



ZYMUTEST vWF

ARK030A

(Complete ELISA kit for measuring von Willebrand Factor)

For in vitro diagnostic use only



Manufactured by Hyphen BioMed.

Last revision: 20/03/2008

INTENDED USE:

The ZYMUTEST vWF kit is an enzyme-immuno-assay for measuring human von Willebrand Factor (vWF) in plasma, or in any fluid where vWF can be present.

ASSAY PRINCIPLE:

In a first step, the diluted tested plasma or biological fluid is introduced into a microwell coated with a polyclonal antibody specific for human vWF. When present, this protein is captured onto the solid phase. Following a washing step, the immunoconjugate, which is a polyclonal antibody coupled to horse radish peroxidase (HRP), is introduced, and binds to free epitopes of immobilized vWF. Following a washing step, the peroxidase substrate, 3,3',5,5' - Tetramethylbenzidine (TMB), in presence of hydrogen peroxide (H₂O₂), is introduced and a blue colour develops. When the reaction is stopped with Sulfuric Acid, a yellow colour is obtained. The amount of colour developed is directly proportional to the concentration of human vWF in the tested sample.

TEST SAMPLE:

- Trisodium Citrate or Na₂ EDTA anticoagulated human plasma.
- Any biological fluid where vWF must be measured.

REAGENTS:

1. **COAT:** Micro ELISA plate, containing 12 strips of 8 wells, coated with a rabbit polyclonal antibody specific for human vWF, then stabilised; the plate is packed in an aluminium pouch hermetically sealed in presence of a desiccant.
2. **SD:** 2 vials containing 50ml of **Sample Diluent**, ready to use.
3. **Cal:** 3 vials of **vWF Calibrator**, lyophilised. When restored with 2 ml of Sample Diluent, a plasma containing a concentration "C" (expressed in %) of human vWF is obtained. This concentration (in the range 120-160% according to the lot), established by reference to the NIBSC international standard, is accurately determined for each lot.
4. **CI:** 1 vial containing 0.5 ml of lyophilised **vWF Plasma Control I (High)** (human plasma).
5. **CIII:** 1 vial containing 0.5 ml of lyophilised **vWF Plasma Control II (Low)** (human plasma).

Note: The vWF concentrations and acceptancy ranges for control plasma I and II, and calibrator, can vary from lot to lot, but are precisely indicated for each lot on the flyer provided in the kit.

6. **IC:** 3 vials of **Anti-(h)-vWF-HRP immunoconjugate**, a polyclonal rabbit antibody specific for human vWF, coupled to Horse-Radish-Peroxidase (HRP), lyophilised.
7. **CD:** 1 vial of 25 ml of **Conjugate Diluent**, ready to use.
8. **WS:** 1 vial of 50 ml of 20 fold concentrated **Wash Solution**.
9. **TMB:** 1 vial of 25 ml peroxidase substrate: 3,3',5,5' - **Tetramethylbenzidine** containing hydrogen peroxide. Ready to use.
10. **SA:** 1 vial of 6 ml of 0.45M **Sulfuric acid (Stop solution)**. Ready to use.

Note: Use only components from a same lot of kits. Do not mix components from different lots of kits, when running the assay.

REAGENTS AND EQUIPMENT REQUIRED BUT NOT PROVIDED:

- 8-channel or repeating pipette allowing dispensing 50-300 µl.
- 1-channel pipettes at variable volumes from 0 to 20 µl, 20 to 200 µl and 200 to 1000 µl.
- Micro ELISA plate washing equipment and shaker.
- Micro ELISA plate reader with a wavelength set up at 450 nm.
- Distilled water.

REAGENTS PREPARATION, STORAGE AND STABILITY:

In their original packaging box, before use, when stored at 2-8°C, the unopened reagents are stable until the expiration date printed on the box.

1. **Micro ELISA plate (COAT):** open the plastic pouch and take off the required amount of 8 well strips for the test series to be performed. When out of the pouch, the strips

must be used within 30 minutes. Unused strips can be stored at 2-8°C for 4 weeks in their original aluminium pouch, in presence of the desiccant, hermetically closed and protected from any moisture, and stored in the provided microplate storage bag (minigrip).

2. **Sample Diluent (SD):** It is ready to use. When open, it can be used for 4 weeks, stored at 2-8 °C, and provided that any bacterial contamination is avoided during use. This reagent contains 0.05% Kathon CG.
3. **vWF Calibrator (CaI):** restore each vial with 2 ml of Sample Diluent (at least 30 minutes before use) in order to obtain a plasma containing the vWF concentration "C", already diluted 1:50 (fifty fold). This solution is stable for at least 8 hours at room temperature.
4. **vWF Plasma Control I (High) (CI):** restore with 0.5 ml distilled water (at least 30 minutes before use).
5. **vWF Plasma Control II (Low)(CIII):** restore with 0.5 ml distilled water (at least 30 minutes before use).

