

american diagnostica inc.

**Von Willebrand Factor (vWF) Activity Kit**  
**Kit d'évaluation de l'activité du Facteur de von**  
**Willebrand (vWF)**  
**Factor von Willebrand (vWF) Kit de Actividad**  
**Von Willebrand Faktor (vWF) Aktivitäts Testkit**  
**Kit di attività del fattore von Willebrand (vWF)**

IVD



REF 885

**FOR IN VITRO DIAGNOSTIC USE**  
**RESERVE A L'USAGE DIAGNOSTIQUE IN VITRO**  
**PARA DIAGNÓSTICO IN VITRO ÚNICAMENTE**  
**NUR ZUR ANWENDUNG ALS IN-VITRO-DIAGNOSTIKUM**  
**PER SOLO USO DIAGNOSTICO IN VITRO**



american diagnostica inc.

500 West Avenue, Stamford, CT 06902

Tel: +1 203 602 7777 Fax: +1 203 602 2221

E-mail: [linus@amdiag.com](mailto:linus@amdiag.com)

Website: [www.americandiagnostica.com](http://www.americandiagnostica.com)

# ENGLISH

## INTENDED USE

The IMUBIND® vWF Activity ELISA is a quantitative direct enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of von Willebrand Factor (vWF) activity in citrated human plasma. It is intended for the assessment of vWF activity in patients where this is deemed useful in the diagnostic process, particularly as an aid in the differential classification of von Willebrand's disease. vWF activity represents one parameter in a multicriterion diagnostic process.

## INTRODUCTION

Von Willebrand Factor (vWF) is a complex multimeric adhesive glycoprotein synthesised by endothelial cells and megakaryocytes. Its principle, apparently unrelated, functions are as a carrier/stabiliser for the pro-coagulant protein FVIII:C, which circulates in serum as a non-covalently linked complex, and it appears to be an adhesive protein in haemostasis. vWF binds collagen and possibly other endothelial structures; it mediates the adhesion of platelets to the sub-endothelium (binding surface receptor glycoprotein Ib), it may also play a role in platelet-platelet interaction through binding glycoprotein IIb/IIIa<sup>1,2</sup>.




Von Willebrand first described this congenital bleeding disorder in 1926. In its mildest form, von Willebrand's disease is the most common bleeding disorder; the reported frequency is 1 in 100. It is a heterogeneous disorder, caused by vWF defects or reduced levels of vWF. Sub-classifications of the disease are based upon clinical observation, patient history and laboratory analysis such as bleeding times, vWF antigen and vWF activity. Measurement of both antigen and activity aids in the differential diagnosis of the two predominant classes of the disease, types 1 and 2. Classification of the disease is important as clinical management may vary with type<sup>3</sup>.

Increased levels of vWF antigen/activity indicate endothelial damage in vascular disease<sup>4</sup>; preliminary studies suggest endothelial damage may be important in the vascular complications of hypertension<sup>5</sup>. The short-term vWF increases observed after exercise, adrenaline, DDAVP infusion (1-deamino (8-d-arginine)-vasopressin) and during pregnancy<sup>6</sup>, however, may indicate activation/stimulation of endothelial cells<sup>7</sup> rather than epithelial damage. Decreased vWF levels are found in hypothyroidism and systemic lupus erythematosus. Acquired forms of von Willebrand's disease have been described in autoimmune disease, Waldenström's disease, benign monoclonal gammopathies, myeloproliferative adrenal carcinoma, rheumatic vasculitis and diabetes<sup>8</sup>. Due to the diversity of clinical conditions associated with vWF abnormalities, a more appropriate descriptor might be von Willebrand's Syndrome.

## PRINCIPLE OF THE ASSAY

The wells of the microtitre strips are coated with a preparation of purified murine anti-vWF monoclonal IgG antibody, the characteristics of which have been documented<sup>9,10</sup>, which recognises a functional epitope of vWF. During the first incubation, specific antigen in diluted plasma binds to the antibody-coated surface. The wells are then washed to remove unbound components. In the second incubation, the Conjugate, a horseradish peroxidase-labelled murine monoclonal antibody to vWF, binds any surface-bound antigen. After further washing, specifically bound antibody is traced by incubation with the Substrate. Addition of Stop Solution terminates the reaction, resulting in a coloured end-product. The amount of Conjugate bound is measured in absorbance units. The von Willebrand Factor activity can be estimated by interpolation from a dose-response curve based on dilutions of the Calibrator. The Calibrator is referenced against the 5th International Standard for Factor VIII and von Willebrand Factor in Plasma, code 02/150, supplied by NIBSC, Blanche Lane, South Mimms, Potters Bar, Hertfordshire EN6 3QG, UK.

## KIT COMPONENTS

vWF Conjugate	1 × 15 mL	Horseradish peroxidase-labelled murine monoclonal antibody to human vWF, stabilisation buffer. Ready-to-use.	
TMB Substrate Concentrate (5X)	1 × 5.5 mL	3,3', 5,5', tetramethyl benzidine (TMB) dissolved in dimethyl sulphoxide (DMSO) and methanol. Dilute before use. N.B. TOXIC & IRRITANT.	 
Substrate Buffer	1 × 25 mL	Acetate/citrate buffer, 0.025% (v/v) hydrogen peroxide, pH 6.0. Ready-to-use.	
Stop Solution	1 × 15 mL	2N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> . Ready-to-use. N.B. IRRITANT.	
vWF Wash Buffer Concentrate (16X)	1 × 25 mL	Borate buffer, 0.32% (w/v) Bronopol. <b>Dilute before use.</b>	

Anti-vWF-Coated Wells and Strip Holder	12 x 8 well microtitre strips	Coated with murine anti-vWF monoclonal antibody, in a resealable foil pack with desiccant.
vWF Diluent Concentrate (5X)	1 x 25 mL	Phosphate buffer, bovine albumin, 0.1% (w/v) Bronopol. Dilute before use.
vWF Calibrator	2 x 0.5 mL	vWF antigen in human plasma, freeze-dried. Reconstitute and dilute before use*. An assigned activity in IU/mL and % is given on the label.
vWF Control 1	2 x 0.5 mL	vWF antigen in human plasma, freeze-dried. Reconstitute and dilute before use*. The acceptable mean and range in IU/mL and % is given on the label and represents a 'normal' activity level.
vWF Control 2	2 x 0.5 mL	vWF antigen in human plasma, freeze-dried. Reconstitute and dilute before use*. The acceptable mean and range in IU/mL and % is given on the label and represents an 'abnormal' activity level.
Pack Leaflet		

\* N.B. The values printed on the labels of the Calibrator and Controls represent the activity *after* reconstitution in 0.5mL distilled/deionised water and further dilution of 1 in 20 as described in Preparation for the Assay. Also note that 1 IU/mL = 100% activity.

## STORAGE OF REAGENTS

### Handling and Procedural Notes

1. Store kit components at 2°-8°C and use until the expiry date on the labels. Do not use expired reagents.
2. Do not mix different lot numbers.
3. TMB Substrate Concentrate, Wash Buffer Concentrate, Diluent Concentrate, Calibrator and Controls 1 and 2 must be diluted before use. All other reagents are ready-to-use.
4. Diluted Wash Buffer and diluted Diluent are stable at 2°-8°C for up to 6 months if microbial contamination is avoided.
5. Dilute TMB Substrate five to ten minutes before use and PROTECT FROM LIGHT. May be stored for up to six hours if diluted in a clean glass container; if diluted in a container other than glass, use within 30 minutes of preparation.
6. Reconstituted and diluted Calibrator and Controls are stable at 2°-8°C for up to 24 hours.
7. Replace surplus microtitre strips in the foil pack and store within the resealable polythene bag with the desiccant at 2°-8°C, until required.
8. Avoid contamination of reagents. Use a new disposable pipette tip for each reagent or sample manipulation.
9. Do not modify the handling or storage conditions for kit reagents or plasma samples.

### Indications of Deterioration

Blue colouring or precipitation indicates the TMB Substrate is contaminated; it should be discarded and a fresh dilution prepared.

### Sample Collection and Storage

The assay is for citrated plasma samples. Collect nine volumes of blood in 0.109M (3.2%) trisodium citrate anticoagulant (one volume). Centrifuge at 2500 x g for 10 minutes.

Plasma may be stored at 2°-8°C or -20°C or lower for four weeks. Frozen plasmas must be thawed DIRECTLY at 37°C for at least 15 minutes before testing. Thoroughly mix thawed samples before assay and avoid repeated freeze/thawing. Samples at 1:20 dilution in diluted Diluent should be assayed within 24 hours of dilution.

## WARNINGS AND PRECAUTIONS

### For *in vitro* diagnostic use only.

#### Safety Precautions

1. Adhere strictly to the instructions in this booklet, particularly for handling and storage conditions.
2. The Calibrators and Controls contain human plasma tested by FDA-cleared assays for HBsAg, HIV-1 RNA or HIV-1 Ag, anti-HIV-1/HIV-2, and anti-HCV or HCV RNA and found to be non-reactive/negative. As no known test offers complete assurance that infectious agents are absent, the Calibrator and Controls should be considered potentially infectious and handled with the same precautions as any other potentially biohazardous material. The CDC/NIH Health Manual "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", 4th edition, May 1999, describes how these materials should be handled in accordance with Good Laboratory Practice. This is applicable in the USA.
3. Do not pipette by mouth.
4. Do not smoke, eat, drink or apply cosmetics in areas where kits and samples are handled.

5. Any skin complaints, cuts, abrasions and other skin lesions should be suitably protected.
6. The TMB Substrate contains DMSO and methanol. It is a carcinogen and flammable. Avoid contact with skin, eyes and mucous membranes and keep away from heat and naked flames.
7. The Stop Solution contains 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and is an irritant. Avoid contact with skin, eyes and mucous membranes.
8. Material safety data sheets for all hazardous components contained in this kit are available on request from American Diagnostica.



**SUBSTRATE**  
Toxic



**STOP SOLUTION**  
Irritant

R20/21/22: Harmful by inhalation, in contact with skin and if swallowed.

R36/38: Irritating to eyes and skin.

R39/23/24/25: Toxic: danger of very serious irreversible effects through inhalation, in contact with skin and if swallowed.

S23: Do not breathe fumes.

S26: In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water and seek medical advice.

S28: After contact with skin, wash immediately with plenty of water

S29/35: Do not empty into drains; dispose of this material and its container in a safe way

S36/37/39: Wear suitable protective clothing, gloves and eye/face protection.

S46: If swallowed, seek medical advice immediately and show this container or label.

S51: Use only in well ventilated areas.

S63: In case of accident by inhalation, remove casualty to fresh air and keep at rest.

R36/38: Irritating to eyes and skin.

S23: Do not breathe fumes.

S26: In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water and seek medical advice.

S29/35: Do not empty into drains; dispose of this material and its container in a safe way.

S36/37/39: Wear suitable protective clothing, gloves and eye/face protection.

## PREPARATION

### Materials/Equipment Required but not Provided

1. 96 well plate/strip reader with 450 nm filter.
2. Precision pipettes to dispense 50 µL, 100 µL, 500 µL, 1 mL. Automatic pipette to dispense 100 µL. Automatic pipette to dispense 200 µL for manual washing, automatic plate washer optional.
3. Glass/plastic measuring cylinders: 1×100 mL, 1×500 mL.
4. 1 mL containers for Calibrator/Control/sample dilutions.
5. Distilled/deionised water.
6. Paper towels.
7. Timer for 15 and 60 minute intervals.

### Preparation for the Assay

Allow all kit components, including the microtitre strips, to warm up to 18°-25°C for a minimum of 30 minutes before use. Mix liquid reagents by gentle inversion.

Dilute vWF Wash Buffer Concentrate by adding the contents of one vial to 375 mL distilled/deionised water in a clean vessel and mixing thoroughly.

Dilute vWF Diluent Concentrate by adding the contents of one vial to 100 mL distilled/deionised water in a clean vessel and mixing thoroughly.

Reconstitute one vial of Calibrator and each Control by adding 0.5 mL distilled/deionised water and swirling gently until all particulate matter is in solution. DO NOT VORTEX. Allow to stand for 30 minutes at 18°-25°C with intermittent gentle swirling before dilution.

Dilute the reconstituted Calibrator 1 in 10 (one part Calibrator to nine parts diluted vWF Diluent). The 1 in 10 dilution activity is equivalent to twice the value given on the label; i.e. if the value given on the Calibrator label is 0.85 IU/mL (85%), then the value for the Calibrator at a 1 in 10 dilution is 1.7 IU/mL (170%). From the 1 in 10 stock, prepare a series of doubling dilutions using diluted vWF Diluent to give a decreasing range of either five or eight Calibrator values. Use diluted vWF Diluent as a Zero Calibrator.

Dilute the reconstituted Controls 1 in 20 by adding 50 µL of Control to 950 µL diluted vWF Diluent and mixing gently.

Dilute patient samples 1 in 20, and 1 in 100 if further dilutions are required. Add 50 µL sample to 950 µL diluted vWF Diluent (1:20) and mix gently; if required, add 200 µL of the 1 in 20 dilution to 800 µL diluted vWF Diluent (1:100) and mix gently.

Five to ten minutes before required dilute the TMB Substrate Concentrate according to the following table (one part TMB Substrate Concentrate to four parts Substrate Buffer) and mix well. Use diluted TMB Substrate within 30 minutes of preparation if prepared in a container other than glass. Protect from light.

Number of Strips	TMB Substrate Concentrate (5X) Volume	Volume of Substrate Buffer
6	1.5 mL	6.0 mL
12	2.5 mL	10.0 mL

Calculate the number of microtitre strips required for the current assay, and retain these in the microtitre strip holder. Return surplus strips to the foil pack with the desiccant, and store in the resealable plastic bag at 2°-8°C until required. Ensure that all strips are securely held within the microtitre strip holder, with the assay identification tab lying along the bottom edge below row H.

## ASSAY PROTOCOL

1. Reference wells for identification.
2. Pipette 100 µL of each reconstituted Calibrator dilution in duplicate, pre-diluted reconstituted Controls 1 and 2, and pre-diluted patient samples (at 1 in 20) into appropriate wells. Addition should be in a continuous operation and should not exceed ten minutes for any one set of Calibrators. Should further dilutions of patient samples be required, a 1 in 100 dilution is recommended.
3. Incubate 60 ± 10 minutes at 18°-25°C.
4. Decant strip contents by quick inversion over a sink suitable for the disposal of biological materials, bearing in mind the potential infective hazard of the samples. Blot inverted strips well with paper towels.
5. Wash wells five times with 200 µL diluted vWF Wash Buffer. Decant and blot after each wash step.
6. Add 100 µL vWF Conjugate to each well.
7. Incubate 15 ± 2 minutes at 18°-25°C.
8. Repeat steps 4 and 5.
9. Add 100 µL diluted vWF TMB Substrate to each well.
10. Incubate 15 ± 2 minutes at 18°-25°C. **Do not decant.**
11. Add 100 µL Stop Solution to each well, in the same order and rate as the Substrate. Tap wells gently to mix.
12. Read strips within 30 minutes at 450nm.

## CALCULATION AND INTERPRETATION OF RESULTS

**Consider each assay separately when calculating and interpreting results.**

Calculate the mean absorbance value of each Calibrator dilution and linear plot against Calibrator activity or concentration on suitable graph paper. Alternatively a suitable computer and curve-fitting programme may be used. The following standard curves have been evaluated.

8-point curve: Seven doubling dilutions of the Calibrator from 1 in 10 to 1 in 640, plus a zero standard.

5-point curve: Four dilutions of the Calibrator of 1 in 10, 1 in 20, 1 in 40 and 1 in 160, plus a zero standard.

The vWF activity for each of the dilutions can be calculated from the vWF activity given on the Calibrator label using the following formula.

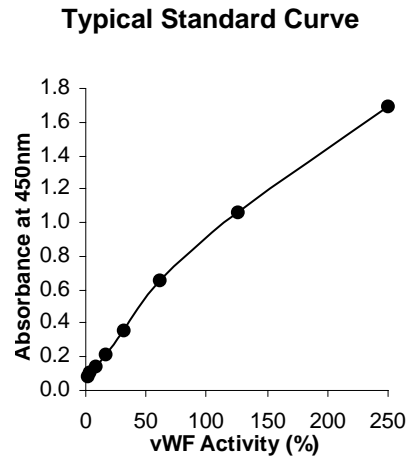
$$\text{Activity of diluted Calibrator} = \text{vWF activity given on label} \times \frac{20}{\text{Dilution Factor}}$$

The following curve-fitting programmes have been found to be suitable:

Smoothed Spline; 4-parameter logistic; 5-parameter logistic; log/logit; lin/linfit.

Control/sample activities can be read by interpolation from the Calibrator curve; a sample plot is shown below for reference purposes, it must not be used for interpreting results.

The activity for Controls/samples should be calculated from the 1 in 20 Control/sample dilution result. DO NOT CORRECT FOR THIS DILUTION FACTOR. If the activity for the samples at a 1 in 20 dilution is greater than the top Standard, results can be calculated using the 1 in 100 dilution if this has been included in the assay run. Results calculated using the 1 in 100 dilution must be multiplied by 5 to correct for this further sample dilution. N.B. 1 IU/mL = 100% activity.



**QUALITY CONTROL**

Ensure that adequate maintenance and calibration of the plate-reader is performed according to the manufacturer's instructions, and that the correct wavelength is employed.

Users should ensure they are fully acquainted with the instructions for the assay, particularly the Warnings and Precautions section, and the Handling and Procedural Notes. Users should demonstrate that they can obtain performance specifications for precision and reportable range of test results comparable to those established by the manufacturer before reporting patient test results. Two Controls representing normal (Control 1) and abnormal (Control 2) vWF activity are supplied for monitoring the quality of the test procedure. It is recommended by the manufacturer that the pre-diluted reconstituted Controls are run in duplicate in each sample test run. The acceptable mean and range in IU/mL and % of each control is given on the label (at 1 in 20 dilution when read from the calibrator curve).

Assuming the precision specifications described by the manufacturer are met, failure of either Control to meet the Control specifications given on the label renders the assay invalid and patient results should not be reported. The operator may repeat the assay, having reviewed their procedure, or contact the distributor/manufacturer. If repeating the assay, prepare a fresh dilution of each Control and sample. Reconstituted Calibrator and Controls are stable at 2°-8°C for up to 24 hours. Laboratories may wish to include in-house controls in each assay run. Store such control material at or below -20°C. Directly thaw at 37°C and avoid repeat freeze/thaw cycles. Do not freeze/thaw samples more than once.

Levels of analytes identified in particular diseases are those established by the manufacturer for specific populations, and may not necessarily mirror the literature. Incidence levels, their relationship to specific diseases, reference ranges, and appropriate cut-off points should all be calculated for the specific populations serviced by users.

**EXPECTED VALUES**

**Asymptomatic Reference Range:** 180 citrated plasma samples from asymptomatic apparently healthy Caucasian donors with an age range of 18-71 years were assayed with the IMUBIND vWF Activity ELISA. The distribution of results is given in the following table. 162/180 (90%) samples gave values greater than 50%, with no statistically significant differences observed with age or gender. See Limitations of Use number 2 regarding vWF level fluctuations in the normal population. It is recommended that users establish reference ranges for the populations served by their laboratories.

Control Group	n	% Activity Range				
		≤30	>30-50	>50-60	>60-180	>180
Asymptomatic Healthy	180	2 1.1%	16 8.9%	17 9.4%	133 74.0%	12 6.6%

**Clinical Samples:** 72 samples from clinically typed 1, 2 and 3 vWF patients were assayed with the IMUBIND vWF Activity ELISA. Patients known to be on treatment were excluded from analysis. The distribution of results is given in the following table.

Clinical Samples	n	% Activity Range									
		≤10		>10-20		>20-30		>30-50		>50	
Type 1	20	7	35%	5	25%	3	15%	2	10%	3	15%
Type 2	49	26	53%	14	29%	4	8%	4	8%	1	2%
Type 3	3	2	67%	1*	33%	-	-	-	-	-	-

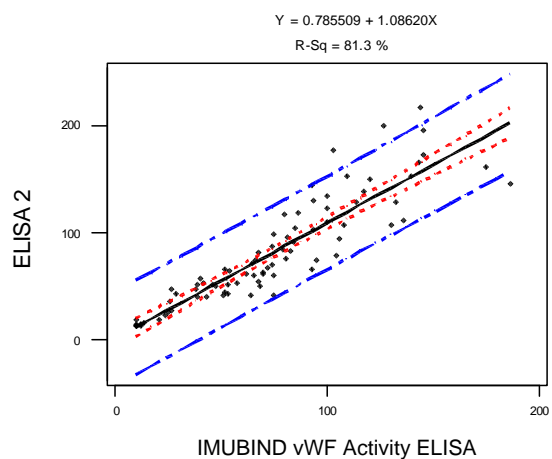
\* Activity = 11%

## PERFORMANCE DATA

### External Study

An evaluation of the IMUBIND vWF Activity ELISA with another commercially available activity ELISA was carried out in the haemostasis department of a large medical centre. Eighty samples with a putative vWF diagnosis were analysed. Samples included those from patients on treatment.

