



# ZYMUTEST™ vWF:CBA

**REF** RK038A

**96 Tests**

## ELISA-Kit zur quantitativen Bestimmung der von-Willebrand-Faktor-Kollagenbindungsaktivität



**Vertrieb und Support:**  
**CoaChrom Diagnostica GmbH**  
[www.coachrom.com](http://www.coachrom.com) | [info@coachrom.com](mailto: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:

ZYMUTEST™ vWF:CBA ist ein Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung der Kollagenbindungsaktivität (CBA) von humanem von Willebrand-Faktor (vWF) in humanem Plasma.

### ZUSAMMENFASSUNG:

#### **Technisch:**

Plasmatischer vWF ist ein multimeres Glykoprotein, das in Endothelzellen und Megakaryozyten produziert wird. Es zirkuliert im Blut als Multimer mit einem Molekulargewicht im Bereich von 0,5 bis 20 MDa. vWF vermittelt die Adhäsion der Thrombozyten an das subendotheliale Bindegewebe des verletzten Blutgefäßes. Zudem dient vWF als plasmatisches Transportprotein für Faktor VIII und stabilisiert dadurch dessen prokoagulatorische Aktivität.

Sehr große Multimere werden durch ADAMTS13 proteolytisch in weniger aktive Formen vWF-Formen gespalten. Die biologische Funktion von vWF hängt hauptsächlich von der Größe seiner Multimere ab. Größere Multimere binden mit höherer Wahrscheinlichkeit an Thrombozyten und Kollagen und fördern die Thrombozytenadhäsion im Blutkreislauf.<sup>1,2</sup>

#### **Klinisch:**

Ein funktionaler oder quantitativer vWF-Mangel führt zum von-Willebrand-Syndrom (vWS), das man in drei Gruppen einteilt:

- Typ 1 (häufigster Typ): Teilweiser quantitativer Mangel an vWF
- Typ 2: Charakterisiert durch eine abnormale Adhäsionsaktivität des vWF, wird abhängig von funktionaler Abnormalität der Multimere in vier Subtypen unterteilt: 2A, 2B, 2M und 2N.
- Typ 3: Schwerwiegender quantitativer Mangel an vWF.

ZYMUTEST™ vWF:CBA basiert auf der Fähigkeit von vWF (mit hohem Molekulargewicht) zur Bindung an Kollagen und dient der genaueren Charakterisierung des vWS-Typs.<sup>3</sup>

### TESTPRINZIP:

Zunächst wird das verdünnte Probenplasma oder andere biologische Flüssigkeit in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte pipettiert, die mit fibrillärem Kollagen beschichtet sind. Der in der Probe enthaltene vWF wird aufgrund seiner Kollagenbindungsaktivität an die feste Phase gebunden. Nach einem Waschschrift erfolgt die Zugabe des Immunkonjugats, eines an Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelten polyklonalen Antikörpers. Dieser bindet an freie Epitope des auf der Platte immobilisierten vWF. Nach einem zweiten Waschschrift wird das Peroxidasesubstrat, 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB), in Gegenwart von Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) zugegeben. Unter diesen Bedingungen färbt sich TMB blau und schlägt beim Stoppen der Reaktion mit Schwefelsäure nach gelb um. Die Farbentwicklung ist direkt proportional zur vWF:CBA-Konzentration der Probe.

