



LIAPHEN™ vWF Antigen



REF 120206

R1 4x5 mL, R2 4x6 mL

Turbidimetrischer Latex-Immunoassay zur quantitativen Bestimmung des von-Willebrand-Faktor Antigen im Plasma, mit gebrauchsfertigen Flüssigreagenzien



Vertrieb und Support:
CooChrom Diagnostica GmbH
www.coachrom.com | info@coachrom.com
Tel. +43-1-236 222 1 | Fax +43-1-236 222 111
Kostenfreie Nummern für Deutschland:
Tel. 0800-24 66 33-0 | Fax 0800-24 66 33-3

VERWENDUNGSZWECK:

LIAPHEN™ vWF:Ag ist ein turbidimetrischer Latex-Immunoassay zur quantitativen *in-vitro*-Bestimmung des von-Willebrand-Faktor Antigens (vWF:Ag) in humanem Citratplasma und ist zur automatisierten Durchführung geeignet. Die Reagenzien liegen in flüssiger Form vor und sind sofort einsetzbar.

ZUSAMMENFASSUNG:

Technisch:

vWF ist ein multimeres Protein, das in Endothelzellen und Megakaryozyten synthetisiert wird. Im Blut zirkuliert es als Multimer im Bereich von 500 bis mehr als 20.000 kDa. vWF vermittelt die Adhäsion der Thrombozyten an das Subendothelium verletzter Blutgefäße und dient als Transportprotein für Faktor VIII, wodurch dessen Halbwertszeit im Blutkreislauf verlängert wird.

Extrem große Multimere werden von ADAMTS13 proteolytisch in kleinere, weniger aktive vWF-Formen gespalten. Die biologische Funktion von vWF hängt im Wesentlichen von seiner Multimergröße ab. Größere Multimere binden eher an Thrombozyten und Kollagen und unterstützen somit die Thrombozyten-Adhäsion im Blutstrom.^{1,2}

Klinisch:

Ein quantitativer oder funktioneller vWF-Mangel führt zur von Willebrand-Erkrankung (vWD), die in 3 Subtypen unterteilt werden kann:

- Typ 1: vWD ist durch einen partiellen quantitativen Mangel an vWF charakterisiert (am häufigsten)
- Typ 2: vWD ist durch eine abnormale vWF-Adhäsion charakterisiert. Dieser Subtyp wird nochmals in 4 Kategorien unterteilt: 2A, 2B, 2M und 2N. Die Unterteilung ist abhängig von der funktionalen Anomalie des Multimers.
- Typ 3: vWD ist durch einen schweren quantitativen Mangel an vWF charakterisiert.

Ein vWF-Mangel kann im Zusammenhang mit verschiedenen Krankheitsbildern auftreten, die sich in einer erworbenen vWF-Erkrankung äußern. Ist das vaskuläre Endothelium betroffen, steigt die vWF-Konzentration im Verhältnis zum Entzündungsprozess.

TESTPRINZIP:

LIAPHEN™ vWF:Ag ist ein turbidimetrischer Latex-Immunoassay, basierend auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion: Das vWF-Antigen der Probe reagiert mit den Latexpartikeln, die mit polyklonalen Kaninchen-Anti-vWF-Antikörpern gekoppelt wurden, was zur Agglutination der Latexpartikel führt. Diese Agglutination kann durch Absorptionsmessung direkt detektiert werden. Die Absorptionszunahme ist direkt proportional zur Menge von vWF:Ag in der Probe.

REAGENZIEN:

R1 Reaktionspuffer, 4 Flaschen mit je 5 mL Flüssigreagenz.

R2 Latexreagenz, 4 Flaschen mit je 6 mL Flüssigreagenz.

Die Reagenzien enthalten bovines Serumalbumin (BSA) und eine geringe Menge an Natriumazid (0,9 g/L).