Correlation between IMUBIND vWF Activity ELISA and ELISA 2:



$$Y = 0.78551 + 1.08620X$$

$$R - Sq = 81.3\%$$

$$R = 0.902 \text{ where } X = \text{IMUBIND ELISA} \text{ and } Y = \text{ELISA 2}$$

### Dilution Characteristics

Five dilutions of three patient samples were assayed using two kit batches. The following table shows the mean values obtained and the dilution-corrected recoveries of the initial dilution.

Sample	Dilution	Mean Value %	Dilution Corrected % Recovery (1/20)
1	1/20	83.3	100
	1/40	39.7	95
	1/80	20.9	100
	1/160	10.8	104
	1/320	6.1	117
2	1/20	40.8	100
	1/40	19.8	97
	1/80	10.3	101
	1/160	6.0	118
	1/320	2.8	110
3	1/20	24.4	100
	1/40	12.1	99
	1/80	7.0	115
	1/160	3.7	121

## Imprecision

1. **Intra-assay imprecision** determined by testing two Controls with replication of four in 26 assays, using three operators and three kit batches, over a period of three days.

Control	Mean Value %	Root Mean Square %CV
1	80	8.0
2	16	11.1

2. **Inter-assay imprecision** determined by testing two Controls with replication of four in 26 assays, using three operators and three kit batches, over a period of three days.

Controls	Mean Value %	SD	%CV
1	80	13.4	17.0
2	16	3.45	21.5

## Lower Limit of Detection

The lower limit of detection, calculated from the zero standard plus 2 standard deviations run in duplicate in 9 separate assays using 3 kit batches, was 1.6%.

## Interferences

Haemoglobin up to 400 mg/dL, bilirubin up to 0.2 mg/mL and intralipid up to 15 mg/dL do not interfere with vWF activity results. Rheumatoid factor at a 1/640 titre showed no interference.

## LIMITATIONS OF USE

1. Although the presence of low vWF activity levels is indicative of von Willebrand's Disease, the information must be considered in light of other clinical and laboratory findings, particularly bleeding times. Decreased levels of vWF have been reported in hypothyroidism and systemic lupus erythematosus.
2. vWF levels fluctuate widely in the normal population and in those affected by von Willebrand's disease. The cause of variation is not always apparent but physical exercise, stress, pregnancy, use of the contraceptive pill and age may contribute to these fluctuations. These factors should be taken into consideration when evaluating the significance of von Willebrand activity results.

## REFERENCES

1. Sporn LA, Chavin SI, et al. Biosynthesis of von Willebrand protein by human megakaryocytes. *J Clin Invest*, **76**, 1102-1106, 1985.
2. Wagner DD. Cell biology of von Willebrand Factor. *Ann Rev Cell Biol*, **6**, 217-246, 1990.
3. Nicols WC and Ginsburg D. Von Willebrand Disease. *Reviews in Molecular Medicine*, **76** No. 1, 1-20, 1997.
4. Belch JJF, Zoma AA, et al. Vascular damage and Factor VIII-related antigen in rheumatic diseases. *Rheumatol Int*, **7**, 107-111, 1987.
5. Blann AD, Naqui T, et al. Von Willebrand Factor and endothelial damage in essential hypertension. *Journal of Human Hypertension*, **7**, 107-111, 1993.
6. Tuddenham EGD. The varieties of von Willebrand's Disease. *Clin Lab Haemat*, **6**, 307-323, 1984.
7. Kahaleh MB. The role of vascular endothelium in the pathogenesis of connective tissue disease - endothelial injury, activation, participation and response. *Clin Exp Rheumatol*, **8**, 595-601, 1990.
8. Fleming TGM. Von Willebrand Factor- its function and its measurement in the laboratory. *B Journal of Biomedical Science*, **52**, 50-57, 1995.
9. Goodall AH, Jarvis J, et al. An immunoradiometric assay for human factor VIII/von Willebrand Factor (VIII:vWF) using a monoclonal antibody that defines a functional epitope. *Br J Haematol*, **59**, 565-577, 1985.
10. Murdock PJ, Woodhams BJ, et al. Von Willebrand Factor activity detected in a monoclonal antibody-based ELISA: an alternative to the ristocetin cofactor platelet agglutination assay for diagnostic use. *Thromb Haemost*, **78**, 1272-1277, 1997.

## SUMMARY OF PROTOCOL

1. Prepare dilutions of reconstituted Calibrator to provide a Calibrator curve range.
2. Reconstitute and dilute Controls 1 and 2, 1 in 20 (1+19).
3. Dilute patient samples 1 in 20 (1+19) and 1 in 100 (1+99) if required.
4. Add 100  $\mu$ L of prepared Calibrators in duplicate, prepared Controls and pre-diluted patient samples into referenced wells of the microtitre strip.
5. Incubate  $60 \pm 10$  minutes at  $18^{\circ}$ - $25^{\circ}$ C.
6. Wash strips 5 times.
7. Add 100  $\mu$ L of vWF Conjugate to each well.
8. Incubate  $15 \pm 2$  minutes at  $18^{\circ}$ - $25^{\circ}$ C.
9. Wash strips 5 times.
10. Add 100  $\mu$ L of vWF TMB Substrate to each well.
11. Incubate  $15 \pm 2$  minutes at  $18^{\circ}$ - $25^{\circ}$ C.
12. Add 100  $\mu$ L of vWF Stop Solution to each well.
13. Read absorbance at 450nm.

# FRANÇAIS

## USAGE PREVU

Le test pour l'évaluation de l'activité du Facteur de von Willebrand produit par American Diagnostica Inc. est un dosage immunoenzymatique quantitatif direct (méthode ELISA) Il permet de détecter l'activité du Facteur de von Willebrand dans du plasma humain citraté. Il est destiné à évaluer l'activité du vWF chez des patients lorsque cette évaluation est jugée utile au niveau du procédé diagnostique, en particulier en tant qu'aide dans la classification différentielle de la maladie de von Willebrand. L'activité du vWF représente un paramètre dans un procédé diagnostique à plusieurs critères.

## INTRODUCTION

Le facteur de von Willebrand (vWF) est une glycoprotéine adhésive multimérique complexe synthétisée par les cellules endothéliales et les mégacaryocytes. Ses principales fonctions, apparemment non associées, sont celles de vecteur/stabilisateur de la protéine procoagulante FVIII:C, qui circule dans le sérum sous forme de complexe sans liaisons covalentes, et qui semble être une protéine adhésive dans l'hémostase. Le vWF fixe le collagène ainsi fort probablement que d'autres structures endothéliales; il sert de médiateur dans l'adhésion des plaquettes sanguines au sous-endothélium (glycoprotéine Ib fixatrice des récepteurs superficiels), il pourrait aussi intervenir au niveau de l'interaction plaquette sanguine-plaquette sanguine par la glycoprotéine fixatrice IIb/IIIa<sup>1,2</sup>.



C'est en 1926 que von Willebrand a décrit cette anomalie hémorragique congénitale pour la première fois. Sous sa forme la moins grave, la maladie de von Willebrand est le trouble hémorragique le plus courant, la fréquence rapportée étant de 1 personne sur 100. Il s'agit d'un trouble hétérogène, causé par une anomalie du vWF ou par des taux réduits du vWF. Les sous-classifications de la maladie reposent sur l'observation clinique, les antécédents du patient et l'analyse biologique pour, par exemple, les temps de saignement, l'antigène du vWF et l'activité de ce dernier. La mesure de l'antigène et de l'activité aide au niveau du diagnostic différentiel des deux classes prédominantes de la maladie, soit type 1 et type 2. La classification de la maladie est importante car la prise en charge clinique peut varier selon le type<sup>3</sup>.


Des taux accrus d'antigène du vWF/une augmentation de l'activité du vWF indiquent qu'il s'est produit des lésions dans la maladie vasculaire<sup>4</sup>; les études précliniques suggèrent que les lésions endothéliales pourraient tenir une place importante dans les complications vasculaires de l'hypertension<sup>5</sup>. Cependant, les augmentations du vWF à court terme observées après avoir fait des exercices physiques, après l'adrénaline, une perfusion de DDAVP (1-désamino (8-d-arginine)-vasopressine) et pendant la grossesse<sup>6</sup>, peuvent parfois indiquer une activation/stimulation des cellules endothéliales<sup>7</sup> plutôt que des lésions épithéliales. Les taux de vWF sont réduits dans l'hypothyroïdisme et le lupus érythémateux aigu disséminé. Les formes acquises de la maladie de von Willebrand ont été décrites dans la maladie auto-immune, la maladie de Waldenström, les gammopathies monoclonales bénignes, le cancer surrénalien myéloprolifératif, la vasculite rhumatismale et le diabète<sup>8</sup>. En raison de la diversité des conditions cliniques associées aux anomalies du vWF, un descripteur plus approprié pourrait être le syndrome de von Willebrand.

## PRINCIPE DU DOSAGE

Les cupules des bandes de microtitrage sont enduites d'une préparation d'anticorps IgG monoclonal anti-vWF murin purifié, dont les caractéristiques ont été documentées<sup>9,10</sup>, reconnaissant un épitope fonctionnel du vWF. Durant la première incubation, l'antigène spécifique qui se trouve dans le sérum dilué se fixe à la surface enduite d'anticorps. Les cupules sont ensuite lavées pour éliminer les constituants non fixés. Dans la seconde incubation, le Conjugué, un anticorps monoclonal murin marqué à la peroxydase de raifort et dirigé contre le vWF, se lie à tout antigène fixé à la surface. Après un autre lavage, l'anticorps fixé spécifiquement est dépisté par incubation avec le Substrat. L'addition de la Solution d'arrêt met fin à la réaction, et on obtient alors un produit final coloré. La quantité de Conjugué fixé est mesurée en unités d'absorption. L'activité du Facteur de von Willebrand peut être estimée par interpolation à partir d'une courbe de dose à effet basée sur des dilutions de l'Étalonneur. L'Étalonneur est comparé au 5<sup>ième</sup> Etalon international pour le Facteur VIII et le Facteur de von Willebrand dans le Plasma, code 02/150, fourni par NIBSC, Blanche Lane, South Mimms, Potters Bar, Hertfordshire EN6 3QG, Royaume-Uni.

## CONSTITUANTS DU NECESSAIRE

Conjugué de vWF	1 x 15 mL	Anticorps monoclonal murin marqué à la peroxydase de raifort et dirigé contre le vWF humain, tampon de stabilisation. Prêt à l'emploi.
Concentré de substrat TMB (5X)	1 x 5,5 mL	3,3', 5,5', tétraméthyl benzidine (TMB) dissous dans du diméthyl sulfoxyde (DMSO) et du méthanol. Diluer avant l'emploi. N.B. TOXIQUE ET IRRITANT.  
Tampon substrat	1 x 25 mL	Tampon acétate/citrate, eau oxygénée à 0,025 % (v/v), pH 6,0. Prêt à l'emploi.

Solution d'Arrêt	1 x 15 mL	2N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> . Prêt à l'emploi. N.B. IRRITANT.	<sup>Xi</sup> 
Concentré tampon de lavage (16X)	1 x 25 mL	Tampon borate, Bronopol à 0,32% (p/v). Diluer avant l'emploi.	
Cupules enduites d'anticorps anti-vWF et Porte-bandes	12 bandes de microtitrage à 8 cupules	Enduites d'anticorps monoclonal anti-vWF murin, dans une poche en aluminium refermable, contenant un desséchant.	
Concentré de diluant vWF (5X)	1 x 25 mL	Tampon phosphate, albumine bovine, Bronopol à 0,1 % (p/v). Diluer avant l'emploi.	
Etalonneur du vWF	2 x 0,5 mL	Antigène du vWF dans du plasma humain, lyophilisé. Reconstituer et diluer avant l'emploi.* Une activité attribuée, exprimée en UI/mL et en %, est indiquée sur l'étiquette.	
Témoin du vWF 1	2 x 0,5 mL	Antigène du vWF dans du plasma humain, lyophilisé. Reconstituer et diluer avant l'emploi*. La moyenne acceptable et les limites, exprimées en UI/mL et en %, sont indiquées sur l'étiquette et elles représentent un niveau d'activité 'normal'.	
Témoin du vWF 2	2 x 0,5 mL	Antigène du vWF dans du plasma humain, lyophilisé. Reconstituer et diluer avant l'emploi*. La moyenne acceptable et les limites, exprimées en UI/mL et en %, sont indiquées sur l'étiquette et elles représentent un niveau d'activité 'anormal'.	
Notice incluse dans le conditionnement			

\* Les valeurs imprimées sur les étiquettes de l'Etalonneur et des Témoins représentent l'activité *après* reconstitution dans 0,5 mL d'eau distillée/désionisée et dilution supplémentaire à raison de 1/20, tel que décrit dans 'Préparation pour le dosage'. Noter également que 1 UI/mL = 100 % d'activité.

## CONSERVATION DES REACTIFS

### Remarques relatives à la manipulation et à la méthode à suivre

1. Conserver les constituants du nécessaire à 2°-8°C et utiliser jusqu'à la date de péremption marquée sur les étiquettes. Ne pas utiliser les réactifs après la date de péremption.
2. Ne pas mélanger des numéros de lots différents.
3. Diluer le concentré de substrat TMB, le Concentré tampon de lavage, le Concentré diluant, l'Etalonneur et les Témoins 1 et 2 avant l'emploi. Tous les autres réactifs sont prêts à l'emploi.
4. Le tampon de lavage dilué et le Diluant dilué restent stables pendant un maximum de 6 mois à 2°-8°C si toute contamination microbienne est évitée.
5. Diluer le Substrat TMB cinq à dix minutes avant l'emploi et PROTEGER DE LA LUMIERE. Peut être conservé pendant six heures maximum si dilué dans un récipient en verre propre. S'il a été dilué dans un récipient non en verre, utiliser dans les 30 minutes suivant sa préparation.
6. L'Etalonneur reconstitué et dilué et les Témoins restent stables à 2°-8° pendant un maximum de 24 heures.
7. Remettre les bandes de microtitrage non utilisées dans la poche en aluminium, et conserver dans le sac en polyéthylène refermable contenant du desséchant à 2°-8°C, jusqu'à ce que l'on en est besoin.
8. Eviter la contamination des réactifs. Utiliser un nouvel embout de pipette à jeter pour chaque réactif ou chaque manipulation des échantillons.
9. Ne pas modifier les conditions de manipulation ou de conservation des réactifs du nécessaire ou des échantillons de plasma.

### Indications d'une détérioration

Une couleur bleue ou un précipité indique que le substrat TMB est contaminé. Le jeter et préparer une dilution fraîche.

### Prélèvement et conservation des échantillons

Le dosage est conçu pour des échantillons de plasma citraté. Recueillir 9 volumes de sang dans de l'anticoagulant citraté trisodique 0,109M (3,2 %) (un volume). Centrifuger à 2500 x g pendant 10 minutes.

Le plasma peut être conservé à 2°-8°C ou -20°C au maximum pendant quatre semaines. Les plasmas congelés peuvent être dégelés DIRECTEMENT à 37°C au moins 15 minutes avant d'effectuer le test. Bien mélanger les échantillons dégelés avant de les analyser et éviter les cycles fréquents de congélation/décongélation. Les échantillons dilués à 1:20 dans du Diluant dilué doivent être analysés dans les 24 heures suivant leur dilution.

## MISES EN GARDE ET PRECAUTIONS

Réservé à l'usage diagnostique in vitro.

### Précautions de sécurité

1. Suivre scrupuleusement les instructions données dans ce dépliant, surtout en ce qui concerne la manipulation et les conditions de conservation.
2. L'Étalonneur et les Témoins contiennent du plasma humain testé avec des dosages approuvés par la FDA pour détecter la présence éventuelle de l'AgHBs, l'ARN VHC ou l'anti-VHC, l'ARN VIH-1 ou l'Ag VIH-1 et pour les anticorps anti-VIH-1/VIH-2, auxquels ils ont obtenu des résultats non réactifs/négatifs. Étant donné qu'il n'existe aucun test qui puisse garantir l'absence d'agents infectieux à 100 %, agir comme si l'Étalonneur et les Témoins étaient potentiellement infectieux et les manipuler en prenant les mêmes précautions qu'avec toute autre substance pouvant être biologiquement dangereuse. Le Manuel de Santé du Centre épidémiologique/des Instituts nationaux de la santé (CDC/NIH), intitulé "Biosécurité dans les laboratoires microbiologiques et biomédicaux", quatrième édition, mai 1999, décrit la manière de manipuler de telles substances conformément aux bonnes pratiques de laboratoire. Cela est applicable aux États-Unis.
3. Ne pas aspirer les produits avec une pipette.
4. Ne pas fumer, manger, boire ou se maquiller dans les zones de manipulation des nécessaires et des échantillons.
5. Protéger toute éruption cutanée, coupure, abrasion et autre lésion cutanée de manière adéquate.
6. Le Substrat TMB contient du DMSO et du méthanol. C'est un cancérigène inflammable. Éviter le contact avec la peau, les yeux et les muqueuses et éloigner de la chaleur et des flammes nues.
7. La solution d'arrêt contient du H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N et c'est un irritant. Éviter tout contact avec la peau, les yeux et les muqueuses.
8. On peut se procurer les fiches de données de sécurité relatives à tous les constituants dangereux inclus dans le nécessaire sur demande auprès d'American Diagnostica.



#### **SUBSTRAT**

Toxique



#### **SOLUTION D'ARRÊT**

Irritant

R20/21/22: Nocif par inhalation et par contact avec la peau, et par ingestion.

R36/38: Irritant pour les yeux et la peau.

R39/23/24/25: Toxique: danger d'effets irréversibles très graves par inhalation, par contact avec la peau et par ingestion.

S23: Ne pas respirer les fumées.

S26: En cas de contact avec les yeux, laver immédiatement et abondamment avec de l'eau et consulter un spécialiste.

S28: Après contact avec la peau, se laver immédiatement et abondamment avec l'eau.

S29/35: Ne pas jeter les résidus à l'égout; ne se débarrasser de ce produit et de son récipient qu'en prenant toute précaution d'usage.

S36/37/39: Porter un vêtement de protection approprié, des gants et un appareil de protection des yeux/du visage.

S46: En cas d'ingestion consulter immédiatement un médecin et lui montrer l'emballage ou l'étiquette.

S51: Ne pas utiliser sur de grandes surfaces dans les locaux habités.

S63: En cas d'accident par inhalation, transporter la victime hors de la zone contaminée et la garder au repos.

R36/38: Irritant pour les yeux et la peau.

S23: Ne pas respirer les fumées.

S26: En cas de contact avec les yeux, laver immédiatement et abondamment avec de l'eau et consulter un spécialiste.

S29/35: Ne pas jeter les résidus à l'égout; ne se débarrasser de ce produit et de son récipient qu'en prenant toute précaution d'usage..

S36/37/39: Porter un vêtement de protection approprié, des gants et un appareil de protection des yeux/du visage.

## PREPARATION

### Substances/Equipement requis mais non inclus dans le nécessaire

1. Plaque à 96 cupules/lecteur de bandes avec un filtre de 450 nm.
2. Pipettes de précision pour distribuer 50 µL, 100 µL, 500 µL et 1 mL. Pipette automatique pour distribuer 100 µL. Pipette automatique pour distribuer 200 µL pour le lavage à la main, laveur de plaques automatique (facultatif).
3. Eprouvettes graduées en verre/matière plastique : 1x100 mL, 1x500 mL.
4. Récipients de 1 mL pour les dilutions de l'Etalonneur/du Témoin/des Echantillons.
5. Eau distillée/désionisée.
6. Serviettes en papier.
7. Minuterie pour intervalles de 15 et 60 minutes.

### Préparation pour le dosage

Attendre 30 minutes minimum pour que tous les constituants du nécessaire, y compris les bandes de microtitrage, soient à la température de 18°-25°C avant de les utiliser. Mélanger les réactifs en renversant doucement les récipients.

Diluer le Concentré tampon de lavage du vWF en ajoutant le contenu d'un flacon de 375 mL d'eau distillée/désionisée dans un récipient propre et en mélangeant bien.

Diluer le Concentré diluant du vWF en ajoutant le contenu d'un flacon de 100 mL d'eau distillée/désionisée dans un récipient propre et en mélangeant bien.

Reconstituer un flacon de l'Etalonneur et chaque Témoin en ajoutant 0,5 mL d'eau distillée/désionisée et en faisant tourner doucement le contenu jusqu'à ce que toutes les particules soient en solution. NE PAS FAIRE TOURBILLONNER. Laisser reposer 30 minutes à 18°-25°C en faisant doucement tourner de temps à autre avant de diluer.

