

**REAADS® VON WILLEBRAND
FACTOR ACTIVITY TEST KIT****For *In Vitro* Diagnostic Use****INTENDED USE**

An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the quantitative determination of Von Willebrand Factor Activity (VWF:Act) in citrated human plasma.

SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

Von Willebrand Factor Antigen (VWF:Ag or Factor VIII-related protein) is a plasma protein found in circulation combined by non-covalent interactions with Factor VIII (FVIII:C), a pro-coagulant protein also known as the anti-hemophilic factor. These two proteins show distinct biochemical and functional properties as well as different antigenic determinants; their plasma levels may vary independently of each other.^{1,2} Deficiency of FVIII causes classic hemophilia while deficiency of VWF causes vonWillebrand disease. Most of VWF:Ag is synthesized and stored by endothelial cells while 15-20% is synthesized by megakaryocytes and stored in circulating platelets. A VWF:Ag unit has a molecular weight of about 250 kD and tends to polymerize in circulation, with multimers ranging in size from 850 kD to as large as 15×10^6 D.³

VWF plays a very important role in hemostasis; it protects FVIII from proteolytic cleavage in circulation and helps platelets to aggregate or to adhere to sites of vascular damage. The *in vivo* half-life of FVIII:C without VWF is shortened from 10-12 hours to a few minutes. These two mechanisms prevent bleeding. Von Willebrand disease is characterized by a deficiency or defect of VWF. Decreased VWF activity in plasma can be the result of low concentrations (quantitative or type I defect) or functional changes of VWF (qualitative or type II defect).^{4,5} Von Willebrand disease is the most common inherited bleeding disorder and is characterized by easy bruising and prolonged bleeding from mucosal surfaces. The prevalence of Von Willebrand disease has been estimated to be 1-3% of the general population. Greater than 70% of Von Willebrand disease patients have a type I deficiency while approximately 20% have a type II deficiency.⁶

The laboratory diagnosis of Von Willebrand disease may require both quantitative and qualitative (functional) determinations to differentiate the two predominant subtypes of the disease, type I and type II.^{7,8} The classification of Von Willebrand disease into subtypes is important in determining the course of clinical treatment.

PRINCIPLE OF THE TEST

The REAADS VWF:Act assay is a sandwich ELISA. A monoclonal capture antibody specific for the portion of VWF which binds platelets is coated to 96-microwell polystyrene plates.^{9,10} Diluted patient plasma is incubated in the wells, allowing any available antigen to bind to the monoclonal antibody on the microwell surface. The plates are washed to remove unbound proteins and other plasma molecules. Bound antigen is quantitated using horseradish peroxidase (HRP) conjugated anti-human VWF detection antibody. Following incubation, unbound conjugate is removed by washing. A chromogenic substrate of tetramethylbenzidine (TMB) and hydrogen peroxide (H_2O_2) is added to develop a colored reaction. The intensity of the color is measured in optical density (O.D.) units with a spectrophotometer at 450 nm. Patient VWF:Act in relative percent concentration is determined against a curve made from the reference plasma provided with the kit.

REAGENTS

Store at 2-8°C. Do Not Freeze.

Each REAADS Von Willebrand Factor Activity (VWF) 96-microwell Test Kit contains the following reagents:

- 12 x 8 stabilized antibody coated microwells (12 strips of 8 breakaway wells), with frame. Wells are coated with a monoclonal antibody specific for the functional region of VWF. (mouse)
- 60 mL Sample Diluent (blue-green solution); *
- 3 x 0.5 mL lyophilized Reference Plasma for preparation of reference curve, with assay sheet.
- 12 mL HRP-Conjugated anti-human VWF Antibody Solution (blue solution). (leporine)
- 13 mL Substrate (TMB/H₂O₂).
- 15 mL Stopping Solution (0.36N sulfuric acid).
- 30 mL Wash Concentrate [33X phosphate buffered saline (PBS) with 0.01% Tween 20]. Note: turbidity may appear in wash concentrate which will not affect component performance and should disappear when working dilution is prepared.



* **CAUTION: Contains sodium azide**

WARNINGS AND PRECAUTIONS

For In Vitro Diagnostic Use

1. Human source material used to prepare the reference plasma included in this kit has been tested and shown to be negative for antibodies to HBsAg, HCV and HIV-I & II by FDA required tests. However, all human blood derivatives, including patient samples, should be handled as potentially infectious material.
2. Do not pipette by mouth.
3. Do not smoke, eat, or drink in areas where specimens or kit reagents are handled.
4. Wear disposable gloves while handling kit reagents and wash hands thoroughly afterwards.
5. Substrate can cause irritation to the eyes and skin. Absorption through the skin is possible. Use gloves when handling substrate and wash thoroughly after handling. Keep reagent away from ignition sources. Avoid contact with oxidizing agents.
6. Certain components are labeled with the following:

Irritating to eyes (R 36). Avoid contact with skin (S 24). Avoid contact with eyes (S 25). In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water and seek medical advice (S 26). If swallowed, seek medical advice immediately and show this container or label (S 46).

Warning . Biological Risk .

SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Plasma collected with either 3.2% or 3.8% sodium citrate as an anticoagulant should be used as the sample matrix. Blood should be collected by venipuncture, and the sample centrifuged immediately. Remove the plasma and store at 2-8°C until testing can be performed. If not tested within 8 hours of collection, the sample should be stored at -70°C and tested within 1 month.

INSTRUCTIONS FOR USE

Materials Provided:

REAADS Von Willebrand Factor Activity Test Kit; see "Reagents," for a complete list.

Materials Required but not Supplied:

- VWF:Act Control Plasma. Reconstitute Control Plasma selected for use following manufacturer's instructions, and store as recommended.
- Reagent grade water (1 L) to prepare PBS/Tween 20 wash solution, to reconstitute Reference Plasma, and to zero or blank the plate reader during the final assay step.
- Graduated cylinders
- Precision pipettors capable of delivering between 5 and 1000 μL , with appropriate tips
- Miscellaneous glassware appropriate for small volume handling
- Flask or bottle, 1 liter
- Wash bottles, preferably with the tip partially cut back to provide a wide stream, or an automated or semi-automated washing system
- Disposable gloves, powder-free recommended
- Plate reading spectrophotometer capable of reading absorbance at 450 nm (with a 650 nm reference, if available)
- Multichannel pipettors capable of delivering to 8 wells simultaneously
- Microdilution tubes for patient sample preparation

Procedural Notes

1. Bring plasma samples and kit reagents to room temperature (18–26°C) and mix well before using; avoid foaming. Return all unused samples and reagents to refrigerated storage (2–8°C) as soon as possible.
2. All dilutions of reference plasma, control plasma selected for use, and patient samples must be made just prior to use in the assay.
3. A single water blank well should be set up on each plate with each run. No sample or kit reagents are to be added to this well. Instead, add 200 μL of reagent grade water to the well immediately prior to reading the plate in the spectrophotometer. The plate reader should be programmed to zero or blank against this water well.
4. Good washing technique is critical for optimal performance of the assay. Adequate washing is best accomplished by directing a forceful stream of wash solution from a plastic squeeze bottle with a wide tip into the bottom of the microwells. Wash solution in the water blank well will not interfere with the procedure. An automated microtiter plate washing system can also be used.
5. **IMPORTANT:** Failure to adequately remove residual PBS/Tween 20 can cause inconsistent color development of the substrate solution.
6. Use a multichannel pipettor capable of delivering to 8 wells simultaneously when possible. This speeds the process and allows for more uniform incubation and reaction times for all wells.
7. Carefully controlled timing of all steps is critical. All reference plasma dilutions, controls and samples must be added to the microwells within a five minute period. Batch size of samples should not be larger than the amount that can be added within this time period.
8. For all incubations, the start of the incubation period begins upon the completion of reagent or sample addition.
9. Addition of all samples and reagents should be performed at the same rate and in the same sequence.
10. Incubation temperatures above or below normal room temperature (18–26°C) may contribute to inaccurate results.
11. Avoid contamination of reagents when opening and removing aliquots from the primary vials.
12. Do not use kit components beyond expiration date.
13. Coated microwells, conjugate, and substrate are lot specific components that should not be used with different kit lots.

REAGENT PREPARATION

1. **Wash Solution (PBS/Tween 20):** Measure 30 mL Wash Concentrate (33X PBS/Tween 20) and dilute to 1 L with reagent grade water. The pH of the final solution should be 7.35 ± 0.1 . Store unused PBS solution in the refrigerator at 2–8°C. Discard if the solution shows signs of microbial or cross-contamination.
2. Reconstitute Reference Plasma by adding 0.5 mL reagent grade water. Swirl gently to mix. Allow to stand for 10 minutes before use for complete dissolution. Stable for 8 hours when stored at 2–8°C. Reconstitute appropriate control plasma following manufacturer's instructions, and store as recommended.

Assay Procedure

1. Remove any microwell strips that will not be used from the frame and store them in the bag provided.
2. Assay each reference plasma dilution in duplicate. Duplicate determinations are also recommended for patient and control samples. One well should be run as a reagent blank; sample diluent without plasma is added to the well as explained in step 6 of this section. This well is treated the same as a patient sample in subsequent assay steps. A water blank well should be included with each plate; it is to remain empty until 200 µL of reagent grade water is added at the completion of the assay, immediately prior to reading the plate. The water blank well is to be used to zero the plate reader.
3. Using the Reference Plasma provided with the kit, prepare five reference plasma dilutions as described below.