Note: When restored, vWF control plasma I and II are stable for 8 hours at room temperature (18-25°C), or 24 hours at 2-8°C, or 1 month frozen at -20°C or below.

Warning: Plasma vWF calibrator (3) and controls (4&5) are prepared with normal human plasma. This latter was tested with registered methods and found negative for HIV antibodies, HBs Ag and HVC antibodies. However, no assay may warrant the total absence of infectious agents. Any product of human origin must then be handled with all the required cautions, as being potentially infectious.

6. **Anti-(h)-vWF-HRP immunoconjugate (IC):** each vial must be restored with 7.5 ml of **Conjugate Diluent**. Let the pellet to be completely dissolved before use, and shake the vial gently in order to homogenize the content. The restored conjugate is stable for at least 24 hours at room temperature or for at least 4 weeks at 2-8°C.
7. **Conjugate Diluent (CD):** It is ready to use. When open, it can be used for 4 weeks, stored at 2-8 °C, and provided that any bacterial contamination is avoided during use. This reagent contains 0.05% Kathon CG.
8. **Wash Solution (WS):** Incubate the vial for 15-30 minutes in a water bath at 37°C until complete dissolution of solids, when present. Shake the vial and dilute the amount required 1:20 in distilled water (the 50 ml contained in the vial allow preparing 1 liter of Wash Solution). The Wash Solution must be stored at 2-8°C in its original vial and used within 4 weeks following opening. The diluted Wash Solution must be used within 7 days, when protected from any contamination and stored at 2-8°C. This reagent contains 0.05% Kathon CG.
9. **TMB substrate (TMB):** It is ready to use. When open, it can be used for 4 weeks, stored at 2-8°C, and provided that any bacterial contamination is avoided during use.
10. **Stop solution (SA):** It is ready to use.

Cautions: Sulfuric acid, although diluted to 0.45M is caustic. As for any similar chemical, handle Sulfuric acid with great care. Avoid any skin and eye contact. Wear protection glasses and gloves when handling.

Note: Bring the kit at room temperature, at least 30 min. before use. Store the unused reagents at 2-8°C.

The stability studies performed at 30°C show that the reagents keep their performances and can be shipped at room temperature without any damage.

PROCEDURE:

Specimen collection:

Blood (9 vol.) must be collected on 0.109M citrate anticoagulant (1 vol.) by a clean venipuncture; plasma supernatant is decanted following a 20 min. centrifugation at 2,500 g; citrated plasma must be tested **within 8 hours** or stored frozen at -20°C or below for up to 6 months, and thawed for 15 min. at 37°C just before use. Thawed specimen must be tested within 4 hours.

EDTA collected human plasma can also be used. Conditions of storage are the same than those for citrated plasma.

Tested plasma or sample or controls:

The sample must be tested diluted **fifty fold (1:50)** in the Sample diluent. For expected vWF concentrations above "C"%, plasma or samples must be tested at a higher dilution, 1:100 (D=100), or more.

Controls I and II must be tested diluted **fifty fold (1:50)**, with Sample Diluent.

D.750.02/ZY/030A



6580 Gove Court • Mason, OH 45040

Phone: 513.770.1991

Toll Free: 866.783.3797

Fax: 513.573.9241

Email: info@aniara.com

www.aniara.com

Calibration:

Using the vWF Calibrator, with a vWF concentration "C" (in the range 120-160%), provided in the kit, prepare the following standard solutions.

vWF concentration (%)	C	C/2	C/4	C/10	C/20	0
Vol. of vWF Calibrator	1 ml	0.5 ml	0.25 ml	0.1 ml	0.05 ml	0 ml
Vol. of Sample Diluent	0 ml	0.5 ml	0.75 ml	0.9 ml	0.95 ml	1 ml

Mix gently for a complete homogenisation.

The standard dilutions are stable for at least **6 hours** at room temperature.

