Wasser verdünnen). Waschpuffer vor Gebrauch auf Zimmertemperatur bringen und gut mischen.

Hinweis: Falls sich in dem 40x Waschpufferkonzentrat Partikel befinden, mischen Sie die Lösung gut vor der Verdünnung.

Normaler Standard: Den normalen Standard mit 2 ml Waschpufferlösung rekonstituieren. (Dies entspricht nun einem 200 %-Standard.) Vor Gebrauch 10-15 Minuten bei Zimmertemperatur stehen lassen. Mit der Waschpufferlösung 100 %-, 50 %-, 25 %- und 12,5 %- Standards präparieren (d.h. aus dem rekonstituierten 200%-Standard Verdünnungen von 1/2, 1/4, 1/8 und 1/16 bereiten.)

Kryopräzipitat- und Kryosupernatant-Kontrollen: Die Kryopräzipitat- und Kryosupernatantkontrollen in 2 ml der Waschpufferlösung rekonstituieren. Vor Gebrauch mindestens 15 Minuten bei Zimmertemperatur stehen lassen.

Konjugat: Konjugat vor Gebrauch mindestens 5 Minuten in 11 ml Waschpufferlösung rekonstituieren. Es ist wichtig, dass das Konjugat vor Lichteinwirkung geschützt ist.

Substrat: Gebrauchsfertig.

Haltbarkeit und Lagerungsbedingungen
Alle Komponenten sind bis zum auf dem Fläschchen angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil, sofern sie ungeöffnet bei 2-8 °C gelagert werden.

Rekonstituierter Standard und Kontrollplasmen sind in Aliquoten bei -20 °C einen Monat und bei -80 °C bis zu drei Monate lagerfähig. Nur einmal einfrieren und auftauen. Standards und Kontrollen dürfen nach Weiterverdünnung mit Waschpufferlösung nicht eingefroren werden. Proben bei 37 °C auftauen und vor Gebrauch auf Zimmertemperatur bringen.

Unbenutztes Konjugat ist bei -20 °C drei Monate und bei -80 °C bis zu sechs Monate stabil.
Waschpufferlösung ist bei 2-8 °C einen Monat lang lagerfähig.
Unbenutzte Mikrotiterstreifen bis zum weiteren Gebrauch in beiliegender Folienpackung mit Klebeband versiegelt aufbewahren.
Reagenzien dürfen nicht mit denen anderer Kits und Chargen gemischt werden.

Anzeichen für Instabilität/Verfall
Besteht bei der Öffnung der Fläschchen kein Hinweis auf ein Vakuum und/oder erscheint das Reagens nicht trocken, oder erscheint die flüssige Substratlösung vor Gebrauch blau, Testpackung an den Hersteller oder Vertriebshändler zurückgeben.

PROBENENTNAHME UND VORBEREITUNG
Entnahme von Proben
Vorsicht: Alle Plasmen als potenziell infektiös behandeln.
Blut entsprechend NCCLS-Norm H21-A3 entnehmen und verarbeiten: Entnahme, Transport und Bearbeitung von Blutproben zur Koagulation und allgemeine Durchführung von Koagulationstests; Zugelassene Richtlinie
- Dritte Fassung (1998).

9 Teile frisch entnommenen Bluts mit 1 Teil 3,2 %-igem Trinatriumcitrat (0,109 M) mischen. Baldmöglichst nach Entnahme bei ≥ 1500 g 15 Minuten lang zentrifugieren. Für vWF-Assays wird eine Filtrierung der Proben nicht empfohlen.

Probenvorbereitung
Alle Proben 1:40 mit Waschpufferlösung verdünnen.
Kryopräzipitat und Kryosupernatant bleiben unverdünnt.

Probenstabilität
Separiertes Plasma bei 2-8 °C lagern und innerhalb von 4 Stunden nach Entnahme testen oder bei < -20° C bis zu 2 Wochen lang einfrieren. Proben bei 37 °C auftauen und vor Gebrauch auf Zimmertemperatur bringen.

Gelieferte Materialien
Jede Packung des Kollagenbindungstests (Bestellnr. CBAE-1) enthält:
1 x 96 Wells kollagenbeschichtete Mikrotiterplatte (6 x 16 Mikrotiterstreifen)
2 x 2 ml vWF Antigen-Standard
4 x 2 ml vWF Antigen-Kontrollen
1 x 11 ml anti-vWF:HRP Konjugat
2 x 11 ml Waschpufferkonzentrat
1 x 11 ml Substratlösung
1 x 11 ml Stopplösung

Benötigte Materialien (nicht im Lieferumfang enthalten)
Mikropipetten:
Pipetten: 1 ml und 10 ml
Gereinigtes Wasser nach USP oder Äquivalent
Mikrotiterplatten-Leser mit Lesekapazität von 450 nm (optional duale Messung bei 450 nm und 650 ± 50 nm)
Teströhrchen oder blanke Mikrotiterplatte zur Verdünnung von Proben.