Diluer l'Etalonneur reconstitué à raison de 1 pour 10 (un volume d'Etalonneur pour neuf volumes dilués de Diluant pour vWF). L'activité de la dilution 1/10 équivaut à deux fois la valeur indiquée sur l'étiquette, c'est-à-dire que si la valeur indiquée sur l'étiquette de l'Etalonneur est 0,85 UI/mL (85 %), alors la valeur pour l'Etalonneur à une dilution 1/10 est 1,7 UI/mL (170 %). A partir d'une solution mère diluée à raison de 1/10, préparer une série de dilutions doubles en utilisant le Diluant du vWF dilué pour donner une gamme décroissante de cinq ou bien de huit valeurs de l'Etalonneur. Utiliser le Diluant du vWF dilué en tant qu'Etalonneur zéro.

Diluer les Témoins reconstitués à 1/20 en ajoutant 50 µL de Témoin à 950 µL de Diluant du vWF dilué, puis mélanger doucement.

Diluer les échantillons du patient à raison de 1/20 et de 1/100 si l'on a besoin d'autres dilutions. Ajouter 50 µL d'échantillon à 950 µL de Diluant du vWF dilué (1/20) et mélanger doucement. Si nécessaire, ajouter 200 µL de la dilution à 1/20 à 800 µL de Diluant du vWF dilué (1/100) et mélanger doucement.

Cinq à dix minutes avant qu'il soit requis, diluer le Concentré du Substrat TMB conformément au tableau suivant (un volume de Concentré de Substrat TMB pour quatre volumes de Tampon pour Substrat) et bien mélanger. Utiliser le Substrat TMB dilué dans les 30 minutes suivant sa préparation, si celle-ci a été effectuée dans un récipient non en verre. Protéger de la lumière.

Nombre de bandes	Volume (5X) de concentré de Substrat TMB	Volume de Tampon du Substrat
6	1,5 mL	6,0 mL
12	2,5 mL	10,0 mL

Calculer le nombre de bandes de microtitrage requises pour le dosage en cours, et les placer dans le porte-bandes de microtitrage. Remettre les bandes non utilisées dans la poche en aluminium avec le desséchant, et conserver dans la poche en plastique refermable à la température de 2°-8°C jusqu'à ce qu'on en ait à nouveau besoin. S'assurer que toutes les bandes ne risquent pas de tomber du porte-bandes de microtitrage, la languette d'identification du dosage étant couchée le long de la bordure inférieure, juste en-dessous de la rangée H.

### PROTOCOLE DU DOSAGE

1. Annoter les cupules afin de pouvoir les identifier.
2. Avec une pipette, prélever 100 µL de chaque dilution d'Etalonneur reconstitué en double exemplaire, les Témoins reconstitués prédilués 1 et 2, et les échantillons prédilués du patient (à raison de 1/20) dans les cupules appropriées. L'addition doit se faire de manière continue et elle ne doit pas prendre plus de dix minutes pour n'importe lequel des Etalonneurs. Si les échantillons du patient exigent d'être dilués davantage, une dilution à 1/100 est recommandée.

3. Faire incuber pendant  $60 \pm 10$  minutes à  $18^{\circ}\text{-}25^{\circ}\text{C}$ .
4. Décanter le contenu des bandes par renversement rapide au-dessus d'un évier convenant à l'élimination de substances biologiques, en n'oubliant pas que les échantillons sont potentiellement infectieux. Bien éponger les bandes renversées avec des serviettes en papier.
5. Laver les cupules cinq fois avec  $200 \mu\text{L}$  de Tampon de lavage du vWF dilué. Décanter et éponger après chaque étape du lavage.
6. Ajouter  $100 \mu\text{L}$  de conjugué dans chaque cupule.
7. Faire incuber pendant  $15 \pm 2$  minutes à  $18^{\circ}\text{-}25^{\circ}\text{C}$ .
8. Répéter les étapes 4 et 5.
9. Ajouter  $100 \mu\text{L}$  de Substrat TMB du vWF idlué dans chaque cupule.
10. Faire incuber pendant  $15 \pm 2$  minutes à  $18^{\circ}\text{-}25^{\circ}\text{C}$ . Ne pas décanter.
11. Ajouter  $100 \mu\text{L}$  de Solution d'arrêt dans chaque cupule, dans le même ordre et avec la même vitesse que le Substrat. Tapoter doucement les cupules pour mélanger.
12. Lire le résultat sur les bandes dans un délai de 30 minutes à  $450 \text{ nm}$ .

## CALCUL ET INTERPRETATION DES RESULTATS

### Considérer chaque dosage séparément lors du calcul et de l'interprétation des résultats.

Calculer la valeur d'absorption moyenne de chaque dilution d'Etalonneur et tracer une courbe en fonction de l'activité ou de la concentration de l'Etalonneur sur du papier millimétré approprié. Ou bien, on peut utiliser un ordinateur adéquat et un programme pour ajustements de courbes. Les courbes étalons suivantes ont été évaluées.

- Courbe à 8 points : Sept dilutions doubles de l'Etalonneur allant de  $1/10$  à  $1/640$ , plus un étalon zéro.  
 Courbe à 5 points : Quatre dilutions de l'Etalonneur, soit  $1/10$ ,  $1/20$ ,  $1/40$  et  $1/160$ , plus un étalon zéro.

On peut calculer l'activité du vWF pour chacune des dilutions à partir de l'activité du vWF indiquée sur l'étiquette de l'Etalonneur et en se servant de la formule suivante.

$$\text{Activité de l'Etalonneur dilué} = \text{activité du vWF indiquée sur l'étiquette} \times \frac{20}{\text{Facteur de dilution}}$$

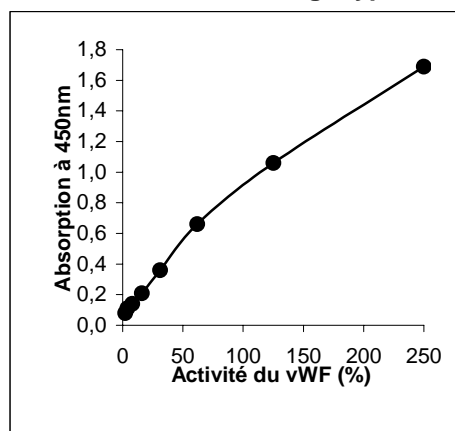
Les programmes d'ajustements de courbes suivants se sont avérés adéquats:

Spline lissée; logistique à 4 paramètres, logistique à 5 paramètres, log/logit, lin/linit.

Les activités du témoin/échantillon peuvent être lues par interpolation à partir de la courbe de l'Etalonneur. Une courbe échantillon est donnée ci-dessous à titre de référence mais elle ne doit pas être utilisée pour interpréter les résultats.

Calculer l'activité des Témoins/échantillons à partir de la dilution des Témoins/échantillons à  $1/20$ . NE PAS RECTIFIER CE FACTEUR DE DILUTION. Si l'activité pour les échantillons dilués à  $1/20$  est supérieure à celle de l'Etalon supérieur, on peut calculer les résultats en utilisant la dilution à  $1/100$ , si celle-ci faisait partie des analyses. Les résultats calculés en utilisant la dilution à  $1/100$  doivent être multipliés par 5 à titre de rectification pour cette dilution supplémentaire des échantillons. N.B.  $1 \text{ UI/mL} = 100 \%$  d'activité.

**Courbe d'étalonnage type**



## CONTROLE DE LA QUALITE

S'assurer qu'un entretien et un étalonnage adéquats du lecteur de plaques ont été effectués, conformément aux instructions du fabricant, et que la longueur d'onde utilisée est correcte.

Les utilisateurs doivent s'assurer qu'ils ont bien pris connaissance des instructions pour effectuer le dosage, et en particulier de la Section sur les Mises en garde et Précautions, et des Remarques relatives à la Manipulation et à la Méthode à suivre. Les utilisateurs doivent prouver qu'ils peuvent obtenir des spécifications de la performance pour la précision, et des limites rapportables de résultats des tests comparables à celles fixées par le fabricant avant de signaler les résultats des tests des patients. Deux Témoins représentant l'activité normale (Témoin 1) et anormale (Témoin 2) du vWF sont fournis pour contrôler la qualité de la procédure-test. Le fabricant recommande d'analyser les Témoins reconstitués dilués en double dans chaque test. La moyenne acceptable et les limites, exprimées en UI/Im et en %, de chaque témoin, sont indiquées sur l'étiquette (à la dilution 1/20 lorsque lues sur la courbe d'étalonnage).

Dans la mesure où les spécifications relatives à la précision décrites par le fabricant sont satisfaites, si un Témoin quelconque ne satisfait pas les spécifications de contrôle figurant sur l'étiquette, le dosage devient invalide et les résultats obtenus du patient ne doivent pas être communiqués. L'opérateur peut répéter le dosage, après avoir réexaminé la méthode à suivre, ou bien se mettre en contact avec le distributeur/fabricant. Si le dosage est renouvelé, préparer une solution fraîche de chaque Témoin et de chaque échantillon. L'Étalonneur reconstitué et les Témoins restent stables à 2°-8°C pendant un maximum de 24 heures. Il se peut que les laboratoires désirent effectuer des contrôles internes durant chaque analyse. Conserver une telle substance témoin à une température égale ou inférieure à -20°C. Dégeler directement à 37°C, et éviter les cycles répétitifs de congélation/décongélation. Ne pas congeler/décongeler les échantillons plus d'une fois.

Les taux d'analytes identifiés dans des affections particulières sont ceux établis par le fabricant pour des populations spécifiques, et ils ne refléteront pas automatiquement ceux mentionnés dans la documentation. Les incidences, leur lien avec des affections spécifiques, les limites de référence, et les points d'arrêt appropriés doivent tous être calculés pour les populations spécifiques servies par les utilisateurs.

## VALEURS ATTENDUES

**Limites de référence pour patients asymptomatiques :** Un total de 180 échantillons de plasma citraté provenant de donneurs de race blanche apparemment en bonne santé et asymptomatiques, d'un âge compris entre 18 et 71 ans, a été analysé avec l'ELISA pour évaluation de l'activité du vWF produit par American Diagnostica. Les résultats ont été répartis dans le tableau suivant. En tout, 162/180 (90 %) des échantillons ont donné des valeurs supérieures à 50 %, aucune différence d'importance statistique n'ayant été observée en fonction de l'âge ou du genre. Se référer aux Limites de l'Utilisation numéro 2 concernant les fluctuations du taux du vWF dans la population normale. Il est recommandé que les utilisateurs fixent des limites de référence pour les populations normalement analysées par leurs laboratoires.

Groupe témoin	n	Limites de l'activité en %				
		≤30	>30-50	>50-60	>60-180	>180
Individus en bonne santé et asymptomatiques	180	2 1,1 %	16 8,9 %	17 9,4 %	133 74,0 %	12 6,6 %

**Echantillons cliniques:** Un total de 72 échantillons provenant de patients avec la maladie de vWF de types 1, 2 et 3 a été analysé avec l'ELISA pour évaluation de l'activité du vWF produit par American Diagnostica. Les patients déjà en cours de traitement étaient exclus de l'analyse. Les résultats sont répartis dans le tableau suivant.

Echantillons cliniques	n	Limites de l'activité en %				
		≤10	>10-20	>20-30	>30-50	>50
Type 1	20	7 35%	5 25%	3 15%	2 10%	3 15%
Type 2	49	26 53%	14 29%	4 8%	4 8%	1 2%
Type 3	3	2 67%	1* 33%	- -	- -	- -

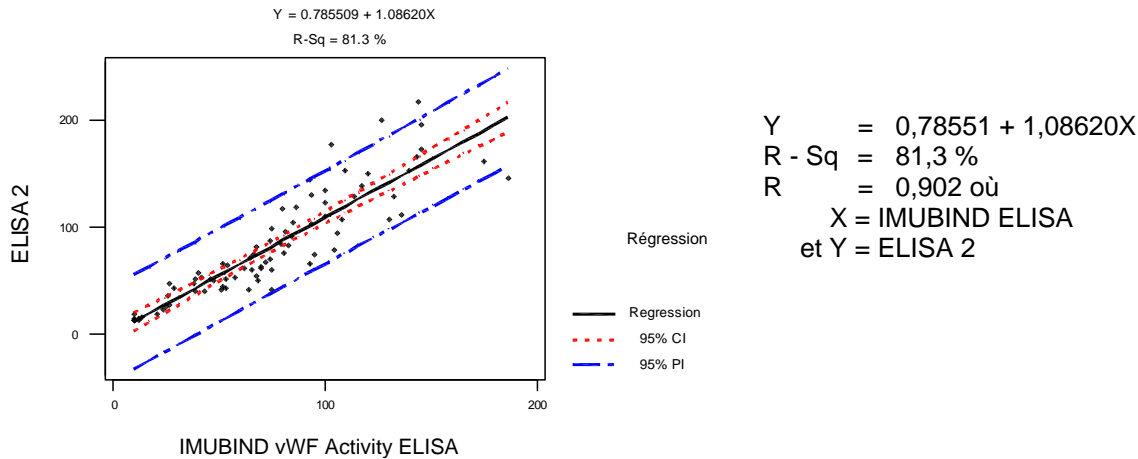
\* Activité = 11 %

## DONNEES RELATIVES A LA PERFORMANCE

### Etude externe

Une évaluation de l'ELISA pour l'activité du vWF produit par American Diagnostica a été faite avec un autre ELISA pour l'activité vendu dans le commerce, cela par le service d'hémostase d'un important centre médical. Quarante-vingt échantillons avec un diagnostic de maladie du vWF généralement admis ont été analysés. Des échantillons provenant de patients en cours de traitement étaient aussi inclus.

Corrélation entre l'ELISA pour l'activité produit par American Diagnostica et l'ELISA 2:



### Caractéristiques de la dilution

Cinq dilutions de trois échantillons de patients ont été analysées avec deux lots de nécessaires. Le tableau suivant indique les valeurs moyennes obtenues et le pourcentage récupéré rectifié en fonction de la dilution.

Echantillon	Dilution	Valeur moyenne %	% récupéré rectifié en fonction de la dilution (1/20)
1	1/20	83,3	100
	1/40	39,7	95
	1/80	20,9	100
	1/160	10,8	104
	1/320	6,1	117
2	1/20	40,8	100
	1/40	19,8	97
	1/80	10,3	101
	1/160	6,0	118
	1/320	2,8	110
3	1/20	24,4	100
	1/40	12,1	99
	1/80	7,0	115
	1/160	3,7	121

### Imprécision

- Imprécision intra-dosages** déterminée en analysant deux Témoins avec une réplication de quatre dans 26 dosages, en utilisant trois laborantins et trois lots de nécessaires, sur une période de trois jours.

Témoin	Valeur moyenne%	Carré moyen de la racine %CV
1	80	8,0
2	16	11,1

2. **Imprecision inter-dosages** déterminée en analysant deux Témoins avec réplication de quatre dans 26 dosages, en utilisant trois laborantins et trois lots de nécessaires, sur une période de trois jours.

Témoins	Valeur moyenne %	ET	%CV
1	80	13,4	17,0
2	16	3,45	21,5

### Limite inférieure de détection

La limite inférieure de détection, calculée à partir de l'étalon zéro plus 2 écart-types en double dans 9 dosages séparés en utilisant 3 lots de nécessaires, était de 1,6 %.

### Interférences

Un maximum de 400 mg/dL d'hémoglobine, de 0,2 mg/mL de bilirubine et de 15 mg/dL d'intralipides n'interfère pas avec les résultats concernant l'activité du vWF. Le facteur rhumatoïde à une concentration de 1/640 ne s'est pas avéré interférer avec les résultats.

### RESTRICTIONS D'UTILISATION

1. Bien que des taux faibles de l'activité du vWF indique la présence de la maladie de von Willebrand, les résultats doivent être considérés en tenant compte des autres résultats cliniques et biologiques, notamment les temps de saignement. Des taux réduits de facteur de vWF ont été rapportés dans l'hypothyroïdisme et le lupus érythémateux aigu disséminé.
2. Les taux de facteur vWF varient grandement dans la population normale et chez les personnes affectées par la maladie de von Willebrand. La cause de ces variations n'est pas toujours apparente mais les exercices physiques, le stress, la grossesse, la prise de la pilule contraceptive et l'âge pourraient y contribuer. Prendre ces facteurs en considération lors de l'évaluation de l'importance des résultats sur l'activité du facteur vWF.

### REFERENCES

1. Sporn LA, Chavin SI, et al. Biosynthèse de la protéine de von Willebrand par les mégacaryocytes humains. *J Clin Invest*, **76**, 1102-1106, 1985.
2. Wagner DD. Biologie cellulaire du Facteur de von Willebrand. *Ann Rev Cell Biol*, **6**, 217-246, 1990.
3. Nicols WC et Ginsburg D. La maladie de von Willebrand. *Reviews in Molecular Medicine*, **76** No. 1, 1-20, 1997.
4. Belch JJF, Zoma AA, et al. Les lésions vasculaires et l'antigène associé au Facteur VIII dans les maladies rhumatismales. *Clin Rheumatol*, **7**, 107-111, 1987.
5. Blann AD, Naqui T, et al. Le Facteur de von Willebrand et les lésions endothéliales dans l'hypertension essentielle. *Journal of Human Hypertension*, **7**, 107-111, 1993.
6. Tuddenham EGD. Les variétés de la maladie de von Willebrand. *Clin Lab Haemat*, **6**, 307-323, 1984.
7. Kahaleh MB. Le rôle de l'endothélium vasculaire dans la pathogenèse de la maladie des tissus connectifs – lésions endothéliales, activation, participation et réponse. *Clin Exp Rheumatol*, **8**, 595-601, 1990.
8. TGM Fleming le Facteur de von Willebrand – sa fonction et sa mesure en laboratoire. *B Journal of Biomedical Science*, **52**, 50-57, 1995.
9. Goodall AH, Jarvis J, et al. Un dosage immunoradiométrique pour le facteur VIII humain/Facteur de von Willebrand (VIII:vWF) en utilisant un anticorps monoclonal qui définit un épitope fonctionnel. *Br J Haematol*, **59**, 565-577, 1985.
10. Murdock PJ, Woodhams BJ, et al. L'activité du Facteur de von Willebrand est détectée dans un ELISA à base d'anticorps monoclonal: une alternative au test d'agglutination des plaquettes sanguines du cofacteur de la ristocétine pour usage diagnostique. *Thromb Haemost*, **78**, 1272-1277, 1997.

## RESUME DU PROTOCOLE

1. Préparer des dilutions de l'Etalonneur reconstitué pour déterminer les limites d'une courbe d'étalonnage.
2. Reconstituer et diluer les Témoins 1 et 2, à raison de 1 volume pour 20 (1+19).
3. Diluer les échantillons des patients à raison de 1 volume pour 20 (1+19) et de 1 volume pour 100 (1+99) si requis.
4. Ajouter 100 µL des Etalonneurs préparés en double, des Témoins préparés et des échantillons prédilués des patients dans les cupules référencées de la bande de microtitrage.
5. Faire incuber pendant  $60 \pm 10$  minutes à 18°-25°C.
6. Laver les bandes 5 fois.
7. Ajouter 100 µL de Conjugué du vWF dans chaque cupule.
8. Faire incuber pendant  $15 \pm 2$  minutes à 18°-25°C.
9. Laver les bandes 5 fois.
10. Ajouter 100 µL de Substrat TMB du vWF dans chaque cupule.
11. Faire incuber pendant  $15 \pm 2$  minutes à 18°-25°C.
12. Ajouter 100 µL de Solution d'arrêt du vWF dans chaque cupule.
13. Lire la capacité d'absorption à 450 nm.

## INDICACIONES

El test IMUBIND de actividad del Factor von Willebrand es una prueba inmunosorbente cuantitativa directa vinculada por enzimas (ELISA) para detectar la actividad del Factor von Willebrand (vWF) en el plasma humano citratado. Esta prueba está indicada para la evaluación de la actividad vWF en pacientes, en casos en que se estima que esta evaluación puede ser útil en el proceso del diagnóstico, en particular como ayuda en la clasificación diferencial de la enfermedad de von Willebrand. La actividad vWF representa uno de los parámetros dentro de un proceso de diagnóstico basado en múltiples criterios.

## INTRODUCCIÓN

El Factor Von Willebrand (vWF) es una glicoproteína adhesiva multimétrica compleja sintetizada por células endoteliales y megacariocitos. Sus principales funciones, que aparentemente no están relacionadas entre sí, son las de portador/estabilizador para la proteína pro-coagulante FVIII:C, que circula en el suero como un complejo vinculado de modo no covalente y parece ser una proteína adhesiva en la hemostasia. El vWF liga el colágeno y posiblemente otras estructuras endoteliales; mediatiza la adhesión de plaquetas al sub-endotelio (ligando la glicoproteína Ib receptora de superficie), y es posible que también desempeñe un papel en la interacción de plaquetas a plaquetas ligando la glicoproteína IIb/IIIa<sup>1,2</sup>.