Volume Reference Plasma		Volume Sample Diluent	*Reference Level (%)
100 µL	+	1000 µL =	200
50 µL	+	1000 µL =	100
25 µL	+	1000 µL =	50
25 µL	+	2000 µL =	25
25 µL	+	4000 µL =	12.5

*** Reference level value to be used for constructing reference curve only.**

4. Prepare a 1:21 dilution of each patient sample and control plasma selected for use in Sample Diluent (blue-green solution); e.g. 25 µL sample added to 500 µL Sample Diluent. Mix thoroughly.
5. Add 100 µL of the dilutions (reference plasmas x 5, patient samples and controls) to the appropriate microwells.
6. Add 100 µL of Sample Diluent to the reagent blank well. Leave the water blank well empty.
7. Incubate 15 minutes at room temperature. After the incubation is complete, carefully invert the microwells and empty the fluid. Do not allow samples to contaminate other microwells.
8. Wash 4 times with working wash solution (PBS/Tween 20). Each well should be filled with wash solution per wash. Wash solution in the empty well intended to serve as a water blank will not interfere with the procedure. Invert microwells between each wash to empty fluid. Use a snapping motion of the wrist to shake the liquid from the wells. The frame must be squeezed at the center on the top and bottom to retain microwell modules during washing. Blot on absorbent paper to remove residual wash fluid. Do not allow wells to dry out between steps.
9. Add 100 µL HRP-Conjugated Antibody Solution (blue) to each well (except the water blank well).
10. Incubate for 15 minutes at room temperature. After the incubation is complete, carefully invert the microwells and empty the conjugate solution.
11. Wash 4 times with working wash solution (PBS/Tween 20) as in step 8. Wash solution in the water blank well will not interfere with the procedure. Use a snapping motion to drain the liquid, and blot on absorbent paper after the final wash. Do not allow the wells to dry out.

12. Add 100 µL Substrate to each well (except for the water blank well) and incubate for 10 minutes at room temperature. Add the substrate to the wells at a steady rate. Blue color will develop in wells with positive samples.
13. Add 100 µL Stopping Solution (0.36N sulfuric acid) to each well (except for the water blank well) to stop the enzyme reaction. Be sure to add Stopping Solution to the wells in the same order and at the same rate as the Substrate was added. Blue substrate will turn yellow and colorless substrate will remain colorless. Do not add Stopping Solution to the water blank well. Instead, add 200 µL reagent grade water to the water blank well. Blank or zero the plate reader against the water blank well. Read the O.D. of each well at 450 nm, against a 650 reference filter (if available). For best results, the O.D. values should be measured within 30 minutes after the addition of Stopping Solution.

RESULTS

Plasma VWF activity values are expressed as relative percent (%) as compared to pooled normal plasma.

1. Calculate the mean O.D. values for the duplicates of the reference plasma dilutions, controls selected for use, and patient samples.
2. Plot the mean O.D. obtained for each dilution of the reference plasma (x axis) against the corresponding value of the reference level (y axis). It is recommended that the curve be plotted on a log-log graph.
3. Using the mean O.D., determine the control and patient relative values from the graph, or alternatively, use linear regression to calculate from the reference curve.
4. To calculate VWF:Act levels in percent (%) of normal, multiply the control and patient relative values (obtained from the reference curve) by the assigned value for the REAADS Reference Plasma (see Reference Assay sheet included in Package Insert).

For example:

Patient relative value (from the reference curve): 40

Reference Plasma assigned value (from Reference Plasma Assay sheet): 105% of normal

Actual patient VWF:Act value (as % of normal): $40 \times 1.05 = 42\%$

5. Ensure that all quality control parameters have been met (see Quality Control) before reporting test results.

QUALITY CONTROL

1. The mean O.D. of the reagent blank should be less than 0.1 when the spectrophotometer has been blanked against the water well. Readings greater than 0.1 may indicate possible reagent contamination or inadequate plate washing.
2. O.D. values for the duplicates of the controls or patient samples should be within 20% of the mean O.D. value for samples with absorbance readings greater than 0.200.
3. VWF:Act values obtained for the controls should fall within manufacturer's assigned ELISA ranges. Occasional small deviations outside these ranges may be acceptable.
4. Each laboratory should periodically determine their own reference range for this assay.

EXPECTED VALUES¹³

One hundred normal plasma samples were tested on three lots of the REAADS VWF:Act assay. The mean value was 99.3% (SD of 39.0%) with 90% of the values for this normal population >50%. The assay cut-off was established at 50%. The 100 normal plasma samples were obtained from healthy individuals of unknown blood type. Individuals with type "O" blood type have been shown to have lower plasma levels of VWF (approximately 25% lower) when compared to those with other blood types. It is recommended that users of the REAADS Von Willebrand Factor Activity Kit establish reference ranges for the population served by their laboratory.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS¹³

Detection Range:

The detection range for the REAADS VWF:Act assay has been determined to be 3.1-245.8%. This range is consistent with that published in the literature and reported by other commercially available assays.⁴⁻⁷ For greatest accuracy, samples that generate absorbance readings outside the O.D. range of the reference curve should be retested at an appropriate dilution. The lower limit of detection was calculated using data for the reagent blank plus 3 standard deviations, using 3 kit lots. The effective range of each run will depend on the assayed value of the reference plasma.

Precision:

Intra-assay precision:

Variability within a plate (intra-assay precision) was determined by testing three commercially prepared plasma samples across three plates from each of three lots (16 replicates per sample per plate). The data, presented in the following table, shows a mean CV of 4.3%. Intra-assay CVs were also determined by testing 14 commercially prepared plasma samples, in duplicate dilutions, across three plate lots. The mean CV for duplicates over three plate lots was 5.2%.

Inter-assay precision:

The precision between lots was determined by comparing the values recovered for eight different control samples on two lots. Each of the eight samples was tested in duplicate in each assay. The mean inter-assay CV was 8.3%.

Intra-assay precision (variability within a plate)	Von Willebrand Factor Activity range	CV range	Overall mean CV:
Replicates (x16) (3 lots):	(% of normal)		
	108.1-117.5%	2.7-5.0%	4.3%
	58.1-62.1%	2.6-6.4%	
37.3-38.4%	2.9-6.4%		
Duplicates (3 lots):	3.2-122.4%	0.7-16.5%	5.2%
Inter-assay inter-lot precision (variability between lots)			
Duplicates (2 lots):	4.8-116.4%	0.0-28.4%	8.3%

Curve Fit:

Curve Fit was evaluated by analyzing reference curves prepared from the Reference Plasma supplied with each kit. Reference Plasma dilutions were prepared and tested in duplicate (as outlined in the product insert) on two different plates, on three lots. For each assay, the mean O.D. of each Reference Plasma dilution was plotted against its Von Willebrand Factor activity concentration, in log-log format (log O.D. vs log of % Von Willebrand Factor activity concentration). The fit of each curve was calculated by linear regression, and expressed as the coefficient of determination (R-squared). The average coefficient of determination (R-squared) was 0.99296.

Percent Recovery:

Percent Recovery was determined by mixing control plasmas, with known values, in various proportions to assess how accurately the assay would recover theoretical values. The mean percent recovery was 102.1% based on two dilutions for each sample across three pilot lots, with an average percent variation of 3.4%.

LIMITATIONS OF THE TEST

The VWF:Act levels obtained from this assay are an aid to diagnosis only. Each physician must interpret these results in light of the patient's history, physical findings, and other diagnostic procedures. There is a normal plasma fluctuation of VWF due to unknown mechanisms. For this reason, repeat testing may be necessary. In addition, VWF acts as an acute phase reactant; it may be increased in various stressful conditions and diseases including pregnancy, oral contraceptive use, surgery, liver and autoimmune diseases, prostate cancer, etc.^{4,5}

Plasma samples can be inadvertently depleted or degraded of VWF by improper collection or laboratory processing. Individuals with "O" blood type have been shown to have lower plasma levels of VWF (25%) when compared to those with other blood types. Acquired Von Willebrand disease has been reported in some patients with lymphoproliferative disease.⁷

As with any assay employing antibodies from an animal source (e.g. mouse, rabbit, goat, etc.) to capture a target molecule, the possibility exists for interference in the serum or plasma of patients who have been exposed to preparations containing animal antibodies for diagnosis or therapy. Falsely elevated or depressed values may be seen in these patients.

Testing samples containing hemoglobin, lipids and bilirubin is not recommended as they may interfere with VWF Activity results.

The presence of Rheumatoid Factor in plasma samples can sometimes interfere in sandwich ELISAs by binding to the capture and/or detecting antibodies. Rheumatoid Factor interference has not been evaluated in the VWF Activity ELISA and should be considered when evaluating results.

Warranty

This product is warranted to perform as described in this package insert. Corgenix, Inc. disclaims any implied warranty of merchantability or fitness for a particular use, and in no event shall Corgenix, Inc. be liable for consequential damage.

For Technical or Customer Service in the United States, phone 1-800-729-5661. Outside the United States, phone (303) 457-4345, fax (303) 457-4519, e-mail: technicalsupport@corgenix.com, or contact a Corgenix authorized distributor.

**REAADS® VON WILLEBRAND
FACTOR ACTIVITY TEST KIT**

***In-vitro*-Diagnostikum**

ANWENDUNGSGEBIET

Ein enzymimmunologischer Test (ELISA) zur quantitativen Bestimmung der Aktivität des von Willebrand-Faktors (VWF:Act) in Zitrushumanplasma.

TESTPRINZIP

Beim REAADS VWF:Act Test handelt es sich um einen Sandwich-ELISA. Die 96 Mikrovertiefungen der Polystyrolplatten sind mit monoklonalen Capture-Antikörpern beschichtet, die spezifisch mit dem thrombozytenbindenden Teil des VWF reagieren.^{9,10} Bei der Inkubation von verdünntem Patientenplasma in den Mikrovertiefungen wird das verfügbare freie Antigen an die monoklonalen Antikörper auf der Oberfläche der Mikrovertiefungen gebunden. Die Platten werden gewaschen, um nichtgebundene Proteine und andere Moleküle aus dem Plasma zu entfernen. Gebundenes Antigen wird mit Hilfe von Antihuman-VWF-Antikörpern, die an Meerrettichperoxidase (HRP) konjugiert sind, quantitativ bestimmt. Nichtgebundenes Konjugat wird nach der Inkubation durch Waschen entfernt. Ein chromogenes Substrat aus Tetramethylbenzidin (TMB) und Wasserstoffperoxid (H₂O₂) wird hinzugefügt, um eine Farbreaktion hervorzurufen. Die Farbintensität wird mit einem Spektrophotometer bei 450 nm gemessen und in optischen Dichteeinheiten (OD/cm) angegeben. Die relative Konzentration von VWF:Act in Patientenplasma wird anhand einer Kurve bestimmt, die mit Hilfe des im Kit enthaltenen Referenzplasmas erstellt wurde (in %).

