

#### **VERWENDUNGSZWECK:**

Der ZYMUTEST® vWF:CBA ist ein Enzymimmunoassay zur Bestimmung der Kollagenbindungsaktivität (CBA) von humanem von-Willebrand-Faktor (vWF) im Blutplasma oder jeder anderen biologischen Flüssigkeit, in der vWF:CBA quantifiziert werden soll.

#### **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 Waschschriff 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 Waschschriff 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.

#### **PROBENMATERIAL:**

Humanes Citratplasma oder jede andere biologische Flüssigkeit, in der vWF:CBA bestimmt werden soll.

#### **IM KIT ENTHALTENE KOMPONENTEN:**

- **COAT:** ELISA-Mikrotiterplatte, bestehend aus 12 Mikrotiterstreifen zu je 8 Vertiefungen, beschichtet und stabilisiert mit Pferdekollagen vom Typ I und III. Die Platte ist in Gegenwart eines Trockenmittels luftdicht in einem Aluminiumbeutel verpackt.
- **SD:** 2 Flaschen mit je 50 ml **Probenverdünner**, gebrauchsfertig.
- **CaI:** 3 Flaschen humaner **vWF:CBA-Kalibrator**, lyophilisiert. Durch Rekonstitution mit 2,0 ml Probenverdünner erhält man ein 1:50 **vorverdünntes** Kalibrierplasma mit einer vWF:CBA-Konzentration von C%. Diese Konzentration ist chargenabhängig (120-160%) und wird für jede Charge exakt bestimmt.
- **CI:** 1 Flasche humanes **vWF:CBA-Kontrollplasma I (hoch)**, lyophilisiert. Mit 0,5 ml Aqua dest. zu rekonstituieren.
- **CII:** 1 Flasche humanes **vWF:CBA-Kontrollplasma II (niedrig)**, lyophilisiert. Mit 0,5 ml Aqua dest. zu rekonstituieren.

**Anmerkung:** Die vWF:CBA-Konzentration des Kalibrators (CaI) sowie die vWF:CBA-Konzentration und der Akzeptanzbereich der Kontrollplasmen (CI und CII) variieren von Charge zu Charge. Sie werden auf dem Datenblatt, das jeder Testpackung beigelegt ist, exakt angeführt.

- **IC:** 3 Flaschen **anti-(h)-vWF-HRP-Immunkonjugat**. Polyklonaler Kaninchenantikörper, spezifisch für humanen vWF, gekoppelt an Meerrettichperoxidase (HRP), lyophilisiert. Mit 7,5 ml Konjugatverdünner (CD) zu rekonstituieren.
- **CD:** 1 Flasche mit 25 ml **Konjugatverdünner**, gebrauchsfertig.
- **WS:** 1 Flasche mit 50 ml 20-fach konzentrierter **Waschlösung**.
- **TMB:** 1 Flasche mit 25 ml **Peroxidasesubstrat** (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin), versetzt mit Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), gebrauchsfertig.
- **SA:** 1 Flasche mit 6 ml **Stopplösung** (0,45 M Schwefelsäure), gebrauchsfertig.

**Anmerkung:** Zur Testdurchführung dürfen ausschließlich Komponenten aus Testpackungen mit übereinstimmender Chargennummer verwendet werden. Es dürfen keine Reagenzien aus Testpackungen mit unterschiedlichen Chargennummern kombiniert werden.

#### **ERFORDERLICHE MATERIALIEN, DIE NICHT IM KIT ENTHALTEN SIND:**

- 8-Kanal- oder Repletierpipette mit einem Pipettivolumen im Bereich von 50-300 µl.
- Einkanalpipetten mit Pipettivolumina 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.
- Aqua dest.

#### **VORBEREITUNG, LAGERUNG UND STABILITÄT DER REAGENZIEN:**

In der Originalverpackung bei 2-8°C gelagert sind die ungeöffneten Reagenzien bis zum auf dem Etikett gedruckten Verfallsdatum haltbar.

