

ZYMUTEST™ vWF:CBA

REF RK038A

96 testů



ELISA měření collagen vázací aktivity von Willebrandova Faktoru.

Datum revize: 05/2021

POUŽITÍ:

ZYMUTEST™ vWF:CBA souprava je ELISA metoda pro in vitro kvantitativní měření kolagen vázací aktivity lidského von Willebrandova Faktoru (vWF) v lidské plazmě.

PRINCIP STANOVENÍ:

Technický:

VWF je multimerní protein produkovaný v endotelních buňkách a megakaryocytech. Obíhá v řečišti jako multimer o 500 až 20,000 kDa. vWF je mediátor adheze destiček na subendotel poškozené cévy a v komplexu s Faktorem VIII si prodlužuje poločas v krevním řečišti. Velmi velké multimery vWF jsou proteolyticky štěpeny ADAMTS13 na méně aktivní formy. Biologická funkce vWF velkým dílem závisí na velikosti multimeru. Velké multimery mají větší šanci navázat destičky na kolagen ale také vazbu destiček v oběhovém řečišti^{1,2}.

Klinický:

Deficit vWF funkční nebo kvantitativní vede k von Willebrandově chorobě (vWD), která má tři typy:

- Typ 1: vWD je charakterizována jako částečný kvantitativní deficit vWF (nejčastější).
- Typ 2: vWD je charakterizována jako neobvyklá adhezivní aktivita vWF. Je rozdělena na čtyři subkategorie: 2A, 2B, 2M a 2N, v závislosti na funkční abnormalitě.
- Typ 3: vWD je charakterizována jako těžký kvantitativní deficit vWF.

vWF:CBA měření je založeno na schopnosti vWF vázat kolagen. Měření aktivity je užitečné pro lepší charakteristiku vWD³.

PRINCIP:

Nejdříve je ředěný měřený vzorek přidán do jamky potažené fibrilárním kolagenem. vWF je zachycen na pevnou fázi. Následuje promývací krok, po kterém se přidá imunokonjugát, což je králičí polyklonální protilátka specifická proti lidskému vWF značená křenovou peroxidázou (HRP). Ta se naváže na volné epitopy znehynbného vWF a následuje další promývání. Do jamek se přidá 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) a peroxid vodíku (H₂O₂) a vytvoří se modré zbarvení. Reakce se zastaví kyselinou sírovou a barva se změní na žlutou, měřenou při 450nm. Množství získané barvy je přímo úměrné koncentraci vWF:CBA v testovaném vzorku.

REAGENCIE:

1. **COAT ELISA destička:** 12x8 obsahuje 12 proužků po 8 jamkách, potažených stabilizovanou králičí polyklonální protilátkou specifickou pro lidský VWF, balenou v hliníkovém pouzdru hermeticky uzavřeném společně s desikantem. Obsahuje malé množství Azidu Sodného (0,9 g/l).
2. **SD ELISA Diluent vzorku:** 2 lahvičky po 50 ml, připraveno k použití. Obsahuje proclin a BSA.
3. **CAL vWF vWF kalibrátor:** 3 lahvičky po 2 ml, lyofilizováno. Každou lahvičku rozpustíte v 2 ml **SD ELISA**, abyste získali standard obsahující „C%“ lidského vWF (Již ředěného 1:50). Koncentrace „C“ je mezi 120 a 160%, podle šarže. Standard je v návaznosti na NIBSC mezinárodní standard. Obsahuje BSA.
4. **CI vWF vWF Vysoká kontrola:** 1 lahvička po 0,5 ml, lyofilizováno.