REAGENZIE

Bei 2 - 8°C lagern. Nicht einfrieren!

Jeder REAADS Testkit zur Bestimmung der Aktivität des von Willebrand-Faktors (VWF) (96 Mikrovertiefungen) enthält die folgenden Reagenzien:

- 12 x 8 Mikrovertiefungen, beschichtet mit stabilisierten Antikörpern (12 Streifen mit je 8 abbrechbaren Vertiefungen), mit Halterung. Die Vertiefungen sind mit maus monoklonalen Antikörpern beschichtet, die spezifisch mit der funktionellen Region des VWF reagieren.
- 60 ml Probenverdünner (blaugrüne Lösung)*
- 3 x 0,5 ml lyophilisiertes Referenzplasma für die Erstellung der Eichkurve, mit Testblatt.
- 12 ml Lösung mit HRP-konjugiertem Kaninchen-Antihuman-VWF-Antikörper (blaue Lösung).
- 13 ml Substrat (TMB/ H₂O₂).
- 15 ml Stopplösung (0,36 N Schwefelsäure).
- 30 ml Waschkonzentrat (33X phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS) mit 0,01% Tween 20). Hinweis: Das Waschkonzentrat kann Trübungen aufweisen, die sich jedoch nicht negativ auswirken und beim Herstellen der Arbeitsverdünnung verschwinden sollten.

*** ACHTUNG: Enthält Natriumazid**

WARNUNGEN UND VORSICHTSMASSNAHMEN

In-vitro-Diagnostikum

1. Zur Herstellung des in diesem Kit enthaltenen Referenzplasmas wurden Materialien humanen Ursprungs verwendet, die in den von der FDA geforderten Tests negativ auf Antikörper gegen HBsAg, HCV, HIV I und HIV II reagierten. Trotzdem sollten alle humanen Blutprodukte einschließlich Patientenproben als potenziell infektiöse Materialien gehandhabt werden.
2. Nicht mit dem Mund pipettieren.
3. In den Bereichen, in denen Proben oder Kitreagenzien gehandhabt werden, nicht rauchen, essen oder trinken.
4. Beim Handhaben der Kitreagenzien Einmalhandschuhe tragen und nachher gründlich die Hände waschen.
5. Das Substrat kann augen- und hautreizend wirken. Absorption durch die Haut ist möglich. Beim Umgang mit dem Substrat stets Handschuhe tragen und anschließend gründlich die Hände waschen. Reagenzien von Zündquellen fernhalten. Kontakt mit Oxidationsmitteln vermeiden.
6. Bestimmte Komponenten sind wie folgt gekennzeichnet:

Reizt die Augen (R 36). Berührung mit der Haut vermeiden (S 24). Berührung mit den Augen vermeiden (S 25). Bei Berührung mit den Augen gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren. (S 26). Bei Verschlucken sofort ärztlichen Rat einholen und Verpackung oder Etikette vorweisen (S 46).

Waarschuwing . Biologisches Risiko .

PROBENENTNAHME UND –VORBEREITUNG

Als Probenmatrix sollte Plasma verwendet werden, dem Natriumzitat (3,2% oder 3,8%) als Antikoagulantium beigefügt wurde. Blut sollte durch Venenpunktion gewonnen und die Probe sofort zentrifugiert werden. Das Plasma abtrennen und bis zum Test bei 2 - 8°C lagern. Wenn die Probe nicht innerhalb von 8 Stunden nach Gewinnung analysiert wird, muss sie bei -70°C gelagert und innerhalb eines Monats untersucht werden.

GEBRAUCHSANLEITUNG

Bereitgestellte Materialien:

REAADS Testkit zur Bestimmung der Aktivität des von Willebrand-Faktors; siehe „Reagenzien“ mit einer vollständigen Auflistung.

Erforderliche, aber nicht bereitgestellte Materialien:

- Kontrollplasma für VWF:Act. Das zur Verwendung gewählte Kontrollplasma entsprechend den Anleitungen des Herstellers rekonstituieren und lagern.
- Analysenreines Wasser (1 l) zur Herstellung der PBS/Tween 20-Waschlösung, zur Rekonstitution von Referenzplasma und zum Nullabgleich des Plattenlesegeräts während des letzten Testschritts.
- Messzylinder
- Präzisionspipetten mit dazu passenden Pipettenspitzen zum Abpipettieren von 5 bis 1000 µl
- Diverses Glasgeschirr zur Handhabung kleiner Volumen
- Kolben oder Flasche, 1 Liter
- Waschflaschen, vorzugsweise mit etwas zurückgeschnittener Spitze, um einen breiten Strahl zu erzielen, oder ein automatisches oder halbautomatisches Mikrotiterplatten-Waschsystem
- Einmalhandschuhe, vorzugsweise talkumfrei
- Spektrophotometer zur Auswertung von Mikrotiterplatten durch Bestimmung der Extinktion bei 450 nm (mit 650 nm als Referenzwellenlänge, sofern verfügbar)
- Mehrkanalpipetten, mit denen 8 Vertiefungen gleichzeitig beschickt werden können
- Mikrodilutionsröhrchen zur Herstellung der Patientenproben

Hinweise zur Durchführung

1. Plasmaproben und Reagenzien vor Verwendung auf Raumtemperatur (18 - 26°C) bringen und vor Gebrauch gründlich durchmischen - nicht aufschäumen. Alle nicht gebrauchten Proben und Reagenzien so schnell wie möglich wieder in den Kühlschrank/Kühlraum (2 - 8°C) zurückstellen.
2. Alle Verdünnungen von Referenzplasma, zur Verwendung vorgesehenem Kontrollplasma und Patientenproben dürfen erst kurz vor der Verwendung im Test hergestellt werden.
3. Für jeden Testlauf sollte auf jeder Platte eine Vertiefung für den Substratleerwert reserviert bleiben. In diese Vertiefung dürfen weder Proben noch Kitreagenzien gegeben werden. Stattdessen werden dieser Vertiefung direkt vor dem Ablesen der Platte im Spektrophotometer 200 µl analysenreines Wasser hinzugefügt. Das Plattenlesegerät sollte so programmiert werden, dass es den Nullabgleich gegen diese mit Wasser gefüllte Vertiefung durchführt.
4. Für ein optimales Testergebnis ist eine gute Waschtechnik erforderlich. Ausreichendes Waschen lässt sich am besten dadurch erreichen, dass ein kraftvoller Waschlösungsstrahl aus einer Plastikspritzflasche mit einer weiten Spritzöffnung auf den Boden der Mikrovertiefungen gerichtet wird. Waschlösung in der für den Substratleerwert reservierten Vertiefung beeinträchtigt das Verfahren nicht. Es kann auch ein automatisches Mikrotiterplatten-Waschsystem verwendet werden.
5. WICHTIG: Wenn das restliche PBS/Tween 20 nicht ausreichend entfernt wird, kann eine richtige Farbentwicklung der Substratlösung nicht gewährleistet werden.
6. Wenn möglich sollte eine Mehrkanalpipette benutzt werden, mit der 8 Vertiefungen gleichzeitig beschickt werden können. Die Durchführung des Tests wird so beschleunigt. Außerdem unterscheiden sich Inkubations- und Reaktionszeiten für die Vertiefungen weniger voneinander.
7. Die Zeitangaben müssen bei allen Schritten sorgfältig eingehalten werden. Alle Referenzplasmaverdünnungen, Kontrollen und Proben müssen innerhalb eines Zeitraums von 5 Minuten zugegeben werden. Daher sollten nur so viele Proben verwendet werden, wie innerhalb dieses Zeitraums zugegeben werden können.
8. Für alle Inkubationen beginnt die Inkubationszeit mit der Komplettierung der Reagenz- oder Probenzugabe.
9. Die Zugabe aller Proben und Reagenzien sollte immer mit der gleichen Geschwindigkeit und in gleicher Reihenfolge erfolgen.
10. Eine Inkubationstemperatur über oder unter der Raumtemperatur (18 - 26°C) kann die Ergebnisse verfälschen.
11. Beim Öffnen der primären Fläschchen und Entnehmen aliquoter Teile muss eine Kontamination der Reagenzien vermieden werden.
12. Die Kitkomponenten nach dem Verfallsdatum nicht mehr verwenden.
13. Beschichtete Mikrovertiefungen, Konjugat und Substrat sind chargenspezifische Komponenten, die nicht mit anderen Chargen zusammen verwendet werden dürfen.

VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

1. **Waschlösung (PBS/Tween 20):** 30 ml Waschkonzentrat (33X PBS/Tween 20) abmessen und mit analysenreinem Wasser auf 1 Liter auffüllen. Der pH-Wert der endgültigen Lösung sollte bei $7,35 \pm 0,1$ liegen. Nicht verwendete PBS-Lösung im Kühlschrank bei 2 - 8°C aufbewahren. Bei den ersten Anzeichen einer mikrobiellen Verunreinigung oder einer Kreuzkontamination ist die Lösung zu verwerfen.
2. Das Referenzplasma durch Zugabe von 0,5 ml analysenreinen Wassers rekonstituieren. Zum Durchmischen vorsichtig mit Drehbewegung schütteln. Vor Verwendung 10 Minuten stehen lassen, damit eine vollständige Auflösung gewährleistet ist. Bei Lagerung zwischen 2 - 8°C 8 Stunden stabil. Das benötigte Kontrollplasma entsprechend den Anleitungen des Herstellers rekonstituieren und lagern.