### IM TESTKIT ENTHALTENE REAGENZIEN:

- **COAT** ELISA-Mikrotiterplatte, bestehend aus 12 Mikrotiterstreifen zu je 8 Vertiefungen, beschichtet mit stabilisiertem equinem Kollagen vom Typ I und III, stabilisiert und in Gegenwart eines Trockenmittels luftdicht in einem Aluminiumbeutel verpackt.
- **SD ELISA** Probenverdünner: 2 Flaschen mit je 50 mL, gebrauchsfertig. Enthält Proclin und BSA.
- **CAL vWF** vWF-Kalibrator: 3 Flaschen mit je 2 mL lyophilisiertem Humanplasma mit einer titrierten vWF-Konzentration im Bereich 120-160%. Die Standardkonzentration wird anhand des internationalen NIBSC Standards festgelegt. Enthält BSA.
- **CI vWF** vWF-Kontrollplasma hoch: 1 Flasche mit 0,5 mL, lyophilisiert.
- **CII vWF** vWF-Kontrollplasma niedrig: 1 Flasche mit 0,5 mL, lyophilisiert.
- **IC ANTI-(h)-vWF HRP** Anti-(h)-vWF-HRP-Immunkonjugat: 3 Flaschen mit je 7,5 mL, polyklonaler Kaninchenantikörper, spezifisch für vWF und gekoppelt an Meerrettichperoxidase (HRP), lyophilisiert. Enthält BSA.
- **CD ELISA** Konjugatverdünner: 1 Flasche mit 25 mL, gebrauchsfertig. Enthält Proclin und BSA.
- **WS ELISA** Waschlösung: 1 Flasche mit 50 mL, 20-fach konzentriert. Enthält Proclin.
- **TMB** 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin: 1 Flasche mit 25 mL Substrat, gebrauchsfertig. Enthält Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).
- **Stop** 0,45 M Schwefelsäure: 1 Flasche mit 6 mL, gebrauchsfertig.

### ANMERKUNGEN UND WARNHINWEISE:

- Für die Herstellung einiger der enthaltenen Reagenzien wird Material tierischen Ursprungs verwendet. Sämtliche Produkte biologischen Ursprungs müssen mit größter Sorgfalt unter Beachtung aller erforderlichen Vorsichtsmaßnahmen und als potenziell infektiös gehandhabt werden.
- Schwefelsäure ist trotz Verdünnung auf 0,45 M ätzend und wie ähnliche Chemikalien mit größter Vorsicht zu handhaben. Jeglicher Haut- und Augenkontakt ist unter Verwendung von Handschuhen und Schutzbrillen zu vermeiden.
- Bei der Entsorgung sind die lokalen Richtlinien zu befolgen.
- Nur Reagenzien aus Packungen mit identischer Chargennummer verwenden.
- Stabilitätsstudien haben gezeigt, dass die Packungen ohne Beeinträchtigung bei Raumtemperatur versendet werden können.
- Zur *in-vitro*-Diagnostik in professionellem Laborgebrauch.

### VORBEREITUNG DER REAGENZIEN:

Die erforderlichen Testkitkomponenten müssen vor Gebrauch für 30 Minuten auf Raumtemperatur (18-25°C) gebracht werden. Die Gummistopfen der Flaschen sind vorsichtig zu öffnen, um einen Verlust an Reagenz zu vermeiden

**COAT** Den Aluminiumbeutel öffnen und die für die jeweilige Testreihe erforderliche Anzahl an Mikrotiterstreifen entnehmen. Nach Entnahme aus dem Beutel müssen die Streifen innerhalb von 30 Minuten verwendet werden.

Den Inhalt jeder Flasche rekonstituieren mit exakt:

**CI vWF** → 0,5 mL **Aqua dest.** mindestens 30 Minuten vor Gebrauch. Bis zur vollständigen Auflösung des Inhalts gut durchmischen.

**CII vWF** → 0,5 mL **Aqua dest.** mindestens 30 Minuten vor Gebrauch. Bis zur vollständigen Auflösung des Inhalts gut durchmischen.

**CAL vWF** → 2 mL **SD ELISA** um ein 1:50 vorverdünntes Kalibrationsplasma mit einer vWF:CBA-Konzentration von C% zu erhalten. Bis zur vollständigen Auflösung des Inhalts gut durchmischen.

**IC ANTI-(h)-vWF HRP** → 7,5 mL **CD ELISA** mindestens 15 Minuten vor Gebrauch. Bis zur vollständigen Auflösung vorsichtig durchmischen.