5. **CI vWF vWF Nízká kontrola:** 1 lahvička po 0,5 ml, lyofilizováno.
6. **IC ANTI-(h)-vWF HRP Anti-(h)-vWF-HRP imunokonjugát:** 3 lahvičky po 7,5 ml, polyklonální protilátka specifická pro lidský VWF s navázanou HRP (křenovou peroxidázou), lyofilizováno. Obsahuje BSA.
7. **CD ELISA Diluent Konjugátu:** 1 lahvička o 25 ml, připraveno k použití. Obsahuje Proclin a BSA.
- 8.: **WS ELISA Wash solution:** 1 lahvička o 50 ml 20x 20krát koncentrovaného. Obsahuje Proclin.
9. **TMB 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine:** 1 lahvička 25 ml substrátu, připraveno k použití. Obsahuje hydrogen peroxidázu.
10. **Stop 0,45M Kyselina sírová:** 1 lahvička o 6 ml, připraveno k použití.

VAROVÁNÍ A UPOZORNĚNÍ:

- Některé reagensy v soupravě obsahují materiál zvířecího původu. Žádná metoda testování nemůže kompletně vyloučit přítomnost infekčních agens. Proto musí být tyto reagensy považovány za potenciálně infekční se všemi odpovídajícími bezpečnostními opatřeními.
- Kyselina sírová, i v ředění na 0,45M, je žiravina. Nakládejte s ní proto s náležitou opatrností a bezpečnostními předpisy jako s jakoukoliv jinou žiravinou. Zabraňte kontaktu s kůží a očima.
- Odpad likvidujte dle příslušných místních platných regulací.
- Používejte pouze reagensy stejné šarže.
- Studie stability prokazují, že reagensy mohou být přepravovány při pokojové teplotě bez degradace.
- Reagensy jsou pouze pro in vitro diagnostické použití v laboratoři.

PŘÍPRAVA REAGENCIÍ:

Stabilizujte pásky a reagensy alespoň 30 minut při pokojové teplotě před použitím. Opatrně sundejte z lahviček zátku, abyste zabránili ztrátě lyofilizátu.

COAT Otevřete hliníkové pouzdro a vyjměte potřebné množství pásků. Pásky použijte během 30 minut.

Následující obsahy lahviček rozpustíte s:

CI vWF **CI vWF** 0,5 ml destilované vody. Dobře promíchejte do úplného rozpuštění.

CAL vWF 2 ml **SD ELISA** abyste získali roztok s „C“ % VWF (již ředěného 1:50). Dobře promíchejte do úplného rozpuštění.

IC ANTI-(h)-vWF HRP 7,5 ml **CD ELISA** alespoň 15 minut před použitím. Dobře promíchejte do úplného rozpuštění.

SD ELISA **TMB** **Stop** **CD ELISA**
Reagensy připraveny k použití.

WS ELISA lahvičku promíchejte a naředte 1:20 s destilovanou vodou (50ml roztoku stačí na přípravu 1 litru promývacího roztoku po naředění).

Dle potřeby inkubujte ve vodní lázni při 37°C dokud se nerozpustí pevné látky.



SKLADOVÁNÍ A STABILITA:

Neotevřené reagentie musí být skladovány při 2 – 8°C v originálním balení. Potom jsou stabilní až do data expirace uvedeném na obalu.

COAT Nepoužité proužky mohou být skladovány při 2-8°C **4 týdny** v originálním hliníkovém balení (hermeticky uzavřen v přítomnosti desikantů), a v přiloženém plastovém sáčku (minigrip), chránění před vlhkostí.

Stabilita reagentie po rozpuštění, pokud je zamezeno kontaminaci nebo odpařování a pokud je reagentie skladována uzavřená, je:

CAL vWF

- 8 hodin při pokojové teplotě (18 – 25°C)

CI vWF CII vWF

- 24 hodin při 2 – 8 °C
- 8 hodin při pokojové teplotě (18 – 25°C)
- 2 měsíce při -20°C a méně*

IC ANTI-(h)-vWF HRP

- 4 týdny při 2 – 8 °C
- 24 hodin při pokojové teplotě (18 – 25°C)

*Rozmrazujte pouze jednou co nejrychleji při 37°C a ihned použijte.

Stabilita reagentie po otevření, pokud je zamezeno kontaminaci nebo odpařování a pokud je reagentie skladována uzavřená, je:

SD ELISA CD ELISA TMB

- 4 týdny při 2 – 8 °C

WS ELISA

- 4 týdny při 2 – 8 °C
- 7 dní při 2 – 8°C pro ředěnou reagentii.