- **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. Zur Lagerung werden nicht benötigte Streifen in Gegenwart des Trockenmittels im originalen Aluminiumbeutel verschlossen und im mitgelieferten Druckverschlussbeutel verpackt. Unter diesen Bedingungen sind die Streifen **4 Wochen bei 2-8°C** haltbar.
- **SD:** Gebrauchsfertig. Nach dem Öffnen kann die Lösung, unter Vermeidung jeglicher Kontamination und Verdunstung, **4 Wochen bei 2-8°C** gelagert werden. Enthält 0,05% Kathon CG.
- **CaI:** Den Inhalt der Flasche mindestens 30 Minuten vor Gebrauch mit **2,0 ml** Probenverdünner (SD) rekonstituieren. Somit erhält man ein **1:50 vorverdünntes** Kalibrierplasma mit einer vWF:CBA-Konzentration von C% (auf dem Datenblatt, das jeder Testpackung beigelegt ist, exakt angeführt). Das rekonstituierte Kalibrierplasma ist **8 Stunden bei Raumtemperatur (18-25°C)** stabil.
- **CI:** Den Inhalt der Flasche mindestens 30 Minuten vor Gebrauch mit **0,5 ml** Aqua dest. rekonstituieren.
- **CII:** Den Inhalt der Flasche mindestens 30 Minuten vor Gebrauch mit **0,5 ml** Aqua dest. rekonstituieren.

**Anmerkung:** Nach Rekonstitution sind die vWF:CBA-Kontrollplasmen (CI und CII) **8 Stunden bei Raumtemperatur (18-25°C), 24 Stunden bei 2-8°C und 1 Monat bei -20°C oder tiefer** stabil.

**Warnhinweis:** Sowohl der vWF:CBA-Kalibrator (CaI) als auch die vWF:CBA-Kontrollplasmen (CI und CII) wurden aus humanem Plasma gewonnen, das mit validierten Methoden auf HIV-Antikörper, HBs-Ag und HCV-Antikörper untersucht und für negativ befunden wurde. Kein Test kann jedoch die Abwesenheit von Infektionserregern mit absoluter Sicherheit garantieren. Sämtliche Produkte biologischen Ursprungs müssen deshalb unter Beachtung aller erforderlichen Vorsichtsmaßnahmen als potenziell infektiös behandelt werden.

- **IC:** Den Inhalt der Flasche mit **7,5 ml** Konjugatverdünner (CD) rekonstituieren und bis zur vollständigen Auflösung vorsichtig schütteln. Das rekonstituierte Konjugat ist **24 Stunden bei Raumtemperatur (18-25°C) und 4 Wochen bei 2-8°C** stabil.
- **CD:** Gebrauchsfertig. Nach dem Öffnen kann die Lösung, unter Vermeidung jeglicher Kontamination und Verdunstung, **4 Wochen bei 2-8°C** gelagert werden. Enthält 0,05% Kathon CG.
- **WS:** Für 15-30 Minuten im Wasserbad **bei 37°C** bis zur vollständigen Auflösung allfälliger Feststoffe inkubieren. Schütteln und das für die Testreihe erforderliche Volumen 1:20 mit Aqua dest. verdünnen. Aus 50 ml Konzentrat lässt sich folglich 1 l verdünnte Waschlösung herstellen. Nach dem Öffnen ist das Konzentrat in der Originalflasche **4 Wochen bei 2-8°C** haltbar. Nach Verdünnung kann die Waschlösung, unter Vermeidung jeglicher Kontamination und Verdunstung, **7 Tage bei 2-8°C** gelagert werden. Enthält 0,05% Kathon CG.
- **TMB:** Gebrauchsfertig. Nach dem Öffnen kann das Substrat, unter Vermeidung jeglicher Kontamination und Verdunstung, **4 Wochen bei 2-8°C** gelagert werden.
- **SA:** Gebrauchsfertig.