**SD ELISA** **TMB** **Stop** **CD ELISA** Gebrauchsfertig

**WS ELISA** Die Flasche schütteln und die Waschlösung **1:20 mit Aqua dest.** verdünnen (aus 50 mL Konzentrat lässt sich folglich 1 L verdünnte Waschlösung herstellen). Falls nötig im Wasserbad bei 37°C bis zur vollständigen Auflösung allfälliger Feststoffe inkubieren.

### 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.

**COAT** Nicht benötigte Streifen können im Original-Aluminiumbeutel (verschlossen, in Gegenwart des Trockenmittels), im mitgelieferten Druckverschlussbeutel verpackt und geschützt vor jeglicher Feuchtigkeit für **4 Wochen** bei 2-8°C gelagert werden.

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

**CAL vWF**

**8 Stunden** bei Raumtemperatur (18-25°C)

**CI vWF** **CII vWF**

**24 Stunden** bei 2-8°C

**8 Stunden** bei Raumtemperatur (18-25°C)

**2 Monate** bei ≤ -20°C\*

\*Kann einmalig bei 37°C aufgetaut werden und muss dann umgehend verwendet werden.

**IC ANTI-(h)-vWF HRP**

**4 Wochen** bei 2-8°C

**24 Stunden** bei Raumtemperatur (18-25°C)

Stabilität des geschlossen gelagerten Reagenz nach dem Öffnen unter der Voraussetzung, dass dieses nicht kontaminiert wurde und keine Verdunstung erfolgte:

**SD ELISA** **TMB** **CD ELISA**

**4 Wochen** bei 2-8°C

**WS ELISA**

**4 Wochen** bei 2-8°C bzw.

**7 Tage** bei 2-8°C (verdünnte Lösung)

**Stop**

**8 Wochen** bei 2-8°C

### ERFORDERLICHE MATERIALIEN, DIE NICHT IM TESTKIT ENTHALTEN SIND:

#### **Reagenzien:**

- Aqua dest.

#### **Materialien:**

- 8-Kanal- oder Repeaterpipette mit einem Pipettiervolumen im Bereich von 50-300 µL
- Einkanalpipetten mit Pipettierolumina in den Bereichen von jeweils 0-20, 20-200 und 200-1000 µL
- Mikrotiterplattenwascher und -schüttler
- Mikrotiterplattenleser zur Messung bei einer Wellenlänge von 450 nm

## 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<sup>10</sup> veröffentlicht). In Bezug auf die Lagerung des Plasmas sind die Referenzen zu beachten.

## TESTDURCHFÜHRUNG:

1. Proben und Kontrollen (CI und CII) müssen zur Testung 1:50 mit **SD ELISA** verdünnt werden. Bei erwarteten vWF-Konzentrationen von >C% muss die Verdünnung auf 1:100 oder mehr erhöht werden.
2. Unter Verwendung von **CAL vWF** mit einer vWF-Konzentration von C% werden folgende Kalibrationslösungen hergestellt:

vWF-Konzentration (%)	C	C:2	C:4	C:10	C:20	0
Volumen vWF-Kalibrator	1 mL	0,5 mL	0,25 mL	0,1 mL	0,05 mL	0 mL
Volumen Probenverdünner	0 mL	0,5 mL	0,75 mL	0,9 mL	0,95 mL	1 mL

Die Kalibrationslösungen werden vorsichtig durchgemischt und sind für **6 Stunden** bei Raumtemperatur (18-25°C) stabil.

