



LIAPHEN™ vWF:Ag



www.hyphen-biomed.com

IVD

Ref. 120206
(R1: 4x5 ml, R2: 4x6 ml)

Turbidimetrický latexový immuassay pro kvantitativní stanovení vWF:Ag, tekuté reagentie

155, rue d'Eragny
95000 NEUVILLE SUR OISE
FRANCE
Tel. : +33 (0)1 34 40 65 10
Fax : +33 (0)1 34 48 72 36
info@hyphen-biomed.com

Revize: 03-2018

POUŽITÍ:

LIAPHEN™ vWF:Ag souprava je určena pro in vitro imunoturbidimetrické stanovení antigenu von Willebrandova faktoru (vWF:Ag) v lidské citrátové plazmě při použití manuální nebo automatizované. Reagentie jsou v tekuté formě, připraveny k použití.

SOUHRN:

vWF je multimerní protein produkovaný v endoteliálních buňkách a v megakaryocytech. V krvi cirkuluje jako multimer o hmotnosti od 500 do 20 000 kDa. vWF zprostředkovává adhezi trombocytů k subendoteliálním vrstvám při poškození cévy a slouží jako nosič FVIII – ten má díky vazbě na vWF delší poločas v krevním oběhu.

Ultra velké multimery vWF jsou proteolyticky štěpeny metaloproteinázou ADAMTS13 do menších a méně aktivních forem. Biologické funkce vWF závisí na velikosti multimeru. Větší multimery více váží trombocyty ke kolagenu a podporují adhezi trombocytů v krevním řečišti.

vWF funkční nebo kvantitativní deficit vede k von Willebrandově chorobě (vWCH), jejíž formu dělíme do 3 skupin:

Typ 1 – vWCH je charakterizována kvantitativním deficitem vWF (nejčastější)

Typ 2 – je abnormální funkce vWF. Dělí se do 4 podtypů – 2A, 2B, 2M a 2N, v závislosti na typu abnormality.

Typ 3 – těžký kvantitativní deficit vWF

Deficit vWF může být spojen s jinými patologiemi, které jsou pak příčinou tzv získané vWCH.

Koncentrace vWF se zvyšuje při poškození endotelu nebo při zánětu^{3,4}.

PRINCIP TESTU:

LIAPHEN™ vWF:Ag je imunoturbidimetrický test založený na reakci antigenu s protilátkou. vWF jako antigen přítomný ve vzorku se váže na latexové částice s navázanou polyklonální králičí protilátkou proti vWF. Tato vazba agreguje latexové částice a měří jejich agregace přímo ovlivní absorpci světla. Změna absorpance je tedy přímo úměrná množství vWF:Ag ve vzorku.

REAGENCIE:

R1: Reagent 1: Reakční pufr, v tekuté formě. 4 lahvičky po 5 ml, obsahuje BSA

R2: Reagent 2: Latex, tekutá forma. 4 lahvičky po 6 ml, obsahuje BSA

Reagentie obsahují malé množství azidu sodného (0,9 g/l). Viz Upozornění a varování.

UPOZORNĚNÍ A VAROVÁNÍ:

- Jedná se o produkt biologického původu, proto s ním musí být zacházeno s opatností jako s potenciálně infekčním.
- Při kontaktu s měděným nebo olověným odpadním potrubím může azid sodný tvořit explozivní azidy kovů.
- Znehodnocení odpadu by mělo být vždy v souladu s lokálními předpisy.
- Užívejte pouze reagentie stejné šarže kitu. Nepoužívejte jednotlivé reagentie od různých šarží souprav – reagentie jsou vždy optimalizovány pro konkrétní šarži.
- S reagentiemi zacházejte opatrně, aby nedošlo ke kontaminaci během užívání. Též se co nejvíce vyvarujte odparu reagentie limitací kontaktního povrchu reagentie se vzduchem. Odpařování reagentie snižuje stabilitu v analyzátoru.
- Pro zachování stability reagentie uzavírejte lahvičky po použití jejich zátkami.
- Studie provedené po 3 týdny při 30°C potvrdily, že reagentie může být přepravována za pokojové teploty po krátkou dobu bez jejího poškození.
- Bovinní plazma použitá pro přípravu BSA byla testována registrovanými metodami a sledována negativně na infekční agens, konkrétně původce bovine spongiformné encefalitidy.
- Pro použití In Vitro.

PŘÍPRAVA A STABILITA REAGENCIE:

R1: Reagent1: Reakční pufr

Průhledná lahvička, připraven k použití. Nechte stabilizovat po dobu 30 min. za pokojové teploty (18-25°C) před použitím. Před každým použitím promíchejte.

Stabilita reagentie R1 po otevření v originální lahvičce, která je hermeticky uzavřena, v případě že je zabráněno vypařování a kontaminaci:

4 týdny při 2-8°C

2 týdny při pokojové teplotě (18-25°C)

Nemrazte.

R2: Reagent 2: Latex

Průhledná lahvička. Připraven k použití. Před použitím nechte stabilizovat 30 minut za pokojové teploty. Před každým použitím promíchejte.