Durchführung des Tests

1. Nicht benötigte Mikrotiterstreifen aus der Halterung entfernen und in dem mitgelieferten Säckchen aufbewahren.
2. Jede Referenzplasmaverdünnung doppelt testen. Für die Patienten- und Kontrollproben werden ebenfalls Doppelbestimmungen empfohlen. Eine Vertiefung sollte für den Blindversuch verwendet werden. Der Probenverdünner ohne Plasma wird wie in Schritt 6 dieses Abschnitts erklärt in die Vertiefung pipettiert. Diese Vertiefung wird im weiteren Testablauf wie eine Patientenprobe behandelt. Auf jeder Platte sollte eine Vertiefung für den Substratleerwert reserviert bleiben. Diese Vertiefung bleibt bis zum Ende des Tests leer; sie wird erst direkt vor dem Ablesen der Platte mit 200 µl analysenreinem Wasser gefüllt. Der Substratleerwert wird zum Nullabgleich des Plattenlesegeräts verwendet.
3. Unter Verwendung des mit dem Kit gelieferten Referenzplasmas entsprechend den nachfolgenden Ausführungen fünf Referenzplasmaverdünnungen herstellen.

Volumenreferenz- plasma		Volumenproben verdünner		Referenz- Konzentrationswert (%)
100 µl	+	1000 µl	=	200
50 µl	+	1000 µl	=	100
25 µl	+	1000 µl	=	50
25 µl	+	2000 µl	=	25
25 µl	+	4000 µl	=	12,5

***Der Referenzkonzentrationswert darf nur zum Erstellen der Eichkurve verwendet werden.**

4. Von jeder Patientenprobe und der zur Verwendung gewählten Kontrollplasmaprobe eine 1:21 Verdünnung mit Probenverdünner (blaugrüne Lösung) herstellen; Beispiel: 25 µl Probe zu 500 µl Probenverdünner geben. Gründlich durchmischen.
5. 100 µl der Verdünnungen (Referenzplasmaproben x 5, Kontrollen und Patientenproben) in die betreffenden Mikrovertiefungen geben.
6. 100 µl des Probenverdünners in die für den Blindversuch vorgesehene Vertiefung pipettieren. Die für den Substratleerwert vorgesehene Vertiefung bleibt leer.
7. 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren. Nach der Inkubation wird die Flüssigkeit durch vorsichtiges Umdrehen der Mikrovertiefungen entleert. Dabei ist darauf zu achten, dass andere Mikrovertiefungen nicht durch die Proben kontaminiert werden.
8. Viermal mit Arbeitswaschlösung (PBS/Tween 20) waschen. Jede Vertiefung sollte bei jedem Waschvorgang mit Waschlösung gefüllt werden. Waschlösung in der für den Substratleerwert reservierten Vertiefung beeinträchtigt das Verfahren nicht. Nach jedem Waschschritt wird die Waschflüssigkeit durch Umdrehen der Mikrovertiefungen entleert. Die Flüssigkeit wird durch eine schnelle Bewegung im Handgelenk aus den Vertiefungen geschleudert. Die Halterung muss in der Mitte, oben und unten zusammengedrückt werden, um ein Herausfallen der Mikrovertiefungen beim Waschen zu vermeiden. Auf saugfähigem Papier abtupfen, um die Waschlösung restlos zu entfernen. Die Vertiefungen dürfen zwischen den einzelnen Waschschritten nicht austrocknen.
9. In jede Vertiefung (mit Ausnahme der für den Substratleerwert vorgesehenen) 100 µl der Lösung mit HRP-konjugiertem Antikörper (blau) geben.
10. 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren. Nach der Inkubation wird die Konjugatlösung durch vorsichtiges Umdrehen der Mikrovertiefungen entleert.
11. Wie in Schritt 8 viermal mit Arbeitswaschlösung (PBS/Tween 20) waschen. Waschlösung in der für den Substratleerwert reservierten Vertiefung beeinträchtigt das Verfahren nicht. Nach dem letzten Waschvorgang durch eine rasche Bewegungen die Flüssigkeit herausschleudern und auf saugfähigem Papier trocknen. Die Vertiefungen nicht austrocknen lassen.

12. Jeder (bis auf die für den Substratleerwert vorgesehene) Vertiefung 100 µl Substrat zugeben und 10 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubieren. Das Substrat muss den Vertiefungen mit einem gleichmäßigen Tempo zugesetzt werden. Bei positiver Reaktion färbt sich der Inhalt der Vertiefungen blau.
13. Die Enzymreaktion wird durch Zugabe von 100 µl Stopplösung (0,36 N Schwefelsäure) pro Vertiefung (außer der für den Substratleerwert reservierten Vertiefung) beendet. Die Stopplösung muss in derselben Reihenfolge und mit derselben Geschwindigkeit wie das Substrat den Vertiefungen zugesetzt werden. Das blaue Substrat schlägt nach gelb um, während bisher farblos gebliebenes Substrat weiterhin farblos bleibt. In die für den Substratleerwert vorgesehene Vertiefung wird keine Stopplösung gegeben. Stattdessen wird diese Vertiefung mit 200 µl analysenreinem Wasser gefüllt. Der Nullpunkt des Plattenlesegeräts wird anhand des Substratleerwerts eingestellt. Für jede Vertiefung die optische Dichte (OD) bei 450 nm gegen einen 650-nm-Referenzfilter (sofern verfügbar) ablesen. Im Interesse bestmöglicher Ergebnisse sollten die OD-Werte innerhalb von 30 Minuten nach Beifügen der Stopplösung abgelesen werden.

ERGEBNISSE

Die Aktivität des VWF in Plasma wird in Prozent (%) relativ zu einem Pool von Normalplasma angegeben.

1. Aus den Doppelbestimmungen der Referenzplasmaverdünnungen, der ausgewählten Kontrollen und Patientenproben die mittleren OD-Werte berechnen.
2. Den für jede Verdünnung des Referenzplasmas erhaltenen mittleren OD-Wert (x-Achse) gegen den entsprechenden Referenzkonzentrationswert (y-Achse) auftragen. Die Kurve sollte auf volllogarithmischem Papier erstellt werden.
3. Anhand des mittleren OD-Werts die relativen Werte für Kontrolle und Patientenproben aus der grafischen Darstellung bestimmen; alternativ können die Werte durch lineare Regression aus der Eichkurve berechnet werden.
4. Zur Berechnung des Gehalts an VWF:Act (in % relativ zum Normalwert) die aus der Eichkurve erhaltenen relativen Werte für Kontrollen und Patientenproben mit dem festgesetzten Wert für das REAADS Referenzplasma multiplizieren (siehe Plasmaanalyse-Referenzblatt in der Packungsbeilage).

Zum Beispiel:

Relativer Patientenwert (aus Eichkurve): 40

Zugehöriger Referenzplasmawert (aus Plasmaanalyse-Referenzblatt): 105% des Normalwerts

Wert für VWF:Act in Patientenprobe (in % relativ zum Normalwert): $40 \times 1,05 = 42\%$

5. Bevor die Analysenergebnisse berichtet werden, muss sichergestellt werden, dass alle Qualitätskontrollparameter erfüllt wurden (siehe Qualitätskontrolle).

QUALITÄTSKONTROLLE

1. Wenn das Spektrophotometer gegen Wasser auf Null gestellt wurde, muss die mittlere OD des Blindversuchs kleiner als 0,1 sein. Höhere Extinktionen können entweder durch Kontamination der Reagenzien oder durch unzureichendes Waschen der Mikrotiterplatte bedingt sein.
2. Bei einer Extinktion von über 0,200 dürfen die Einzelwerte der OD-Doppelbestimmungen von Kontrollen oder Patientenproben um nicht mehr als 20% vom OD-Mittelwert abweichen.
3. Für die Kontrollen erhaltene Werte für VWF:Act sollten innerhalb des vom Hersteller für ELISA-Tests festgesetzten Bereichs liegen. Gelegentliche, geringe Abweichungen von diesem Bereich können toleriert werden.
4. Jedes Labor sollte regelmäßig den eigenen Referenzbereich für diesen Test festlegen.

NORMALWERTE¹³

Einhundert normale Plasmaproben wurden mit drei Chargen des REAADS VWF:Act Tests untersucht. Der Mittelwert lag bei 99,3% (Std.abw. = 39,0%) mit 90% der Werte für diese normale Population > 50%. Der Grenzwert des Tests wurde als 50% bestimmt. Die 100 normalen Plasmaproben stammten von gesunden Spendern mit unbekannter Blutgruppe. Personen mit Blutgruppe O weisen niedrigere VWF-Plasmaspiegel (ca. 25% geringer) als Personen mit anderen Blutgruppen auf. Anwender des REAADS Testkits zur Bestimmung der Aktivität des von Willebrand-Faktors sollten ihre eigenen Referenzbereiche für die vom jeweiligen Labor erfasste Population festlegen.

GRENZEN DES TESTS

Die mit diesem Test erhaltenen VWF:Act-Konzentrationen sind als Hilfestellung zur Diagnose anzusehen. Jeder Arzt muss diese Ergebnisse im Zusammenhang mit der Krankengeschichte des Patienten, der körperlichen Untersuchung sowie den Ergebnissen anderer diagnostischer Verfahren interpretieren. Die Normalplasma-VWF-Werte unterliegen bestimmten Schwankungen, deren Ursache derzeit noch nicht bekannt ist. Daher muss die Bestimmung u. U. wiederholt werden. Darüber hinaus verhält sich VWF wie ein Akutphasenindikator. Er kann in verschiedenen Belastungssituationen und bei Krankheitszuständen, wie z. B. Schwangerschaft, Einnahme oraler Kontrazeptiva, Operationen, Leberkrankheiten, Autoimmunerkrankungen, Prostatakrebs etc. erhöht sein.^{4,5}

Durch Fehler bei der Blutabnahme oder beim Verarbeiten der Plasmaproben im Labor kann VWF unbeabsichtigterweise abgebaut oder zerstört werden. Personen mit Blutgruppe O weisen niedrigere VWF-Plasmaspiegel (25%) als Personen mit anderen Blutgruppen auf. Bei Personen mit lymphoproliferativer Erkrankung kann ein erworbenes von Willebrand-Jürgens-Syndrom vorliegen.⁷

Wie bei jedem Test mit Antikörpern aus tierischen Quellen (z. B. Maus, Kaninchen, Ziege etc.) zum Binden eines Zielmoleküls besteht auch hier die Gefahr von Störungen im Serum oder Plasma von Patienten, die zu einem früheren Zeitpunkt im Rahmen einer Therapie oder Diagnosestellung Zubereitungen mit tierischen Antikörpern ausgesetzt waren. Bei solchen Patienten haben erhöhte oder erniedrigte Werte keine klinische Bedeutung.