Assay procedure:

Remove the required number of strips from the aluminium pouch, for the series of measures to be performed. Then put the strips in the frame provided. In the different wells of the micro ELISA plate introduce the reagents and perform the various assay steps as indicated on the following table:

Reagent	Volume	Procedure
vWF standards (1:1) or tested sample or controls diluted 1:50 or Sample Diluent (blank)	200 µl	Introduce the standard solutions or the tested samples in the corresponding micro ELISA plate well (a).
Incubate for 2 hours at room temperature (18-25°C) (b)		
Wash Solution (20 fold diluted in distilled water)	300 µl	Proceed to 5 successive washings using the washing instrument (c).
Anti-(h)-vWF-HRP conjugate (restored with 7.5 ml of Conjugate Diluent)	200 µl	Introduce the Anti-(h)-vWF - HRP immunoconjugate in the micro ELISA plate wells (c).
Incubate for 1 hour at room temperature (18-25°C) (b)		
Wash Solution (20 fold diluted in distilled water)	300 µl	Proceed to 5 successive washings using the washing instrument (c).
TMB/H ₂ O ₂ Substrate	200 µl	Immediately after the washing, introduce the substrate into the wells. Note: The substrate distribution, row by row, must be accurate and at exact time intervals (c, d).
Incubate for exactly 5 minutes at room temperature (18-25 °C) (b)		
0.45M Sulfuric Acid	50 µl	Following exactly the same time intervals than for the addition of substrate, stop the colour development by introducing the 0.45M sulfuric acid (d).
Wait for 10 minutes in order to allow the colour to stabilize and measure absorbance at 450 nm (A450) (e). Subtract the blank values		

Note:

- Distribute calibrators, controls and tested specimen as rapidly as possible (within 10 minutes), in order to obtain an homogeneous immunological kinetics for vWF binding. A too long delay between the distribution of the first and the last wells may induce an influence of immunological kinetics and produce wrong results.
- Avoid letting the plate in the bright sunlight during incubations and more particularly during colour development. A micro-ELISA plate shaker can be used.
- Never let the plates empty between the addition of the reagents or following the washing step. The next reagent must be added within 3 minutes, in order to prevent the plate from drying, which could damage the immobilized components. If necessary, keep the plate filled with Wash Solution and empty it just before the introduction of the next reagent. The washing instrument must be adjusted in order to wash the plates gently, and to avoid a too drastic emptying, which could lower plate reactivity.
- For addition of the TMB substrate, the time interval between each row must be accurate and exactly determined. It must be the same when stopping the reaction.
- For bichromatic readings, a reference wavelength at 690 nm or at 620 nm can be used.

EXPRESSION OF RESULTS:

- On a linear graph paper plot the vWF concentrations, in %, on abscissa and the corresponding absorbances (A450) on ordinates, in order to establish the calibration curve.
- Users must construct their own calibration curve, obtained using their standard dilutions. From the curve obtained, deduce directly the vWF concentration for the tested sample. For obtaining the vWF concentration in a sample tested at a higher dilution, this value must be multiplied by D:50 (i.e. x2 for D=100...) (See model on the flyer).
- For controls I and II, the concentrations are directly deduced from the calibration curve.
- Alternatively, an ELISA software (i.e. Dynex, Biolise, etc...) can be used for the calculation of concentrations.

EXPECTED RANGE:

- The vWF concentration in normal human plasma is of about 10 µg/ml. It presents a large distribution (from 50 to 160%) in the general population.
- Plasma vWF level is highly influenced by the ABO histo group (decreased of about 25% in type O subjects), the gender (vWF is higher in women than in men), and the ethnic origin (vWF is lower in Caucasians). vWF is positively associated with diabetes, and it increases with age.

BIOCHEMISTRY:

- Plasma von Willebrand factor (vWF) is a high molecular weight (MW), multimeric glycoprotein (MW ranging from 1,000 to 20,000KD), composed of identical disulfide-linked subunits (of about 280KD), synthesized by endothelial cells and megakaryocytes. After a complex processing, the molecule is released in blood, and is present both in plasma and in platelets, as well as in endothelial cells and subendothelial matrix of the vessel wall.
- Especially the higher molecular forms mediate platelet adhesion to subendothelial connective tissue following vascular injury and support platelet aggregation to a lesser extent. vWF is also a carrier protein in plasma for FVIII:C, stabilizing its coagulant activity, and therefore playing a key role in the coagulation process.

PATHOLOGICAL VARIATIONS:

Von Willebrand disease (vWD) is the most commonly inherited (autosomally) bleeding disorder, present at about 1% in the general population. It may affect males and females. The disease presents very heterogeneous manifestations, usually classified in 3 major subtypes:

- Type I vWD (about 70 to 80% of cases): quantitative and moderate deficiency in vWF (15 to 50% of normal); asymptomatic or mild bleeding symptoms (mucocutaneous bleeding).
- Type II vWD (about 15 to 20% of cases): qualitative abnormalities of vWF (2A, 2B, 2M), mostly associated with high MW multimers deficiency. Patients present mild to severe bleeding manifestations.
- Type III vWD (about 1 to 5% of cases): severe hemorrhagic disorders, in which plasma vWF is severely reduced or absent from plasma and platelets.