3. Die für die Testreihe erforderliche Anzahl an Mikrotiterstreifen aus dem Aluminiumbeutel entnehmen und in den mitgelieferten Rahmen legen. Dann nach folgendem Schema verfahren:

Reagenz	Volumen	Vorgehen
<b>CAL vWF</b> oder <b>CI vWF</b> oder <b>CII vWF</b> oder Verdünnte Proben oder <b>SD ELISA</b> (Leerwert)	200 µL	In jeweils eine Vertiefung der Mikrotiterstreifen pipettieren
Für 2 Stunden bei Raumtemperatur (18-25°C) inkubieren (a)		
<b>WS ELISA</b>	300 µL	10 aufeinanderfolgende Waschschriffe (b)
<b>IC ANTI-(h)-vWF HRP</b>	200 µL	In die einzelnen Vertiefungen hinzupipettieren
Für 1 Stunde bei Raumtemperatur (18-25°C) inkubieren (a)		
<b>WS ELISA</b>	300 µL	10 aufeinanderfolgende Waschschriffe (b)
<b>TMB</b>	200 µL	Unmittelbar nach dem letzten Waschschriff in die einzelnen Vertiefungen hinzupipettieren (b,c). Die Verteilung des Substrats muss genau und in exakten Zeitabständen erfolgen.
Für 15 Minuten bei Raumtemperatur (18-25°C) inkubieren (a)		
<b>Stop</b>	50 µL	Mit identischer Verteilung und Zeitintervallen wie vorher für das Substrat in die einzelnen Vertiefungen hinzupipettieren, um die Farbreaktion zu stoppen (c)
Zur Stabilisierung der Farbe für 10 Minuten bei Raumtemperatur (18-25°C) inkubieren, dann die Absorption bei 450 nm messen und jeweils den Leerwert subtrahieren (d).		

Um eine homogene Bindung von vWF an das Kollagen zu gewährleisten, müssen die Kalibrationslösungen, Kontrollen und Proben so rasch wie möglich und jedenfalls innerhalb von 10 Minuten in die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen pipettiert werden. Etwaige Verzögerungen können zu falschen Ergebnissen führen (Unterschätzung der Werte bei den letzten Vertiefungen).

- (a) Während der Inkubation und hierbei besonders während der Farbentwicklung sollten die Testansätze vor direkter Sonneneinstrahlung geschützt werden. Es kann ein Mikrotiterplattenschüttler verwendet werden.
- (b) Im Zuge des Hinzufügens der Reagenzien oder der Entfernung der Waschlösung nach jedem einzelnen Waschschriff dürfen die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen niemals austrocknen, da dies die an der Platte immobilisierten Komponenten beeinträchtigen könnte. Deshalb muss das darauffolgende Reagenz so rasch wie möglich und jedenfalls innerhalb von 3 Minuten nach Entfernung der Waschlösung in die einzelnen Vertiefungen pipettiert werden. Falls nötig, kann die Platte mit Waschlösung gefüllt bleiben und erst direkt vor Zugabe des nächsten Reagenz geleert werden. Der Mikrotiterplattenwascher muss so eingestellt sein, dass die Platten schonend gewaschen werden und ein abruptes Entfernen der Waschlösung vermieden wird.
- (c) Die Zugabe des Substrats von Reihe zu Reihe muss in genau definierten Zeitabständen erfolgen.
- (d) Bei bichromatischen Messungen kann eine Referenzwellenlänge von 620 oder 690 nm verwendet werden.

## QUALITÄTSKONTROLLE:

Die Verwendung von Qualitätskontrollplasma ermöglicht bei Verwendung der gleichen Reagenzcharaktere 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. Für jede Testserie ist eine neue Kalibrationskurve zu erstellen. Jedes Labor kann unter den eigenen Testbedingungen seine Akzeptanzbereiche festlegen und die erwartete Testleistung verifizieren.