VERFAHREN
1. Erforderliche Anzahl an Mikrotiterstreifen aus Folienpackung entnehmen.
2. 100 µl verdünnte Standards und Kontrollen in doppelte Vertiefungen pipettieren.
3. 100 µl verdünnte Proben in doppelte Vertiefungen pipettieren.
4. 100 µl Waschpufferlösung für Nullpunkt der Standardkurve in doppelte Vertiefungen pipettieren.
5. Alle Proben innerhalb von 5 Minuten zugeben, um Schwankungen in der Inkubationszeit zu minimieren. Durch vorsichtiges Klopfen an alle vier Seiten oder mittels eines mechanischen Mixers mischen.
6. Platte abdecken (oder in Feuchtekammer stellen) und 60 Minuten bei 20-25 °C inkubieren.
7. Konjugat mindestens 5 Minuten vor Verwendung rekonstituieren (siehe Vorbereitung der Reagenzien).
8. Inhalt aller Vertiefungen gründlich absaugen.
9. Platte dreimal durch Füllen aller Vertiefungen mit 300 µl Waschpufferlösung und nachfolgendes Absaugen waschen. Nach dem letzten Absaugen umgekehrt auf Saugpapier klopfen.
10. In jede Vertiefung 100 µ l Konjugat pipettieren. Durch vorsichtiges Klopfen an alle vier Seiten oder mittels eines mechanischen Mixers mischen. Es ist wichtig, dass nachfolgende Reagenzien schnell hinzugefügt werden und die Inkubationszeit der Proben konsistent ist.
11. Platte abdecken (oder in Feuchtekammer stellen) und 60 Minuten bei 20-25 °C inkubieren.
12. Platte viermal waschen (siehe Schritt 9).
13. In jede Vertiefung 100 µl Substratlösung pipettieren.
14. Unbedeckt bei 20-25 °C 5 Minuten inkubieren.
15. In jede Vertiefung 100 µ l Stopplösung pipettieren, mit gleicher Geschwindigkeit und in gleicher Reihenfolge wie beim Substrat.
16. Extinktion innerhalb von 15 Minuten bei 450 nm messen; oder bei 450 nm gegen eine 650 ± 50 nm-Referenz, sollte ein Dual-Wellenlängen-Mikrotiterplattenleser vorhanden sein.

QUALITÄTSKONTROLLE
Die Resultate für die in der Testpackung enthaltenen Kryosupernatant- und Kryopräzipitatplasmen sollten innerhalb des im beiliegenden, chargenspezifischen Datenblatt angegebenen Bereichs liegen.

ERGEBNISSE
Nach Berechnung der mittleren Extinktion der Doppelwerte für die Standards, die Standardkurve durch Plotten der vWF-Konzentration (Abszisse) gegen die Extinktion (Ordinate) für jede Verdünnung des Normalstandards erarbeiten. Eine fließende Kurve bester Passung zeichnen. Resultate der Patientenproben lassen sich von der Standardkurve ablesen.

EINSCHRÄNKUNGEN UND STÖRUNGEN

Keine lipämischen, hämolysierten oder ikterischen Plasmen verwenden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen von Patientenproben wird nicht empfohlen.

ERWARTUNGSWERTE
Normalbereich: 50-400 %. Bitte beachten, dass jedes Labor für diesen Assay seinen eigenen Normalbereich ermitteln sollte.

Der vWF:CB-Assay lässt sich bei Benutzung des vWF:Ag-Assay zur Differenzierung zwischen WJS Typ I und Typ II verwenden, indem das Verhältnis der beiden Testergebnissen folgendermaßen errechnet wird:

$$\text{Verhältnis} = \frac{\text{VWF:CB\%}}{\text{VWF:Ag\%}}$$

WJS Typ I ergibt im Allgemeinen sowohl im vWF:Ag als auch im vWF:CB-Assay niedrige Ergebnisse.Verhältnis H 1 zeigt eine insgesamt verringerte vWF-Produktion, aber eine im Wesentlichen normale Produktion des Multimere-bildenden vWF.
Beim WJS Typ II sind die Ergebnisse des vWF:Ag-Assay im Allgemeinen niedrig und die Verhältnisse im vWF:CB-Assay sehr niedrig.
Verhältnis < 0,5 zeigt, dass vWF zwar produziert wird, genetisch jedoch anormal ist, und daher keine hochmolekularen Multimerformen bildet.

Hinweis: Blutgruppe 0 wird mit reduziertem vWF-Spiegel in Verbindung gebracht, wobei die Signifikanz hierbei noch nicht bekannt ist [6].

SPEZIFISCHE LEISTUNGSCHARAKTERISTIKA
Intra-Assay-Präzision: 11 %

LITERATURVERZEICHNIS

1. Mazurier, C and Rodegherio, F (on behalf of the von Willebrand Factor Subcommittee of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostas). Recommended Abbreviations for von Willebrand Factors and Its Activities. Thromb Haemost, 86, 712, 2001.
2. Moroose R, Hoyer LW. von Willebrand factor and platelet function. Annual Reviews of Medicine. 37, 157-163, 1986
3. Brown JE, Bosak JO. An ELISA test for the binding of von Willebrand antigen to collagen. Thrombosis Research. 43, 303-311, 1986
4. Favaloro EJ, Grispo L, Exner T, Koutts J. Development of a simple collagen based ELISA aids in the diagnosis of, and permits sensitive discrimination between type I and type II von Willebrand's disease. Blood Coagulation and Fibrinolysis. 2, 285-291, 1991
5. Favaloro EJ, Grispo L. Dinale A, Berndt M, Koutts J. Von Willebrand's Disease: Laboratory investigation using an improved assay for von Willebrand factor. Pathology. 25, 152-158, 1993
6. Gill JC, Endres-Brooks J, Bauerm PJ et al. The effect of ABO blood group on the diagnosis of von Willebrand disease. Blood. 69; 1691-1695, 1987