**Warnhinweis:** Schwefelsäure (SA) 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.

**Anmerkung:** Die erforderlichen Kitkomponenten müssen mindestens 30 Minuten vor Gebrauch auf Raumtemperatur (18-25°C) gebracht werden. Nicht benötigte Komponenten sind bei 2-8°C zu lagern. Stabilitätsstudien bei 30°C haben gezeigt, dass die Testpackungen ohne Beeinträchtigung der darin enthaltenen Komponenten bei Raumtemperatur (18-25°C) versendet werden können.

#### **TESTDURCHFÜHRUNG:**

##### **Probengewinnung:**

Blut (9 Volumenteile) wird vorsichtig in 0,109 M oder 0,129 M Trinatrium-Citrat als Antikoagulant (1 Volumenteil) abgenommen und für 20 Minuten bei 2.500 g zentrifugiert. Das aus dem Überstand gewonnene Citratplasma muss innerhalb von **8 Stunden** getestet werden. Alternativ kann es für bis zu **6 Monate** bei -20°C oder tiefer gelagert werden. Das gefrorene Plasma muss vor Gebrauch für 15 Minuten bei 37°C aufgetaut und innerhalb von **4 Stunden** getestet werden.

##### **Proben und Kontrollen:**

**Proben und Kontrollen** (CI und CII) müssen zur Testung **1:50** mit Probenverdünner (SD) verdünnt werden. Bei erwarteten vWF:CBA-Konzentrationen von > C% müssen die Proben in höherer Verdünnung (**1:100 oder höher**) getestet werden.

### Kalibrierung:

Unter Verwendung des 1:50 vorverdünnten vWF:CBA-Kalibrators (Ca) mit einer vWF:CBA-Konzentration von C% (auf dem Datenblatt, das jeder Testpackung beigelegt ist, exakt angeführt) werden folgende Kalibrierlösungen hergestellt:

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

Die Kalibrierlösungen werden vorsichtig durchmischt und sind für **8 Stunden bei Raumtemperatur (18-25°C)** stabil.

### Testdurchführung:

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
Leerwert (nur Probenverdünner), Kalibrierlösungen (wie oben hergestellt), Kontrollen (1:50 verdünnt) oder Proben (1:50 verdünnt)	200 µl	In jeweils eine Vertiefung der Mikrotiterstreifen pipettieren. <sup>1</sup>
Für 2 Stunden bei Raumtemperatur (18-25°C) inkubieren. <sup>2</sup>		
Waschlösung (WS), 1:20 mit Aqua dest. verdünnt	300 µl	10 aufeinanderfolgende Waschschrte unter Verwendung eines Waschgeräts. <sup>3</sup>
Anti (h)-vWF-HRP-Immunkonjugat (IC), mit 7,5 ml Konjugatverdünner (CD) rekonstituiert	200 µl	In die einzelnen Vertiefungen hinzupipettieren. <sup>3</sup>
Für 1 Stunde bei Raumtemperatur (18-25°C) inkubieren. <sup>2</sup>		
Waschlösung (WS), 1:20 mit Aqua dest. verdünnt	300 µl	10 aufeinanderfolgende Waschschrte unter Verwendung eines Waschgeräts. <sup>3</sup>
Peroxidasesubstrat (TMB)	200 µl	Unmittelbar nach dem letzten Waschschrte in die einzelnen Vertiefungen hinzupipettieren. <sup>3,4</sup>
Für 15 Minuten bei Raumtemperatur (18-25°C) inkubieren. <sup>2</sup>		
Stopplösung (SA)	50 µl	In die einzelnen Vertiefungen hinzupipettieren, um die Farbreaktion zu stoppen. <sup>4</sup>
Zur Stabilisierung der Farbe für 10 Minuten bei Raumtemperatur (18-25°C) inkubieren und die Absorption bei 450 nm (A <sub>450</sub> ) messen. <sup>2,5</sup> Jeweils den Leerwert subtrahieren.		