Considering the heterogeneity of vWF concentration in the normal population, and in clinical manifestations, a complete biological study is necessary for vWD diagnosis, combining the assay of at least 3 parameters: FVIII:C activity, vWF activity and vWF antigen assay, and with regards to the ABO group and the familial context.

- Recent epidemiological studies have demonstrated an association between elevated vWF concentrations and an increased risk of cardiovascular diseases (atherosclerosis, thrombosis, ischaemia...).
- Assay of vWF:Ag is then of predictive value for cardiovascular pathology and follow-up of disease evolution or treatment.

APPLICATIONS:

- Diagnosis of von Willebrand disease (vWD).
- Assay of vWF in clinical samples, as a disease marker or as indicator for cardiovascular diseases.
- Auto-antibodies to vWF (malignancy).

ASSAY CHARACTERISTICS:

- Dynamic range: 0 to about 150%.
- Detection threshold ≤ 5%.
- Intra-assay CV: 3-8%.
- Inter-assay CV: 5-10%.
- No significant interference of heparin up to 2 IU/ml, of bilirubin up to 0.05 mg/ml and of haemoglobin up to 10 mg/ml.

REFERENCES:

- "Von Willebrand factor, platelets and endothelial cells interactions", Ruggeri, *J. Thromb. Haemost.*, Vol 1, No 7, 1335-1342, 2003.
- "Assays of von Willebrand Factor Antigen and Ristocetin Cofactor Activity; Approved Guideline", National Committee for Clinical Laboratory Standards, *NCCLS Document* H51-A, Vol 22, No 20.
- "Von Willebrand's disease in the year 2003: towards the complete identification of gene defects for correct diagnosis and treatment", Mannucci & al., *Haematologica*, Vol 88, No 1, 94-108, 2003.
- "Measurement of von Willebrand factor activity: relative effects of ABO blood type and race", Evatt & al., *J Thromb Haemost*, Vol 1, No 10, 2191-7, 2003.
- "Familial clustering of factor VIII and von Willebrand factor levels", Rosendaal & al., *Thromb Haemost*, Vol 79, No 2, 323-7, 1998.
- "Von Willebrand factor and its relevance to cardiovascular disorders", Lip, Blann, *Br Heart J*, Vol 74, No 6, 580-3, 1995.
- "Associations of factor VIII and von Willebrand factor with age, race, sex, and risk factors for atherosclerosis. The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study", Wu & al., *Thromb Haemost*, Vol 70, N° 3, 380-5, 1993.



ZYMUTEST vWF

Ref. ARK030A

(Kit completo para ELISA para la determinación de factor de von Willebrand)

Para uso exclusivo en diagnóstico *in vitro*.



Fabricado por: HYPHEN BioMed

Última revisión: 20/03/2008

USO PREVISTO:

El kit ZYMUTEST vWF es un ensayo inmunoenzimático para la determinación del factor de von Willebrand (vWF) en plasma, o en cualquier líquido en el que el vWF pueda estar presente.

PRINCIPIO DEL ENSAYO:

En una primera etapa, se introduce el plasma analizado diluido o el líquido biológico en un micropocillo recubierto con un anticuerpo policlonal específico de vWF humano. Cuando está presente, esta proteína es capturada en la fase sólida. Después de una etapa de lavado, se introduce el inmunoconjugado, que es un anticuerpo policlonal unido a peroxidasa de rábano (HRP), y se une a epítopos libres de vWF inmovilizado. Después de una etapa de lavado, se añade el sustrato de peroxidasa, 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) en presencia de peróxido de hidrógeno (H₂O₂), y aparece un color azul. Cuando se detiene la reacción con ácido sulfúrico, se obtiene un color amarillo. La intensidad del color obtenido es directamente proporcional a la concentración de vWF humano en la muestra analizada.

MUESTRA ANALIZADA:

- Plasma humano anticoagulado con EDTA-Na₂ o citrato trisódico.
- Cualquier líquido biológico en el que deba medirse el vWF.