DSRV, Inc.
330 Waterloo Valley Rd.
Suite 200
Mount Olive, NJ 07828 USA
Email – dsrv@stago.com

Ensayo de unión a colágeno
Para la determinación de la función del factor de von Willebrand (FvW)

USO INDICADO
Este documento solamente se puede utilizar en los Estados Unidos de América.
Enzimoinmunoensayo para la determinación de la función del factor de von Willebrand (FvW) en plasma humano. El ensayo de unión a colágeno (*Collagen Binding Assay*, CBA) se puede utilizar para diferenciar entre la enfermedad de von Willebrand (EvW) de tipo I y II cuando se utiliza conjuntamente con el ensayo del antígeno del FvW (VWF:Ag)[1].

RESUMEN Y EXPLICACIÓN
El FvW es una importante proteína de coagulación sanguínea, que ayuda en la adhesión plaquetaria y en la estabilización del factor de coagulación VIII.

En la enfermedad de von Willebrand (EvW), normalmente hay una deficiencia cuantitativa parcial (clasificada como EvW de tipo I) o una deficiencia cualitativa (clasificada como EvW de tipo II). La EvW de tipo III es poco frecuente y se caracteriza por una deficiencia prácticamente total de FvW.

La incidencia de la EvW en todo el mundo se calcula que es del 1 % al 3 % pero quizás la incidencia sea mayor ya que los casos leves pueden no detectarse. El CBA es un procedimiento ELISA que cuantifica la capacidad de unión a colágeno (FvW:CB)[1] del FvW en los pocillos de microvaloración recubiertos de colágeno[3] .La capacidad de unión a colágeno del FvW se asocia con las formas de mayor peso molecular (*higher molecular weight*, HMW) de FvW, que se considera tienen más importancia funcionalmente en la hemostasia que las formas de menor peso molecular (*lower molecular weight*, LMW). Por lo tanto, el CBA se puede correlacionar más estrechamente con la función del FvW y los problemas hemorrágicos que los procedimientos ELISA normales para el FvW[4,5] que mide el FvW total (LMW + HMW).

PRINCIPIO DE LA PRUEBA
Durante el primer paso de incubación, los multímeros de FvW existentes en la muestra se unen al colágeno que está adherido a la superficie de la placa de micropocillos. Las proteínas plasmáticas no unidas se eliminan después mediante lavado y en una segunda reacción, los anticuerpos anti-FvW conjugados con peroxidasa se unen a los multímeros de FvW fijados. Los anticuerpos sobrantes se eliminan y se determina la actividad de los anticuerpos fijados mediante la adición de un sustrato. El desarrollo de color del sustrato se detiene añadiendo ácido. La intensidad de color resultante, que es proporcional a los multímeros de FvW de alto peso molecular que hay en la muestra, se determina fotométricamente. Los patrones calibrados suministrados se pueden utilizar para la cuantificación de los multímeros de FvW de alto peso molecular.

REACTIVOS
Composición
Placa de micropocillos (1 placa de 96 pocillos, 6 tiras de 16 pocillos), recubierta de colágeno. Solución amortiguadora de lavado concentrada 40x: solución amortiguadora Tris, conservantes y colorante. Patrón normal/controles de crioprecipitado/controles de criosobrenadante: plasma humano liofilizado, azida sódica y colorante.
Conjugado: anti-FvW humano conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) y colorante.
Sustrato: TMB y disolvente
Solución de parada: H_2SO_4 2 M

Advertencias y precauciones
Para su uso en investigación. Las características de funcionamiento de este producto no se han establecido.
Trate todas las muestras como potencialmente infecciosas. Todas las muestras de plasma humano preparadas para liofilización se han analizado utilizando ensayos aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos (*Food and Drug Administration,* FDA) de EE. UU. y se confirma que son negativas para el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg) y los anticuerpos contra los virus VIH-1, VIH-2 y VHC.
Cuando se deseche la azida, enjuague siempre con gran cantidad de agua para evitar la posibilidad de que se forme un residuo explosivo en las tuberías de metal.
Evite que la solución de parada y la solución amortiguadora de lavado concentrada entren en contacto con la piel y los ojos.

Preparación para usar
Todos los componentes del kit deben estar a temperatura ambiente antes de usar.
Solución amortiguadora de lavado concentrada 40x: prepare una solución amortiguadora de lavado diluyendo el concentrado en una relación 1:40 con agua purificada. Asegúrese de preparar suficiente solución amortiguadora de lavado para diluir las muestras, los controles y el patrón además de lavar la placa. (es decir, para un ensayo de placa completa, diluya con agua destilada 22 ml de concentrado y lleve el volumen hasta 880 ml). La solución amortiguadora de lavado debe estar a temperatura ambiente y bien mezclada antes de usarla.

Nota: si hay partículas en la solución amortiguadora de lavado concentrada 40x, mezcle bien la solución antes de diluir.