### Anmerkungen:

- Um eine homogene immunologische Reaktion bei der Bindung von vWF an Kollagen zu gewährleisten müssen die Kalibrierlösungen, Kontrollen und Proben so rasch wie möglich und jedenfalls innerhalb von 10 Minuten in die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen pipettiert werden. Ein zu großer Zeitunterschied bei der Zugabe der Reagenzien in die einzelnen Vertiefungen kann sich auf die Bindungskinetik auswirken und zu falschen Ergebnissen führen.
- Die Testansätze sollten während der Inkubationen und besonders während der Farbentwicklung vor direkter Sonneneinstrahlung geschützt werden. Es empfiehlt sich die Verwendung eines Mikrotiterplattenschüttlers.
- Im Zuge der Entfernung der Waschlösung nach jedem einzelnen Waschschrte 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. Der Mikrotiterplattenwascher muss so eingestellt sein, dass die Platten schonend gewaschen werden und ein abruptes Entfernen der Waschlösung vermieden wird. Jeder einzelne der jeweils 10 aufeinanderfolgenden Waschschrte muss strikt eingehalten werden, um eine optimale Leistungsfähigkeit des Kits zu gewährleisten.
- Die Zugabe des Peroxidasesubstrats von Reihe zu Reihe muss in genau definierten Zeitabständen erfolgen. Diese Zeitabstände müssen bei der anschließenden Zugabe der Stopplösung genau eingehalten werden.
- Bei bichromatischen Messungen kann eine Referenzwellenlänge von 620 oder 690 nm verwendet werden.

### ERGEBNISDARSTELLUNG:

- Zur Erstellung der Kalibrierkurve werden die berechneten vWF:CBA-Konzentrationen (%) der einzelnen Kalibrierlösungen auf der x-Achse gegen die bei 450 nm jeweils ermittelten Absorptionen (A<sub>450</sub>) auf der y-Achse aufgetragen.
- Von der ermittelten Kurve kann man anhand der für die Proben und Kontrollen gemessenen A<sub>450</sub>-Werte auf die jeweiligen vWF:CBA-Konzentrationen schließen.

Würden die Proben anders als 1:50 verdünnt, muss der errechnete Wert unter Berücksichtigung des abweichenden Verdünnungsfaktors D mit D:50 multipliziert werden (z.B. mit 100:50 = 2 bei einer Verdünnung von 1:100), um die tatsächliche vWF:CBA-Konzentration der Probe zu erhalten.

- Alternativ kann eine ELISA-Software (z.B. Dynex, Biolise o.ä.) für die Berechnung der jeweiligen vWF:CBA-Konzentrationen herangezogen werden.

### ERWARTETE BEREICHE:

Die vWF:CBA-Konzentration in humanem Normalplasma schwankt im Bereich von 50-160%. 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 Rasse (niedriger bei Kaukasiern). Außerdem korreliert er positiv mit Diabetes und steigt mit dem Alter an.

### BIOCHEMISCHE EIGENSCHAFTEN:

Die vWF-Konzentration in normalem humanem Plasma beträgt ca. 10 µg/mol. Plasmatischer vWF ist ein multimeres Glykoprotein mit einem hohen Molekulargewicht im Bereich von 1 bis 20 MDa. Das Multimer besteht aus identischen, durch Disulfidbrücken verbundenen Untereinheiten von je etwa 280 kDa, die in Endothelzellen und Megakaryozyten synthetisiert werden. Nach einer komplexen Prozessierung werden die Moleküle ins Blut sezerniert und sind in Plasma, Thrombozyten, Endothelzellen und in der subendothelien Matrix der Gefäßwand nachweisbar.

vWF spielt eine Schlüsselrolle im Gerinnungsprozess. Bei Blutgefäßverletzungen vermitteln besonders die größeren Multimere die Adhäsion der Thrombozyten an subendotheliales Bindegewebe und unterstützen, wenn auch in geringerem Ausmaß, auch die Thrombozytenaggregation. vWF dient zudem als plasmatisches Transportprotein für Faktor VIII:C und stabilisiert dadurch dessen prokoagulatorische Aktivität.