REACTIVOS:

- RECUBRIMIENTO (COAT):** microplaca de ELISA, con 12 tiras de 8 pocillos, recubierta con un anticuerpo policlonal de conejo específico de vWF humano, y luego estabilizada. La placa se suministra envasada en una bolsa de aluminio herméticamente sellada que contiene desecante.
- DM (SD):** 2 viales con 50 ml de **diluyente de muestras**, listo para usar.
- Cal:** 3 viales de **calibrador de vWF**, liofilizados. Una vez reconstituidos con 2 ml del diluyente de muestras, se obtiene un plasma que contiene una concentración "C" (expresada en %) de vWF humano. Esta concentración (en el intervalo de 120-160% según el lote), establecida tomando como referencia el estándar internacional del NIBSC, se determina con exactitud para cada lote.
- CI:** 1 vial con 0,5 ml de **control I plasmático de vWF (alto)** liofilizado (plasma humano).
- CII:** 1 vial con 0,5 ml de **control II plasmático de vWF (bajo)** liofilizado (plasma humano).

Nota: las concentraciones de vWF y los intervalos de aceptación de los controles I y II plasmáticos y del calibrador pueden variar entre lotes, pero se indican con precisión para cada lote en el folleto suministrado con el kit.

- IC:** 3 viales de **inmunoconjugado de HRP-anticuerpo anti-vWF(h)**, un anticuerpo policlonal de conejo específico de vWF humano unido a HRP, liofilizado.
- DC (CD):** 1 vial de 25 ml de **diluyente de conjugado**, listo para usar.
- SL (WS):** 1 vial de 50 ml de **solución de lavado** concentrada 1:20.
- TMB:** 1 vial de 25 ml de sustrato de peroxidasa: **3,3',5,5'-tetrametilbencidina** con peróxido de hidrógeno, listo para usar.
- AS (SA):** 1 vial de 6 ml de **ácido sulfúrico 0,45 M (solución de parada)**, listo para usar.

Nota: solo deben utilizarse componentes de un mismo lote de kits. No mezclar componentes de diferentes lotes de kits para realizar el ensayo.

REACTIVOS Y EQUIPO NECESARIOS NO SUMINISTRADOS:

- **Pipeta de 8 canales** o de repetición para dispensar 50-300 µl.
- **Pipetas de 1 canal** a volúmenes variables de 0 a 20 µl, de 20 a 200 µl y de 200 a 1.000 µl.
- Equipo de lavado y agitador para **microplacas de ELISA**.
- **Lector** de microplacas de ELISA con una longitud de onda establecida en 450 nm.
- Agua destilada.

PREPARACIÓN, ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD DE LOS REACTIVOS:

Los reactivos sin abrir, en el embalaje original, antes del uso y almacenados a 2-8 °C, son estables hasta la fecha de caducidad impresa en la caja.

- Microplaca de ELISA (RECUBRIMIENTO):** abrir la bolsa de plástico y sacar la cantidad de tiras de 8 pocillos necesaria para la serie de pruebas que se desea realizar. Una vez fuera de la bolsa, las tiras deben utilizarse en un plazo de 30 minutos. Las tiras no utilizadas pueden almacenarse a 2-8 °C durante 4 semanas en la bolsa de aluminio original, que debe contener desecante, estar herméticamente

cerrada y protegida de la humedad, y almacenarse en la bolsa de almacenamiento de microplaca suministrada (Minigrip).

- Diluyente de muestras :** está listo para usar. Una vez abierto, puede utilizarse durante **4 semanas**, almacenado a **2-8 °C**, siempre que se evite cualquier contaminación bacteriana durante el uso. Este reactivo contiene Kathon CG al 0,05%.
- Calibrador de vWF (Cal):** reconstituir cada vial con **2 ml** de diluyente de muestras (al menos 30 minutos antes del uso) para obtener un plasma que contenga una concentración "C" de vWF, ya diluido 1:50. Esta solución es estable durante al menos **8 horas** a temperatura ambiente.
- Control I plasmático de vWF (alto) (CI):** reconstituir con **0,5 ml** de agua destilada (al menos 30 minutos antes del uso).
- Control II plasmático de vWF (bajo) (CII):** reconstituir con **0,5 ml** de agua destilada (al menos 30 minutos antes del uso).

Nota: una vez reconstituidos, los controles I y II plasmáticos de vWF son estables durante **8 horas** a temperatura ambiente (**18-25 °C**), **24 horas** a **2-8 °C** o **1 mes** congelados a una temperatura de **-20 °C** o inferior.

Advertencia: el calibrador de vWF plasmático (3) y los controles (4 y 5) se preparan con plasma humano normal. Este último se ha analizado con métodos aprobados para la detección de anticuerpos anti-VIH y anti-VHC y de antígeno HBsAg, y ha dado negativo. Sin embargo, no existe ninguna prueba que pueda excluir por completo la presencia de agentes infecciosos. Cualquier producto de origen humano debe manipularse con todas las precauciones necesarias, como si fuera potencialmente infeccioso.