ANMERKUNGEN UND WARNHINWEISE:

- Für die Herstellung der Reagenzien wird Material tierischen Ursprungs verwendet. Produkte biologischen Ursprungs müssen mit den erforderlichen Vorsichtsmaßnahmen und als potentiell infektiös gehandhabt werden.
- Natriumazid kann mit Blei- bzw. Kupferarmaturen unter Bildung explosiver Verbindungen reagieren.
- Bei Entsorgung sind die lokalen Richtlinien zu befolgen.
- Nur Reagenzien aus Packungen mit identischer Chargennummer verwenden.
- Stabilitätsstudien für 3 Wochen bei 30°C haben gezeigt, dass die Packungen ohne Beeinträchtigung bei Raumtemperatur versendet werden können.
- Zur *in-vitro*-Diagnostik in professionellem Laborgebrauch.

VORBEREITUNG DER REAGENZIEN:

R1 **R2** Die Reagenzien liegen gebrauchsfertig vor. Vorsichtig durchmischen und dabei Schaumbildung vermeiden, gemäß Applikationsanleitung auf den Gerinnungsautomaten laden.

LAGERUNG UND STABILITÄT:

Die ungeöffneten Reagenzien müssen bei 2-8°C in der Originalverpackung gelagert werden. Sie sind dann bis zu dem auf dem Etikett aufgedruckten Verfalldatum stabil.

R1 **R2** Stabilität des geschlossen gelagerten Reagenz nach Rekonstitution unter der Voraussetzung, dass dieses nicht kontaminiert wurde und keine Verdunstung erfolgte:

- 4 Wochen bei 2-8°C
- 2 Wochen bei Raumtemperatur (18-25°C)
- Nicht einfrieren
- On Board-Stabilität – siehe gerätespezifische Applikation

ERFORDERLICHE MATERIALIEN, DIE NICHT IM KIT ENTHALTEN SIND:

Reagenzien:

- Aqua dest.
- Imidazol-Puffer (Art.Nr. AR021A/AR021K/AR021L) zur Probenverdünnung.
- Spezifische Kalibratoren und Kontrollen mit bekannten vWF:Ag-Werten, gegen den Internationalen Standard (NIBSC) für vWF:Ag im Plasma kalibriert, z.B.:

Artikelbezeichnung	Art.Nr.
BIOPHEN™ Kalibrationsplasma Gerinnung	222101
BIOPHEN™ Kontrollplasma Gerinnung „Normal“	223201
BIOPHEN™ Kontrollplasma Gerinnung „Abnormal“	223301

Geräte:

- Spektrophotometer oder Gerinnungsautomat für turbidimetrische Immunoassays
- Kalibrierte Pipetten, Silikon- oder Plastikröhrchen.

PROBENGEWINNUNG:

Blut (9 Volumenteile) wird vorsichtig in 0,109 M Citrat als Antikoagulant (1 Volumenteil) abgenommen. Die Blutabnahme erfolgt durch Venenpunktion. Das erste Röhrchen ist zu verwerfen.

Die Gewinnung und Lagerung der Proben hat gemäß aktuellen lokalen Vorschriften zu erfolgen (Vorschriften für die Probengewinnung, -handhabung und -lagerung sind im CLSI-Dokument H21-A5 veröffentlicht).⁵ In Bezug auf die Lagerung des Plasmas sind die Referenzen zu beachten.^{5,6}

TESTDURCHFÜHRUNG:

LIAPHEN™ vWF:Ag wurde als kinetische Methode zur Durchführung auf Gerinnungsautomaten entwickelt. Der Test wird bei einer Temperatur von 37°C durchgeführt, die Agglutinationsentwicklung wird bei 575 nm gemessen (andere Wellenlängen können benutzt werden, vorzugsweise zwischen 540 und 800 nm).

Testmethode:

1. Die Kalibratoren und Kontrollen sind anhand der spezifischen Inserts oder nach interner Praxis zu rekonstituieren. Die Kalibrationspunkte sind in einem Bereich zwischen 0 und 150% vWF:Ag zu setzen (0-20-75-150% vWF:Ag mit Imidazol-Puffer verdünnt). Die Verdünnung ist auf 4/15 festzulegen, dies entspricht der angegebenen vWF:Ag-Konzentration „C“ des kommerziell erhältlichen Kalibrators.
2. Die Verdünnung der Proben und Kontrollen mittels Imidazol-Puffer ist wie in der unten stehenden Tabelle angegeben einzustellen:

	Art.Nr.	Verdünnung
Kontrolle	223201 / 223301	4/15
Probe	-	4/15

Die Kalibrationskurve ist zu erstellen und mittels Qualitätskontrollen zu überprüfen. Verdünnte Proben sollten, wenn sie bei Raumtemperatur (18-25°C) gelagert werden, rasch getestet werden. Die exakten chargenspezifischen Werte der Kalibratoren und Kontrollen sind einem der Packung beiliegenden Datenblatt zu entnehmen.