Stabilita reagentie po otevření v originální lahvičce, uzavřené, v případě že je zabráněno vypařování a kontaminaci:

4 týdny při 2-8°C

2 týdny při pokojové teplotě (18-25°C)

Nemrazte.

SKLADOVACÍ PODMÍNKY:

Neotevřené reagentie musí být skladovány při 2-8°C v jejich originálních obalech. Pak jsou stabilní do data expirace uvedeného na obalu.

REAGENCIE A MATERIÁL POTŘEBNÝ, V KITU NEPŘÍTOMNÝ:

Reagentie:

Destilovaná voda

Imidazolový pufr (AR021A/AR021K/AR021L) jako diluent

Kalibrační plazma s určenou hladinou vWF:Ag s návazností na mezinárodní standardy NIBSC pro vWF:Ag v plazmě, například:

Jméno produktu	Reference
BIOPHEN™ Plasma Calibrator	222 101
BIOPHEN™ Normal Control Plasma	223 201
BIOPHEN™ Abnormal Control Plasma	223 301

Materiál:

Automat pro imunoturbidimetrické testy.

Kalibrované pipety

TESTOVANÉ VZORKY:

Vzorky by měly být připraveny a skladovány ve shodě s lokálními doporučeními (pro USA viz CLSI H21-A5)⁵.

Vzorek:

Lidská citrátová plazma.

Odběr:

Krev (9 dílů) musí být odebrána do citrátu sodného 0,109 M (1 díl) přímou venepunkcí. První zkumavka má být znehodnocena.

Centrifugace:

Vzorek by měl být centrifugován do 2 hodin za použití v laboratoři validované metody pro získání plazmy chudé na destičky – např. 15 minut při 2500 g za pokojové teploty (18 – 25°C). Plazma by měla být přenesena do plastové zkumavky.

Skladování plazmy⁶

4 hodiny při pokojové teplotě (18-25°C)

24 měsíců při -20°C

24 měsíců při -70°C

Zmrazená plazma by měla být rozmrazena rychle při 37°C, poté promíchána a ihned testována. Jakýkoliv precipitát rozmíchejte intenzivním promícháním – hned po rozmrazení a před použitím.

POSTUP:

Souprava je určena pro automatické kinetické metody, ale může být též použita pro manuální metodu. Při použití manuální metody musí být test proveden při teplotě 37°C a turbidita má být měřena při 575 nm (mohou být užity i jiné vlnové délky v rozmezí 540 až 800 nm).

Automatizované metody:

Aplikace pro různé analyzátoři jsou dostupné na vyžádání. Odkazujeme na specifické podmínky každého analyzátoru.

Distributor: Diagnostica a.s., Za Tratí 686, Praha 9, Česká republika, tel.+420 266 315 909, Fax.+420 266 316 000, e-mail: info@diagnostica.cz, www.diagnostica.cz



Vlastní provedení:

1. Rekonstituuje referenční přípravky nebo kalibrátor a kontrolní plazmy – doporučují se kontrolní materiály na 2 hladinách kolem 40 a 100% vWF:Ag – dle instrukcí pro jejich použití a ve shodě s doporučenými postupy. Připravte kalibrační body v rozmezí od 0 do 150% (0 – 20 – 75 – 150% vWF: Ag) v Imidazol pufu.
2. Naředte vzorky, kalibrátory a kontroly Imidazolovým pufrem, jak je popsáno v tabulce níže:

Vzorek	Předředění	Ředění
Kalibrátor	Není	4/15
Kontroly	není	4/15
vzorky	Použijte předředění nezbytné pro výsledek v rozmezí kalibrační křivky 10-150%	4/15

Vytvořte kalibrační křivku a testujte kontrolní materiál.
Pokud skladujete při pokojové teplotě, testujte naředěné plazmy do 2 hodin po naředění.

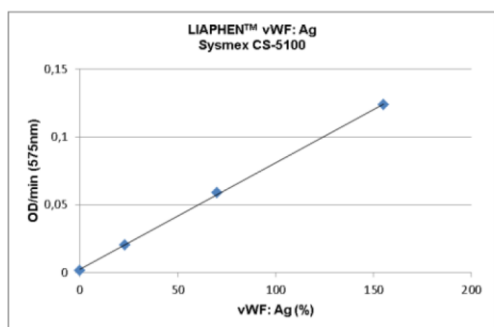
3. Testujte při 37°C

Reagencie	Objem
Kalibrátor, kontroly ředěné v Imidazolovém pufu	30 mikrolitrů
R1: Reakční pufr	60 mikrolitrů
Inkubace při 37°C po 130 sekund	
R2: Latex	100 mikrolitrů
Promíchejte a měřte kontinuálně optickou densitu (mezi 20 a 50 sec) při 575 nm při teplotě 37°C.	

Pokud jsou potřeba jiné reakční objemy, musí být vždy zachován poměr mezi jednotlivými složkami testu. Uživatel je zodpovědný za validaci každé změny v doporučeném postupu, která by mohla mít vliv na výsledek.