### PATHOLOGISCHE VERÄNDERUNGEN:

Mit einer Prävalenz von etwa 1% in der Allgemeinbevölkerung ist das von-Willebrand-Syndrom (vWS) die am häufigsten autosomal vererbte Blutungsstörung. vWS tritt sowohl bei Männern als auch bei Frauen auf und äußert sich in stark unterschiedlichen Ausprägungen, die man in der Regel in 3 Subtypen einteilt:

- Typ I (70-80% aller Fälle): Mittelmäßiger, quantitativer Mangel an vWF (15-50%), verläuft asymptomatisch oder mit leichten Blutungssymptomen (Schleimhautblutungen).
- Typ II (15-20% der Fälle): Qualitative Abweichungen des vWF (2A, 2B, 2M), großteils assoziiert mit dem Mangel an hochmolekularen Multimeren. Leichte bis starke Blutungssymptome.
- Typ III (1-5% der Fälle): Schwerwiegende Blutungssymptome aufgrund eines extremen Mangels an vWF.

Aufgrund der großen Streuung der vWF-Spiegel innerhalb der Allgemeinbevölkerung und der verschiedenen pathologischen Zustände ist für die Diagnose von vWS eine umfassende Untersuchung des Patienten erforderlich. Diese kombiniert die Testung von mindestens drei verschiedenen Parametern: FVIII:C-Aktivität, vWF-Antigen und vWF-Aktivität, unter Berücksichtigung der ABO-Blutgruppe und des familiären Kontextes.

Der vWF:CBA-Test, der auf der Fähigkeit der vWF-Multimere zur Bindung an Kollagen basiert, ist ein nützlicher Test zur Erfassung der physiologischen Aktivität des vWF und somit zur genaueren Charakterisierung des vWS-Typs.

### ANWENDUNGEN:

- Diagnose des von-Willebrand-Syndroms.
- Messung von vWF:CBA in klinischen Proben als ein Indikator für (kardiovaskuläre) Erkrankungen.

### TESTEIGENSCHAFTEN:

- Messbereich: Von 0 bis etwa 150%.
- Nachweisgrenze: ≤ 5%.
- Intra-Assay-VK: <10%.
- Inter-Assay-VK: <10%.
- Referenzmaterial: Internationaler Standard für vWF.

### WEITERFÜHRENDE LITERATUR:

- Ruggeri (2003). Von Willebrand factor, platelets and endothelial cells interactions, *J. Thromb. Haemost.*, 1, 1335-42.
- Mannucci *et al.* (2003). Von Willebrand's disease in the year 2003: Toward the complete identification of gene defects for correct diagnosis and treatment, *Haematologica*, 88, 91-108.
- Evatt *et al.* (2003). Measurement of von Willebrand factor activity: Relative effects of ABO blood type and race, *J. Thromb. Haemost.*, 10, 2197.
- Rosendaal *et al.* (1998). Familial clustering of factor VIII and von Willebrand factors levels, *J. Thromb. Haemost.*, 79, 323-7.
- Lip & Blann (1995). Von Willebrand factor and its relevance to cardiovascular disorders, *Br. Heart J.*, 74, 580-3.
- Wu *et al.* (1993). Associations of factor VIII and von Willebrand factor with age, race, sex and risk factors for atherosclerosis, *J. Thromb. Haemost.*, 70.
- Favaloro (2000). Collagen Binding assay for von Willebrand Factors (vWF:CBA): Detection of von Willebrand Disease (vWD), and discrimination of vWF subtypes depends on collagen source, *J. Thromb. Haemost.*, 83, 127-35.