3. Die unten stehende Tabelle zeigt beispielhaft ein Testschema für die Sysmex CS-Serie. In die bei 37°C präinkubierten Kunststoffröhrchen folgendermaßen hinzufügen (direkt erledigt durch den Analyser):

Reagenzien	Volumen
Kalibratoren, Proben oder Kontrollen, in Imidazol-Puffer verdünnt	30 µL
R1 Reaktionspuffer	60 µL
Inkubation bei 37°C für 130 Sek.	
R2 Latexreagenz	100 µL
Mischen und Messen der Absorption (kontinuierlich zwischen 20 und 50 Sek.) bei 575 nm und 37°C.	

Falls die verwendete Methode andere Reagenzvolumina als die oben beschriebenen erfordert, müssen die Verhältnisse der Reagenzkonzentrationen genau eingehalten werden, um den Erhalt der Leistungsmerkmale des Tests zu gewährleisten. Es liegt in der Verantwortung des Anwenders, alle Veränderungen und sämtliche Auswirkungen auf die Testergebnisse zu überprüfen.

Für hohe Konzentrationen (zwischen 150% und 1600%) wird eine höhere Vorverdünnung mit Imidazolpuffer empfohlen. Die gemessene Konzentration ist in diesem Fall mit dem Vorverdünnungsfaktor zu multiplizieren.

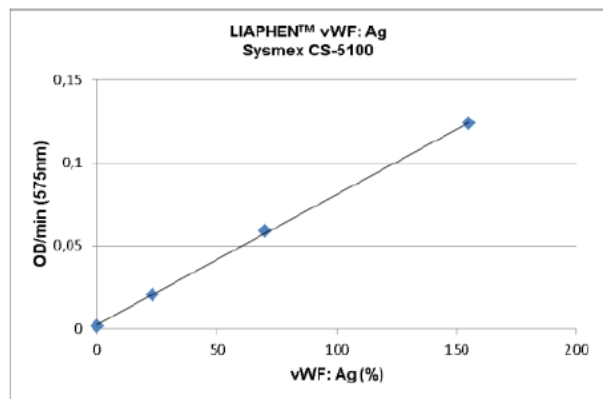
Adaptionsanleitungen für verschiedene Gerinnungsautomaten sind auf Anfrage erhältlich. Die Besonderheiten der jeweiligen Anwendung und spezifische Warnhinweise für den jeweiligen Automaten sind dann zu beachten.

KALIBRATION:

Der LIAPHEN™ vWF:Ag kann für die Messung von vWF:Ag in humanem Plasma kalibriert werden. Entsprechende Kalibrationsplamen, die den Kalibrationsbereich abdecken, sind von HYPHEN BioMed erhältlich (siehe Abschnitt **ERFORDERLICHE MATERIALIEN, DIE NICHT IM KIT ENTHALTEN SIND**) und können für die Erstellung der Kalibrationskurve verwendet werden.

Der Kalibrationsbereich auf Sysmex CS-5100 beträgt 0 bis 150% vWF:Ag.

Die nachfolgend gezeigte Kalibrationskurve dient lediglich als Beispiel. Zur Ergebnisberechnung von Proben darf ausschließlich die für die jeweilige Analysenserie gemessene Kalibrationskurve verwendet werden.



QUALITÄTSKONTROLLE:

Die Verwendung von Qualitätskontrollplasma ermöglicht bei Verwendung der gleichen Reagenzcharge die Validierung der Kalibrationskurve und der homogenen Reaktivität des Tests von Analyse zu Analyse.

Gemäß guter Laborpraxis ist bei jeder Testserie eine Qualitätskontrolle zu inkludieren, um die generierten Ergebnisse zu überprüfen.