- Inmunoconjugado de HRP-anticuerpo anti-vWF(h) (IC):** cada vial debe reconstituirse con **7,5 ml** de **diluyente de conjugado**. Dejar que el sedimento se disuelva por completo antes del uso, y agitar el vial suavemente para homogeneizar el contenido. El conjugado reconstituido es estable durante al menos **24 horas** a temperatura ambiente o durante al menos **4 semanas** a **2-8 °C**.
- Diluyente de conjugado (DC):** está listo para usar. Una vez abierto, puede utilizarse durante **4 semanas**, almacenado a **2-8 °C**, siempre que se evite cualquier contaminación bacteriana durante el uso. Este reactivo contiene Kathon CG al 0,05%.
- Solución de lavado (SL):** incubar el vial durante 15-30 minutos en un baño María a **37 °C** hasta la completa disolución de los sólidos, cuando están presentes. Agitar el vial y diluir la cantidad necesaria en proporción 1:20 en agua destilada (los 50 ml contenidos en el vial permiten preparar 1 litro de solución de lavado). La solución de lavado debe almacenarse a **2-8 °C** en su vial original y utilizarse en las **4 semanas** posteriores a su apertura. La solución de lavado diluida debe usarse antes de **7 días**, si se protege de cualquier contaminación, y almacenarse a **2-8 °C**. Este reactivo contiene Kathon CG al 0,05%.
- Sustrato TMB (TMB):** está listo para usar. Una vez abierto, puede utilizarse durante **4 semanas**, almacenado a **2-8 °C**, siempre que se evite cualquier contaminación bacteriana durante el uso.
- Solución de parada (AS):** está listo para usar.

Precauciones: el ácido sulfúrico, aunque diluido a 0,45 M, es cáustico. Al igual que con cualquier sustancia química parecida, el ácido sulfúrico debe manipularse con sumo cuidado. Evitar cualquier contacto con la piel y los ojos. Llevar gafas y guantes de protección durante la manipulación.

Nota: dejar que el kit alcance la temperatura ambiente, al menos 30 minutos antes del uso. Almacenar los reactivos no utilizados a 2-8 °C.

Los estudios de estabilidad realizados a 30 °C muestran que los reactivos mantienen su rendimiento y pueden ser transportados a temperatura ambiente sin sufrir daños.

PROCEDIMIENTO:

Obtención de muestras:

La sangre debe recogerse en un recipiente con anticoagulante citrato 0,109 M (en proporción 9:1) mediante venopunción aseptica; tras una centrifugación de 20 minutos a 2.500 g, se decanta el plasma sobrenadante; el plasma citratado debe analizarse en un **plazo de 8 horas** o almacenarse congelado a una temperatura de **-20 °C** o inferior durante un período de hasta 6 meses, y descongelarse durante 15 minutos a 37 °C justo antes del uso. La muestra descongelada debe analizarse antes de **4 horas**. También puede utilizarse plasma humano obtenido con EDTA. Las condiciones de almacenamiento son las mismas que para el plasma citratado.

Plasma, muestra o controles analizados:

La muestra debe analizarse diluida en **proporción 1:50** en el diluyente de muestras. Para concentraciones previstas de vWF superiores a "C%", el plasma o las muestras deben analizarse a una dilución más alta (**1:100 [D=100] o superior**).

D.750.21/ZY/030A



8560 Gove Court • Mason, OH 45040

Phone: 513.770.1991

Toll Free: 866.783.3797

Fax: 513.573.9241

Email: info@aniara.com

www.aniara.com

Los **controles I y II** deben analizarse diluidos en proporción **1:50** en el diluyente de muestras.

Calibración:

Utilizando el **calibrador de vWF** suministrado con el kit, con una concentración "C" de vWF (en el intervalo de 120-160%), preparar las soluciones estándar siguientes:

Concentración de vWF (%)	C	C/2	C/4	C/10	C/20	0
Volumen de calibrador de vWF	1 ml	0,5 ml	0,25 ml	0,1 ml	0,05 ml	0 ml
Volumen de diluyente de muestras	0 ml	0,5 ml	0,75 ml	0,9 ml	0,95 ml	1 ml

Mezclar suavemente para una homogeneización completa.

Las diluciones estándar son estables durante al menos **6 horas** a temperatura ambiente.