KALIBRACE:

LIAPHEN™ vWF: Ag může být kalibrován pro test vWF: Ag antigen v lidské plazmě. Pro kalibraci použijte lineární metodu. Test je lineární mezi 10 a 170% vWF:Ag na analyzátoru Sysmex CS-5100 (ve standardním ředění). Kalibrační křivka uvedená níže byla získána na přístroji Sysmex CS-5100 a slouží pouze jako příklad. Kalibrace musí být vždy provedena před každou serii testů.



KONTROLA KVALITY:

Použití komerčních kontrolních materiálů umožní validaci kalibrační křivky stejně jako homogenity v serii a mezi seriami při použití stejné šarže reagencie. Začněte kontrolu kvality do každé serie testů, dle doporučení pro správnou laboratorní praxi. Kalibrace by měla být provedena pro každou serii testů, nejméně při změně šarže reagencie, po významné opravě nebo údržbě analyzátoru, nebo když jsou výsledky kontrol kvality mimo přijatelné meze. Každá laboratoř si musí definovat vlastní přijatelné rozmezí a verifikovat průběh měření na analytickém systému.

VÝSLEDEK:

Na analyzátořech Sysmex CS je kalibrační křivka bilineární s absorbcí při 575 nm na ose Y a s koncentrací vWF:Ag v % na ose X. Koncentrace vWF:Ag v testovaném vzorku je přímo odečtena z kalibrační křivky, pokud je použito standardní ředění. Výsledky jsou vyjádřeny jako % vWF:Ag. Výsledky by měly být interpretovány ve shodě s posouzením klinického a biologického stavu pacienta. Pokud je použito jiné ředění vzorku, musí být získaný výsledek násoben doplňkovým dilučním faktorem (na přístrojích Sysmex CS serie může být analytický rozsah rozšířen od 3 do 1600% vWF:Ag.)

LIMITY:

Pro zajištění optimálního provedení testu by měly být dodrženy technické instrukce a specifikace validované výrobcem Hyphen-BioMed. Laboratoř je odpovědná za validaci každé změny, která mění tyto instrukce. Každý reagent s neobvyklým vzhledem nebo se známkami kontaminace by měl být vyloučen. Každý vzorek s výše uvedenými změnami by neměl být testován. Každá plazma se známkami přítomnosti sraženiny nebo kontaminace by měla být vyloučena. Revmatoidní faktor a heterofilní protilátky mohou interferovat v testu a vést k abnormálním výsledkům vWF:Ag. Pro možný vliv Hook efektu odkazujeme na specifické aplikační protokoly pro použité analyzátoři. Nebyl pozorován žádný vliv koncentrace vWF:Ag do 1600% na přístroji Sysmex CS-5100. Možné interference či jiné vlivy jsou uvedeny v aplikačních protokolech – pro analyzátoř Sysmex CS5100 nebyl pozorován vliv heparinu do koncentrace 2 IU/ml, bilirubinu do 60 mg/dl, hemoglobinu a intralipidu do 1000 mg/dl.

OBVYKLÉ HODNOTY:

Referenční rozmezí bylo získáno měřením vzorků zdravých dospělých osob (n=120) na analyzátoř Sysmex CS5100 (průměr 90%, 95. Percentil) – 62 až 169% vWF:Ag. Přesto by referenční interval měl být ověřen pro konkrétní podmínky. Krevní skupina, speciálně KS 0, stejně tak jako věk, pohlaví, gravidita - ovlivňují koncentraci vWF:Ag v plazmě.

VLASTNOSTI:

Dolní mez detekce je závislá na použitém analyzátoř - na analyzátoř Sysmex CS-5100 je <1%. Na Sysmex CS serii analyzátořů je měřicí rozsah mezi 3 a 600% vWF:Ag. Pro vzorky s >600% je nutné použít komplementární ředění. Byly provedeny studie se 3 šaržemi reagencí za použití přístroje Sysmex CS-5100. Provedení bylo posuzováno měřením kontrolních plazem po dobu 5 dní, 2 serie denně ve 3 opakováních v každé serii a pro každou kontrolu. Byly získány následující výsledky:

Kontrola	V serii				Mezi seriami			
	n	Průměr%	CV%	SD	n	Průměr%	CV%	SD
normální	40	102,8	2,2	2,3	30	103,4	2,2	2,3
patologická	40	39,8	4,6	1,8	30	39,2	2,6	1,0

LITERATURA:

1. Luo et al. von Willebrand Factor: more than a regulator of hemostasis and thrombosis. Acta Haematol, 2012, 128:158-169.
2. Peyvandi et al. Role of von Willebrand Factor in the haemostasis. Blood Transfus, 2011, 9 suppl 2:s3-s8.
3. 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.
4. Farkas et al, Complement activation, inflammation and relative ADAMTS13 deficiency in secondary thrombotic microangiopathies. Immunobiology, 2017, 222:119-127.
5. 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.
6. Woodhams B. et al., Stability of coagulation proteins in frozen plasma. Blood coagulation and Fibrinolysis. 2001.
7. Gill et al. The Effect of ABO group on the diagnosis of von Willebrand disease. Blood, 1987, 69:1692.

SYMBOLY:

Použité symboly jsou dle směrnice ISO 15223-1, část Definice symbolů.