Zumindest bei Chargenwechsel, größeren Wartungsarbeiten am Analysenautomaten oder wenn die Kontrollen außerhalb des Vertrauensbereiches liegen, muss eine Neukalibration erfolgen. Jedes Labor sollte die Richtigkeit der Zielwerte und Akzeptanzbereiche unter den eigenen Testbedingungen überprüfen.

ERGEBNISSE:

- Auf der Sysmex CS Serie erhalten Sie eine Lin-Lin-Kalibrationskurve. Entlang der y-Achse wird die Absorption bei 575 nm und entlang der x-Achse die vWF:Ag-Konzentration in % aufgetragen.
- Die vWF:Ag-Konzentration in der Probe leitet sich, sofern die Standardverdünnung genutzt wurde, direkt von der Kalibrationskurve ab.
- Falls andere Verdünnungen genutzt wurden, wird die gemessene Konzentration mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor multipliziert.
- Die Ergebnisse sind orientiert am klinischen und biologischen Zustand des Patienten zu interpretieren.

EINSCHRÄNKUNGEN DES TESTES:

- Um eine optimale Leistung zu gewährleisten und die Spezifikationen zu erfüllen, sollten die technischen Anweisungen von HYPHEN BioMed sorgsam beachtet werden. Für die Validierung jeglicher Abweichungen von diesen Anweisungen ist das Labor verantwortlich.
- Jegliches Reagenz mit unüblicher Erscheinung oder Anzeichen von Kontamination muss verworfen werden. Jegliche verdächtige Proben oder jene mit Anzeichen für Aktivierung müssen verworfen werden.
- Heterophile Antikörper können zu abnormal hohen vWF:Ag-Werten führen.
- Bzgl. eines möglichen Hook-Effektes, richten Sie sich nach den spezifischen Adaptionsanleitungen für den verwendeten Automaten (auf Sysmex CS-5100 wurden keine signifikanten Effekte für vWF:Ag-Konzentration bis 1600% beobachtet)

ERWARTETE WERTE:

Der Referenzbereich wurde bei gesunden Erwachsenen (n=120) auf dem Sysmex CS-5100 gemessen (Zentral 90%, 95. Perzentil) und liegt zwischen 62-169 % vWF:Ag. Jedoch muss jedes Labor seinen eigenen Normbereich festlegen.

Die Blutgruppe des Spenders, besonders Blutgruppe 0, sowie das Alter, das Geschlecht und eine bestehende Schwangerschaft können die vWF:Ag-Konzentration im Plasma beeinflussen.⁷

LEISTUNGSMERKMALE:

- Die untere Nachweisgrenze hängt vom verwendeten Analysensystem ab (<1% auf dem Sysmex CS-5100).
- Der Messbereich hängt vom verwendeten Analysensystem ab (zwischen 3 und 1600% vWF:Ag auf der Sysmex CS-Serie mit Verdünnung, der Test ist ohne Verdünnung zwischen 10 und 170% linear)
- Leistungsstudien wurden intern unter Einsatz einer Reagenzcharge auf Sysmex CS-5100 durchgeführt. Sie wurden mittels Qualitätskontrollen des Labors 5 Tage ausgewertet, 2 Läufe pro Tag und 3 Wiederholungen pro Lauf für jedes Kontrollniveau. Die folgenden Daten wurden erhalten:

Kontrolle	Intra-Lauf				Inter-Lauf			
	n	Mittelwert	VK%	SD	n	Mittelwert	VK%	SD
Normal	40	102,8	2,2	2,3	30	103,4	2,2	2,3
Pathologisch	40	39,8	4,6	1,8	30	39,2	2,6	1,0

- Korrelation mit Referenzmethode (vWF:Ag (Siemens) vs. LIAPHEN™ vWF:Ag auf Sysmex CS-5100):
 $n = 73$ $y = 1,032 x + 0,49$ $r = 0,998$

REFERENZEN:

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

SYMBOLE:

Verwendete Symbole und Zeichen sind in der ISO-Norm 15223-1 gelistet. Das der Packung beiliegende Symbolerklärungs-Blatt ist zu beachten.