Patrón normal: reconstituya el patrón normal con 2 ml de solución amortiguadora de lavado. (Esto equivale ahora a un patrón al 200 %). Deje en reposo a temperatura ambiente durante 10-15 minutos antes de usar. Usando la solución amortiguadora de lavado, prepare patrones al 100 %, 50 %, 25 % y 12,5 %. (es decir, prepare diluciones de 1/2, 1/4, 1/8 y 1/16 del patrón reconstituido al 200 %).

Controles de crioprecipitado y de criosobrenadante: reconstituya los controles de crioprecipitado y criosobrenadante con 2 ml de solución amortiguadora de lavado. Deje en reposo a temperatura ambiente durante al menos 15 minutos antes de usar.

Conjugado: es necesario reconstituir el conjugado con 11 ml de solución amortiguadora de lavado al menos 5 minutos antes de usarlo. Es importante proteger el conjugado de la exposición a la luz.

Sustrato: listo para usar.

Conservación y estabilidad
Todos los componentes son estables hasta la fecha de caducidad que se indica en el vial, si se conservan entre 2 °C y 8 °C sin abrir.

El patrón reconstituido y los plasmas de control se pueden conservar en alícuotas a -20 °C durante 1 mes o a -80 °C durante tres meses. No congelar-descongelar más de una vez No congelar los patrones y controles después de diluirlos más con la solución amortiguadora de lavado. Las muestras se deben descongelar a 37 °C y luego dejar que alcancen la temperatura ambiente antes de usarlas.

El conjugado sin utilizar es estable durante 3 meses a -20 °C o durante 6 meses a -80 °C
La solución amortiguadora de lavado se puede conservar durante un mes entre 2 °C y 8 °C.
Vuelva a colocar las tiras de micropocillos no utilizadas en la bolsa de papel de aluminio incluida y ciérrela con cinta adhesiva hasta que vaya a utilizarla.
Los reactivos no se deben intercambiar entre diferentes lotes de kits.

Indicaciones de inestabilidad/deterioro
Si no se detecta vacío al abrir los viales, y/o si el reactivo no parece estar seco, o si la solución de sustrato líquido tiene color azul antes de usarla, el kit se debe devolver al fabricante o distribuidor local.

OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS
Obtención de las muestras
Precaución: trate todas las muestras de plasma como potencialmente infecciosas.
Recoja y procese la sangre conforme a la norma H21-A3 del Comité Nacional de Normas de Laboratorio Clínico (*National Committee for Clinical Laboratory Standards*, NCCLS): Collection, Transport and Processing of Blood Specimens for Coagulation Testing and General Performance of Coagulation Assays; Approved Guideline - Third Edition (1998).
Mezcle 9 partes de sangre recién extraída con 1 parte de citrato trisódico al 3,2 % (0,109 M). Centrifugue lo antes posible después de obtener la muestra a > 1500 g durante 15 minutos. En los ensayos del FvW no se recomienda filtrar las muestras.

Preparación de las muestras
Diluya todas las muestras con solución amortiguadora de lavado en una proporción 1:40. El crioprecipitado y el criosobrenadante no requieren más dilución.

Estabilidad de las muestras
El plasma separado se debe conservar a 2-8 °C y analizarse en las 4 horas siguientes a su recogida o se puede congelar a < - 20 °C durante un período máximo de 2 semanas. Las muestras se deben descongelar a 37 °C y luego dejar que alcancen la temperatura ambiente antes de usarlas.

Materiales proporcionados
Cada paquete del ensayo de unión a colágeno, código de pedido CBAE-1 contiene:
1 placa de 96 micropocillos recubiertos de colágeno (6 tiras de 16 pocillos)
2 patrones de antígeno del FvW de 2 ml
4 controles de antígeno del FvW de 2 ml
1 anti-FvW conjugado con HRP de 11 ml
2 concentrados de solución amortiguadora de lavado de 11 ml
1 solución sustrato de 11 ml
1 solución de parada de 11 ml

Materiales necesarios pero no suministrados
Micropipetas
Pipetas: 1 ml y 10 ml
Agua purificada de grado USP o equivalente
Lector de placa de micropocillos capaz de leer a 450 nm (medición dual opcional a 450 nm y 650 ± 50 nm)
Tubos de ensayo o placa de micropocillos en blanco para la dilución de las muestras.

PROCEDIMIENTO
1. Extraiga la cantidad necesaria de tiras de micropocillos de la bolsa de papel de aluminio.
2. Añada a pocillos por duplicado 100 µl de controles y patrones diluidos.
3. Añada a pocillos por duplicado 100 µl de muestras diluidas.
4. Añada a pocillos por duplicado 100 µl de solución amortiguadora de lavado para usar como punto cero en la curva patrón.
5. Asegúrese de añadir todas las muestras en los 5 minutos siguientes para minimizar la variación en los tiempos de incubación. Mezcle golpeando suavemente los 4 laterales o con un mezclador mecánico.
6. Tape la placa (o colóquela en una cámara húmeda) e incube durante 60 minutos a 20-25 °C.
7. Reconstituya el conjugado al menos 5 minutos antes de usarlo (véase la preparación de los reactivos)
8. Aspire bien el contenido de todos los pocillos.
9. Lave la placa 3 veces llenando todos los pocillos con 300 µl de solución amortiguadora de lavado, después aspire. Coloque boca abajo sobre papel secante después de la aspiración final.
10. Añada 100 µl de conjugado a cada pocillo. Mezcle golpeando suavemente los 4 laterales o con un mezclador mecánico. Es importante la adición secuencial y rápida de los reactivos y mantener la uniformidad del período de incubación de las muestras.
11. Cubra (o coloque en una cámara húmeda) e incube durante 60 minutos a 20-25 °C.
12. Lave la placa 4 veces (véase el paso 9).
13. Añada 100 µl/pocillo de solución sustrato.
14. Incube sin tapar durante 5 minutos a 20-25 °C.
15. Añada 100 µl de solución de parada a cada pocillo a la misma velocidad y en la misma secuencia que el sustrato.
16. En 15 minutos, lea la absorbancia a 450 nm o a 450 nm con una referencia de 650± 50 nm si se dispone de un lector de placas de doble longitud de onda.