Von Willebrand describió por primera vez este desorden congénito de sangramiento en 1926. El su forma más suave, la enfermedad de von Willebrand es la forma más común de sangramiento; según los estudios realizados, su frecuencia es de 1 en 100. Se trata de un desorden heterogéneo, causado por defectos vWF o por una reducción en los niveles de vWF. Las sub-clasificaciones de la enfermedad se basan en la observación clínica, el historial del paciente y análisis de laboratorio como por ejemplo los tiempos de sangramiento, el antígeno vWF y la actividad vWF. Las mediciones tanto del antígeno como de la actividad contribuyen al diagnóstico diferencial de las dos clases predominantes de la enfermedad, los tipos 1 y 2. La clasificación de la enfermedad es importante, puesto que la gestión clínica puede variar según el tipo<sup>3</sup>.


El aumento en los niveles de antígeno/actividad vWF es indicador de un daño endotelial en enfermedad vascular<sup>4</sup>. Los estudios preliminares sugieren que el daño endotelial podría ser importante en las complicaciones vasculares de hipertensión<sup>5</sup>. Los aumentos de vWF a corto plazo observados después de realizar ejercicio, adrenalina, infusión DDAVP infusión (1-deamino (8-d-arginina)-vasopresina) y durante el embarazo<sup>6</sup>, sin embargo, pueden indicar activación/estimulación de las células endoteliales<sup>7</sup> más bien que daño epitelial. Se encuentra una disminución en niveles vWF en el hipotiroidismo y en el lupus eritematoso sistémico. Han sido descritas formas adquiridas de la enfermedad de von Willebrand en la enfermedad autoinmune, la enfermedad de Waldenström, las gammopatías monoclonales, el carcinoma adrenal mieloproliferativo, la vasculitis reumática y la diabetes<sup>8</sup>. A causa de la diversidad de condiciones clínicas asociadas con las anomalías vWF, el Síndrome von Willebrand podría ser un descriptor más apropiado.

## PRINCIPIO DEL ENSAYO

Los pozos de las tiras microtítulo están cubiertos de un preparado de anticuerpo monoclonal IgG anti-vWF de murino purificado, cuyas características han sido documentadas<sup>9,10</sup>, que reconoce un epítipo funcional de vWF. Durante la primera incubación, el antígeno específico en el plasma diluido se liga a la superficie cubierta con el anticuerpo. Entonces se lavan los pozos para eliminar los componentes no ligados. En la segunda incubación, el Conjugado, un anticuerpo monoclonal del vWF de murino etiquetado de peroxidasa del rábano, liga los antígenos que pueda haber ligados en superficie. Después de proceder a otro lavado, se rastrea el anticuerpo ligado específicamente, mediante incubación con el Substrato. La reacción termina con la adición de la Solución Stop, lo cual resulta en un producto final de color. La cantidad del Conjugado ligado se mide en unidades de absorbencia. La actividad del Factor von Willebrand se puede calcular por interpolación a partir de una curva de dosis-respuesta basada en diluciones del Calibrador. El Calibrador es referenciado frente al 5 Estándar Internacional para el Factor VIII y el Factor von Willebrand en Plasma, código 02/150, facilitado por NIBSC, Blanche Lane, South Mimms, Potters Bar, Hertfordshire EN6 3QG, Reino Unido.

## COMPONENTES DEL KIT

vWF Conjugado	1 x 15 mL	Anticuerpo monoclonal de murino etiquetado de peroxidasa del rábano frente al vWF humano, buffer de estabilización. Listo para ser usado.
Concentrado Substrato TMB (5X)	1 x 5,5 mL	3,3', 5,5', bencidina tetrametilo (TMB) disuelta en sulfóxido dimetilo (DMSO) y metanol. Diluir antes de usar. N.B. TÓXICO e IRRITANTE.  
Buffer Substrato	1 x 25 mL	Buffer de acetato/citrato, 0.025% (v/v) peróxido de hidrógeno, pH 6,0. Listo para ser usado.

Solución Stop	1 x 15 mL	2N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> . Listo para ser usado. N.B. IRRITANTE. 
Concentrado Buffer vWF de Lavado (16X)	1 x 25 mL	Buffer de borato, 0,32% (w/v) Bronopol. Diluir antes de usar.
Pozos cubiertos anti-vWFy soporte de las tiras	12 x 8 tiras microtítulo de pozo	Cubiertas de anticuerpo monoclonal de murino anti-vWF, en un paquete de papel metalizado resellable con desecante.
Concentrado diluyente vWF (5X)	1 x 25 mL	Buffer de fosfato, albúmina bovina, 0,1% (w/v) Bronopol. Diluir antes de usar.
Calibrador vWF	2 x 0,5 mL	Antígeno vWF en plasma humano, secado por congelación. Reconstituir y diluir antes de usar *. En la etiqueta se informa sobre la actividad asignada en IU/mL y %.
Control 1 vWF	2 x 0,5 mL	Antígeno vWF en plasma humano, secado por congelación. Reconstituir y diluir antes de usar *. En la etiqueta se informa sobre la media y la gama aceptables en IU/mL y %, y representa un nivel 'normal' de actividad.
Control 2 vWF	2 x 0,5 mL	Antígeno vWF en plasma humano, secado por congelación. Reconstituir y diluir antes de usar *. En la etiqueta se informa sobre la media y la gama aceptables en IU/mL y %, y representa un nivel 'anormal' de actividad.
Prospecto del paquete		

\* N.B. Los valores impresos en las etiquetas del Calibrador y los Controles representan la actividad *después* de la reconstitución en 0,5 mL de agua destilada/desionizada y una dilución posterior de 1 in 20 tal como queda descrito en la sección sobre Preparación para el Ensayo. Se debe observar, además, que 1 IU/mL = actividad 100%.

## ALMACENAMIENTO DE LOS REACTIVOS

### Notas sobre manejo y procedimiento

- Los componentes del "kit" (equipo) se deben almacenar a una temperatura de 2°-8°C y usar antes de la fecha de caducidad que figura en las etiquetas. No se debe hacer uso de reactivos pasados de fecha.
- No se deben mezclar lotes de diferente numeración.
- El Concentrado Substrato TMB, el Concentrado Buffer de Lavado, el Diluyente, el Calibrador y los Controles 1 y 2 deben ser diluidos antes de ser usados. Todos los demás reactivos vienen listos para ser usados.
- El Buffer diluido de lavado y el Diluyente diluido son estables a 2°-8°C hasta un máximo de 6 meses, si se evita la contaminación microbiana.
- El Substrato TMB se debe diluir entre cinco y diez minutos antes de proceder a su uso, y SE DEBE RESGUARDAR DE LA LUZ. Se puede almacenar hasta seis horas si se diluye en un recipiente limpio de vidrio; si se diluye en un recipiente que no sea de vidrio, se debe usar en los 30 minutos siguientes a su preparación.
- El Calibrador y los Controles reconstituidos y diluidos son estables a 2°-8°C durante un máximo de 24 horas.
- Las tiras microtítulo que sobren deberán ser devueltas al paquete de papel metalizado y ser conservadas a una temperatura de 2°-8°C en la bolsa resellable de polieteno con el desecante, hasta que se vayan a usar.
- Se debe evitar la contaminación de los reactivos. Debe emplearse una punta de pipeta desechable para cada reactivo o cada manipulación de una muestra.
- No se deben introducir modificaciones en el manejo o las condiciones de almacenamiento para los reactivos del "kit" o las muestras de plasma.

### Indicaciones y deterioro

El azul en el color o el precipitado indica que el Substrato TMB está contaminado; en tal caso, se debe desechar, y preparar una nueva dilución.

### Recogida y almacenamiento de muestras

Este ensayo ha sido diseñado para muestras de plasma citratado. Se recogen nueve volúmenes de sangre en 0,109M (3,2%) de anticoagulante citrato de trisodio (en cada volumen). Se centrifuga a 2500 x g durante 10 minutos.

El plasma se puede almacenar a 2°-8°C o -20°C o temperatura inferior durante cuatro semanas. Los plasmas congelados deben ser descongelados DIRECTAMENTE a 37°C durante por lo menos 15 minutos anteriormente a proceder a realizar el test. Mezclar minuciosamente alas muestras descongeladas antes del análisis y no volver a

congelar/descongelar. Las muestras a una dilución de 1:20 en Diluyente diluido deben ser sometidas a ensayo en las 24 horas siguientes a la dilución.

## AVISOS Y PRECAUCIONES

Para diagnóstico *in vitro* únicamente.

### Precauciones de seguridad

1. Es necesario adherirse estrictamente a las instrucciones que aparecen en este prospecto, en especial en lo que se refiere al manejo y condiciones de almacenamiento.
2. El Calibrador y los Controles contienen plasma humano sometido a test mediante ensayos aprobados por la FDA para el HBsAg, el antígeno del VIH-1 o el RNA del VIH-1, los anticuerpos antiVHC o el RNA del VHC, y los anticuerpos antiVIH-1/VIH-2, cuyos resultados han sido no reactivos/negativos. En vista de que ningún test conocido ofrece garantía completa de que estén ausentes todos los agentes de infección, el Calibrador y los Controles deben ser considerados potencialmente infecciosos y manejados con las mismas precauciones que cualquier otro material biopeligroso. El Manual de Salud CDC/NIH "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", 4<sup>a</sup> edición, mayo 1999, describe el modo en que se deben manipular estos materiales de acuerdo con una Buena Práctica de Laboratorio. Esto es aplicable en los EE.UU.
3. No se debe transferir por pipeta utilizando la boca.
4. No se debe fumar, comer, beber ni aplicar cosméticos en las zonas donde se manejan los "kits" y las muestras.
5. Las dolencias dérmicas, cortes, abrasiones y otras lesiones cutáneas deben quedar protegidas de modo apropiado.
6. El Substrato TMB contiene DMSO y metanol. Es carcinógeno y es inflamable. Se debe evitar el contacto con la piel, los ojos y las membranas mucosas, y mantener alejado del calor y de las llamas desnudas.
7. La Solución Stop contiene 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y es irritante. Se debe evitar el contacto con la piel, los ojos y las membranas mucosas.
8. Se pueden solicitar a American Diagnostica las hojas de notas con datos sobre seguridad material de todos los componentes peligrosos que se incluyen en este "kit".



#### SUBSTRATO

Tóxico



#### SOLUCION STOP

Irritante

R20/21/22: Nocivo por inhalación, por ingestión y en contacto con la piel.

R36/38: Irrita los ojos y la piel.

R39/23/24/25: Tóxico: peligro de efectos irreversibles muy graves por inhalación, contacto con la piel e ingestión.

S23: No respirar los vapores.

S26: En caso de contacto con los ojos, lávense inmediata y abundantemente con agua y acúdase a un médico.

S28: En caso de contacto con la piel, lávese inmediata y abundantemente con agua

S29/35: No tirar los residuos por el desagüe; elimínense los residuos del producto y sus recipientes con todas las precauciones posibles.

S36/37/39: Usen indumentaria y guantes adecuados y protección para los ojos/la cara.

S46: En caso de ingestión, acuda inmediatamente al médico y muéstrela la etiqueta o el envase.

S51: Úsese únicamente en lugares bien ventilados.

S63: En caso de accidente por inhalación, alejar a la víctima de la zona contaminada y mantenerla en reposo.

R36/38: Irrita los ojos y la piel.

S23: No respirar los vapores.

S26: En caso de contacto con los ojos, lávense inmediata y abundantemente con agua y acúdase a un médico.

S29/35: No tirar los residuos por el desagüe; elimínense los residuos del producto y sus recipientes con todas las precauciones posibles.

S36/37/39: Usen indumentaria y guantes adecuados y protección para los ojos/la cara.

## PREPARACIÓN

### **Materiales/utensilios que hacen falta pero no vienen incluidos**

1. Lector del placa/tira de 96 pozos con filtro de 450 nm.
2. Pipetas de precisión para dispensar 50 µL, 100 µL, 500 µL, 1 mL. Pipeta automática para dispensar 100 µL. Pipeta automática para dispensar 200 µL para lavado manual, placa de lavado automático opcional.
3. Cilindros de medición de vidrio/plástico: 1x100 mL, 1x500 mL.
4. Recipientes de 1 mL para las diluciones del Calibrador/Controles/muestras.
5. Agua destilada/desionizada.
6. Toallas de papel.
7. Temporizador para intervalos de 15 y 60 minutos.

### **Preparación para el ensayo**

Se debe permitir que todos los componentes del "kit", incluso las tiras microtítulo, alcancen una temperatura de 18°-25°C durante un mínimo de 30 minutos antes de proceder a su uso. Mezclar los reactivos líquidos mediante suave inversión.

Diluir el Concentrado Buffer vWF de Lavado agregando el contenido de un vial a 375 mL de agua destilada/desionizada en un recipiente limpio, y mezclar bien.

Diluir el Concentrado Diluyente vWF agregando el contenido de un vial a 100 mL de agua destilada/desionizada en un recipiente limpio, y mezclar bien.

Reconstituir un vial de Calibrador y de cada Control agregando 0.5 mL de agua destilada/desionizada y remover ligeramente hasta que toda la materia particulada se encuentre en la solución. NO SE DEBE VORTICIAR. Dejar en reposo durante 30 minutos a 18°-25°C removiéndolo intermitentemente con suavidad antes de la dilución.

Diluir el Calibrador reconstituido en proporción 1 en 10 (una parte de Calibrador a nueve partes de Diluyente vWF diluido). La actividad de dilución 1 en 10 es equivalente a dos veces el valor que figura en la etiqueta; es decir, si el valor dado en la etiqueta del Calibrador es de 0.85 IU/mL (85%), el valor del Calibrador en una dilución de 1 en 10 es 1.7 IU/mL (170%). A partir de la solución madre de 1 en 10, se prepara una serie de diluciones de doblaje utilizando Diluyente vWF diluido para obtener una gama decreciente de cinco u ocho valores de Calibrador. Se debe usar Diluyente vWF diluido como Calibrador Cero.

Diluir los Controles reconstituidos en proporción de 1 en 20 agregando 50 µL de Control a 950 µL Diluyente vWF diluido y mezclar suavemente.

Diluir muestras del paciente en proporción de 1 en 20, y de 1 en 100 si hacen falta más diluciones. Añadir una muestra de 50 µL a 950 µL de Diluyente vWF diluido (1:20) y mezclar suavemente; si es necesario, añadir 200 µL de la dilución 1 en 20 a 800 µL de Diluyente vWF diluido (1:100), y mezclar suavemente.

Entre cinco y diez minutos antes de proceder a su uso, diluir el Concentrado Substrato TMB de acuerdo con la siguiente tabla (una parte de Concentrado Substrato TMB por cuatro partes de Substrato Buffer), y mezclar bien. El Substrato TMB diluido se debe usar en los 30 minutos siguientes a su preparación, si se prepara en un recipiente que no sea de vidrio. Debe ser resguardado de la luz.

Número de tiras	Volumen de Concentrado Substrato TMB (5X)	Volumen de Substrato Buffer
6	1,5 mL	6,0 mL
12	2,5 mL	10,0 mL

Calcular el número de tiras microtítulo que se requiere para el ensayo vigente, y retener este número de tiras en el soporte de tiras microtítulo. Poner las tiras que sobren otra vez en el paquete de papel metalizado con el desecante, y conservar en la bolsa resellable de plástico a una temperatura de 2°-8°C hasta que se vayan a utilizar. El operario se debe asegurar de que todas las tiras quedan bien fijadas dentro del soporte de tiras microtítulo, con la orejeta de identificación del ensayo en el borde inferior, por debajo de la fila H.

### **PROTOCOLO DEL ENSAYO**

1. Pozos de referencia para identificación.
2. Pipeta de 100 µL de cada dilución de Calibrador reconstituido en duplicado, Controles 1 y 2 pre-diluidos reconstituidos, y muestras pre-diluidas del paciente (en proporción de 1 en 20) en los pozos correspondientes. El añadido se debe hacer en una sola operación continua y no debe llevar más de diez minutos para cada conjunto de Calibradores. Si hacen falta más diluciones de muestras del paciente, se recomienda una dilución en proporción de 1 en 100.

3. Incubar durante  $60 \pm 10$  minutos a  $18^{\circ}$ - $25^{\circ}$ C.
4. Decantar el contenido de las tiras mediante inversión rápida realizada encima de un lavabo idóneo para el desecho de materiales biológicos, teniendo en cuenta el peligro en potencia de infección de las muestras. Enjuagar bien las tiras invertidas con toallas de papel.
5. Lavar los pozos cinco veces con 200  $\mu$ L de Buffer vWF de Lavado. Decantar y enjuagar bien después de cada lavado.
6. Añadir 100  $\mu$ L de Conjugado vWF a cada pozo.
7. Incubar durante  $15 \pm 2$  minutos a  $18^{\circ}$ - $25^{\circ}$ C.
8. Repetir los pasos 4 y 5.
9. Añadir 100  $\mu$ L de Substrato TMB vWF diluido a cada pozo.
10. Incubar durante  $15 \pm 2$  minutos a  $18^{\circ}$ - $25^{\circ}$ C. No se debe decantar.
11. Añadir 100  $\mu$ L de Solución Stop a cada pozo, en el mismo orden y en la misma proporción que el Substrato. Dar golpecitos suaves en los pozos para mezclar.
12. Leer las tiras en los próximos 30 minutos a 450 nm.

## CÁLCULOS E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

**Se debe considerar cada ensayo por separado al hacer los cálculos e interpretar los resultados.**

Calcular el valor promedio de absorbencia de cada dilución de Calibrador y hacer en papel cuadrículado idóneo para el caso el trazado lineal de la actividad del Calibrador o la concentración. De modo alternativo, se puede usar un ordenador apropiado con programa generador de curvas. Las siguientes curvas estándar han sido evaluadas.

- Curva de 8 puntos: Siete diluciones de doblaje del Calibrador desde 1 en 10 a 1 en 640, más un estándar cero.
- Curva de 5 puntos: Cuatro diluciones del Calibrador de 1 en 10, 1 en 20, 1 en 40 y 1 en 160, más un estándar cero.

La actividad vWF para cada una de las diluciones se puede calcular a partir de la actividad vWF mencionada en la etiqueta del Calibrador, utilizando la siguiente fórmula.

$$\text{Actividad del Calibrador diluido} = \text{actividad vWF mencionada en la etiqueta} \times \frac{20}{\text{Factor de Dilución}}$$

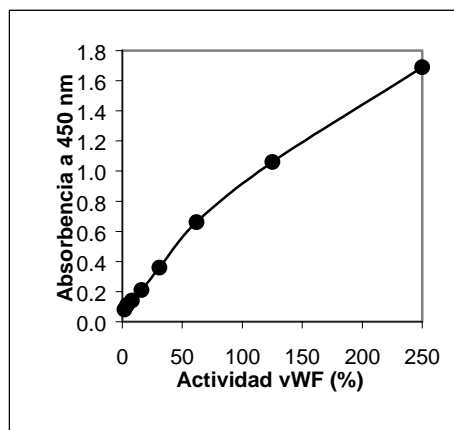
Según se ha comprobado, son idóneos los siguientes programas generadores de curvas:

Smoothed Spline; logístico de 4 parámetros; logístico de 5 parámetros; log/logit; lin/linfit.

La actividad en relación con los controles/las muestras se puede leer por interpolación a partir de la curva del Calibrador; para que sirva de referencia, más abajo se muestra el trazado de una curva, pero no se debe usar para interpretar los resultados.

La actividad en relación con los controles/las muestras se puede calcular a partir del resultado de la dilución del Control/muestra de 1 en 20. **NO SE DEBE CORREGIR PARA ESTE FACTOR DE DILUCIÓN.** Si la actividad en relación con las muestras en una dilución de 1 en 20 es mayor que en el Estándar más alto, los resultados se pueden calcular utilizando la dilución 1 en 100 si ésta ha sido incluida en la serie de ensayos. Los resultados calculados haciendo uso de la dilución 1 en 100 deben ser multiplicados por **5** para corregir con respecto a esta dilución suplementaria de la muestra. N.B. 1 IU/mL = actividad 100%.

**Curva estándar típica**



## CONTROL DE CALIDAD

Debe uno cerciorarse de que se realiza un adecuado mantenimiento y calibración del lector de placas, en conformidad con las instrucciones del fabricante, y que se emplea la longitud de onda correcta.

Los usuarios deben asegurarse de que se encuentran plenamente familiarizados con las instrucciones para realizar el ensayo, prestando especial atención a la sección de Avisos y Precauciones, y las Notas sobre Manejo y Procedimiento. Se recomienda que los usuarios sean capaces de demostrar que pueden conseguir especificaciones de ejecución de precisión y una gama de informes de resultados de tests comparables con los establecidos por el fabricante, antes de informar sobre los resultados de los tests realizados con pacientes. Se incluyen dos Controles, que representan actividad vWF normal (Control 1) y anormal (Control 2), para que sean utilizados en el monitoreo de la calidad del procedimiento seguido en los tests. El fabricante recomienda que los Controles reconstituidos pre-diluidos se realicen por duplicado en cada serie de tests de muestras. En la etiqueta se indica el promedio y gama aceptables en IU/mL y % de cada control (dilución a 1 en 20 cuando se lee desde la curva del calibrador).