Stop

- 8 týdnů při 2 – 8 °C

MATERIÁL POTŘEBNÝ, ALE V KITU NEOBSAŽENÝ:

Reagentie:

- Destilovaná voda.

Materiál:

- 8smi kanálová opakovací pipeta schopná dávkovat 50-300 µl.
- Pipety o různých objemech od 0 do 20 µl, od 20 do 200 µl a od 200 do 1000 µl.
- Micro ELISA třepačku destiček a promývací přístroj.
- Čtečka micro ELISA destiček s vlnovou délkou 450 nm.

VZOREK:

Krev (9 dílů) musí být odebrána do 0,109 M tri-sodného citrátového antikoagulantia (1 díl; 0,109M, 3,2%), přímou venepunkcí. První odebraná zkumavka by měla být znehodnocena.

Vzorky by měly být připraveny a skladovány dle relevantních řádů.

Pro skladování plazmy se odkažte na reference.

PRŮBĚH TESTU:

Metoda měření:

1. Vzorky a kontroly naředte v **SD ELISA** dle tabulky níže:

Vzorky	Ředění
CI a CII	1:50
Vzorky	1:50

Pro předpokládanou VWF koncentraci nad „C“ v %, naředte vzorky **1:100** (D=100) nebo více.

2. Stanovte kalibrační rozmezí dle tabulky níže s kalibrátorem **CAL vWF** o koncentraci „C“ v %.

Koncentrace VWF (%)	C	C:2	C:4	C:10	C:20	0
Objem CAL vWF	1 ml	0,5ml	0,25ml	0,1ml	0,05ml	0
Objem SD ELISA	0	0,5ml	0,75ml	0,9ml	0,95ml	1 ml

Homogenizujte.

Ředění jsou stabilní **8 hodin** při pokojové teplotě (18-25°C).

3. Vložte proužky do přiložených rámečků. Přidejte následující do jamek ELISA destičky a proveďte měření dle následující tabulky:

Reagentie	Objem	Postup
CAL vWF nebo CI vWF nebo CII vWF nebo ředěné vzorky nebo SD ELISA (blank)	200 µl	Přidejte reagentie nebo vzorek do odpovídající jamky micro ELISA destičky
Inkubujte po 1 hodinu při pokojové teplotě (18-25°C) (a)		
WS ELISA	300 µl	Proveďte 5 promytí (b)
IC ANTI-(h)-vWF HRP	200 µl	Přidejte imunokonjugát do jamek destičky
Inkubujte po 1 hodinu při pokojové teplotě (18-25°C) (a)		
WS ELISA	300 µl	Proveďte 5 promytí (b)
TMB	200 µl	Okamžitě po promytí přidejte substrát (b, c). Pozn: Distribuce substrátu musí být přesná objemem i časovými intervaly.
Inkubujte 5 minut při pokojové teplotě (18-25°C) (a)		
Stop	50 µl	Dodržujte stejné časové intervaly jako s přidáním substrátu. (c)
Počkejte 10 minut, aby se mohlo zbarvení stabilizovat a pak měřte absorbanci při 450 nm. Odečtěte od hodnot blank vzorku (d).		

Distribujte naředěné kalibrátory, kontroly a vzorky co nejrychleji, abyste získali homogenní kinetiku dávkování. Příliš dlouhá prodleva (> 10 minut) mezi první a poslední jamkou může mít vliv na imunologickou kinetiku a vydávat nepřesné výsledky (falešně nízké pro poslední jamky).

a) Zabraňte vystavení destičky přímému slunečnímu svitu během inkubace, hlavně pak při zabarvovací reakci. Můžete použít třepačku micro ELISA destiček.

b) Nikdy nenechávejte jamky vyschnout mezi kroky postupu. Další reagentie musí být přidána do 3 minut. Vyschnutí jamek by mohlo poškodit znehýbněné komponenty a snížit reaktivitu destičky.