Hämoglobin-, lipid- oder bilirubinhaltige Proben sollten nicht getestet werden, da sich diese Verbindungen störend auf den VWF Activity Test auswirken können.

Eventuell in Plasmaproben vorhandener Rheumafaktor kann sich u.U. an die Capture- und/or Detektionsantikörper binden und dadurch den Sandwich-ELISA stören. Der VWF Activity ELISA wurde hinsichtlich einer Störung durch Rheumafaktor nicht untersucht; dieses Störpotenzial sollte bei der Interpretation der Ergebnisse in Betracht gezogen werden.

Garantie

Dieses Produkt wird mit der Garantie geliefert, dass es wie in dieser Packungsbeilage beschrieben funktioniert. Corgenix, Inc. macht keine stillschweigenden Zusicherungen bezüglich der Handelbarkeit oder Eignung für einen bestimmten Zweck und haftet in keinem Fall für Folgeschäden.

Unseren technischen und allgemeinen Kundendienst erreichen Sie in den USA unter 1-800-729-5661. Nummern von außerhalb der USA: Telefon +1-303-457-4345, Fax +1-303-457-4519, E-Mail: technicalsupport@corgenix.com. Sie können sich auch mit einem autorisierten Corgenix-Händler in Verbindung setzen.

**REAADS® VON WILLEBRAND
FACTOR ACTIVITY TEST KIT**

Pour utilisation diagnostique *in vitro*

UTILISATION ENVISAGÉE

Dosage immunoenzymatique pour la détermination quantitative de l'activité du facteur Von Willebrand (VWF:Act) dans le plasma citraté.

PRINCIPE DU TEST

Le dosage VWF:Act REAADS est un dosage immunoenzymatique en sandwich. Une couche d'anticorps monoclonal de capture spécifique de la portion de VWF qui lie les plaquettes est déposée sur des plaques en polystyrène à 96 micropuits.^{9,10} Le plasma patient dilué est incubé dans les puits en laissant tout l'antigène disponible se lier à l'anticorps monoclonal à la surface des micropuits. Les plaques sont lavées afin de retirer les protéines non liées et autres molécules du plasma. L'antigène lié est quantifié à l'aide d'un anticorps de détection anti-VWF conjugué à la peroxydase du raifort (PR). Après incubation, le conjugué non lié est enlevé par lavage. Un substrat chromogène de tétraméthylbenzène (TMB) et de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) est ajouté pour développer une réaction colorée. L'intensité de la couleur à 450 nm est mesurée en unités de densité optique (D.O.) à l'aide d'un spectrophotomètre. La concentration relative en pourcentage de VWF:Act est déterminée sur une courbe établie à l'aide du plasma de référence fourni dans le kit.

RÉACTIFS

Conserver entre 2 et 8 °C. Ne pas congeler.

Chaque kit de test de l'activité du facteur Von Willebrand (VWF) REAADS pour 96 micropuits contient les réactifs suivants :

- 12 x 8 micropuits enduits d'anticorps stabilisé (12 barrettes de 8 puits détachables), avec cadre. Les puits sont enduits d'un anticorps monoclonal spécifique de la zone fonctionnelle de VWF. (d'origine souris)
- 60 ml de tampon pour échantillon (solution bleu vert) *
- 3 x 0,5 ml de plasma de référence lyophilisé pour la préparation de la courbe de référence, avec feuille de dosage.
- 12 ml de solution conjuguée anticorps anti-VWF PR (solution bleue). (d'origine lapine)
- 13 ml de substrat (TMB/H₂O₂).
- 15 ml de solution d'arrêt (acide sulfurique 0,36 N).
- 30 ml de concentré de lavage [33X sérum physiologique tamponné au phosphate (SPTP) avec 0,01 % de Tween 20]. Remarque : le concentré de lavage peut présenter une turbidité qui n'affecte pas la performance du composant et doit disparaître lors de la préparation de la solution de travail.



*** ATTENTION : Contient de l'azide de sodium**

AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS

Pour utilisation diagnostique in vitro

1. Les produits d'origine humaine utilisés pour préparer le plasma de référence inclus dans ce kit ont été testés et vérifiés négatifs pour les anticorps anti-HBsAG, anti-HCV et anti-HIV-I & II selon les tests requis par la FDA. Cependant, tous les dérivés de sang humain, y compris les échantillons patient, doivent être traités comme s'ils étaient potentiellement infectieux.
2. Ne pas aspirer à la bouche.
3. Ne pas fumer, boire ou manger dans les zones où des échantillons ou des réactifs du kit sont manipulés.
4. Mettre des gants à usage unique pour manipuler les réactifs du kit et se laver soigneusement les mains ensuite.
5. Le substrat peut causer une irritation des yeux et de la peau. Une absorption à travers la peau est possible. Utiliser des gants pour manipuler le substrat et se laver soigneusement après la manipulation. Tenir les réactifs éloignés des sources d'ignition. Éviter tout contact avec des agents oxydants.
6. Certains composants sont étiquetés avec la mention suivante :

Irritant pour les yeux (R 36). Éviter le contact avec la peau (S 24). Éviter le contact avec les yeux (S 25). En cas de contact avec les yeux, laver immédiatement et abondamment avec de l'eau et consulter un spécialiste (S 26). En cas d'ingestion, consulter immédiatement un médecin et lui montrer l'emballage ou l'étiquette (S 46).

Avertissement . Risque biologique .

COLLECTE ET PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

La matrice d'échantillage doit être constituée de plasma prélevé avec 3,2 % ou 3,8 % de citrate de sodium à titre d'anticoagulant. Le sang doit être prélevé par ponction veineuse et l'échantillon doit être immédiatement centrifugé. Retirer le plasma et stocker entre 2 et 8°C jusqu'au moment où le dosage peut être effectué. S'il n'est pas dosé dans les huit heures du prélèvement, l'échantillon doit être stocké à -70°C et dosé dans le mois.

MODE D'EMPLOI

Matériel fourni :

Kit de test de l'activité du facteur Von Willebrand REAADS ; voir la liste complète sous « Réactifs ».

Matériel requis mais non fourni:

- Plasma de contrôle VWF:Act. Suivre les instructions du fabricant pour reconstituer le plasma de contrôle choisi en vue de son utilisation et stocker ainsi qu'il est recommandé.
- Eau pure pour analyse (1 l) pour préparer la solution mère SPTP/Tween, pour reconstituer le plasma de référence et pour mettre au zéro ou effacer le lecteur de plaque durant l'étape finale du dosage.
- Cylindres gradués
- Pipettes de précision capables de délivrer entre 5 et 1 000 µl, avec embout approprié
- Verrerie convenant à la manipulation de petits volumes
- Flacon ou bouteille de 1 litre
- Des pissettes, de préférence munies d'un goulot partiellement découpé pour autoriser un débit élargi, ou bien un système de lavage automatique ou semi-automatique
- Gants à usage unique, de préférence non talqués
- Spectrophotomètre de lecture de plaque capable de lire la densité optique à 450 nm (avec une référence à 650 nm si disponible)
- Pipettes multicanal capables de distribuer dans 8 puits simultanément.
- Tubes de microdilution pour la préparation des échantillons patient

Remarques sur la procédure

1. Amener les échantillons de plasma et les réactifs à température ambiante (18 à 26°C) et bien mélanger avant l'utilisation, éviter la formation de mousse. Remettre dès que possible tous les échantillons et réactifs inutilisés dans le réfrigérateur (2 à 8°C).
2. Toutes les dilutions de plasma de référence, de plasma de contrôle et d'échantillons patient doivent être effectuées juste avant leur utilisation pour le dosage.
3. Un unique puits d'eau à blanc doit être inclus sur chaque plaque pour chaque lot de tests. Aucun échantillon ou réactif du kit ne doit être ajouté à ce puits. Ajouter à la place à ce puits 200 µl d'eau pure pour analyse immédiatement avant de lire la plaque dans le spectrophotomètre. Le lecteur de plaque doit être programmé sur le zéro ou à vide sur ce puits d'eau.
4. Une bonne technique de lavage est primordiale pour une performance optimale du dosage. La meilleure technique pour obtenir un lavage satisfaisant est de diriger en force un débit de solution mère dans le fond des micropuits à l'aide d'une poire en plastique à gros goulot. La présence de solution mère dans le puits d'eau à blanc n'in-terfère pas avec la procédure. On peut aussi utiliser un système automatique de lavage de microplaque.
5. **IMPORTANT:** L'élimination imparfaite des résidus SPTP/Tween 20 risque de causer un développement irrégulier de la couleur de la solution substrat.
6. Utiliser si possible une pipette multicanal capable de distribuer dans 8 puits simultanément. Cela accélère la procédure et permet de mieux uniformiser la durée d'incuba-tion et de réaction de tous les puits.
7. Respecter impérativement la durée des étapes. Tous les plasmas de référence dilués, contrôles et échantillons doivent être ajoutés aux micropuits en cinq minutes au plus. Ne pas traiter un nombre d'échantillons nécessitant plus de temps.
8. Pour toutes les incubations, la période d'incubation débute dès que l'ajout du réactif ou de l'échantillon est terminé.
9. L'ajout de tous les échantillons et réactifs doit s'effectuer au même rythme et dans le même ordre.
10. Une température d'incubation s'écartant de la température ambiante (18 à 26°C) peut causer des résultats erronés.
11. Éviter toute contamination des réactifs lors de l'ouverture des flacons primaires et du retrait des prélèvements fractionnés.
12. Ne pas utiliser les composants du kit au-delà de leur date de péremption.
13. Les micropuits enduits, le conjugué et le substrat sont des composants spécifiques d'un lot, ne pas les utiliser avec des kits d'autres lots.