CONTROL DE CALIDAD
Los resultados de las muestras de plasma de criosobrenadante y crioprecipitado suministradas en el kit deben estar dentro de los límites que se indican en la ficha de datos adjunta específica del lote.

RESULTADOS
Después de calcular la absorbancia media de los valores duplicados de los patrones, prepare la curva patrón representando la concentración de FvW (eje X) frente a la absorbancia (eje Y) de cada dilución de patrón normal. Trace la curva que se adapte mejor. El resultado de la muestra del paciente se puede leer extrapolándolo de la curva patrón.

LIMITACIONES E INTERFERENCIAS
Evite usar plasmas lipémicos, hemolizados o ictéricos. No se recomienda congelar/descongelar las muestras de pacientes más de una vez.

VALORES ESPERADOS
Intervalo normal; 50-400 %. Tenga en cuenta que cada laboratorio debe establecer su propio intervalo normal para este ensayo.

Cuando se utiliza conjuntamente con el ensayo de antígeno del FvW, el ensayo de FvW:CB se puede utilizar para diferenciar entre la EvW de tipo I y II calculando un cociente de los resultados de los dos ensayos de la siguiente forma:

$$\text{Cociente} = \frac{\text{FvW:CB\%}}{\text{FvW:Ag\%}}$$

La EvW de tipo I normalmente obtiene resultados bajos en los ensayos FvW:Ag y FvW:CB. Cociente ≈ 1 indica una disminución total en la producción de FvW, aunque la cantidad producida es FvW prácticamente normal, que forma multímeros.
La EvW de tipo II normalmente presenta resultados bajos en el ensayo del antígeno de FvW y cocientes muy bajos en el ensayo FvW:CB.
Un cociente < 0,5 indica que se produce FvW, pero es genéticamente anormal por lo que el FvW no pasa a formas más complejas de multímeros de alto peso molecular.
Nota: el grupo sanguíneo 0 se asocia con concentraciones reducidas de FvW aunque no se conoce todavía la importancia de ello.[6]

CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DE RENDIMIENTO
Precisión intraensayo 11 %

BIBLIOGRAFÍA

1. Mazurier, C and Rodegherio, F (on behalf of the von Willebrand Factor Subcommittee of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostas). Recommended Abbreviations for von Willebrand Factors and Its Activities. Thromb Haemost, 86, 712, 2001.
2. Moroose R, Hoyer LW. von Willebrand factor and platelet function. Annual Reviews of Medicine. 37, 157-163, 1986
3. Brown JE, Bosak JO. An ELISA test for the binding of von Willebrand antigen to collagen. Thrombosis Research. 43, 303-311, 1986
4. Favaloro EJ, Grispo L, Exner T, Koutts J. Development of a simple collagenbased ELISA aids in the diagnosis of, and permits sensitive discrimination between type I and type II von Willebrand's disease. Blood Coagulation and Fibrinolysis. 2, 285-291, 1991
5. Favaloro EJ, Grispo L. Dinale A, Berndt M, Koutts J. Von Willebrand's Disease: Laboratory investigation using an improved assay for von Willebrand factor. Pathology. 25, 152-158, 1993
6. Gill JC, Endres-Brooks J, Bauerm PJ et al. The effect of ABO blood group on the diagnosis of von Willebrand disease. Blood. 69; 1691-1695, 1987

DSRV, Inc.
330 Waterloo Valley Rd.
Suite 200
Mount Olive, NJ 07828 USA
Email – dsrv@stago.com

Test del legame del collagene
Per la determinazione della funzione VWF

USO PREVISTO
Questo documento è destinato solo all'uso negli Stati Uniti d'America.
Test immunoenzimatico per la determinazione della funzione del fattore di von Willebrand (VWF) nel plasma umano. Il test del legame del collagene (CBA) può essere impiegato per differenziare tra la malattia di von Willebrand (VWD) di Tipo I e di Tipo II se usato in combinazione con l'esame dell'antigene VWF (VWF:Ag).[1]

RIEPILOGO E SPIEGAZIONE
Il VWF è un'importante proteina coinvolta nella coagulazione del sangue, che contribuisce sia all'aggregazione piastrinica sia alla stabilizzazione del fattore di coagulazione VIII.

La malattia di von Willebrand (VWD) è caratterizzata da una carenza quantitativa parziale (classificata come VWD di Tipo 1) o da una carenza qualitativa (classificata come VWD di Tipo 2). La VWD di Tipo 3 è rara ed è caratterizzata da una carenza praticamente completa di VWF.