Procedimiento de ensayo:

Extraer de la bolsa de aluminio el número de tiras necesarias para la serie de determinaciones que deben realizarse. A continuación, colocar las tiras en el soporte suministrado. Introducir los reactivos en los diferentes pocillos de la microplaca de ELISA y llevar a cabo las distintas etapas del ensayo según se indica en la tabla siguiente:

Reactivo	Volumen	Procedimiento
Estándares de vWF (1:1), muestra analizada, controles diluidos 1:50 o diluyente de muestras (blanco)	200 µl	Introducir las soluciones estándar o las muestras analizadas en el pocillo correspondiente de la microplaca de ELISA (a).
Incubar durante 2 hora a temperatura ambiente (18-25 °C) (b).		
Solución de lavado (diluida 1:20 en agua destilada)	300 µl	Realizar 5 lavados sucesivos utilizando el equipo de lavado (c).
Conjugado de HRP-anticuerpo anti-vWF(h) (reconstituido con 7,5 ml de diluyente de conjugado)	200 µl	Introducir el inmunconjugado de HRP-anticuerpo anti-vWF(h) en los pocillos de la microplaca de ELISA (c).
Incubar durante 1 hora a temperatura ambiente (18-25 °C) (b).		
Solución de lavado (diluida 1:20 en agua destilada)	300 µl	Realizar 5 lavados sucesivos utilizando el equipo de lavado (c).
Sustrato TMB/H₂O₂	200 µl	Inmediatamente después del lavado, introducir el sustrato en los pocillos. Nota: la distribución del sustrato, fila a fila, debe ser precisa y a intervalos temporales exactos (c, d).
Incubar durante 5 minutos exactos a temperatura ambiente (18-25 °C) (b).		
Ácido sulfúrico 0,45 M	50 µl	Siguiendo exactamente los mismos intervalos de tiempo que para la adición de sustrato, detener la formación de color añadiendo el ácido sulfúrico 0,45 M (d) .
Esperar durante 10 minutos para permitir que el color se establezca y medir la absorbancia a 450 nm (A450) (e) . Restar los valores del blanco.		

Nota:

- Distribuir los calibradores, los controles y la muestra analizada lo más rápido posible (en 10 minutos) con el fin de obtener una cinética inmunológica homogénea para la unión de vWF. Una demora demasiado larga entre la distribución de los primeros y los últimos pocillos puede dar lugar a una influencia de la cinética inmunológica y producir resultados erróneos.
- Evitar exponer la placa a la luz solar directa durante las incubaciones, y especialmente durante la aparición del color. Puede utilizarse un agitador para microplacas de ELISA.
- No dejar nunca las placas vacías entre la adición de los reactivos o después de la etapa de lavado. El siguiente reactivo debe añadirse antes de 3 minutos para evitar que la placa se seque, lo que podría dañar los componentes inmovilizados. En caso necesario, llenar la placa con solución de lavado y vaciarla justo antes de introducir el siguiente reactivo. El equipo de lavado debe ajustarse para proporcionar un lavado suave de las placas y evitar un vaciado demasiado brusco, lo que podría disminuir la reactividad de la placa.
- Para la adición del sustrato TMB, el intervalo de tiempo entre cada fila debe ser preciso y determinarse con exactitud. Debe procederse del mismo modo al parar la reacción.
- En caso de lecturas bicromáticas, puede utilizarse una longitud de onda de referencia a 690 nm o a 620 nm.

EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS:

- En un papel milimetrado, representar gráficamente las concentraciones de vWF (en % en el eje de abscisas y las absorbancias correspondientes (A450) en el eje de ordenadas para establecer la curva de calibración.
- Los usuarios deben crear su propia curva de calibración, obtenida utilizando sus diluciones estándar. A partir de la curva obtenida, deducir directamente la concentración de vWF de la muestra analizada. Para obtener la concentración de vWF en una muestra analizada a una dilución más alta, este valor debe multiplicarse por **D:50** (es decir, **x2 para D=100...**). (Ver el ejemplo en el folleto.)
- Para los **controles I y II**, las concentraciones se deducen directamente de la curva de calibración.
- Como alternativa, puede utilizarse un software de ELISA (es decir, Dynex, Biolise, etc.) para el cálculo de las concentraciones.

INTERVALO PREVISTO:

- La concentración de vWF en plasma humano normal es de aproximadamente 10 µg/ml. Presenta una amplia distribución (entre el 50 y el 160%) en la población general.
- El nivel de vWF en plasma está sumamente influido por el grupo histológico ABO (disminuido en un 25% en los individuos de tipo O), el sexo (el vWF es más alto en mujeres que en hombres) y la raza (el vWF es más bajo en la raza blanca). El vWF está asociado con certeza a la diabetes y aumenta con la edad.