PRÉPARATION DES RÉACTIFS

1. **Solution mère (SPTP/Tween 20) :** Mesurer 30 ml de concentré de lavage (33X SPTP/Tween 20) et diluer dans de l'eau pure pour analyse afin d'obtenir 1 litre. Le pH de la solution finale doit être de $7,35 \pm 0,1$. Conserver la solution de SPTP inutilisée au réfrigérateur entre 2 et 8°C. Jeter si la solution montre des signes de contamination microbienne ou croisée.
2. Reconstituer le plasma de référence en ajoutant 0,5 ml d'eau pure pour analyse. Agiter doucement pour mélanger. Laisser reposer 10 minutes pour une dissolution complète avant l'utilisation. Reste stable 8 heures si stocké entre 2 et 8 °C. Reconstituer le plasma de contrôle selon les instructions du fabricant et stocker ainsi qu'il est recommandé.

Procédure de dosage

1. Retirer du cadre toutes les barrettes de micropuits qui ne seront pas utilisées et les ranger dans le sac fourni à cet effet.
2. Doser en double chaque dilution de plasma de référence. La détermination en double des échantillons des patients et des contrôles est aussi recommandée. Un puits doit être utilisé pour le réactif à blanc : ajouter du tampon pour échantillon sans plasma au puits ainsi qu'expliqué à l'étape 6 de cette section. Ce puits sera traité de la même manière qu'un échantillon patient dans les étapes suivantes du dosage. Un puits d'eau à blanc doit être inclus avec chaque plaque ; il doit rester vide jusqu'à l'ajout de 200 µl d'eau pure pour analyse à la fin du dosage, immédiatement avant la lecture de la plaque. Le puits d'eau à blanc sert à la mise à zéro du lecteur de plaque.
3. Utiliser le plasma de référence fourni avec le kit pour préparer 5 dilutions de plasma de référence ainsi que décrit ci-dessous.

<u>Volume Plasma de référence</u>		<u>Volume Tampon pour échantillon</u>		<u>Taux de référence (%)</u>
100 µl	+	1 000 µl	=	200
50 µl	+	1 000 µl	=	100
25 µl	+	1 000 µl	=	50
25 µl	+	2 000 µl	=	25
25 µl	+	4 000 µl	=	12,5

*** La valeur du taux de référence ne doit être utilisée que pour tracer la courbe de référence.**

4. Préparer une dilution à 1:21 de chaque échantillon patient et de plasma de contrôle choisi pour l'utilisation dans du tampon pour échantillon (solution bleu vert) : ajouter par ex. 25 µl d'échantillon à 500 µl de tampon pour échantillon. Bien mélanger.
5. Ajouter 100 µl des dilutions (plasmas de référence x 5, échantillons patient et contrôles) aux micropuits appropriés.
6. Ajouter 100 µl de tampon pour échantillon au puits de réactif à blanc. Laisser vide le puits destiné à l'eau à blanc.
7. Laisser incuber 15 minutes à température ambiante. Lorsque l'incubation est terminée, retourner avec précaution les micropuits et jeter le liquide. Ne pas laisser les échantillons contaminer les autres micropuits.
8. Laver 4 fois à l'aide de solution mère de travail (SPTP/Tween 20). Chaque puits doit être rempli de solution mère à chaque lavage. L'utilisation de solution mère dans le puits vide destiné à servir d'eau à blanc n'interfère pas avec la procédure. Retourner les micropuits entre chaque lavage pour évacuer le liquide. Secouer le liquide des puits d'un mouvement sec du poignet. Tenir le cadre serré par le milieu de ses bords supérieur et inférieur afin de retenir les barrettes au cours du lavage. Éponger sur du papier absorbant pour éliminer les résidus de liquide de lavage. Ne pas laisser sécher les puits entre les étapes.
9. Ajouter 100 µl de solution conjuguée anticorps PR (bleue) à chaque puits (excepté le puits d'eau à blanc).
10. Laisser incuber 15 minutes à température ambiante. Lorsque l'incubation est terminée, retourner avec précaution les micropuits et jeter la solution conjuguée.
11. Laver 4 fois à l'aide de solution mère de travail (SPTP/Tween 20) ainsi qu'à l'étape 8. La présence de solution mère dans le puits d'eau à blanc n'interfère pas avec la procédure. Après le dernier lavage, retourner la plaque d'un mouvement sec du poignet et éponger le liquide restant sur du papier absorbant. Ne pas laisser sécher les puits entre les étapes.

12. Ajouter 100 µl de solution substrat dans chaque puits (excepté le puits d'eau à blanc) et laisser incuber 10 minutes à température ambiante. Ajouter de la solution substrat aux puits à un rythme constant. Une couleur bleue se développe dans les puits avec échantillon positif.
13. Ajouter 100 µl de solution d'arrêt (acide sulfurique 0,36 N) à chaque puits (excepté le puits d'eau à blanc) pour arrêter la réaction enzymatique. Veiller à ajouter la solution d'arrêt aux puits dans le même ordre et au même rythme que la solution substrat. La solution substrat bleue devient jaune et la solution substrat incolore reste incolore. Ne pas ajouter de solution d'arrêt au puits d'eau à blanc. À la place, ajouter dans le puits d'eau à blanc 200 µl d'eau pure pour analyse. Annuler ou mettre à zéro le lecteur de plaque sur le puits d'eau à blanc. Lire la D.O. de chaque puits à 450 nm au regard d'un filtre de référence à 650 nm (si disponible). Pour un résultat optimal, la D.O. doit être mesurée dans les 30 minutes qui suivent l'ajout de la solution d'arrêt

RÉSULTATS

Les valeurs de l'activité VWF du plasma sont généralement exprimées en pourcentage relatif (%) par rapport à une réserve de plasma normal.

1. Calculer la D.O. moyenne des doubles dilutions de plasma de référence, des contrôles retenus pour l'utilisation et des échantillons patient.
2. Reporter les valeurs de la D.O. moyenne obtenues pour chaque dilution du plasma de référence (abscisse) sur la valeur correspondante du taux de référence (ordonnée). Il est recommandé d'établir la courbe en coordonnées logarithmiques.
3. Utiliser la D.O. moyenne pour déterminer les valeurs de contrôle et patient relatives sur la courbe ; on peut aussi calculer par régression linéaire à partir de la courbe de référence.
4. Pour calculer le taux de VWF:Act en % de la normale, multiplier les valeurs de contrôle et patient relatives (obtenues sur la courbe de référence appropriée) par la valeur assignée correspondante du plasma de référence REAADS (voir la feuille de dosage plasmatique de référence figurant sur la notice).

Par exemple:

Valeur patient relative (sur la courbe de référence) : 40

Valeur assignée du plasma de référence (provenant de la feuille de dosage plasmatique de référence):
105 % de la normale

Valeur réelle de VWF:Act patient (en % de la normale) : $40 \times 1,05 = 42 \%$

5. S'assurer que tous les paramètres du contrôle qualité sont remplis (voir Contrôle qualité) avant de communiquer les résultats des tests.

CONTRÔLE QUALITÉ

1. La D.O. moyenne obtenue pour le réactif à blanc doit être inférieure à 0,1 lorsque le zéro du spectrophotomètre a été réalisé sur l'eau. Une valeur supérieure à 0,1 indique une contamination ou une plaque mal lavée.
2. Les D.O. des doubles des contrôles ou des échantillons patient ne doivent pas différer de plus de 20 % de la D.O. moyenne des échantillons dont les D.O. lues sont supérieures à 0,200.
3. Les valeurs de VWF:Act obtenues pour les contrôles doivent être comprises dans les plages de dosage immunoenzymatique assignées du fabricant. De petites variations occasionnelles peuvent être tolérées.
4. Chaque laboratoire doit déterminer régulièrement ses propres plages de référence pour ce dosage.

VALEURS NORMALES¹³

100 échantillons de plasma normal ont été dosés sur 3 lots du dosage VWF:Act REAADS. La valeur moyenne était de 99,3 % (É-T 39,0 %) avec 90 % des valeurs de cette population normale > 50 %. Le seuil du dosage était fixé à 50 %. Les 100 échantillons de plasma normal provenaient de sujets normaux de groupe sanguin inconnu. Comparés aux sujets d'autres groupes sanguins, les sujets de type « O » se sont avérés présenter un taux de VWF du plasma inférieur (~25 %). Il est recommandé aux laboratoires utilisant le kit de test de l'activité du facteur de Von Willebrand REAADS d'établir des plages de référence de la population qu'ils desservent.

LIMITATIONS DU TEST

Les taux de VWF:Act obtenus ne constituent qu'une aide au diagnostic. Chaque médecin doit interpréter ces résultats au vu des antécédents du patient, de son examen médical et des autres procédures de diagnostic. Des mécanismes inconnus entraînent des fluctuations normales du VWF du plasma. Pour cette raison on peut devoir répéter les dosages. En outre, le VWF agit en tant que réactif de phase aiguë et peut augmenter lors de diverses situations de stress et maladies, y compris la grossesse, le traitement contraceptif oral, les interventions chirurgicales, les maladies auto-immunes et hépatiques, le cancer de la prostate etc.^{4,5}

Un prélèvement ou un traitement de laboratoire incorrect risque d'épuiser ou de diminuer le VWF des échantillons de plasma. Comparés aux sujets d'autres groupes sanguins, les sujets de type « O » se sont avérés présenter un taux de VWF du plasma inférieur (25 %). Des cas de maladie de Von Willebrand acquise ont été rapportés chez des patients avec syndrome lymphoprolifératif.⁷

Comme pour tout dosage utilisant un anticorps d'origine animale (par ex. souris, lapin, chèvre etc.) pour capturer une molécule cible, il y a un risque d'interférence dans le sérum ou le plasma de patients ayant été exposés à des préparations contenant des anticorps animaux dans le cadre d'un diagnostic ou d'un traitement. Ces patients peuvent présenter des valeurs faussement élevées ou basses.

Les échantillons contenant de l'hémoglobine, des lipides ou de la bilirubine ne sont pas recommandés car ces éléments peuvent compromettre les résultats de l'activité du facteur de Von Willebrand (VWF).