L'incidenza della VWD a livello mondiale è stimata all'1%-3%, ma può essere più comune poiché i casi lievi non vengono sempre individuati. Il CBA è una procedura ELISA che quantifica la capacità di legame del collagene (VWF:CB) [1] del VWF su pozzetti per microtitolazione rivestiti di collagene [3] . Il legame del collagene del VWF è associato alle forme di VWF a peso molecolare più alto (HMW), che sono ritenute funzionalmente più importanti nell'emostasi rispetto a quelle a peso molecolare più basso (LMW). Il CBA si può quindi correlare più strettamente alla funzione VWF e ai problemi di coagulazione rispetto ai normali ELISA per VWF [4,5] che misurano il VWF totale (LMW + HMW).

PRINCIPIO DEL TEST
Durante la prima fase di incubazione, i multimeri del VWF presenti nel campione si legano al collagene che aderisce alla superficie dei micropozzetti della piastra. Le proteine di plasma non legate vengono quindi rimosse dal lavaggio e, in una seconda reazione, gli anticorpi anti-VWF coniugati con perossidasi si legano ai multimetri VWF catturati. Gli anticorpi eccedenti vengono lavati via e l'attività legante viene determinata dall'aggiunta del substrato. Lo sviluppo di colore del substrato viene interrotto dall'aggiunta di acido. L'intensità cromatica risultante, proporzionale ai multimeri VWF ad alto peso molecolare presenti nel campione, viene determinata fotometricamente. Gli standard calibrati forniti possono essere utilizzati per quantificare i multimeri VWF ad alto peso molecolare.

REAGENTI
Composizione
Piastra con micropozzetti (1 piastra da 96 pozzetti, 6 strisce da 16 pozzetti) rivestita di collagene. Tampone di lavaggio concentrato 40x: Soluzione tampone Tris, conservanti e colorante. Standard normale/controlli crioprecipitato e criosurnatante: plasma umano liofilizzato, azide sodica e colorante.
Coniugato: anticorpo antiumano VWF coniugato con perossidasi di rafano (HRP) e colorante.
Substrato: TMB e solvente
Soluzione stoppante: 2M H_2SO_4

Avvertenze e precauzioni
Per uso sperimentale: le caratteristiche di rendimento di questo prodotto non sono state definite. Trattare come potenzialmente infettivo. Tutto il plasma umano preparato per la liofilizzazione è stato esaminato e confermato negativo per HBsAg e gli anticorpi anti-HIV-1, HIV-2 e HCV utilizzando esami approvati dalla FDA.
Per lo smaltimento dell'azide, lavare sempre con grandi volumi di acqua per evitare la possibilità che si formi un residuo esplosivo nei tubi metallici.
Evitare il contatto della soluzione stoppante e del tampone di lavaggio concentrato con la pelle e gli occhi

Preparazione per l'uso
Portare tutti i componenti del kit a temperatura ambiente prima dell'uso.
Tampone di lavaggio concentrato 40x: preparare una soluzione tampone di lavaggio diluendo il concentrato in acqua depurata con un rapporto 1 a 40. Assicurarsi di preparare una soluzione tampone di lavaggio sufficiente per la diluizione dei campioni, i controlli e lo standard e per il lavaggio della piastra (ovvero, per l'esame di una piastra completa, diluire 22 ml di concentrato in 880 ml di acqua distillata). Il tampone di lavaggio deve essere portato a temperatura ambiente e miscelato bene prima dell'uso.

Nota: se sono presenti particelle nel tampone di lavaggio concentrato 40x, miscelare bene la soluzione prima della diluizione.

Standard normale: ricostituire lo standard normale con 2 ml di soluzione tampone di lavaggio (ora equivalente a uno standard del 200%). Lasciare riposare a temperatura ambiente per 10-15 minuti prima dell'uso. Utilizzando la soluzione tampone di lavaggio, preparare standard al 100%, 50%, 25% e 12,5% (ovvero, preparare diluizioni 1/2, 1/4, 1/8 e 1/16 dello standard al 200% ricostituito).

Controlli crioprecipitato e criosurnatante: ricostituire i controlli crioprecipitato e criosurnatante con 2 ml di soluzione tampone di lavaggio. Lasciare riposare a temperatura ambiente per almeno 15 minuti prima dell'uso.

Coniugato: ricostituire il coniugato con 11 ml di soluzione tampone di lavaggio almeno 5 minuti prima dell'uso. È importante proteggere il coniugato dalla luce.

Substrato: pronto all'uso.

Conservazione e stabilità
Tutti i componenti sono stabili fino alla data di scadenza indicata sulla fiale quando conservati chiusi a 2-8 °C.

Lo standard ricostituito e i campioni di plasma di controllo possono essere conservati in aliquote a -20 °C per 1 mese o a -80 °C per 3 mesi. Non sottoporre a più di un ciclo di congelamento-scongelamento. Non congelare gli standard e i controlli dopo ulteriore diluizione con la soluzione tampone di lavaggio. I campioni devono essere scongelati a 37 °C e quindi equilibrati a temperatura ambiente prima dell'uso.