Asumiendo que se cumple con las especificaciones de precisión descritas por el fabricante, si con cualquiera de los dos Controles no se obtienen las especificaciones de Control mencionadas en la etiqueta, se deberá considerar inválido el ensayo, y no se deberá hacer uso de los resultados para el paciente en cuestión. El operario podrá repetir el ensayo después de revisar el procedimiento seguido, o bien ponerse en contacto con el distribuidor/fabricante. Si se repite el ensayo, se deberá preparar una nueva dilución de cada Control y muestra. El Calibrador y los Controles reconstituidos son estables a 2°-8°C durante un máximo de 24 horas. Los laboratorios probablemente incluirán sus propios controles internos en cada serie de ensayos. El material de control utilizado debe ser almacenado a una temperatura de -20°C o inferior. La descongelación se hará de forma directa a 37°C, y se deben evitar repetir los ciclos de congelación/descongelación. No se deben congelar/descongelar las muestras más de una vez.

Los niveles de análisis identificados en enfermedades particulares son los establecidos por el fabricante con respecto a poblaciones específicas, y es posible que no sean los mismos que los que se mencionan en la literatura científica. Los niveles de incidencia, su relación con enfermedades específicas, las gamas de referencia y los valores límite deben ser calculados en relación con las poblaciones específicas a las que atienden los usuarios.

## VALORES ESPERADOS

**Gama de Referencia Asintomática:** Fueron sometidas a ensayos con el ELISA IMUBIND de actividad vWF 180 muestras citradas de plasma procedentes de donantes blancos sanos de 18-71 años aparentemente asintomáticos. La distribución de resultados se presenta en la siguiente tabla. 162/180 muestras (un 90%) dieron valores más altos que un 50%, sin que se observasen diferencias estadísticamente significativas relacionadas con la edad o el género. Véanse las Limitaciones de Uso, número 2, en relación con las fluctuaciones en el nivel vWF en la población normal. Se recomienda que los usuarios establezcan gamas de referencia para las poblaciones a las que atienden en sus laboratorios.

Grupo de Control	n	Gama de actividad en %				
		≤30	>30-50	>50-60	>60-180	>180
Sano asintomático	180	2 1,1%	16 8,9%	17 9,4%	133 74,0%	12 6,6%

**Muestras clínicas:** Se realizaron ensayos con 72 muestras de pacientes clasificados clínicamente como tipos 1, 2 y 3 pacientes vWF utilizando el ELISA IMUBIND de actividad vWF. Fueron excluidos del análisis los pacientes que se sabía que se encontraban bajo tratamiento. La distribución de los resultados se presenta en la siguiente tabla.

Muestras clínicas	n	Gama de actividad en %				
		≤10	>10-20	>20-30	>30-50	>50
Tipo 1	20	7 35%	5 25%	3 15%	2 10%	3 15%
Tipo 2	49	26 53%	14 29%	4 8%	4 8%	1 2%
Tipo 3	3	2 67%	1* 33%	- -	- -	- -

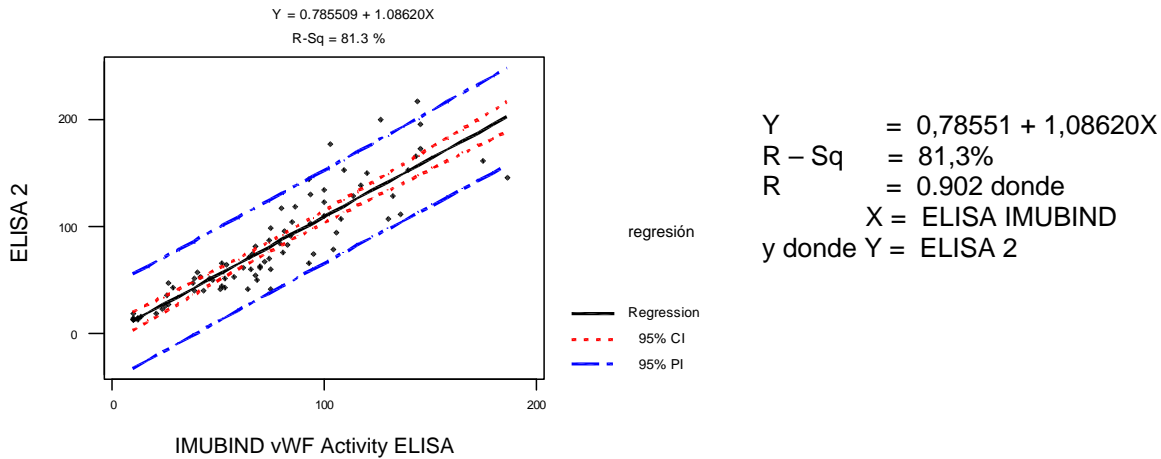
\* Actividad = 11%

## DATOS DE FUNCIONAMIENTO

### Estudio externo

En el departamento de hemostasia de un centro médico grande se llevó a cabo una evaluación del ELISA IMUBIND de actividad vWF frente a otro ELISA de actividad que existe en el mercado. Fueron analizadas ochenta muestras con un diagnóstico putativo de vWF. Fueron incluidas muestras procedentes de pacientes que se encontraban recibiendo tratamiento.

Correlación entre el ELISA IMUBIND de actividad y el ELISA 2:



### Características de las diluciones

Fueron sometidas a ensayos cinco diluciones de muestras de tres pacientes, usando dos lotes de "kits". En la siguiente tabla aparecen los valores promedios obtenidos y las recuperaciones de la dilución inicial corregidas en cuanto a dilución.

Muestra	Dilución	Valor promedio en %	Recuperación de dilución corregida en % (1/20)
1	1/20	83,3	100
	1/40	39,7	95
	1/80	20,9	100
	1/160	10,8	104
	1/320	6,1	117
2	1/20	40,8	100
	1/40	19,8	97
	1/80	10,3	101
	1/160	6,0	118
	1/320	2,8	110
3	1/20	24,4	100
	1/40	12,1	99
	1/80	7,0	115
	1/160	3,7	121

### Imprecisión

1. La **Imprecisión intra-ensayos** fue determinada por medio de tests de los dos Controles con replicación de cuatro de los 26 ensayos, usando tres operarios y tres lotes de "kits", durante un periodo de tres días.

Control	Valor promedio en %	Media cuadrática en %CV
1	80	8,0
2	16	11,1

2. La **Imprecisión inter-ensayos** fue determinada por medio de tests de los dos Controles con replicación de cuatro de las 26 ensayos, usando tres operarios y tres lotes de "kits", durante un periodo de tres días.

Controles	Valor medio %	SD	%CV
1	80	13,4	17,0
2	16	3,45	21,5

### **Límite inferior de detección**

El límite inferior de detección, calculado desde el estándar cero más 2 desviaciones estándar con realización por duplicado en 9 ensayos separados usando 3 lotes de "kits", fue de 1.6%.

### **Interferencias**

Hemoglobina hasta 400 mg/dL, bilirrubina hasta 0,2 mg/mL e intralípido hasta 15 mg/dL no interfieren con los resultados de actividad vWF. El factor reumatoide con un título de 1/640 no mostró interferencia.

### **LIMITACIONES EN CUANTO AL USO**

1. Aunque la presencia de niveles bajos de actividad vWF es indicativa de la enfermedad de von Willebrand, este dato debe ser considerado a la luz de otros resultados clínicos y de laboratorio, particularmente los tiempos de sangramiento. Existen informes sobre reducción en los niveles de vWF en casos de hipotiroidismo y de lupus eritematoso sistémico.
2. Los niveles de vWF presentan una amplia fluctuación en la población normal y en las personas afectadas por la enfermedad de von Willebrand. La causa de esta variación no es siempre aparente, pero es posible que contribuyan a estas fluctuaciones el ejercicio físico, el estrés, el embarazo, el uso de la píldora anticonceptiva y la edad. Estos factores deben ser tenidos en cuenta a la hora de evaluar el significado de los resultados de actividad von Willebrand.

### **REFERENCIAS**

1. Sporn LA, Chavin SI, et al. Biosynthesis of von Willebrand protein by human megakaryocytes. *J Clin Invest*, **76**, 1102-1106, 1985.
2. Wagner DD. Cell biology of von Willebrand Factor. *Ann Rev Cell Biol*, **6**, 217-246, 1990.
3. Nicols WC and Ginsburg D. Von Willebrand Disease. *Reviews in Molecular Medicine*, **76** No. 1, 1-20, 1997.
4. Belch JJF, Zoma AA, et al. Vascular damage and Factor VIII-related antigen in rheumatic diseases. *Rheumatol Int*, **7**, 107-111, 1987.
5. Blann AD, Naqui T, et al. Von Willebrand Factor and endothelial damage in essential hypertension. *Journal of Human Hypertension*, **7**, 107-111, 1993.
6. Tuddenham EGD. The varieties of von Willebrand's Disease. *Clin Lab Haemat*, **6**, 307-323, 1984.
7. Kahaleh MB. The role of vascular endothelium in the pathogenesis of connective tissue disease - endothelial injury, activation, participation and response. *Clin Exp Rheumatol*, **8**, 595-601, 1990.
8. Fleming TGM. Von Willebrand Factor- its function and its measurement in the laboratory. *B Journal of Biomedical Science*, **52**, 50-57, 1995.
9. Goodall AH, Jarvis J, et al. An immunoradiometric assay for human factor VIII/von Willebrand Factor (VIII:vWF) using a monoclonal antibody that defines a functional epitope. *Br J Haematol*, **59**, 565-577, 1985.
10. Murdock PJ, Woodhams BJ, et al. Von Willebrand Factor activity detected in a monoclonal antibody-based ELISA: an alternative to the ristocetin cofactor platelet agglutination assay for diagnostic use. *Thromb Haemost*, **78**, 1272-1277, 1997.

## SUMARIO DEL PROTOCOLO

1. Preparar diluciones de Calibrador reconstituido para obtener una gama de curvas de Calibrador.
2. Reconstituir y diluir los Controles 1 y 2, en proporción de 1 en 20 (1+19).
3. Diluir las muestras de pacientes en proporción de 1 en 20 (1+19), y de 1 en 100 (1+99) si es necesario.
4. Añadir 100  $\mu$ L de Calibradores preparados por duplicado, los Controles preparados y las muestras de pacientes pre-diluidas a los pozos referenciados de la tira microtítulo.
5. Incubar durante  $60 \pm 10$  minutos a  $18^{\circ}$ - $25^{\circ}$ C.
6. Lavar las tiras 5 veces.
7. Añadir 100  $\mu$ L de Conjugado vWF a cada pozo.
8. Incubar durante  $15 \pm 2$  minutos a  $18^{\circ}$ - $25^{\circ}$ C.
9. Lavar las tiras 5 veces.
10. Añadir 100  $\mu$ L de Substrato TMB vWF a cada pozo.
11. Incubar durante  $15 \pm 2$  minutos a  $18^{\circ}$ - $25^{\circ}$ C.
12. Añadir 100  $\mu$ L de Solución Stop vWF a cada pozo.
13. Leer la absorbencia a 450nm.

# DEUTSCH

## ANWENDUNGSGEBIETE

Der IMUBIND von-Willebrand-Faktor-Aktivitätstest ist ein quantitativer Enzyme-linked-Immunosorbent-Assay (ELISA) zur Ermittlung von Willebrand-Faktor-(vWF)-Aktivität in zitriertem Humanplasma. Dieser Test ist zur Beurteilung der vWF-Aktivität bei Patienten erforderlich, wenn das im Rahmen des Diagnoseprozesses, insbesondere als Hilfsmittel zur differenzierten Klassifizierung der von-Willebrand-Krankheit (VWD), nützlich erscheint. Die vWF-Aktivität stellt jedoch nur einen Parameter in einem sich aus mehreren Kriterien zusammensetzenden diagnostischen Prozess dar.

## EINLEITUNG

Der von-Willebrand-Faktor (vWF) ist ein komplexes adhäsives multimeres Glykoprotein, das von Endothelzellen und Megakaryozyten synthetisiert wird. Seine wichtigsten, scheinbar voneinander unabhängigen Funktionen umfassen die Rolle als Träger/Stabilisator für das prokoagulante Protein FVIII:C, das im Serum als nichtkovalent-verbundener Komplex zirkuliert sowie als adhäsives Protein bei Hämostase. vWF bindet Kollagen sowie möglicherweise andere Endothelstrukturen; es wirkt als Zwischenträger bei der Subendothel-Adhäsion von Thrombozyten (durch Bindung des Oberflächenrezeptor-Glykoproteins Ib); es spielt evtl. auch eine Rolle bei der Wechselwirkung zwischen Thrombozyten durch Bindung des Glykoproteins IIb/IIIa<sup>1,2</sup>.



Diese angeborene Blutungsstörung wurde 1926 zum ersten Mal von von Willebrand beschrieben. In ihrer mildesten Form ist die von-Willebrand-Krankheit die häufigste Blutungsstörung; offiziellen Berichten nach kommt sie in 1 von 100 Fällen vor. Es ist eine heterogene Krankheit, die durch vWF-Defekte oder durch reduzierte vWF-Werte verursacht wird. Subklassifizierung der Krankheit stützt sich auf klinische Beobachtung, Patientengeschichte und Laboranalyse wie z. B. Blutungszeiten, vWF-Antikörper und vWF-Aktivität. Die Messung von Antikörper und Aktivität hilft bei der differenzierten Diagnose der beiden vorherrschenden Klassen dieser Krankheit, Typ 1 und Typ 2. Die Klassifizierung der Krankheit spielt eine wichtige Rolle, da die klinische Behandlung je nach Typ<sup>3</sup> variieren kann.


Erhöhte Werte von vWF-Antikörper/Aktivität sind Anzeichen für Endothelschäden bei Gefäßkrankheiten<sup>4</sup>; vorläufige Studien legen nahe, dass Endothelschäden bei Gefäßkomplikationen in Verbindung mit hohem Blutdruck<sup>5</sup> eine bedeutende Rolle spielen könnten. Der nach Leibesübungen, Adrenalin, DDAVP-Infusion (1-Deamin-(8-d-Arginin)-Vasopressin) und bei Schwangerschaft<sup>6</sup> beobachtete kurzfristige vWF-Anstieg kann jedoch auf Aktivierung/Stimulierung von Endothelzellen<sup>7</sup> statt auf Epithelschäden zurückzuführen sein. Verminderte vWF-Werte lassen sich bei Hypothyreose und generalisiertem Lupus erythematoses feststellen. Erworbene Formen der von-Willebrand-Krankheit sind in Verbindung mit Autoimmunkrankheit, Waldenström-Krankheit, gutartigen monoklonalen Gammopathien, myeloproliferativen Adrenalkarzinomen, rheumatischer Vaskulitis und Diabetes<sup>8</sup> beschrieben worden. Angesichts der Diversität klinischer Beschwerden in Verbindung mit vWF-Anomalien wäre es vielleicht angemessen, die Bezeichnung Willebrand-Syndrom zu verwenden.

## TESTPRINZIP

Die Vertiefungen in den Mikrotiterstreifen werden mit einem Präparat aus hochgradig gereinigtem murinem monoklonalem anti-vWF IgG-Antikörper gemäß dokumentierten<sup>9,10</sup> Merkmalen beschichtet, der ein funktionales vWF-Epitop erkennt. Während der ersten Inkubation binden sich in verdünntem Plasma vorliegende spezifische Antikörper an die mit Antigen beschichtete Oberfläche. Die Vertiefungen werden dann zur Entfernung ungebundener Komponenten gewaschen. Bei der zweiten Inkubation heftet sich das Konjugat, ein gegen vWF gerichteter, mit Meerrettich-Peroxidase markierter monoklonaler Antikörper, an alle Oberflächen-gebundenen Antikörper an. Nach weiterem Waschen werden spezifisch gebundene Antikörper durch Inkubation mit dem Substrat nachgewiesen. Die Reaktion wird durch Zugabe von Stopplösung unterbrochen und führt zu einem farbigen Endprodukt. Die Menge des gebundenen Konjugates wird in Extinktionseinheiten gemessen. Die von-Willebrand-Faktor-Aktivität kann durch Interpolation einer auf Standardlösungsverdünnungen bezogenen Dosis-Wirkungskurve bestimmt werden. Die Standardlösung wird mit dem 5. Internationalen Standard für Faktor VIII und mit dem von NIBSC, Blanche Lane, South Mimms, Potters Bar, Hertfordshire EN6 3QG, Vereinigtes Königreich, gelieferten von-Willebrand-Faktor in Plasma, Code 02/150, verglichen.

## TESTKIT-REAGENZIE

vWF-Konjugat	1 x 15 mL	Mit Meerrettich-Peroxidase markierter muriner monoklonaler Antikörper gegen Human-vWF, Stabilisierungspuffer. Gebrauchsfertig.
TMB-Substrat-Konzentrat (5x)	1 x 5,5 mL	3,3', 5,5', Tetramethylbenzidin (TMB), in einer Lösung von Dimethylsulphoxid (DMSO) und Methanol. Vor Gebrauch verdünnen. Zur Beachtung: GIFTIG UND REIZEND.  

Substratpuffer	1 x 25 mL	Azetat-/Zitratpuffer, 0,025% (v/v) Wasserstoffperoxid, pH 6,0. Gebrauchsfertig.
Stopplösung	1 x 15 mL	2N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> . Gebrauchsfertig. Zur Beachtung: REIZEND. 
Waschpufferkonzentrat (16x)	1 x 25 mL	Boratpuffer, 0,32% (w/v) Bronopol. Vor Gebrauch verdünnen.
Anti-vWF-beschichtete Vertiefungen und Streifenrahmen	12 x 8 Streifen mit Mikrotitervertiefungen	Beschichtet mit murinem monoklonalem anti-vWF-Antikörper, in einer wiederverschließbaren Folienpackung mit Trockenmittel.
vWF-Diluens-Konzentrat (5x)	1 x 25 mL	Phosphatpuffer, Rinderalbumin, 0,1% (w/v) Bronopol. Vor Gebrauch verdünnen.
vWF Standardlösung	2 x 0,5 mL	vWF Antikörper in Humanplasma, gefriergetrocknet. Vor dem Gebrauch rekonstituieren und verdünnen*. Eine zugewiesene Aktivität ist in IU/mL und % auf dem Etikett angegeben.
vWF-Kontrolle 1	2 x 0,5 mL	vWF Antikörper in Humanplasma, gefriergetrocknet. Vor dem Gebrauch rekonstituieren und verdünnen*. Der annehmbare Mittelwert sowie der Bereich in IU/mL und % sind auf dem Etikett angegeben; sie stellen einen 'normalen' Aktivitätsbereich dar.
vWF-Kontrolle 2	2 x 0,5 mL	vWF Antikörper in Humanplasma, gefriergetrocknet. Vor dem Gebrauch rekonstituieren und verdünnen*. Der annehmbare Mittelwert und Bereich in IU/mL und % sind auf dem Etikett angegeben; sie stellen einen 'normalen' Aktivitätsbereich dar.
Packungsbeilage		

\* Zur Beachtung: Die auf den Etiketten der Standardlösung und Kontrollen abgedruckten Werte stellen die Aktivität *nach* Rekonstitution in 0,5 mL destilliertem/deionisiertem Wasser dar sowie weiterer Verdünnung von 1:20 gemäß Beschreibung unter 'Vorbereitung zur Testdurchführung'. Beachten Sie auch, dass 1 IU/mL = 100% Aktivität entspricht.

## LAGERUNG DER REAGENZIEN

### Handhabungs- und Verfahrenshinweise

1. Die Testkit-Bestandteile bei 2°-8°C lagern und bis zu dem auf den Etiketten angegebenen Verfalldatum verwenden. Reagenzien nicht über das Verfalldatum hinaus verwenden.
2. Reagenzien aus verschiedenen Testkit-Chargen dürfen nicht miteinander gemischt werden.
3. TMB-Substrat-Konzentrat, Waschpuffer-Konzentrat, Diluens-Konzentrat, Standardlösung sowie Kontrollen 1 und 2 müssen vor Gebrauch verdünnt werden. Alle anderen Reagenzien sind gebrauchsfertig.
4. Verdünnter Waschpuffer und verdünntes Diluens sind bei 2°-8°C bis zu 6 Monaten beständig, wenn eine mikrobielle Kontamination vermieden wird.
5. Das TMB-Substrat fünf bis zehn Minuten vor Gebrauch verdünnen und VOR LICHT SCHÜTZEN. Kann im verdünnten Zustand bis zu sechs Stunden lang in einem reinen Glasbehälter gelagert werden; falls es in einem Behälter aus einem anderen Material gelagert wird, muss es innerhalb von 30 Minuten nach Herstellung verwendet werden.
6. Rekonstituierte und verdünnte Standardlösung und Kontrollen sind bei 2°-8°C bis zu 24 h lang beständig.
7. Überzählige Mikrotiterstreifen in die Folienpackung zurückgeben und in dem wieder versiegelbaren Polyethylenbeutel mit dem Trockenmittel bis zum Gebrauch bei 2°-8°C lagern.
8. Jegliche Kontamination der Reagenzien vermeiden. Für jedes Reagenz oder Probe eine neue Einmalpipettenspitze verwenden.
9. Handhabungs- oder Lagerungsvorschriften für Testkit-Reagenzien oder Plasmaproben dürfen nicht abgeändert werden.