La présence du facteur rhumatoïde dans des échantillons plasmatiques peut parfois présenter une interférence dans des dosages ELISA sandwich en raison de sa liaison aux anticorps de capture et/ou de détection. L'interférence du facteur rhumatoïde n'a pas été évaluée dans le dosage ELISA de l'activité VWF, mais il convient d'en tenir compte lors de l'évaluation de résultats.

Garantie

Ce produit est garanti fonctionner ainsi que décrit dans la notice jointe au kit. Corgenix, Inc. dénie toute garantie implicite d'aptitude à la vente ou de conformité à une utilisation particulière et Corgenix, Inc. ne sera en aucun cas responsable d'aucun dommage consécutif.

Pour contacter le service technique ou client aux États-Unis : téléphone 1-800-729-5661. Hors des États-Unis: téléphone (303) 457-4345; télécopie (303) 4574519; Email technicalsupport@corgenix.com ; sinon, contacter un distributeur autorisé de Corgenix.

**REAADS® VON WILLEBRAND
FACTOR ACTIVITY TEST KIT**

Para uso diagnóstico *in vitro*

INDICACIONES

Un ensayo inmunoenzimático (ELISA) para la determinación cuantitativa de la actividad del factor de Von Willebrand (VWF:Act) en plasma humano citratado.

PRINCIPIO DE LA PRUEBA

El ensayo del VWF:Act REAADS es un ELISA de tipo sándwich. Para llevarlo a cabo se recubren placas de poliestireno de 96 micropocillos con un anticuerpo monoclonal de captura específico de la parte del VWF que se une a los trombocitos^{9,10}. El plasma diluido del paciente se incuba en los pocillos, lo que permite que los antígenos disponibles se unan a los anticuerpos monoclonales de la superficie de los micropocillos. Las placas se lavan para retirar las proteínas no retenidas y otras moléculas plasmáticas. El antígeno retenido se cuantifica utilizando anticuerpos de detección del VWF antihumano conjugados con peroxidasa (HRP). Tras la incubación, los conjugados no retenidos se retiran mediante lavado. Se añade un sustrato cromógeno de tetrametilbencidina (TMB) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂) para desarrollar una reacción coloreada. La intensidad del color se mide en unidades de densidad óptica (D.O.) con un espectrofotómetro a 450 nm. Los porcentajes de concentración relativos de VWF:Act en el plasma del paciente se determinan respecto a una curva elaborada a partir del plasma de referencia incluido con el equipo.

REACTIVOS

Consérvelos a entre 2 y 8°C. No los congele.

Cada prueba de la actividad del factor de Von Willebrand (VWF) de 96 micropocillos REAADS contiene los siguientes reactivos:

- 12 x 8 micropocillos recubiertos de anticuerpos estabilizados (12 tiras de 8 pocillos divisibles), con gradilla. Los pocillos están recubiertos con un anticuerpo monoclonal específico de la región funcional del VWF. (ratones)
- 60 ml de diluyente de muestras (solución azul-verde)*
- 3 x 0,5 ml de plasma de referencia liofilizado para la preparación de la curva de referencia, con hoja de ensayo.
- 12 ml de conjugado de solución de anticuerpos del VWF antihumano y HRP (solución azul). (leporino)
- 13 ml de sustrato (TMB/ H₂O₂).
- 15 ml de solución de parada (ácido sulfúrico 0,36 N).
- 30 ml de concentrado para lavado (tampón fosfato salino [PBS] 33X con Tween 20 al 0,01%). Nota: en el concentrado para lavado puede aparecer turbidez que no afectará a la actuación de los componentes y desaparecerá cuando se prepare la dilución de trabajo.


*** PRECAUCIÓN: Contiene azida sódica**

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

Para uso diagnóstico in vitro

1. El material de origen humano empleado para preparar el plasma de referencia incluido con este equipo se ha examinado y dio negativo en las pruebas de los anticuerpos del antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg), el virus de la hepatitis C (HCV) y los virus VIH I y II requeridas por la FDA (organismo estadounidense regulador de la calidad de los alimentos y los medicamentos). Sin embargo, todos los derivados sanguíneos humanos, incluidas las muestras de los pacientes, deben manipularse como material potencialmente infeccioso.
2. No use la pipeta con la boca.
3. No fume, coma ni beba en áreas donde se manipulen muestras o reactivos del equipo.
4. Use guantes desechables cuando manipule reactivos del kit y lávese minuciosamente las manos después de su uso.
5. El sustrato puede causar irritación ocular o cutánea. Es posible la absorción a través de la piel. Utilice guantes cuando manipule sustrato y lávese minuciosamente las manos después de su uso. Mantenga este reactivo lejos de fuentes inflamables. Evite el contacto con agentes oxidantes.
6. Algunos componentes están rotulados con lo siguiente:

Irritante para los ojos (R 36). Evite el contacto con la piel (S 24). Evite el contacto con los ojos (S 25). En caso de contacto con los ojos, enjuague inmediatamente con abundante agua y busque consejo médico (S 26). En caso de ingestión, busque inmediatamente atención médica y muestre este envase o etiqueta (S 46).

Advertencia . Riesgo biológico .

OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

Como matriz de muestra debe emplearse el plasma obtenido con citrato de sodio al 3,2 ó 3,8% como anticoagulante. La sangre debe extraerse por venopunción, y la muestra ha de centrifugarse inmediatamente. Extraiga el plasma y consérvelo a entre 2 y 8°C hasta que pueda realizarse el análisis. Si la muestra no se examina en las ocho horas posteriores a la obtención, deberá conservarse a -70°C y examinarse en el curso de un mes.

INSTRUCCIONES DE USO

Materiales provistos

Prueba de la actividad del factor de Von Willebrand REAADS; véase una lista completa en «Reactivos».

Materiales necesarios pero no suministrados

- Plasma de control para VWF:Act. Reconstituya el plasma de control seleccionado para utilizarlo según las instrucciones del fabricante y consérvelo de la forma recomendada.
- Agua destilada (1 litro) para preparar solución de lavado de PBS y Tween 20, para reconstituir el plasma de referencia y para poner a cero o borrar la lectura de la placa durante el paso final del ensayo.
- Probetas
- Pipetas de precisión capaces de dispensar entre 5 y 1000 µl, con puntas apropiadas
- Diverso material de vidrio adecuado para el manejo de volúmenes pequeños
- Matraz o botella de 1 litro
- Botellas de lavado, preferentemente con la punta parcialmente cortada para proporcionar un flujo amplio, o un sistema automático o semiautomático de lavado
- Se recomienda el uso de guantes desechables sin talco

- Espectrofotómetro lector de placas capaz de leer la absorbancia a 450 nm (con referencia de 650 nm si se encuentra disponible)
- Pipetas multicanal capaces de administrar las soluciones simultáneamente a 8 pocillos
- Tubos de microdilución para la preparación de la muestra del paciente

Notas sobre el procedimiento

1. Deje que las muestras de plasma y los reactivos del equipo alcancen la temperatura ambiente (entre 18 y 26°C) y mézclelos bien antes de utilizarlos. Evite la formación de espuma. Devuelva todas las muestras y reactivos sin usar al almacenamiento refrigerado (entre 2 y 8°C) en cuanto sea posible.
2. Todas las diluciones del plasma de referencia, el plasma de control elegido y las muestras de los pacientes deben prepararse inmediatamente antes de utilizarlos en el ensayo.
3. En cada proceso debe incluirse un pocillo testigo únicamente con agua en cada placa. No deben añadirse muestras ni reactivos del equipo a este pocillo. En su lugar, añada 200 µl de agua destilada al pocillo inmediatamente antes de la lectura de la placa en el espectrofotómetro. El lector de placas debe programarse para que la densidad óptica del pocillo testigo se sustraiga de las densidades ópticas del resto de los pocillos.
4. Una buena técnica de lavado es fundamental para el funcionamiento correcto de este ensayo. El lavado adecuado se logra mejor si se dirige un flujo de solución de lavado a presión apretando una botella de plástico de punta ancha dentro del fondo de los micropocillos. La solución de lavado del pocillo testigo de agua no interferirá con el procedimiento. También puede utilizarse un sistema de lavado de placas de microvaloración automático.
5. **IMPORTANTE:** Si no se retiran adecuadamente los restos de PBS y Tween 20, la solución de sustrato puede desarrollar un color inadecuado.
6. Siempre que sea posible, utilice una pipeta multicanal capaz de administrar las soluciones a 8 pocillos simultáneamente. Esto agiliza el proceso y proporciona tiempos de reacción e incubación más uniformes en todos los pocillos.
7. Es fundamental controlar estrictamente el tiempo de todos los pasos. Todas las diluciones del plasma de referencia, los controles y las muestras deben añadirse a los micropocillos en un plazo máximo de 5 minutos. El tamaño del lote de muestras no debe ser mayor que la cantidad que puede añadirse en este período de tiempo.
8. Para todas las incubaciones, el tiempo de incubación comienza a partir de la aplicación del último reactivo o muestra.
9. El añadido de todas las muestras y reactivos debe realizarse a la misma velocidad y en la misma secuencia.
10. Las temperaturas de incubación superiores o inferiores a la temperatura ambiente normal (entre 18 y 26°C) pueden hacer que se obtengan resultados inexactos.
11. Evite la contaminación de los reactivos al abrir y extraer alícuotas de los frascos primarios.
12. No utilice los componentes del equipo después de la fecha de caducidad.
13. Los micropocillos recubiertos, el conjugado y el sustrato son componentes específicos del lote, y no deben emplearse con lotes diferentes del equipo.

