



LIAPHEN™ vWF:Ag



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:  
CoaChrom 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 Bestimmung des von-Willebrand-Faktor Antigens (vWF:Ag) in humanem Citratplasma und ist sowohl zur manuellen als auch zur automatisierten Durchführung geeignet. Die Reagenzien liegen in flüssiger Form vor und sind sofort einsetzbar.

#### ZUSAMMENFASSUNG:

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. 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 vasculäre 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.

#### IM KIT ENTHALTENE REAGENZIEN:

**R1** Reaktionspuffer, 4 Flaschen mit je 5 mL Flüssigreagenz.  
Enthält bovines Serumalbumin (BSA).

**R2** Latexreagenz, 4 Flaschen mit je 6 mL Flüssigreagenz.

Die Reagenzien enthalten eine geringe Konzentration an Natriumazid (0,9 g/L), der unten aufgeführte Warnhinweis ist zu beachten.

#### ANMERKUNGEN UND WARNHINWEISE:

- Alle Produkte biologischen Ursprungs müssen mit den erforderlichen Vorsichtsmaßnahmen und als potentiell infektiös behandelt werden.
- Natriumazid kann mit Blei- bzw. Kupferarmaturen unter Bildung hochexplosiver Metallazide reagieren.
- Bei der Entsorgung sind die lokalen Entsorgungsrichtlinien zu befolgen.
- Nur Reagenzien aus Packungen mit identischer Chargennummer verwenden. Zur Testdurchführung dürfen keine Reagenzien aus Testpackungen mit unterschiedlicher Chargennummer verwendet werden. Die Kombination der Reagenzien ist in Bezug auf die Testcharge optimiert.
- Die Reagenzien sind sorgfältig zu behandeln, um jegliche Kontamination während der Verwendung zu vermeiden. Um Verdunstung der Reagenzien während der Verwendung soweit wie möglich zu vermeiden, ist die Verdunstungsfläche so gering wie möglich zu halten. Verdunstung verringert die Reagenzstabilität in Analysenautomaten.
- Um die Stabilität zu gewährleisten, müssen die Reagenzflaschen nach jedem Gebrauch mit der Original-Schraubkappe verschlossen werden.
- Stabilitätsstudien für 3 Wochen bei 30°C haben gezeigt, dass die Packungen ohne Beeinträchtigung bei Raumtemperatur versendet werden können.
- Das zur Herstellung des bovines Serumalbumins (BSA) verwendete bovine Plasma wurde mit dokumentierten Methoden auf die Abwesenheit infektiöser Substanzen getestet, insbesondere auf den bovine spongiforme Enzephalopathie (BSE) verursachenden Erreger.
- Zur in-vitro-Diagnostik.

#### VORBEREITUNG UND STABILITÄT DER REAGENZIEN:

- **R1** Gebrauchsfertiger Reaktionspuffer
- **R2** Gebrauchsfertiges Latexreagenz

Vor Verwendung für 30 Minuten bei Raumtemperatur (18-25°C) inkubieren. Vor dem Gebrauch durchmischen.

Stabilität der in der Originalflasche gelagerten, geöffneten Reagenzien unter der Voraussetzung, dass diese nicht kontaminiert wurden und keine Verdunstung erfolgte:

- 4 Wochen bei 2-8°C.
- 2 Wochen bei Raumtemperatur (18-25°C).
- Nicht einfrieren

#### LAGERUNG:

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

#### 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:

- Gerinnungsautomaten für turbidimetrische Immunoassays
- Kalibrierte Pipetten.

#### PROBENGEWINNUNG:

Die Gewinnung und Lagerung der Proben hat gemäß aktueller lokaler Vorschriften zu erfolgen (Vorschriften für die Probengewinnung, -handhabung und -lagerung sind für die USA im CLSI H21-A5 Dokument veröffentlicht).

Proben: Humanes Plasma mit Tri-Natrium Citrat als Antikoagulant.

**Blutabnahme:** Blut (9 Volumenteile) wird vorsichtig in 0,109 M Citrat als Antikoagulant (1 Volumenteil) abgenommen. Die Blutabnahme erfolgt durch Venenpunktion, wobei jegliche Gerinnungsaktivierung vermieden werden muss.

**Zentrifugation:** Die Herstellung von plättchenarmem Plasma hat innerhalb von 2 Stunden nach Blutabnahme gemäß einem validierten, laborspezifischen Verfahren zu erfolgen, z.B. durch Zentrifugation bei Raumtemperatur (18-25°C) für 15 Minuten bei 2500g. Das Plasma wird anschließend in ein Kunststoffröhrchen überführt.

##### Lagerung der Plasmaproben bis zu:

- 4 Stunden bei Raumtemperatur (18-25°C).
- 24 Monate tiefgefroren bei -20°C bis -70°C

Gefrorene Plasmaproben sollten bei 37°C zügig aufgetaut, anschließend behutsam gemischt und dann sofort getestet werden. Jegliche Niederschläge sind durch gründliches Mischen sofort nach dem Auftauen und vor dem Testen zu resuspendieren.

#### TESTDURCHFÜHRUNG:

LIAPHEN™ vWF:Ag wurde als kinetische Methode zur Durchführung auf Gerinnungsautomaten entwickelt und kann auch als Endpunkt-Methode durchgeführt werden. 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).