### Anzeichen einer Wertminderung

Eine Blaufärbung oder Niederschlag sind Hinweise darauf, dass das TMB-Substrat kontaminiert ist; es ist zu entsorgen und eine frische Verdünnung herzustellen.

### Probensammlung und Aufbewahrung

Der Test ist für Citratplasmaproben bestimmt. Neun Blutproben in 0,109M (3,2%) Trisodiumcitrat-Antikoagulans (ein Volumen) sammeln. Bei 2500 x g 10 Minuten lang zentrifugieren.

Plasma kann bei 2°-8°C oder -20° C und niedrigeren Temperaturen vier Wochen lang gelagert werden. Gefrorenes Plasma muss DIREKT vor dem Testen mind. 15 Minuten lang bei 37°C aufgetaut werden. Aufgetaute Proben vor dem Test gründlich mischen, und erneutes Einfrieren/Auftauen vermieden. Proben in einer Verdünnung von 1:20 verdünntem Diluens sind innerhalb von 24 h zu testen.

## WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

### Nur zur Anwendung als In-vitro-Diagnostikum.

#### Vorsichtsmaßnahmen

1. Die Anleitungen in dieser Broschüre, besonders die Handhabungs- und Lagerungsvorschriften, strikt befolgen.
2. Standardlösung und Kontrollen enthalten menschliches Plasma und wurden gemäß den geltenden FDA-Richtlinien auf HBsAg, HIV-1 RNA oder HIV-1 Ag, anti-HIV-1/HIV-2 und anti-HCV oder HCV RNA getestet und als nicht reaktiv/negativ befunden. Da keine bekannte Testmethode die absolute Gewähr bieten kann, dass Produkte aus menschlichem Blut pathogenfrei sind, müssen alle Standardlösungen und Kontrollen als potentiell infektiös angesehen und unter Beachtung der gleichen Sicherheitsrichtlinien wie andere potentiell gefährliche biologische Materialien behandelt werden. Das CDC/NIH-Gesundheitshandbuch "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", 4. Auflage, Mai 1999, beschreibt wie diese Materialien unter Beachtung der Good Laboratory Practice (GLP) zu handhaben sind. Dies trifft in den USA zu.
3. Nicht mit dem Mund pipettieren.
4. In Bereichen, in denen Testkits und Proben gehandhabt werden, nicht rauchen, essen, trinken und keine Kosmetika anwenden.
5. Alle erkrankten Hautareale, Schnitte, Abschürfungen und andere Hautläsionen ausreichend schützen.
6. Das TMB-Substrat enthält DMSO und Methanol. Es ist krebserregend und flammbar. Vermeiden Sie jeglichen Kontakt mit Haut, Augen und Schleimhäuten und halten Sie es von Hitze und offenen Flammen fern.
7. Die Stopplösung enthält 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und ist ein Reizstoff. Den Kontakt mit Haut, Augen und Schleimhäuten vermeiden.
8. Sicherheitsdatenblätter für alle in diesem Testkit enthaltenen gefährlichen Bestandteile sind auf Anfrage von American Diagnostica erhältlich.



#### SUBSTRATPUFFER

Giftig



#### STOPPLÖSUNG

Reizend

R20/21/22: Gesundheitsschädlich beim Einatmen, Verschlucken und Berührung mit der Haut.

R36/38: Reizt die Augen und die Haut.

R39/23/24/25: Giftig: Gefahr irreversiblen Schadens durch Einatmen, Berührung mit der Haut und durch Verschlucken.

S23: Dampf nicht einatmen.

S26: Bei Berührung mit den Augen gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren.

S28: Bei Berührung mit der Haut sofort abwaschen mit viel Wasser.

S29/35: Nicht in die Kanalisation gelangen lassen; Abfälle und Behälter müssen in gesicherter Weise beseitigt werden.

S36/37/39: Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung, Schutzhandschuhe und Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen.

S46: Bei Verschlucken sofort ärztlichen Rat einholen und Verpackung oder Etikett vorzeigen.

S51: Nur in gut gelüfteten Bereichen verwenden.

S63: Bei Unfall durch Einatmen: Verunfallten an die frisch Luft bringen und ruhigstellen.

R36/38: Reizt die Augen und die Haut.

S23: Dampf nicht einatmen.

S26: Bei Berührung mit den Augen gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren.

S29/35: Nicht in die Kanalisation gelangen lassen; Abfälle und Behälter müssen in gesicherter Weise beseitigt werden.

S36/37/39: Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung, Schutzhandschuhe und Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen.

## VORBEREITUNG

### **Erforderliche, aber nicht mitgelieferte Materialien/Geräte**

1. Lesegerät mit 450 nm Filter für eine Platte/einen Streifen mit 96 Vertiefungen.
2. Präzisionspipetten zum Pipettieren von 50 µL, 100 µL, 500 µL und 1 mL. Automatische Pipette zum Pipettieren von 100 µL. Automatische Pipette zum Pipettieren von 200 µL zum manuellen Waschen, wahlweise mit einem automatischen Plattenwäscher.
3. Glas/Kunststoffmesszylinder: 1×100 mL, 1×500 mL.
4. 1 mL Behälter für Standardlösungs-/Kontrollen-/Probenverdünnungen.
5. Destilliertes/deionisiertes Wasser.
6. Papiertücher.
7. Stoppuhr für 15 und 60 Minuten Intervalle.

### **Vorbereitung zur Testdurchführung**

Alle Testkit-Bestandteile, einschließlich Mikrotiterstreifen, vor Gebrauch mind. 30-60 Minuten bis auf 18°-25°C anwärmen. Die flüssigen Reagenzien durch vorsichtiges Schwenken mischen.

Das vWF-Waschpufferkonzentrat durch Hinzufügen eines Fläschchens auf 375 mL destilliertes/deionisiertes Wasser in einem reinen Behälter verdünnen und gründlich mischen.

Das vWF-Diluenskonzentrat durch Hinzufügen eines Fläschchens zu 100 mL destilliertem/deionisiertem Wasser in einem reinen Behälter verdünnen und gründlich mischen.

Ein Fläschchen Standardlösung und jede Kontrolle durch Hinzufügen von 0,5 mL destilliertem/deionisiertem Wasser rekonstituieren und behutsam verwirbeln, bis alle Partikel aufgelöst sind. KEINEN STARKEN WIRBEL ERZEUGEN. Vor dem Verdünnen bei gelegentlichem Wirbeln 30 Minuten bei 18°-25°C stehen lassen.

Die rekonstituierte Standardlösung 1:10 (ein Teil Standardlösung zu neun Teilen verdünntem vWF-Diluens) verdünnen. Die Verdünnungsaktivität 1:10 entspricht einem Zweifachen des auf dem Etikett angegebenen Wertes; d.h. beträgt sich der auf dem Standardlösungsetikett angegebene Wert 0,85 IU/mL (85%), beläuft sich der Wert für die Standardlösung bei einer Verdünnung von 1:10 auf 1,7 IU/mL (170%). Anhand des 1:10-Bestands stellen Sie unter Verwendung von vWF-Diluens eine Reihe von Verdopplungslösungen her, so dass sich ein Bereich von entweder fünf oder acht progressiv abnehmenden Standardlösungswerten ergibt. Verwenden Sie das verdünnte vWF-Diluens als Nullstandard.

Die rekonstituierten Kontrollen 1:20 verdünnen, indem Sie 50 µL der Kontrolle dem 950 µL verdünnten vWF-Diluens hinzufügen; behutsam vermischen.

Die Patientenproben 1:20 bzw. 1:100 verdünnen, falls weitere Verdünnung erforderlich ist. Die 50 µL Probe dem auf 950 µL verdünnten vWF Diluens (1:20) hinzufügen und behutsam vermischen; gegebenenfalls 200 µL von der 1:20 Verdünnung dem auf 800 µL verdünnten vWF Diluens (1:100) hinzufügen und behutsam vermischen.

Fünf bis zehn Minuten vor Gebrauch verdünnen Sie das TMB-Substrat-Konzentrat gemäß folgender Tabelle (ein Teil TMB-Substrat-Konzentrat zu vier Teilen Substratpuffer); gut vermischen. Das verdünnte TMB-Substrat muss innerhalb von 30 Minuten nach Herstellung verwendet werden, wenn es in einem nicht aus Glas bestehenden Behälter hergestellt wurde. Vor Licht schützen.

Anzahl Streifen	TMB-Substrat-Konzentrat-(5x) Volumen	Volumen des Substratpuffers
6	1,5 mL	6,0 mL
12	2,5 mL	10,0 mL

Die Anzahl der für den jeweiligen Test erforderlichen Mikrotiterstreifen berechnen und diese in dem Mikrotiterstreifenrahmen vorstecken. Übrige Streifen wieder in die Folienpackung mit dem Trockenmittel zurückgeben und in einem wieder verschließbaren Plastikbeutel bis zum nächsten Gebrauch bei 2°-8°C lagern. Darauf achten, dass alle Streifen in dem Mikrotiterstreifenrahmen sicher eingesteckt sind, wobei sich der Testidentifikationsstreifen entlang der unteren Kante unter Reihe H befindet.

## TESTPROTOKOLL

1. Referenzvertiefungen zum Nachweis.
2. Je 100 µL der rekonstituierten Standardlösung (Doppelbestimmung), vorverdünnte rekonstituierte Kontrollen 1 und 2 und vorverdünnte Patientenproben (1:20) in die entsprechenden Vertiefungen pipettieren. Das Hinzufügen muss in einem fortlaufenden Arbeitsgang erfolgen und darf bei einem Satz von Standardlösungen nicht länger als 10 Minuten dauern. Sind weitere Verdünnungen von Patientenproben erforderlich, empfiehlt sich eine Verdünnung von 1:100.
3. 60 ± 10 Minuten bei 18°-25°C inkubieren.

4. Den Streifeninhalt durch schnelles Umkehren über einem für die Entsorgung biologischer Materialien geeigneten Spülbecken dekantieren, wobei die potentielle Infektionsgefahr der Proben zu berücksichtigen ist. Die umgekehrten Streifen gründlich mit Papiertüchern abtupfen.
5. Die Vertiefungen fünfmal mit 200 µL verdünntem vWF-Waschpuffer waschen. Dekantieren und nach jedem Waschschritt abtupfen.
6. In jede Vertiefung 100 µL vWF-Konjugat geben.
7. 15 ± 2 Minuten bei 18°-25°C inkubieren.
8. Schritte 4 und 5 wiederholen.
9. In jede Vertiefung 100 µL vWF-TMB-Substrat geben.
10. 15 ± 2 Minuten bei 18°-25°C inkubieren. Nicht dekantieren.
11. In der gleichen Reihenfolge und Rate wie für das Substrat in jede Vertiefung 100 µL Stopplösung geben. Die Vertiefungen durch vorsichtiges Beklopfen mischen.
12. Die Extinktion innerhalb von 30 Minuten bei 450nm ablesen.

## BERECHNUNG UND INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

**Bei der Berechnung und Interpretation der Ergebnisse jeden Test getrennt auswerten.**

Berechnen Sie den durchschnittlichen Extinktionswert jeder Standardlösung und zeichnen Sie eine Kurve für eine Standardlösungsaktivität oder -konzentration auf geeignetem Diagrammpapier auf. Anderenfalls können ein geeigneter Computer und ein Kurvenzeichnungsprogramm verwendet werden. Es sind folgende Standardkurven untersucht worden:

8-Punkt-Kurve: Sieben Verdopplungslösungen der Standardlösung von 1:10 bis 1:640, plus einem Nullstandard.

5-Punkt-Kurve: Vier Verdünnungen der Standardlösung von 1:10, 1:20, 1:40 und 1:160, plus einem Nullstandard.

Die vWF Aktivität für die einzelnen Verdünnungen lässt sich anhand der auf dem Standardlösungsetikett angegebenen vWF Aktivität unter Verwendung folgender Formel berechnen:

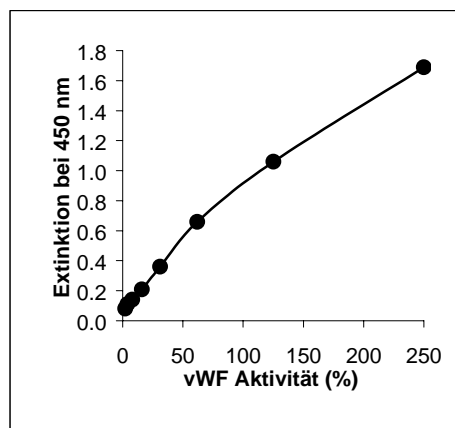
$$\text{Aktivität der verdünnten Standardlösung} = \text{auf Etikett angegebene vWF Aktivität} \times \frac{20}{\text{Verdünnungs-faktor}}$$

Die folgenden Kurvenzeichnungsprogramme haben sich als nützlich erwiesen: Smoothed Spline; 4-parameter logistic; 5-parameter logistic; log/logit; lin/lin.

Die Kontroll-/Probenaktivitäten lassen sich durch Interpolation der Standardkurve ablesen; eine typische Kurve wird für Referenzzwecke nachstehend gezeigt, sie darf jedoch nicht zur Interpretation der Ergebnisse eingesetzt werden.

Die Aktivität für Kontrollen/Proben lässt sich anhand des 1:20 Kontroll-/Probenverdünnungsergebnisses berechnen. **DIESER VERDÜNNUNGSFAKTOR DARF NICHT KOMPENSIERT WERDEN.** Wenn die Aktivität bei den Proben in einer Verdünnung von 1:20 größer ist als der höchste Standardwert, können die Ergebnisse anhand der 1:100 Verdünnung berechnet werden, falls diese einen Bestandteil des Testdurchlaufs darstellt. Ergebnisse, die anhand der 1:100 Verdünnung ermittelt wurden, müssen mit **5** multipliziert werden, um diese weitere Probenverdünnung zu kompensieren. Zur Beachtung: 1 IU/mL = 100% Aktivität.

**Typische Standardkurve**



## QUALITÄTSKONTROLLE

Darauf achten, dass eine angemessene Instandhaltung und Kalibrierung des Plattenlesegerätes nach Anweisungen des Herstellers durchgeführt und die richtige Wellenlänge angewendet wird.

Die Laboratorien sollten sicherstellen, dass das Personal mit der Testanleitung, besonders aber den Abschnitten zu den Warnungs- und Vorsichtsmaßnahmen sowie den Handhabungs- und Verfahrenshinweisen vollkommen vertraut ist. Das Personal muss darüber hinaus den Nachweis erbringen, dass es vor der Herausgabe der Patientenergebnisse Leistungsspezifikationen in Bezug auf die Präzision und den zu berichtenden Bereich der Testergebnisse erheben kann, die mit den vom Hersteller vorgegebenen vergleichbar sind. Es werden zwei Kontrollen zur Überwachung der Qualität des Testverfahrens mitgeliefert, die die normale (Kontrolle 1) und anomale (Kontrolle 2) vWF-Aktivität darstellen. Der Hersteller empfiehlt, dass die vorverdünnten rekonstituierten Kontrollen in allen Probenreihen als Doppelbestimmung mitlaufen. Der annehmbare Mittelwert und Bereich in IU/mL und % sind für jede Kontrolle auf dem Etikett angegeben (bei 1:20 Verdünnung, wenn sie von der Standardlösungskurve abgelesen werden).

Vorausgesetzt, dass die vom Hersteller beschriebenen Präzisionsspezifikationen erfüllt werden, ist der Test ungültig und die Patientenergebnisse dürfen nicht herausgegeben werden, wenn eine Kontrolle nicht den auf dem Etikett angegebenen Kontrollverhältnis-Spezifikationen entspricht. Der Test kann nach Überprüfung des Verfahrens oder Kontaktaufnahme mit dem Händler/Hersteller wiederholt werden. Bei Wiederholung des Tests eine frische Verdünnung von jeder Kontrolle und der Probe herstellen. Rekonstituierte und verdünnte Standardlösung und Kontrollen sind bei 2°-8°C bis zu 24 h lang beständig. Einige Laboratorien möchten bei jedem Testdurchlauf gegebenenfalls auch ihre laboreigenen Kontrollen mitlaufen lassen. Dieses Kontrollmaterial muss bei oder unter -20°C aufbewahrt werden. Unmittelbar vor dem Gebrauch bei 37°C auftauen lassen und wiederholte Einfrier-/Auftauzyklen vermeiden. Proben dürfen nicht mehr als einmal eingefroren/aufgetaut werden.

Bei den Konzentrationen von Analyten, die bei bestimmten Erkrankungen nachgewiesen werden, handelt es sich um diejenigen, die von dem Hersteller für spezifische Populationen vorgegeben werden; sie stimmen nicht unbedingt mit den in der Literatur angegeben überein. Inzidenz-Grade, ihr Zusammenhang mit spezifischen Erkrankungen, Referenzbereiche und geeignete Cut-off-Punkte sind von dem jeweiligen Laboratorium für die von ihm betreute spezifische Population zu berechnen.

## ERWARTETE WERTE

**Asymptomatischer Referenzbereich:** 180 Zitratplasmaabgaben von scheinbar gesunden asymptomatischen Spendern kaukasischer Rassen im Altersbereich von 18 bis 71 Jahren wurden anhand des IMUBIND vWF-Aktivitäts-ELISA getestet. Die Verteilung der Ergebnisse ist der nachstehenden Tabelle zu entnehmen. 162/180 (90%) Proben ergaben Werte von mehr als 50%, wobei keine alters- oder geschlechtsspezifisch signifikanten statistischen Unterschiede zu beobachten waren. Siehe Anwendungsgrenzen Nummer 2 hinsichtlich vWF-Wert-Schwankungen bei der Normalbevölkerung. Es empfiehlt sich, dass Benutzer Referenzbereiche für die von ihren Laboratorien versorgten Populationen festsetzen.

Kontrollgruppe	n	% Aktivitätsbereich				
		≤30	>30-50	>50-60	>60-180	>180
Asymptomatisch gesund	180	2 1,1%	16 8,9%	17 9,4%	133 74,0%	12 6,6%

**Klinische Proben:** 72 Proben von klinisch definierten vWF-Patienten vom Typ 1, 2 und 3 wurden anhand des IMUBIND vWF-Aktivitäts-ELISA getestet. In Behandlung befindliche Patienten wurden von der Analyse ausgeschlossen. Die Verteilung der Ergebnisse ist der nachstehenden Tabelle zu entnehmen.

Klinische Proben	n	% Aktivitätsbereich				
		≤10	>10-20	>20-30	>30-50	>50
Typ 1	20	7 35%	5 25%	3 15%	2 10%	3 15%
Typ 2	49	26 53%	14 29%	4 8%	4 8%	1 2%
Typ 3	3	2 67%	1* 33%	- -	- -	- -

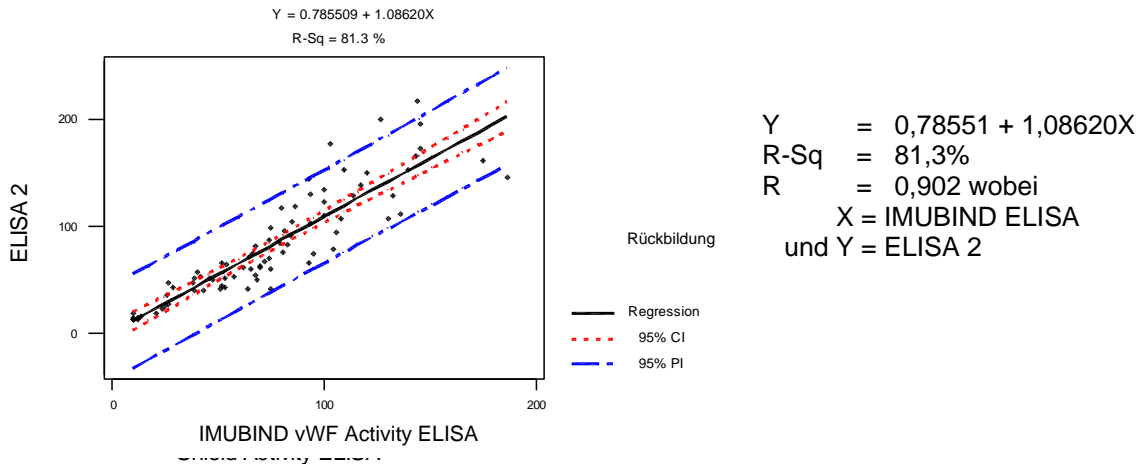
\* Aktivität = 11%

## LEISTUNGSMERKMALE

### Externe Studie

Eine Untersuchung des IMUBIND vWF-Aktivitäts-ELISA unter Verwendung eines anderen handelsüblichen Aktivitäts-ELISA wurde in der Hämostase-Abteilung einer Großpraxis ausgeführt. Es wurden achtzig Proben mit einer mutmaßlichen vWF-Diagnose analysiert. Unter den Proben befanden sich auch Exemplare von unter Behandlung stehenden Patienten.