## ERGEBNISSE:

- Die bei 450 nm gemessenen Absorptionen können je nach effektiver Temperatur während des Testlaufs variieren.
- Die vWF-Konzentration in % wird auf der Abszisse (x-Achse) gegen die jeweilige Absorption A450 auf der Ordinate (y-Achse) aufgetragen, wobei das „best fit“-Interpolationsverfahren zu wählen ist (das der Packung beiliegende Datenblatt ist zu beachten).
- Die Ergebnisse werden unter Verwendung der Kalibrationskurve mit den für die Proben und Kontrollen erhaltenen Absorptionen bei 450 nm ausgedrückt.
- Die vWF-Konzentration (%) der Probe kann, sofern die Standardverdünnung von 1:50 verwendet wird, direkt von der erhaltenen Kalibrationskurve abgelesen werden.
- Bei Verwendung anderer Verdünnungen muss der erhaltene Wert noch mit dem zusätzlichen Verdünnungsfaktor multipliziert werden.
- Alternativ kann eine ELISA-Software (z.B. Dynex, Biolise o.ä.) für die Berechnung der jeweiligen vWF-Konzentrationen herangezogen werden.
- Für die Kontrollen **CI vWF** und **CII vWF** werden die Konzentrationen direkt von der Kalibrationskurve abgeleitet.
- 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.
- Jegliches Reagenz mit unüblicher Erscheinung oder Anzeichen von Kontamination muss verworfen werden. Jegliche verdächtige Proben oder jene mit Anzeichen für Aktivierung müssen verworfen werden.
- Wird ein Waschschriff nicht korrekt ausgeführt, kann die Negativkontrolle einen hohen Extinktionswert hervorrufen. Ein nicht-spezifische Farbentwicklung zu vermeiden, ist sicherzustellen, dass alle Waschschriffe korrekt ausgeführt werden.

## ERWARTETE BEREICHE:

Die vWF:CBA-Konzentration in humanem Normalplasma beträgt ca. 10 µg/mL. vWF:CBA hat in der Allgemeinbevölkerung einen großen Streubereich, der zwischen 50 und 160% liegt. Der Plasmaspiegel von vWF wird stark beeinflusst durch die ABO-Blutgruppe (bei Typ 0 um 25% verringert), das Geschlecht (bei Frauen höher als bei Männern) und die ethnische Herkunft (niedriger bei Kaukasern). Außerdem korreliert er positiv mit Diabetes und steigt mit dem Alter an.

## TESTEIGENSCHAFTEN:

- Messbereich: Von 0 bis 150%.
- Nachweisgrenze: ≤ 5%.
- Intra-Assay-VK: ≤ 10%.
- Inter-Assay-VK: ≤ 10%.
- Keine Beeinflussung durch Heparine bis zu 2 IE/mL, Bilirubin bis zu 0,5 mg/mL, Hämoglobin bis zu 5 mg/mL und Triglyzeride bis zu 1,25 mg/mL.

## 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. Favalaro EJ. Towards personalized therapy for von Willebrand disease: a future role for recombinant products. Blood Transfus. 2016.
4. Ruggeri Z.M. Von Willebrand factor, platelets and endothelial cells interactions. J.Thromb. Haemost. 2003.
5. Castaman G. et al. Von Willebrand's disease in the year 2003: towards the complete identification of gene defects for correct diagnosis and treatment. Haematologica. 2003.
6. Miller C.H. et al. Measurement of von Willebrand factor activity: relative effects of ABO blood type and race. J Thromb Haemost. 2003.
7. Kamphuisen P.W. et al. Familial clustering of factor VIII and von Willebrand factor levels. Thromb Haemost. 1998.
8. Lip G.Y.H. and Blann A.D. Von Willebrand factor and its relevance to cardiovascular disorders. Br Heart J. 1995.
9. CLSI Document GP44-A4: "Procedures for the handling and processing of blood specimens for common laboratory tests".
10. CLSI Document H21-A5: "Collection, transport, and processing of blood specimens for testing plasma-based coagulation assays and molecular hemostasis assays; approved guideline". 2008.

## SYMBOLE:

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

**SD ELISA** **CD ELISA** **WS ELISA**

H317: Kann allergische Hautreaktionen verursachen