#### Automatisierte Methoden:

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

### Manuelle Methode:

- Die Kalibratoren und Kontrollen sind anhand der spezifischen Inserts zu rekonstituieren (es werden mindestens 2 Kontrollen mit etwa 40 und 100% vWF:Ag empfohlen). Die Kalibrationspunkte sind in einem Bereich zwischen 0 und 150% (z.B. 0-20-75-150% vWF:Ag mit Imidazol-Puffer verdünnt) zu setzen.
- Die Proben, Kalibratoren und Kontrollen sollten mittels Imidazol-Puffer wie in der unten stehenden Tabelle verdünnt werden:

Probe	Vorverdünnung	Endverdünnung
Kalibrator	Nein	4/15
Kontrolle	Nein	4/15
Probe	Entsprechender Verdünnungsfaktor für den 10-150% Bereich	4/15

Die Kalibrationskurve ist zu erstellen und mittels Qualitätskontrollen zu überprüfen. Verdünnte Proben sollten innerhalb von 2 Stunden getestet werden, wenn sie bei Raumtemperatur (18-25°C) gelagert werden.

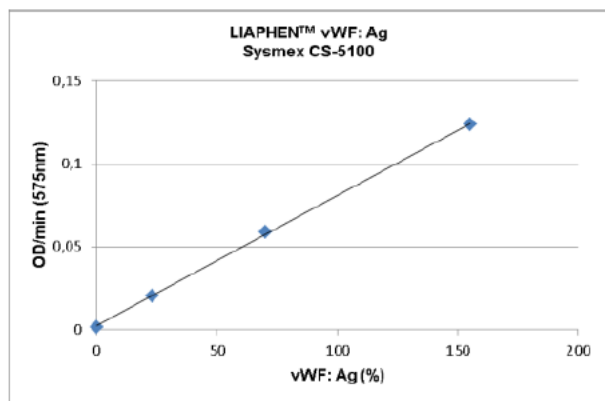
- Bei 37°C pipettieren:

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

Falls die verwendete Methode andere Reagenzvolumenta 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.

### KALIBRATION:

Der LIAPHEN™ vWF:Ag Test kann für die Messung von vWF:Ag in humanem Plasma kalibriert werden. Der Test ist auf Sysmex CS-5100 (mit einer Standard-Verdünnung) von 10 bis 170% vWF:Ag linear. Die nachfolgend gezeigte Kalibrationskurve, die auf einem Sysmex CS-5100 erstellt wurde, 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 dem Sysmex CS 5100 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.
- Ergebnisse werden in % vWF:Ag angegeben.
- Die Ergebnisse sind orientiert am klinischen und biologischen Zustand des Patienten zu interpretieren.
- Falls andere Verdünnungen genutzt wurden, wird die gemessene Konzentration mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor multipliziert (auf Sysmex CS-Serien kann der Messbereich zwischen 3 bis 1600 % vWF:Ag erweitert werden).

### 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. Plasmen, die Gerinnsel oder Anzeichen für Kontaminationen aufweisen, sind zu verwerfen.
- Rheumafaktoren und 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 (keine signifikanten Effekte wurden für vWF:Ag-Konzentration bis 1600% beobachtet).
- Für mögliche Einflüsse von Störfaktoren richten Sie sich nach den spezifischen Adaptionsanleitungen für den verwendeten Automaten (keine signifikanten Effekte wurden für Konzentrationen von Heparin  $\leq 2$  IE/mL, Bilirubin  $\leq 60$  mg/mL, Hämoglobin  $\leq 1000$  mg/dL, Intralipid  $\leq 1000$  mg/dL 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 beeinflussen die vWF:Ag-Konzentration im Plasma.

### LEISTUNGSMERKMALE:

- Die untere Nachweisgrenze hängt vom verwendeten Analysensystem ab (<1% auf dem Sysmex CS-5100).
- Auf der Sysmex CS-Serie liegt der Messbereich zwischen 3 und 600% vWF:Ag (für Proben über 600% kann eine entsprechende Rückverdünnung vorgenommen werden).
- Diese Präzision wurde unter Verwendung von 3 Reagenzchargen erstellt. Sie wurde mittels Qualitätskontrolle des Labors über 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

### REFERENZEN:

- Luo et al. von Willebrand Factor: more than a regulator of hemostasis and thrombosis. Acta Haematol, 2012, 128:158-169.
- Peyvandi et al. Role of von Willebrand Factor in the haemostasis. Blood Transfus, 2011, 9 suppl 2:s3-s8.
- Schwameis et al. vWF excess and ADAMTS13 deficiency: a unifying pathomechanism linking inflammation to thrombosis in DIC, malaria, and TTP. Thrombosis and Haemostasis, 113.3/2015.
- Farkas et al. Complement activation, inflammation and relative ADAMTS13 deficiency in secondary thrombotic microangiopathies. Immunobiology, 2017, 222:119-127.
- 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.
- Woodhams B. et al., Stability of coagulation proteins in frozen plasma. Blood coagulation and Fibrinolysis. 2001.
- Gill et al. The Effect of ABO group on the diagnosis of von Willebrand disease. Blood, 1987, 69:1692

### SYMBOLE:

Verwendete Symbole und Zeichen sind in der ISO-Norm 15223-1 gelistet.