Korrelation zwischen IMUBIND Aktivitäts-ELISA und ELISA 2:



### Verdünnungsmerkmale

Fünf Verdünnungen von drei Patientenproben wurden unter Verwendung von zwei Kitchargen getestet. Die folgende Tabelle zeigt die erhaltenen Mittelwerte und die um die Verdünnung korrigierte Wiederfindung der ursprünglichen Verdünnung.

Probe	Verdünnung	Mittelwert %	Für die Verdünnung bereinigte Wiederfindung (1/20)
1	1/20	83,3	100
	1/40	39,7	95
	1/80	20,9	100
	1/160	10,8	104
	1/320	6,1	117
2	1/20	40,8	100
	1/40	19,8	97
	1/80	10,3	101
	1/160	6,0	118
	1/320	2,8	110
3	1/20	24,4	100
	1/40	12,1	99
	1/80	7,0	115
	1/160	3,7	121

### Impräzision

- Die Impräzision der Serie (**Intraassay-Impräzision**) wurde durch Testen von zwei Kontrollen mit vier Doppelbestimmungen in 26 Assays durch drei Laboranten anhand von drei Kitchargen in einem Zeitraum von drei Tagen bestimmt.

Kontrolle	Mittelwert %	Quadratisches Mittel %VK
1	80	8,0
2	16	11,1

2. Die Impräzision der Serie (**Interassay-Impräzision**) wurde durch Testen von zwei Kontrollen mit vier Doppelbestimmungen in 26 Assays durch drei Laboranten anhand von drei Kitchargen über einen Zeitraum von drei Tagen bestimmt.

Kontrollen	Mittelwert %	SD	VK (%)
1	80	13,4	17,0
2	16	3,45	21,5

### **Untere Nachweisgrenze**

Die untere Nachweisgrenze - anhand des Nullstandards plus zwei Standardabweichungen berechnet, welche in Doppelbestimmung in 9 separaten Tests unter Verwendung von drei Kitchargen durchgeführt wurden - lag bei 1,6%.

### **Störfaktoren**

Hämoglobin bis zu 400 mg/dL, Bilirubin bis zu 0,2 mg/mL und Intralipid bis zu 15 mg/dL haben keine Auswirkungen auf vWF-Aktivitätsergebnisse. Der Rheumafaktor zeigte bei einem Titer von 1/640 keine Auswirkungen.

### **ANWENDUNGSGRENZEN**

1. Obwohl das Vorliegen niedriger vWF-Aktivitätswerte als Anzeichen auf von-Willebrand-Krankheit zu sehen ist, muss diese Information stets unter Berücksichtigung von anderen klinischen und Laborbefunden, insbesondere Blutungszeiten, betrachtet werden. Verminderte vWF-Werte sind bei Hypothyreose und generalisiertem Lupus erythematodes festgestellt worden.
2. vWF-Werte schwanken sowohl in der Normalbevölkerung als auch bei an von-Willebrand-Krankheit leidenden Populationen stark. Die Ursache der Schwankung liegt nicht immer auf der Hand; Leibesübungen, Stress, Schwangerschaft, Einnahme der Antibabypille und Alter können allerdings zu diesen Schwankungen beitragen. Diese Faktoren sind bei der Beurteilung der Signifikanz von Willebrand-Aktivitäts-Resultaten in Betracht zu ziehen.

### **LITERATUR**

1. Sporn LA, Chavin SI, et al. Biosynthesis of von Willebrand protein by human megakaryocytes. *J Clin Invest*, **76**, 1102-1106, 1985.
2. Wagner DD. Cell biology of von Willebrand Factor. *Ann Rev Cell Biol*, **6**, 217-246, 1990.
3. Nicols WC and Ginsburg D. Von Willebrand Disease. *Reviews in Molecular Medicine*, **76** No. 1, 1-20, 1997.
4. Belch JJF, Zoma AA, et al. Vascular damage and Factor VIII-related antigen in rheumatic diseases. *Rheumatol Int*, **7**, 107-111, 1987.
5. Blann AD, Naqui T, et al. Von Willebrand Factor and endothelial damage in essential hypertension. *Journal of Human Hypertension*, **7**, 107-111, 1993.
6. Tuddenham EGD. The varieties of von Willebrand's Disease. *Clin Lab Haemat*, **6**, 307-323, 1984.
7. Kahaleh MB. The role of vascular endothelium in the pathogenesis of connective tissue disease - endothelial injury, activation, participation and response. *Clin Exp Rheumatol*, **8**, 595-601, 1990.
8. Fleming TGM. Von Willebrand Factor - its function and its measurement in the laboratory. *B Journal of Biomedical Science*, **52**, 50-57, 1995.
9. Goodall AH, Jarvis J, et al. An immunoradiometric assay for human factor VIII/von Willebrand Factor (VIII:vWF) using a monoclonal antibody that defines a functional epitope. *Br J Haematol*, **59**, 565-577, 1985.
10. Murdock PJ, Woodhams BJ, et al. Von Willebrand Factor activity detected in a monoclonal antibody-based ELISA: an alternative to the ristocetin cofactor platelet agglutination assay for diagnostic use. *Thromb Haemost*, **78**, 1272-1277, 1997.

## ZUSAMMENFASSUNG DES PROTOKOLLS

1. Verdünnungen von rekonstituierter Standardlösung herstellen, um einen Standardlösungskurvenbereich zu vermitteln.
2. Kontrollen 1 und 2 rekonstituieren und im Verhältnis 1:20 (1+19) verdünnen.
3. Die Patientenproben im Verhältnis von 1:20 (1+19) bzw. gegebenenfalls 1:100 (1+99) verdünnen.
4. 100 µL hergerichteter Standardlösung (in Doppelbestimmung), hergerichtete Kontrollen und vorverdünnte Patientenproben in die entsprechenden gekennzeichneten Vertiefungen des Mikrotiterstreifens geben.
5.  $60 \pm 10$  Minuten bei  $18^{\circ}$ - $25^{\circ}$ C inkubieren.
6. Die Streifen 5-mal waschen.
7. In jede Vertiefung 100 µL vWF-Konjugat geben.
8.  $15 \pm 2$  Minuten bei  $18^{\circ}$ - $25^{\circ}$ C inkubieren.
9. Die Streifen 5-mal waschen.
10. In jede Vertiefung 100 µL vWF-TMB-Substrat geben.
11.  $15 \pm 2$  Minuten bei  $18^{\circ}$ - $25^{\circ}$ C inkubieren.
12. In jede Vertiefung 100 µL Stopplösung geben.
13. Extinktion bei 450 nm ablesen.

# ITALIANO

## INDICAZIONI PER L'USO

Il test di attività del fattore von Willebrand di American Diagnostica è un test immunoenzimatico diretto ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) per la determinazione quantitativa dei livelli di attività del fattore di von Willebrand (vWF) nel plasma citrato umano. È indicato per la valutazione del livello di attività del vWF nei pazienti per i quali questo test è ritenuto un parametro utile nel processo di diagnosi, in particolare laddove sia indicato arrivare ad una classificazione differenziata del morbo di von Willebrand. Il livello di attività del vWF è uno dei parametri utilizzati nei protocolli di diagnosi multicriterio.

## INTRODUZIONE

Il fattore di von Willebrand (vWF) è una complessa glicoproteina multimerica, adesiva, sintetizzata dalle cellule endoteliali e dai megacariociti. Il vWF ha funzione principale, seppur apparentemente non correlata, di trasportatore/stabilizzatore della proteina procoagulante FVIII:C, presente nel siero come complesso legato in modo non covalente, e sembra essere una proteina adesiva nel processo di emostasi. Il vWF lega il collagene e possibilmente altre strutture endoteliali, media l'adesione piastrinica al subendotelio (legando il recettore di superficie glicoproteina Ib) e partecipa all'interazione piastrina-piastrina legando la glicoproteina IIb/IIIa<sup>1,2</sup>.




Nel 1926, la diatesi emorragica congenita è stata descritta per la prima volta da Von Willebrand. Nella forma più lieve, il morbo di von Willebrand è la più diffusa patologia emorragica, con una frequenza riportata di 1 su 100. È un disordine eterogeneo, causato da difetto o da ridotto livello del vWF. Le sottoclassificazioni della patologia si basano sull'osservazione clinica, sull'anamnesi del paziente e sulle analisi di laboratorio, quali il tempo di sanguinamento, l'antigene e l'attività del vWF. La misurazione dell'antigene e dell'attività aiuta la diagnosi differenziale delle due classi predominanti della patologia, i tipi 1 e 2. La classificazione del morbo di von Willebrand è essenziale, dato che gestione clinica della malattia può variare a seconda del tipo<sup>3</sup>.

Livelli innalzati di attività del vWF e del suo antigene indicano danno endoteliale nella vasculopatia<sup>4</sup>; studi preliminari suggeriscono che tale danno potrebbe essere importante nelle complicanze vascolari dell'ipertensione<sup>5</sup>. L'aumento a breve termine del livello di vWF, osservato dopo l'attività fisica, l'infusione di adrenalina e DDAVP (1desamino-8-D-arginina vasopressina) e durante la gravidanza<sup>6</sup>, possono tuttavia indicare l'attivazione o stimolazione delle cellule endoteliali<sup>7</sup> piuttosto che danno endoteliale. Livelli ridotti di vWF sono presenti nell'ipotiroidismo e nel lupus eritematoso sistemico. Forme acquisite del morbo di von Willebrand sono state descritte nella patologia autoimmune, nella malattia di Wadenström, nelle gammopatie monoclonali benigne, nel carcinoma surrenale mieloproliferativo, nelle vasculiti reumatiche e nel diabete<sup>8</sup>. Vista la diversità delle condizioni cliniche associate alle anomalie del vWF, una descrizione più appropriata potrebbe essere sindrome di von Willebrand.

## PRINCIPIO DEL DOSAGGIO

I pozzetti delle micro-strip sono adesi con un preparato di anticorpo IgG purificato, monoclonale, murino, anti-vWF, le cui caratteristiche sono stata documentate<sup>9,10</sup>, che riconosce l'epitopo funzionale della molecola di vWF. Durante la prima incubazione, l'antigene specifico presente nel plasma diluito si lega alla superficie adesa con l'anticorpo e un lavaggio dei pozzetti rimuove le componenti plasmatiche non legate. Nella seconda incubazione, il coniugato - un anticorpo monoclonale murino anti-vWF, marcato con perossidasi (HRP) - lega qualsiasi antigene adeso alla superficie. Dopo un ulteriore lavaggio, l'anticorpo specifico viene tracciato per incubazione con il substrato. La reazione viene interrotta con l'aggiunta della soluzione bloccante, generando un prodotto finale colorato. La quantità di coniugato legato viene misurata in unità di assorbanza. L'attività del vWF può essere stimata interpolandola con una curva dose-risposta, basata sulle diluizioni del calibratore. Il calibratore è quindi rapportato con il 5° standard internazionale per il fattore VIII e vWF nel plasma, codice 02/150, fornito da NIBSC, Blanche Lane, South Mimms, Potters Bar, Hertfordshire EN6 3QG, Regno Unito.

## COMPONENTI DEL KIT

Coniugato di vWF	1 x 15 mL	Tampone stabilizzante di anticorpo monoclonale murino anti-vWF, marcato con perossidasi. Pronto per l'uso.		
Substrato TMB concentrato (5X)	1 x 5,5 mL	3,3', 5,5', tetrametilbenzidina (TMB) dissolta in dimetilsolfossido (DMSO) e metanolo. Diluire prima dell'uso. NOTA: TOSSICO E IRRITANTE		
Tampone substrato	1 x 25 mL	Tampone di acetato/citrato, acqua ossigenata 0,025% (v/v), pH 6,0. Pronto per l'uso.		
Soluzione bloccante	1 x 15 mL	2N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> . Pronta all'uso. NOTA: IRRITANTE		

Tampone di lavaggio concentrato vWF (16X)	1 x 25 mL	Tampone borato, bronopol 0,32% (p/v). Diluire prima dell'uso.
Pozzetti adesi con anticorpo anti-vWF e supporto per strip	12 strip x 8 micropozzetti	Adesi con anticorpo monoclonale murino anti-vWF, in confezione di alluminio risigillabile, con essiccante
Diluyente concentrato vWF (5X)	1 x 25 mL	Tampone fosfato, albumina bovina, bronopol 0,1% (p/v). Diluire prima dell'uso.
Calibratore vWF	2 x 0,5 mL	Antigene vWF in plasma umano, liofilizzato. Ricostituire e diluire prima dell'uso*. Sull'etichetta è riportata un'attività assegnata in IU/mL e %.
Controllo vWF 1	2 x 0,5 mL	Antigene vWF in plasma umano, liofilizzato. Ricostituire e diluire prima dell'uso*. I valori medi e limite in IU/mL e %, riportati sull'etichetta, rappresentano il livello normale di attività.
Controllo vWF 2	2 x 0,5 mL	Antigene vWF in plasma umano, liofilizzato. Ricostituire e diluire prima dell'uso*. I valori medi e limite in IU/mL e %, riportati sull'etichetta, rappresentano il livello anomalo di attività.
Foglio illustrativo		

\* N.B.: I valori stampati sulle etichette del calibratore e dei controlli rappresentano il livello di attività *dopo* la ricostituzione in 0,5mL di acqua distillata o deionizzata e l'ulteriore diluizione 1 a 20, come descritto in Preparazione del dosaggio. Va anche notato che 1 IU/mL = 100% di attività.

## CONSERVAZIONE DEI REAGENTI

### **Note sulla manipolazione e sulla procedura**

1. Conservare i componenti del kit a temperature comprese tra 2°C e 8°C fino alla data di scadenza riportata sulle etichette. Non utilizzare i reagenti scaduti.
2. Non miscelare componenti appartenenti a lotti di numero diverso.
3. Prima dell'uso, diluire il substrato TMB concentrato, il tampone di lavaggio concentrato, il diluyente concentrato, il calibratore e i controlli 1 e 2. Tutti gli altri reagenti sono pronti per l'uso.
4. Una volta diluiti, il tampone di lavaggio e il diluyente per campioni sono stabili a temperature comprese tra 2°C e 8°C per un periodo massimo di 6 mesi, in assenza di contaminazione microbica.
5. Diluire il substrato TMB da cinque a dieci minuti prima dell'uso e **PROTEGGERE DALLA LUCE**. Se diluito in un contenitore di vetro, può essere conservato per un periodo massimo di sei ore; per contro, se diluito in un contenitore di altro materiale, il substrato va utilizzato entro 30 minuti dalla preparazione.
6. I calibratore e i controlli ricostituiti rimangono stabili fino a 24 ore alla temperatura di 2°-8°C.
7. Riporre le strip di micropozzetti inutilizzate nella confezione di alluminio e conservare nel sacchetto di polietilene risigillabile, contenente essiccante, a temperature comprese tra 2°C e 8°C fino al momento dell'uso.
8. Evitare di contaminare i reagenti. Per ciascun reagente o a ogni manipolazione dei campioni, utilizzare un nuovo puntale per le pipette.
9. Non modificare le condizioni di manipolazione o conservazione dei reagenti del kit o del plasma umano.

### **Indicazioni di deterioramento**

La presenza di una colorazione blu o di precipitato nella soluzione del substrato TMB è indice di contaminazione; in tale evenienza, smaltire la diluizione e prepararne una nuova.

### **Raccolta e conservazione dei campioni**

Il dosaggio va eseguito con campioni di plasma citrato. Raccogliere nove volumi di sangue in 0,109M (3,2%) di anticoagulante di trisodio citrato (un volume). Centrifugare a 2500 x g per 10 minuti.

Il plasma può essere conservato a temperature di 2°-8°C o -20°C o meno per quattro settimane. Il plasma congelato va scongelato **DIRETTAMENTE** a 37°C per almeno 15 minuti prima del test. Miscelare accuratamente i campioni scongelati prima del test; evita il congelamento e lo scongelamento ripetuti. I campioni diluiti 1 a 20 nel diluyente vanno analizzati entro 24 ore dalla diluizione.

## AVVERTENZE E PRECAUZIONI

Per solo uso diagnostico *in vitro*.

### Precauzioni di sicurezza

1. Attenersi strettamente alle istruzioni contenute in questo opuscolo, in particolare per quanto concerne le condizioni di manipolazione e di conservazione.
2. Il calibratore e i controlli contengono plasma umano, analizzato mediante metodologie approvate dall'FDA per l'HBsAg, per l'antigene HIV-1 o per l'HIV-1 RNA e per gli anticorpi anti-HIV-1/HIV-2 e anti-HCV o per l'HCV RNA e dimostrato non reattivo/negativo. Considerato che nessun test offre la certezza assoluta dell'assenza di agenti infettivi, il calibratore e i controlli vanno considerati potenzialmente infetti e manipolati con le stesse precauzioni adottate per altri biomateriali potenzialmente pericolosi. Nel manuale CDC/NIH Health Manual "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", 4<sup>a</sup> edizione, Maggio 1999, viene descritto come manipolare questi materiali, conformemente alla buona pratica di laboratorio. Questo non è applicabile negli Stati Uniti d'America.
3. Non pipettare con la bocca.
4. Non fumare, non mangiare, non bere né usare cosmetici in aree dove vengono manipolati i kit e campioni.
5. Proteggere adeguatamente qualsiasi eruzione cutanea, taglio, abrasione o altre lesioni cutanee.
6. Il substrato TMB contiene DMSO e metanolo. È cancerogeno ed infiammabile. Evitare il contatto con la cute, gli occhi e le mucose e tenere lontano da fonti di calore o fiamma viva.
7. La soluzione bloccante contiene 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ed è irritante. Evitare il contatto con la pelle, gli occhi e le mucose.
8. Le schede dei dati di sicurezza per tutti i componenti pericolosi contenuti in questo kit sono disponibili a richiesta presso American Diagnostics.



#### SUBSTRATO

Tossico



#### SOLUZIONE BLOCCANTE

Irritante

R20/21/22: Nocivo per inalazione, contatto con la pelle e per ingestione.

R36/38: Irritante per gli occhi e la pelle

R39/23/24/25: Tossico: pericolo di effetti irreversibili molto gravi per inalazione, a contatto con la pelle e per ingestione.

S23: Non respirare i vapori.

S26: In caso di contatto con gli occhi, lavare immediatamente e abbondantemente con acqua e consultare un medico.

S28: In caso di contatto con la pelle lavarsi immediatamente ed abbondantemente con acqua.

S29/35: Non gettare i residui nelle fognature; Non disfarsi del prodotto e del recipiente se non con le dovute precauzioni.

S36/37/39: Usare indumenti protettivi e guanti adatti e proteggersi gli occhi/la faccia.

S46: In caso d'ingestione consultare immediatamente il medico e mostrargli il contenitore o l'etichetta.

S51: Non utilizzare su grandi superfici in locali abitati.

S63: In caso di incidente per inalazione, allontanare l'infortunato dalla zona contaminata e mantenerlo a riposo.

R36/38: Irritante per gli occhi e la pelle.

S23: Non respirare i vapori.

S26: In caso di contatto con gli occhi, lavare immediatamente e abbondantemente con acqua e consultare un medico.

S29/35: Non gettare i residui nelle fognature; Non disfarsi del prodotto e del recipiente se non con le dovute precauzioni.

S36/37/39: Usare indumenti protettivi e guanti adatti e proteggersi gli occhi/la faccia.

## PREPARAZIONE

### Materiali e attrezzature richiesti ma non forniti

1. Lettore per piastra/strip da 96 pozzetti con filtro da 450nm.
2. Pipette di precisione per dispensare 50 µL, 100 µL, 500 µL, 1 mL. Pipetta automatica per dispensare 100 µL. Pipetta automatica per dispensare 200 µL per il lavaggio manuale. Lavapiastra automatica opzionale.

3. Dosatori cilindrici in vetro o plastica: 1×100 mL, 1×500 mL.
4. Contenitori da 1mL per diluire il calibratore, i controlli e i campioni.
5. Acqua distillata o deionizzata.
6. Salviette assorbenti di carta.
7. Timer per intervalli di 15 e 60 minuti.

### **Preparazione del dosaggio**

Prima dell'uso, lasciar riscaldare i componenti del kit, comprese le strip di micropozzetti, fino a temperature comprese tra 18°C e 25°C per 30-60 minuti. Mescolare delicatamente i reagenti liquidi per inversione.