Dle potřeby nechte promývací roztok v jamkách a odstraňte jej těsně před přidáním další reagentie. Promývací přístroj musí být nastaven tak, aby proužky promýval a vyprazdňoval opatrně; jinak může dojít k poškození potahu jamek a snížení jejich reaktivity.

c) Pro přidání TMB substrátu – časové intervaly mezi pipetováním do řádků musí být přesně určeny a stejné intervaly musí pak být při pipetování zastavovacího roztoku.

d) Pro bichromatické měření můžete použít vlnovou délku 620 nebo 690 nm.



KONTROLA KVALITY:

Použití kontrol slouží k validaci výsledků a homogenity měření v sérii nebo mezi sériemi pro danou šarži reagensů.

Začněte kontroly kvality do každé série měření, podle pravidel laboratorní praxe. Nová kalibrační křivka musí být stanovena pro každou sérii testů.

Každá laboratoř si musí stanovit vlastní přijatelné meze pro svůj analytický systém a ověřit jejich výkon.

VÝSLEDKY:

- Získaný OD450 se může lišit podle teploty během průběhu testu.
- Stanovte kalibrační křivku s OD 450 nm podél osy Y a koncentraci VWF v % podél osy X s interpolační metodou „best fit“ (viz příložený leták k soupravě).
- Výsledky vzorků a kontrol jsou vyjádřeny v OD450, viz kalibrační křivka.
- Koncentrace VWF:CBA (%) je přímo odečtena z kalibrační křivky, pokud je použito standardní ředění 1:50.
- Pokud je použito jiné ředění, získané hodnoty musí být násobeny použitým ředícím faktorem.
- Pro kalkulaci koncentrace VWF se může použít specifický software (např.: Dynex, Biolise, atd.).
- Pro **CI vWF** a **CII vWF** jsou koncentrace přímo odečteny z kalibrační křivky.
- Výsledky musí být vyloženy dle pacientova klinického a biologického stavu.

LIMITY:

- Pro zajištění optimálního průběhu testu a pro splnění specifikací by měly být dodrženy instrukce validované výrobcem HYPHEN BioMed.
- Reagencie s neobvyklým vzhledem nebo jevící známky kontaminace, by měly být znehodnoceny.
- Vzorky podezřelého vzhledu nebo vzorky vykazující známky aktivace musí být znehodnoceny.
- Pokud není promývací krok postupu řádně proveden, negativní kontrola může vykazovat vyšší hodnoty absorbance. Abyste zajistili nespecifickou tvorbu zbarvení, zkontrolujte, jestli je promývací krok správně prováděn.

OČEKÁVANÉ HODNOTY:

Koncentrace vWF:CBA v normální lidské plazmě je kolem 10 µg/ml. vWF:CBA má velké rozmezí distribuce v populaci (od 50 do 160%).

Tato hladina je ovlivněna ABO skupinou (25% snížení u typu O), pohlavím (vyšší hladiny u žen), etnickou národností (nižší hladina u bělošské populace).

Koncentrace vWF je pozitivně spojena s diabetes a zvyšuje se s věkem.

CHARAKTERISTIKA:

- Dynamické rozmezí: 0 až 150%.
- Detekční limit ≤ 5%.
- Intra-assay CV: 3-8%.
- Inter-assay CV: 5-10%.
- **Interference:** Nebyly zjištěny žádné interference do následujících koncentrací:

Heparin	Bilirubin	Hemoglobin
2 UI/ml	0,05 mg/ml	5 mg/ml

REFERENCE:

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 M. 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 GP44-A4: "Procedures for the handling and processing of blood specimens for common laboratory tests".
6. CLSI Document H21-A5: "Collection, transport, and processing of blood specimens for testing plasma -based coagulation assays and molecular hemostasis assays; approved guideline". 2008.

SYMBOLY:

Použité symboly a znaky jsou uvedeny v seznamu ISO 15223-1 standard, viz dokument definice symbolů.

SD ELISA **CD ELISA** **WS ELISA**: H317 Může způsobit alergickou kožní reakci.