BIOQUÍMICA:

- El vWF plasmático es una glucoproteína multimérica de peso molecular elevado (que oscila entre 1.000 y 20.000 kD), se compone de subunidades idénticas unidas mediante puentes disulfuro (de aproximadamente 280 kD) y es sintetizada por células endoteliales y megacariocitos. Después de un procesamiento complejo, la molécula es liberada a la sangre y está presente tanto en el plasma como en las plaquetas, así como en las células endoteliales y en la matriz subendotelial de la pared vascular.
- En particular, las formas moleculares de mayor peso actúan como mediador en la adhesión plaquetaria al tejido conjuntivo subendotelial después de una lesión vascular y contribuyen, en menor medida, a la agregación plaquetaria. El vWF también es una proteína transportadora en plasma de FVIII:C, que estabiliza su actividad coagulante y, por lo tanto, desempeña una función clave en el proceso de la coagulación.

VARIACIONES PATOLÓGICAS:

- La enfermedad de von Willebrand es el trastorno hemorrágico heredado (autosómicamente) con mayor frecuencia y está presente en aproximadamente un 1% de la población general. Puede afectar a hombres y a mujeres. Esta enfermedad presenta cuadros muy heterogéneos, que normalmente se clasifican en 3 subtipos principales:
 - Enfermedad de von Willebrand de tipo I (un 70-80% de los casos): deficiencia cuantitativa y moderada de vWF (15-50% respecto a la normalidad); asintomática o síntomas hemorrágicos leves (hemorragia mucocutánea).
 - Enfermedad de von Willebrand de tipo II (un 15-20% de los casos): anomalías cualitativas de vWF (2A, 2B, 2M), en su mayor parte asociadas a una deficiencia de multímeros de alto peso molecular. Los pacientes presentan síntomas hemorrágicos de leves a graves.
 - Enfermedad de von Willebrand de tipo III (un 1-5% de los casos): trastornos hemorrágicos graves, en los que el vWF plasmático se encuentra seriamente reducido o no está presente en el plasma ni en las plaquetas.

Teniendo en cuenta la heterogeneidad de la concentración de vWF en la población normal, y en las manifestaciones clínicas, se requiere un estudio biológico completo para el diagnóstico de la enfermedad de von Willebrand, que combine el ensayo de al menos 3 parámetros: actividad de FVIII:C, actividad de vWF y ensayo del antígeno de vWF, y en relación con el grupo ABO y el contexto familiar.

- Estudios epidemiológicos recientes han demostrado la existencia de una asociación entre las concentraciones elevadas de vWF y un mayor riesgo de enfermedades cardiovasculares (aterosclerosis, trombosis, isquemia, etc.).
- Así pues, el ensayo del antígeno vWF presenta un valor predictivo de patología cardiovascular y seguimiento de la evolución o tratamiento de la enfermedad.

APLICACIONES:

- Diagnóstico de la enfermedad de von Willebrand.
- Ensayo de vWF en muestras clínicas, como marcador de enfermedad o como indicador de enfermedades cardiovasculares.
- Autoanticuerpos frente a vWF (malignidad).

CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO:

- Intervalo dinámico: de 0% a aproximadamente 150%
- Umbral de detección: ≤ 5%
- CV intraensayo: 3-8%
- CV interensayo: 5-10%
- Sin interferencia significativa de heparina hasta 2 UI/ml, de bilirrubina hasta 0,05 mg/ml y de hemoglobina hasta 10 mg/ml.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- "Von Willebrand factor, platelets and endothelial cells interactions", Ruggeri, *J. Thromb. Haemost.*, Vol 1, No 7, 1335-1342, 2003.
- "Assays of von Willebrand Antigen and Ristocetin Cofactor Activity; Approved Guideline", National Committee for Clinical Laboratory Standards, *NCCLS Document H51-A*, Vol 22, No 20.
- "Von Willebrand's disease in the year 2003: towards the complete identification of gene defects for correct diagnosis and treatment", Mannucci & al., *Haematologica*, Vol 88, No 1, 94-108, 2003.
- "Measurement of von Willebrand factor activity: relative effects of ABO blood type and race", Evatt & al., *J Thromb Haemost*, Vol 1, No 10, 2191-7, 2003.
- "Familial clustering of factor VIII and von Willebrand factor levels", Rosendaal & al., *Thromb Haemost*, Vol 79, No 2, 323-7, 1998.
- "Von Willebrand factor and its relevance to cardiovascular disorders", Lip, Blann, *Br Heart J*, Vol 74, No 6, 580-3, 1995.
- "Associations of factor VIII and von Willebrand factor with age, race, sex, and risk factors for atherosclerosis. The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study", Wu & al., *Thromb Haemost*, Vol 70, N° 3, 380-5, 1993.