In un contenitore pulito, diluire il tampone di lavaggio concentrato vWF aggiungendo il contenuto di una fila a 375 mL di acqua distillata o deionizzata, quindi mescolare completamente.

In un contenitore pulito, diluire il diluente concentrato vWF aggiungendo il contenuto di una fila a 100 mL di acqua distillata o deionizzata, quindi mescolare completamente.

Ricostituire una fiala di calibratore e di ogni controllo aggiungendo 0,5 mL di acqua distillata o deionizzata, quindi miscelare delicatamente con movimento rotatorio finché tutto il particolato non sia disciolto nella soluzione. **NON AGITARE VORTICOSAMENTE.** Prima di diluirla, lasciar riposare la soluzione per 30 minuti a 18°-25°C, miscelandola delicatamente di tanto in tanto con movimento rotatorio.

Preparare la diluizione 1 a 10 del calibratore ricostituito (una parte di calibratore per nove parti di diluente vWF diluito). L'attività della diluizione 1 a 10 equivale a due volte il valore riportato nell'etichetta; ossia, se il valore riportato sull'etichetta del calibratore è 0,85 IU/mL (85%), il valore del calibratore diluito 1:10 è 1,7 IU/mL (170%). Con la soluzione diluita 1 a 10, preparare una serie di diluizioni in duplicato, utilizzando il diluente vWF diluito per ottenere una serie decrescente di valori di cinque o otto valori di calibratore. Utilizzare il diluente vWF diluito quale calibratore zero.

Preparare una diluizione 1 a 20 dei controlli ricostituiti aggiungendo 50µL di controllo a 950µL di diluente vWF diluito, quindi mescolare delicatamente.

Preparare una diluizione 1 a 20 dei campioni del paziente e 1 a 100, qualora fossero richieste ulteriori diluizioni. Aggiungere 50µL di campione a 950µL di diluente vWF diluito (1 a 20) e mescolare delicatamente; se del caso, aggiungere 200µL della diluizione 1 a 20 a 800µL di diluente vWF diluito (1 a 100) e mescolare delicatamente.

Cinque – dieci minuti prima dell'uso, diluire il substrato TMB concentrato in base alla tabella seguente (una parte di substrato TMB concentrato in quattro parti di tampone del substrato) e mescolare accuratamente. Se preparato in un contenitore di vetro, utilizzare il substrato TMB diluito entro 30 minuti dalla preparazione. Proteggere dalla luce.

<b>Numero di strip</b>	<b>Volume di substrato TMB concentrato (5X)</b>	<b>Volume di tampone del substrato</b>
6	1,5 mL	6,0 mL
12	2,5 mL	10,0 mL

Calcolare il numero di strip di micropozzetti necessarie per il dosaggio da eseguire e porle nell'apposito supporto. Riporre le strip inutilizzate nella confezione di alluminio contenente essiccante; conservare nel sacchetto di polietilene risigillabile, a temperature comprese tra 2°C e 8°C fino al momento dell'uso. Verificare che tutte le strip siano ben salde nell'apposito supporto e che l'etichetta di identificazione del dosaggio sia affissa lungo il bordo inferiore, sotto la griglia H.

### **PROTOCOLLO PER IL DOSAGGIO**

1. Marcare i pozzetti per l'identificazione.
2. Pipettare 100 µL di ciascuna diluizione del calibratore ricostituito in duplicato, prediluire i controlli 1 e 2 ricostituiti e prediluire i campioni dei pazienti (1 a 20) negli appositi pozzetti. Le aggiunte vanno eseguite in modo continuo ed il processo non devono superare i 10 minuti per ciascun set di calibratori. Qualora siano necessarie ulteriori diluizioni dei campioni del paziente, si consiglia una diluizione 1 a 100.
3. Incubare 60 ± 10 minuti a 18°-25°C.
4. Decantare il contenuto delle strip per inversione rapida in un lavello idoneo allo smaltimento di materiali biologici, tenendo presente il potenziale infettivo dei campioni. Asciugare le strip capovolte con salviette di carta assorbente.
5. Lavare i pozzetti cinque volte con 200 µL di tampone di lavaggio vWF diluito. Decantare il liquido ed asciugare i pozzetti con materiale assorbente dopo ogni lavaggio.
6. Aggiungere 100 µL di coniugato in ciascun pozzetto.
7. Incubare 15 ± 2 minuti a 18°-25°C.
8. Ripetere le operazioni riportate ai punti 4 e 5.
9. Aggiungere 100 µL di substrato TMB vWF diluito in ciascun pozzetto.
10. Incubare 15 ± 2 minuti a 18°-25°C. Non decantare.

11. Aggiungere 100 µL di soluzione bloccante in ciascun pozzetto, nello stesso ordine e alla stessa velocità del substrato. Picchiettare delicatamente i pozzetti per miscelare.
12. Leggere le strip entro 30 minuti a 450nm.

## CALCOLO E INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

**Valutare ciascun saggio separatamente per calcolare e interpretare i risultati.**

Calcolare il valore medio di assorbanza di ciascuna diluizione di calibratore e riportarlo su carta per grafici idonea in grafico lineare rispetto al livello di attività del calibratore. È anche possibile utilizzare un programma elettronico o di interpolazione di curva adatto. Sono state valutate le seguenti curve standard:

Curva a 8 punti: sette diluizioni duplicate del calibratore a partire da 1 a 10 fino a 1 a 640, più uno standard zero.

Curva a 5 punti: quattro diluizioni del calibratore di 1 a 10, 1 a 20, 1 a 40 e 1 a 160, più uno standard zero.

Il livello di attività del vWF per ciascuna diluizione può essere calcolato dal livello riportato sull'etichetta del calibratore usando con la seguente formula:

$$\text{Attività del calibratore diluito} = \text{attività del vWF sull'etichetta} \times \frac{20}{\text{Fattore di diluizione}}$$

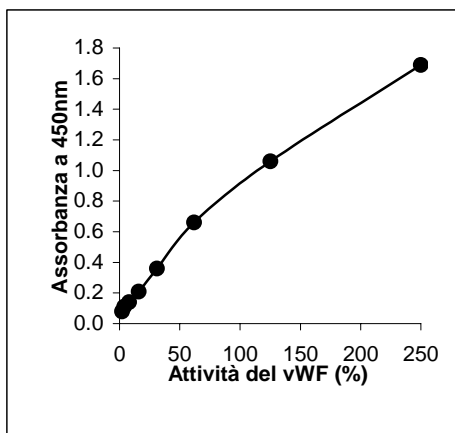
I seguenti programmi di interpolazione della curva sono ritenuti idonei:

spline lineare, logistica a 4 o 5 parametri, logit-log, lineare-lineare.

I livelli di attività dei controlli e dei campioni possono essere letti per interpolazione dalla curva del calibratore; un grafico tipico è riportato di seguito a scopo di riferimento e non va pertanto utilizzato per l'interpretazione dei risultati.

Il livello di attività dei controlli e dei campioni va calcolata dal risultato delle diluizioni 1 a 20 dei controlli e dei campioni. **NON AGGIUSTARE QUESTO FATTORE DI DILUIZIONE.** Se il livello di attività dei campioni a una diluizione 1 a 20 supera il limite normale più alto, i risultati possono essere calcolati utilizzando la diluizione 1a 100, se inclusa nella serie analitica. I risultati calcolati con la diluizione 1 a 100 vanno moltiplicati per **5** per aggiustare questa ulteriore diluizione del campione. Nota: 1 IU/mL = 100% di attività.

**Curva standard tipica**



## CONTROLLO DELLA QUALITÀ

Verificare che la manutenzione e calibrazione del lettore di piastre vengano eseguite in modo adeguato e in conformità alle istruzioni del costruttore, e che venga impiegata la lunghezza d'onda corretta.

Gli operatori devono accertarsi di aver compreso appieno le istruzioni per il dosaggio, in particolare per quanto concerne le avvertenze, le precauzioni e le annotazioni sulla manipolazione e la procedura. Inoltre, prima di riferire i risultati dei test al paziente, gli operatori devono aver dimostrato di essere in grado di ottenere specifiche prestazionali, in termini di precisione e di intervallo riportabile dei risultati, equiparabili a quelle stabilite dal costruttore. Nel kit sono inclusi due controlli che rappresentano il livello di attività normale (controllo 1) ed anomala (controllo 2) per monitorare la qualità della procedura del test. Il produttore consiglia che i controlli ricostituiti prediluiti vengano eseguiti in duplicato per ciascuna serie di test dei campioni. I valori medi e normali accettabili per ciascun controllo, espressi in IU/mL e %, sono riportati sull'etichetta (ad una diluizione di 1 a 20 se letti dalla curva del calibratore).

Presupponendo che le specifiche di precisione descritte dal costruttore siano soddisfatte, qualora uno o l'altro dei due controlli non soddisfi le specifiche del rapporto di controllo riportate di seguito, il dosaggio va considerato non valido e non va riportato. L'operatore può ripetere il dosaggio, dopo aver riesaminato la procedura seguita, oppure rivolgersi al distributore o costruttore. Se il dosaggio viene ripetuto, preparare una nuova diluizione di ciascun controllo e campione. I calibratore e i controlli ricostituiti rimangono stabili fino a 24 ore alla temperatura di 2°-8°C. Per ciascuna serie analitica, i laboratori possono scegliere di includere i propri controlli interni. Conservare i materiali di controllo a temperature pari o inferiori a -20°C; evitare cicli di congelamento e scongelamento ripetuti. Non congelare e scongelare i campioni più di una volta.

I livelli degli analiti identificati in patologie specifiche sono quelli stabiliti dal costruttore per popolazioni specifiche, per il qual motivo è possibile che non riflettano quanto riportato nella letteratura. I livelli di incidenza, il loro rapporto con patologie specifiche, gli intervalli di riferimento e i valori di normalità appropriati devono essere calcolati per le popolazioni specifiche servite dagli operatori.

## VALORI ATTESI

**Valori di riferimento asintomatici:** 180 campioni di plasma citrato, prelevati da donatori asintomatici, apparentemente sani, di razza caucasica, di età compresa tra 18 e 71 anni, sono stati analizzati con il test ELISA di attività del vWF di American Diagnostica. La distribuzione dei risultati è riportata nella tabella che segue. In 162 dei 180 (90%) campioni, i valori ottenuti sono superiori a 50%, ma non sono state riscontrate differenze statisticamente significative riguardo all'età o al sesso. Per le fluttuazioni del livello di vWF nella popolazione normale, si rinvia al punto 2 della sezione Limiti d'impiego. Si consiglia che gli operatori stabiliscano gli intervalli di riferimento per le popolazioni servite dal laboratorio.

Gruppo di controllo	n	Valori limite dell'attività %				
		≤30	>30-50	>50-60	>60-180	>180
Sano asintomatico	180	2 1,1%	16 8,9%	17 9,4%	133 74,0%	12 6,6%

**Campioni clinici:** 72 campioni di pazienti con diagnosi clinica di malattia di von Willebrand di tipo 1, 2 e 3 sono stati analizzati con il test ELISA di attività del vWF di American Diagnostica. Dall'analisi sono stati esclusi i pazienti in terapia. La distribuzione dei risultati è riportata nella tabella che segue.

Campioni clinici	n	Valori limite dell'attività %				
		≤10	>10-20	>20-30	>30-50	>50
Tipo 1	20	7 35%	5 25%	3 15%	2 10%	3 15%
Tipo 2	49	26 53%	14 29%	4 8%	4 8%	1 2%
Tipo 3	3	2 67%	1* 33%	- -	- -	- -

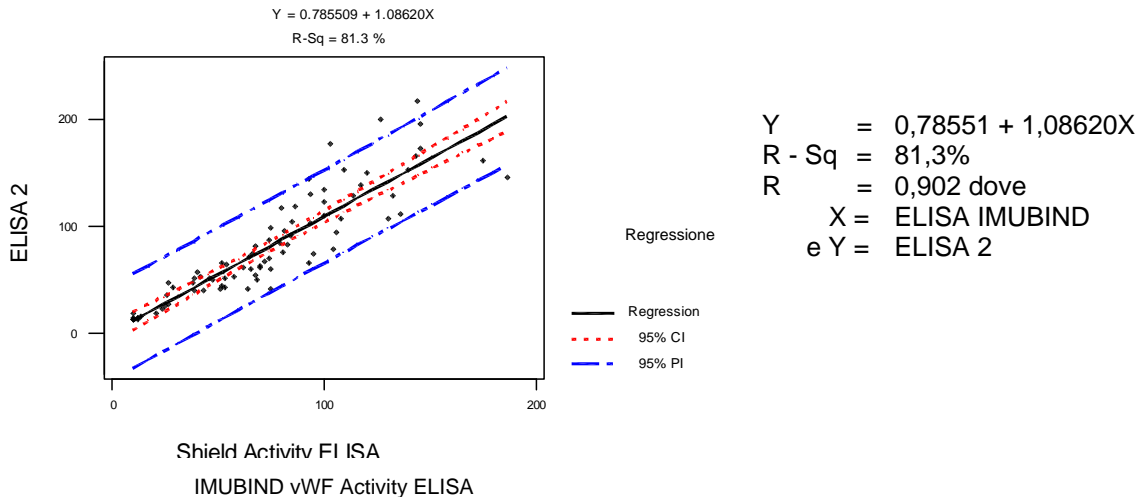
\* Attività = 11%

## DATI SULLE PRESTAZIONI

### Studio esterno

Nel reparto di emostasi di un grosso presidio ospedaliero, è stata condotta una valutazione del test ELISA per la determinazione dell'attività del vWF di American Diagnostica rispetto ad un altro ELISA disponibile nel mercato. Sono stati analizzati ottanta campioni con presunta diagnosi di vWF. I campioni comprendevano quelli di pazienti in terapia.

Correlazione tra il test ELISA di attività vWF di American Diagnostica ed ELISA 2:



### Caratteristiche di diluizione

Sono state analizzate cinque diluizioni dei campioni di tre pazienti utilizzando due lotti di kit. Nella tabella che segue sono riportati i valori medi ottenuti e la percentuale di recupero della diluizione iniziale.

Campione	Diluizione	Valore medio %	Diluizione corretta % Recupero (1/20)
1	1/20	83,3	100
	1/40	39,7	95
	1/80	20,9	100
	1/160	10,8	104
	1/320	6,1	117
2	1/20	40,8	100
	1/40	19,8	97
	1/80	10,3	101
	1/160	6,0	118
	1/320	2,8	110
3	1/20	24,4	100
	1/40	12,1	99
	1/80	7,0	115
	1/160	3,7	121

### Imprecisione

- Imprecisione Intradosaggio**, determinata analizzando due controlli con quattro repliche in 26 dosaggi, utilizzando tre operatori e tre lotti di kit, in un periodo di tre giorni.

Controllo	Valore medio %	Scarto quadratico medio %CV
1	80	8,0
2	16	11,1

2. **Imprecisione Interdosaggio**, determinata analizzando due controlli con quattro repliche in 26 dosaggi, utilizzando tre operatori e tre lotti di kit, in un periodo di tre giorni.

Controlli	Valore medio %	DS	%CV
1	80	13,4	17,0
2	16	3,45	21,5

### **Limite inferiore di rivelazione**

Il limite inferiore di rivelazione, calcolato dallo standard zero più 2 deviazioni standard, eseguite in duplicato in 9 dosaggi diversi, utilizzando 3 lotti di kit, era 1,6%.

### **Interferenze**

L'emoglobina fino a 400mg/dL, la bilirubina fino a 0,2mg/mL e gli intralipidi fino a 15mg/dL non interferiscono con i risultati del livello di attività del vWF. Il fattore reumatoide ad una titolazione di 1/640 non ha dimostrato interferenze.

### **LIMITI D'IMPIEGO**

1. Nonostante la presenza di un basso livello di attività del vWF sia indicativa di morbo di von Willebrand, i dati vanno valutati alla luce di altri referti clinici e di laboratorio, in particolare del tempo di sanguinamento. Livelli ridotti di vWF sono stati riportati nell'ipotiroidismo e nel lupus eritematoso sistemico.
2. Il livello di vWF varia largamente nella popolazione normale e in quella affetta da morbo di von Willebrand. La causa di tale variazione non è sempre apparente, ma è possibile che l'attività fisica, lo stress, la gravidanza e l'uso di contraccettivi orali contribuisca a queste fluttuazioni. Questi fattori devono pertanto essere valutati nel determinare la significatività dei risultati dell'attività del vWF.

### **BIBLIOGRAFIA**

1. Sporn LA, Chavin SI, et al. Biosynthesis of von Willebrand protein by human megakaryocytes. *J Clin Invest*, **76**, 1102-1106, 1985.
2. Wagner DD. Cell biology of von Willebrand Factor. *Ann Rev Cell Biol*, **6**, 217-246, 1990.
3. Nicols WC and Ginsburg D. Von Willebrand Disease. *Reviews in Molecular Medicine*, **76** No. 1, 1-20, 1997.
4. Belch JJF, Zoma AA, et al. Vascular damage and Factor VIII-related antigen in rheumatic diseases. *Rheumatol Int*, **7**, 107-111, 1987.
5. Blann AD, Naqui T, et al. Von Willebrand Factor and endothelial damage in essential hypertension. *Journal of Human Hypertension*, **7**, 107-111, 1993.
6. Tuddenham EGD. The varieties of von Willebrand's Disease. *Clin Lab Haemat*, **6**, 307-323, 1984.
7. Kahaleh MB. The role of vascular endothelium in the pathogenesis of connective tissue disease - endothelial injury, activation, participation and response. *Clin Exp Rheumatol*, **8**, 595-601, 1990.
8. Fleming TGM. Von Willebrand Factor- its function and its measurement in the laboratory. *B Journal of Biomedical Science*, **52**, 50-57, 1995.
9. Goodall AH, Jarvis J, et al. An immunoradiometric assay for human factor VIII/von Willebrand Factor (VIII:vWF) using a monoclonal antibody that defines a functional epitope. *Br J Haematol*, **59**, 565-577, 1985.
10. Murdock PJ, Woodhams BJ, et al. Von Willebrand Factor activity detected in a monoclonal antibody-based ELISA: an alternative to the ristocetin cofactor platelet agglutination assay for diagnostic use. *Thromb Haemost*, **78**, 1272-1277, 1997.

## RIEPILOGO DEL PROTOCOLLO

1. Preparare le diluizioni del calibratore ricostituito per ottenere i limiti normali della curva del calibratore.
2. Ricostituire e diluire 1 a 20 (1+19) i controlli 1 e 2.
3. Preparare una diluizione 1 a 20 dei campioni del paziente e, se del caso, 1 a 100.
4. Aggiungere 100  $\mu$ L di calibratore in duplicato, i controlli preparati e i campioni prediluiti del paziente nei pozzetti referenziati della strip.
5. Incubare per  $60 \pm 10$  minuti a  $18^{\circ}$ - $25^{\circ}$ C.
6. Lavare le strip 5 volte.
7. Aggiungere 100  $\mu$ L di coniugato in ciascun pozzetto.
8. Incubare per  $15 \pm 2$  minuti a  $18^{\circ}$ - $25^{\circ}$ C.
9. Lavare le strip 5 volte.
10. Aggiungere 100  $\mu$ L di substrato TMB vWF in ciascun pozzetto.
11. Incubare per  $15 \pm 2$  minuti a  $18^{\circ}$ - $25^{\circ}$ C.
12. Aggiungere 100  $\mu$ L di soluzione bloccante vWF in ciascun pozzetto.
13. Leggere l'assorbanza a 450nm.

## SYMBOLS



For in vitro diagnostic use |  
 Pour diagnostic in vitro | Para uso diagnóstico in vitro |  
 In Vitro Diagnosticum | Per uso diagnostico in vitro



Catalogue number |  
 Numéro catalogue | Número de catálogo |  
 Bestellnummer | Numero di catalogo



Lot |  
 Lot | Lote |  
 Ch.-B. | Lotto



96 tests |  
 96 determinations | 96 pruebas |  
 96 Bestimmungen | 96 tests



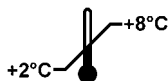
Caution |  
 Avertissez | Adverta |  
 Verwarnen | Cautela



See instructions for use |  
 Voir les consignes d'utilisation | Ver las instrucciones de uso |  
 Gebrauchsinformation beachten | Vedere le istruzioni per l'uso



Use by |  
 Utiliser avant | Utilizar antes de |  
 Verwendbar bis | Scadenza



Store at 2°-8°C |  
 Conserver à 2°-8°C | Conservar a 2°-8°C |  
 Lagerung bei 2°-8°C | Conservare a 2°-8°C



Manufactured by |  
 Fabriqué par | Fabricado por |  
 Hergestellt von | Prodotto da



Positive Control |  
 Témoin positif | Control Positivo |  
 Positiv-Kontrolle | Controllo Positivo



Negative Control |  
 Témoin négatif | Control Negativo |  
 Negativ-Kontrolle | Controllo Negativo