Il coniugato inutilizzato è stabile per 3 mesi a -20 °C o per 6 mesi a -80 °C.
La soluzione tampone di lavaggio può essere conservata per 1 mese a 2-8 °C.
Ricollocare le strisce dei micropozzetti inutilizzate nelle confezioni fornite e sigillare con nastro adesivo fino al momento dell'uso.
I reagenti non sono intercambiabili tra le diverse partite di kit.

Indicazioni di instabilità/deterioramento
Se non vi è alcun segno di vuoto all'apertura delle fiale e/o il reagente non sembra essere asciutto, oppure se la soluzione di substrato liquido appare blu prima dell'uso, restituire il kit al produttore o al distributore locale.

RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI
Prelievo dei campioni
Attenzione: trattare tutto il plasma come potenzialmente infettivo.
Prelevare e trattare il sangue in conformità allo standard NCCLS H21-A3: Prelievo, trasporto e trattamento dei campioni ematici per i test di coagulazione e rendimento generale degli esami di coagulazione; Linee guida approvate
- Terza edizione (1998).
Miscelare 9 parti di sangue appena prelevato con 1 parte di citrato trisodico al 3,2% (0,109 M). Centrifugare il prima possibile dopo il prelievo a > 1500 g per 15 minuti. La filtrazione dei campioni non è consigliata per i test VWF.

Preparazione del campione
Diluire tutti i campioni con la soluzione tampone di lavaggio con un rapporto 1 a 40.
Il crioprecipitato e il criosurnatante non necessitano di altre diluizioni.

Stabilità dei campioni
Il plasma separato deve essere conservato a 2-8°C e analizzato entro 4 ore dal prelievo, oppure può essere congelato a < -20 °C per un massimo di 2 settimane. I campioni devono essere scongelati a 37 °C e quindi equilibrati a temperatura ambiente prima dell'uso.

Materiale fornito
Ogni confezione di Test del legame del collagene - Codice ordine CBAE-1 contiene
1 piastra da 96 pozzetti rivestita di collagene (6 strisce da 16 pozzetti)
2 standard antigene VWF da 2 ml
4 controlli antigene VWF da 2 ml
1 coniugato anti-VWF:HRP da 11 ml
2 tamponi di lavaggio concentrati da 11 ml
1 soluzione di substrato da 11 ml
1 soluzione stoppante da 11 ml

Materiale necessario ma non fornito
Micropipette
Pipette: da 1 ml e 10 ml
Acqua depurata, USP o equivalente
Lettore di piastre a micropozzetti in grado di leggere a 450 nm (misurazione doppia opzionale a 450 nm e 650 ± 50 nm)
Provette o piastra a micropozzetti vuota per la diluizione dei campioni.

PROCEDURA
1. Estrarre dalla confezione il numero necessario di strisce dei micropozzetti.
2. Aggiungere 100 µl di standard e controlli diluiti per duplicare i pozzetti.
3. Aggiungere 100 µl di campioni diluiti per duplicare i pozzetti.
4. Aggiungere 100 µl di soluzione tampone di lavaggio ai pozzetti duplicati; utilizzare come punto zero sulla curva standard.
5. Assicurarsi che tutti i campioni vengano aggiunti entro 5 minuti per ridurre al minimo le variazioni dei tempi di incubazione. Miscelare picchiettando delicatamente sui 4 lati o utilizzando un mixer meccanico.
6. Coprire la piastra (o collocarla in camera umida) e incubare per 60 minuti a 20-25 °C.
7. Ricostituire il coniugato almeno 5 minuti prima dell'uso (vedere la preparazione del reagente).
8. Aspirare accuratamente il contenuto di tutti i pozzetti.
9. Lavare 3 volte la piastra riempiendo tutti i pozzetti con 300 µl di soluzione tampone di lavaggio, quindi aspirando. Svuotare picchiettando su carta assorbente dopo l'ultima aspirazione.
10. Aggiungere 100 µl di coniugato a ogni pozzetto. Miscelare picchiettando delicatamente sui 4 lati o utilizzando un mixer meccanico. È importante aggiungere rapidamente i reagenti sequenziali e che il periodo di incubazione dei campioni sia costante.
11. Coprire (o collocare in camera umida) e incubare per 60 minuti a 20-25 °C.
12. Lavare 4 volte la piastra (vedere il punto 9).
13. Aggiungere 100 µl di soluzione di substrato ai pozzetti.
14. Incubare senza coperchio per 5 minuti a 20-25 °C.
15. Aggiungere 100 µl di soluzione stoppante a ogni pozzetto, aggiungendola alla stessa velocità e seguendo la stessa sequenza del substrato.
16. Entro 15 minuti, misurare l'assorbanza a 450 nm o a 450 nm con un riferimento di 650± 50 nm se è disponibile un lettore di piastre a doppia lunghezza d'onda.

CONTROLLO QUALITÀ
I risultati per il crioprecipitato e il criosurnatante del plasma fornito nel kit devono rientrare nei limiti indicati nella scheda dati specifici allegata.

RISULTATI
Dopo avere calcolato l'assorbanza media dei valori duplicati per gli standard, preparare la curva standard tracciando la concentrazione di VWF (asse X) rispetto all'assorbanza (asse Y) di ogni diluizione di standard normale. Disegnare una curva regolare di best-fit. Il risultato del campione del paziente può essere letto dalla curva standard.

LIMITI E INTERFERENZE
Evitare l'uso di plasma lipemico, emolizzato o itterico. È sconsigliabile sottoporre i campioni dei pazienti a cicli ripetuti di congelamento-scongelamento.

VALORI PREVISTI
Intervallo normale: 50-400%. Notare che ogni laboratorio deve stabilire il proprio intervallo normale per questo test.

Se usato in combinazione con il test VWF:Ag, il test VWF:CB può essere impiegato per differenziare tra VWD di Tipo I e II calcolando un rapporto dei risultati dei due test nel modo seguente:

$$\text{Rapporto} = \frac{\text{VWF:CB\%}}{\text{VWF:Ag\%}}$$

Il genere la VWD di Tipo I produce risultati bassi in entrambi i test VWF:Ag e VWF:CB.
Il rapporto ≈1 indica una riduzione totale nella produzione di VWF i quali, essenzialmente normali, formano i multimeri.
In genere la VWD di Tipo II mostra risultati bassi nel test VWF:Ag e rapporti molto bassi nel test VWF:CB.
Un rapporto < 0,5 indica che, benché venga prodotto VWF, questo è generalmente anomalo e quindi non si trasforma in forme multimeriche a peso molecolare funzionalmente alto.
Nota: il gruppo sanguigno 0 è associato a livelli ridotti di VWF, benché l'importanza di questo fattore non sia ancora nota [6] .

CARATTERISTICHE DI RENDIMENTO SPECIFICHE
Precisione di intra-analisi: 11%

BIBLIOGRAFIA

17. Mazurier, C and Rodegherio, F (on behalf of the von Willebrand Factor Subcommittee of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostas). Recommended Abbreviations for von Willebrand Factors and Its Activities. Thromb Haemost, 86, 712, 2001.
18. Moroose R, Hoyer LW. von Willebrand factor and platelet function. Annual Reviews of Medicine. 37, 157-163, 1986
19. Brown JE, Bosak JO. An ELISA test for the binding of von Willebrand antigen to collagen. Thrombosis Research. 43, 303-311, 1986
20. Favaloro EJ, Grispo L, Exner T, Koutts J. Development of a simple collagen based ELISA aids in the diagnosis of, and permits sensitive discrimination between type I and type II von Willebrand's disease. Blood Coagulation and Fibrinolysis. 2, 285-291, 1991
21. Favaloro EJ, Grispo L. Dinale A, Berndt M, Koutts J. Von Willebrand's Disease: Laboratory investigation using an improved assay for von Willebrand factor. Pathology. 25, 152-158, 1993
22. Gill JC, Endres-Brooks J, Bauerm PJ et al. The effect of ABO blood group on the diagnosis of von Willebrand disease. Blood. 69; 1691-1695, 1987

DSRV, Inc.
330 Waterloo Valley Rd.
Suite 200
Mount Olive, NJ 07828 USA
Email – dsrv@stago.com

Symbols Key / Symbolschlüssel / Explication des Symboles / Interpretazione simboli / Clave de los Símbolos

	Do not reuse / Nicht zur Wiederverwendung / Ne pas réutiliser / Non riutilizzare / No reutilizar
CCYY-MM-DD	Use By / Verwendbar bis / A utiliser avant le / Utilizzare entro il / Usar antes del
LOT	Batch Code / Chargenbezeichnung / Code du lot / Codice lotto / Código de lote
REF	Catalogue Number / Bestellnummer / Catalogue nº / Numero di catalogo / Número de referencia
	Caution, consult accompanying documents / Achtung, Begleitdokumente beachten / Attention : Consulter les documents d'appui / Attenzione, consultare i documenti accompagnatori / Precaución, consulte los documentos adjuntos
	Manufacturer / Hersteller / Fabricant / Produttore / Fabricante
EC REP	Authorized Representative in the European Community / Bevollmächtigter in der Europäischen Gemeinschaft / Représentant autorisé dans la Communauté Européenne / Rappresentante autorizzato nella Comunità Europea / Representante autorizado en la Comunidad Europea
	Contains sufficient for <n> tests / Inhalt ausreichend für <n> Tests / Contient suffisamment pour, n. tests / Contiene quantità sufficiente per n. test / Contiene suficiente para n pruebas
IVD	In Vitro Diagnostic Medical Device / In Vitro-Diagnostikum / Dispositif medical de diagnostic in vitro / Dispositivo medico diagnostico in vitro / Dispositivo médico para diagnóstico in vitro
	Temperature Limitation / Temperaturbegrenzung / Limites de temperature / Limite di temperatura / Límite de temperatura
	Consult Instructions for Use / Gebrauchsanweisung beachten / Consulter les instructions d'utilisation / Consultare le istruzioni per l'uso / Consulte las instrucciones de uso
NON STERILE	Non-sterile / Nicht steril / Non stérile / Non sterile / No estéril
CE	CE Mark / CE-Zeichen / Marquage « CE » / Marchio CE / Marcado CE
CONTENTS	Contents / Inhalt / Contenu / Contenuto / Contenido /
	Reconstitution Volume / Rekonstitutionsvolumen / Volume de reconstitution / Volume di ricostituzione / Volumen de reconstitución
LEVEL	Level / Niveau / Niveau / Livello / Nivel

2006-09_EF | GSP

EC REP Authorized Representative according to IVD 98/79/ EC
MDSS
Schiffgraben 41
D-30175 Hannover, Germany