PREPARACIÓN DEL REACTIVO

1. **Solución de lavado (PBS y Tween 20):** Mida 30 ml de concentrado para lavado (PBS 33X y Tween 20) y dilúyalos en agua destilada hasta obtener un litro de solución. El pH de la solución final debe ser $7,35 \pm 0,1$. Conserve la solución PBS no utilizada en el refrigerador a entre 2 y 8°C. Deseche la solución si muestra signos de contaminación microbiana o cruzada.
2. Reconstituya el plasma de referencia añadiendo 0,5 ml de agua destilada. Remuévalo ligeramente para que se mezcle. Para que se disuelva por completo, déjelo reposar 10 minutos antes de utilizarlo. Se mantendrá estable durante 8 horas cuando se conserve a entre 2 y 8°C. Reconstituya el plasma de control apropiado según las instrucciones del fabricante y consérvelo de la forma recomendada.

Procedimiento del ensayo

1. Retire de la gradilla las tiras de micropocillos que no se vayan a utilizar y guárdelas en la bolsita suministrada.
2. Analice cada dilución de plasma de referencia por duplicado. También se recomienda realizar determinaciones por duplicado para analizar las muestras de control y de los pacientes. Un pocillo debe procesarse como reactivo testigo; a este pocillo se añadirá diluyente de muestras sin plasma, tal como se explica en el paso 6 de este apartado. Este pocillo se trata de la misma forma que las muestras de pacientes en los siguientes pasos del ensayo. Debe incluirse un pocillo testigo de agua con cada placa, que debe permanecer vacío hasta que se añadan 200 µl de agua destilada al completar el ensayo, inmediatamente antes de la lectura de la placa. El pocillo testigo de agua debe usarse para poner a cero el lector de placas.
3. Utilizando el plasma de referencia suministrado con el equipo, prepare cinco diluciones de plasma de referencia de la forma descrita a continuación.

<u>Volumen de plasma de referencia</u>		<u>Volumen de diluyente de muestras</u>		<u>*Nivel de referencia (%)</u>
100 µl	+	1 000 µl	=	200
50 µl	+	1 000 µl	=	100
25 µl	+	1 000 µl	=	50
25 µl	+	2 000 µl	=	25
25 µl	+	4 000 µl	=	12,5

***El valor del nivel de referencia sólo debe utilizarse para construir la curva de referencia.**

4. Prepare una dilución al 1:21 de cada muestra de los pacientes y plasma de control que se vayan a utilizar en el diluyente de muestras (solución azul-verde); p. ej., 25 µl añadidos a 500 µl de diluyente de muestras. Mezcle bien.
5. Añada 100 µl de las diluciones (plasmas de referencia x 5, muestras de los pacientes y controles) a los micropocillos apropiados.
6. Añada 100 µl de diluyente de muestras al pocillo testigo de reactivo. Deje vacío el pocillo testigo de agua.
7. Incúbase durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después de completar la incubación, invierta cuidadosamente los micropocillos y deseche el líquido. No permita que las muestras contaminen otros micropocillos.
8. Lave los pocillos 4 veces con solución de lavado de trabajo (PBS y Tween 20). Cada pocillo debe llenarse con solución de lavado en cada uno de los lavados. La solución de lavado en el pocillo vacío que se va a utilizar como pocillo testigo de agua no interferirá con el procedimiento. Invierta los micropocillos entre cada lavado para vaciar el líquido. Con un movimiento seco de la muñeca, sacuda el líquido de los pocillos. La gradilla debe presionarse por el centro de las partes superior e inferior para que no se caigan los módulos de micropocillos durante el lavado. Seque con papel secante para retirar los restos de líquido de lavado. No debe permitirse que los pocillos se sequen entre un paso y otro.
9. Añada 100 µl de solución de anticuerpos de actividad conjugada con HRP (solución azul) a cada pocillo (excepto al pocillo testigo de agua).
10. Incúbase durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después de completar la incubación, invierta cuidadosamente los micropocillos y deseche la solución de conjugado.
11. Lave los pocillos 4 veces con solución de lavado de trabajo (PBS y Tween 20), como en el paso 8. La solución de lavado del pocillo testigo de agua no interferirá con el procedimiento. Mediante un movimiento seco, escurra el líquido del pocillo y séquelo con papel absorbente tras el lavado final. No permita que los pocillos se sequen.

12. Añada 100 µl de sustrato a cada pocillo (con excepción del pocillo testigo de agua) e incube durante 10 minutos a temperatura ambiente. Añada sustrato a los pocillos a un ritmo uniforme. Se desarrollará un color azul en los pocillos con muestras positivas.
13. Añada 100 µl de la solución de parada (ácido sulfúrico 0,36 N) a cada pocillo (con excepción del pocillo testigo de agua) para detener la reacción enzimática. Asegúrese de añadir la solución de parada a los pocillos en el mismo orden y al mismo ritmo con el que se añadió el sustrato. La solución de sustrato azul se volverá amarilla y el sustrato incoloro permanecerá igual. No añada solución de parada al pocillo testigo de agua. En su lugar, añada 200 µl de agua destilada al pocillo testigo de agua. Borre o ponga a cero el lector de placas respecto al pocillo testigo de agua. Lea la D.O. de cada pocillo a 450 nm, respecto a un filtro de referencia de 650 nm (si se encuentra disponible). Para obtener un resultado óptimo, los valores de la D.O. deben leerse durante los 30 minutos posteriores a la adición de la solución de parada.

RESULTADOS

Los valores de la actividad del VWF plasmático se expresan en porcentajes relativos (%) de los del plasma normal combinado.

1. Calcule los valores medios de la D.O. de los duplicados de las diluciones del plasma de referencia de los controles que se vayan a utilizar y de las muestras de los pacientes.
2. Trace las D.O. medias obtenidas con cada dilución del plasma de referencia (eje x) respecto al valor correspondiente del nivel de referencia (eje y). Se recomienda trazar la curva sobre un gráfico log-log.
3. Utilice la D.O. media para determinar los valores relativos de controles y pacientes a partir del gráfico; también puede utilizar la regresión lineal para calcular a partir de la curva de referencia.
4. Para calcular los niveles de VWF:Act en porcentajes (%) de lo normal, multiplique los valores relativos de controles y pacientes (obtenidos a partir de la curva de referencia) por el valor asignado del plasma de referencia REAADS(consulte la hoja del ensayo de plasma de referencia incluida en el prospecto del envase).

Por ejemplo:

Valor relativo del paciente (de la curva de referencia): 40

Valor asignado del plasma de referencia (de la hoja del ensayo de plasma de referencia): 105% de lo Normal
Valor real de VWF:Act (en porcentaje de lo normal): $40 \times 1,05 = 42\%$

5. Asegúrese de que todos los parámetros de control de calidad se hayan cumplido (véase «Control de calidad») antes de informar sobre los resultados de las pruebas.

CONTROL DE CALIDAD

1. La D.O. media del reactivo testigo debe ser inferior a 0,1 cuando el espectrofotómetro se haya borrado con respecto al pocillo de agua. Las lecturas superiores a 0,1 pueden indicar una posible contaminación de los reactivos o un lavado inadecuado de las placas.
2. Los valores de la D.O. de los duplicados de los controles y las muestras de los pacientes deben estar a menos de un 20% por encima o por debajo del valor medio de la D.O. en el caso de muestras con lecturas de absorbancia superiores a 0,200.
3. Los valores de VWF:Act obtenidos en los controles deben estar dentro de los rangos del ELISA asignados por el fabricante. Las desviaciones pequeñas y ocasionales fuera de estos rangos pueden ser aceptables.
4. Cada laboratorio debe determinar periódicamente su propio rango de referencia para este ensayo.

VALORES ESPERADOS¹³

Se analizaron cien muestras de plasma normal en tres lotes del ensayo de VWF:Act REAADS. La media fue de 99,3% (desviación estándar de 39,0%), y un 90% de los valores de esta población normal fueron > 50%. El umbral del ensayo se estableció en un 50%. Las 100 muestras de plasma normal se obtuvieron de personas sanas de grupo sanguíneo desconocido. Se ha demostrado que las personas con grupo sanguíneo «O» tienen menores niveles plasmáticos de VWF (aproximadamente un 25% menores) que las de otros grupos sanguíneos. Se recomienda que los usuarios de la prueba de actividad del factor de Von Willebrand REAADS establezcan rangos de referencia para la población a la que atiende su laboratorio.

LIMITACIONES DE LA PRUEBA

Los niveles de VWF:Act obtenidos en este ensayo constituyen únicamente una ayuda diagnóstica. Cada médico debe interpretar estos resultados basándose en los antecedentes del paciente, en los datos obtenidos en la exploración física y en otros procedimientos diagnósticos. Hay una fluctuación plasmática normal del VWF debida a mecanismos desconocidos, por lo que puede ser necesario repetir la prueba. Además, el VWF actúa como reactivo de fase aguda; puede tener niveles altos en varias condiciones estresantes y en enfermedades, que incluyen embarazo, anticonceptivos orales, intervenciones quirúrgicas, nefropatías, enfermedades autoinmunitarias, cáncer de próstata, etc.^{4,5}

El VWF de las muestras de plasma puede agotarse o degradarse inadvertidamente si no se utiliza un método de obtención o un procesamiento de laboratorio apropiados. Se ha demostrado que los individuos con grupo sanguíneo «O» tienen menores niveles plasmáticos de VWF (25%) que los de otros grupos sanguíneos. Se ha observado que algunos pacientes con enfermedad linfoproliferativa presentan enfermedad de Von Willebrand adquirida⁷.

Como en todos los ensayos que utilizan anticuerpos de origen animal (p. ej., ratones, conejos, cabras, etc.) para capturar una molécula determinada, cabe la posibilidad de que haya interferencias en el suero o plasma de los pacientes a los que se les haya administrado preparados que contengan anticuerpos animales con fines diagnósticos o terapéuticos. En estos pacientes pueden observarse valores espurios altos o bajos.

No se recomienda analizar muestras que contengan hemoglobina, lípidos y bilirrubina, ya que estas sustancias pueden interferir con los resultados de la actividad del VWF.

Algunas veces, la presencia de factor reumatoide en muestras de plasma puede producir interferencias en los ELISA de tipo sándwich, ya que dicho factor se une a los anticuerpos de captura o detección. La interferencia del factor reumatoide no se ha evaluado en el ELISA de la actividad del VWF, y debe tenerse en cuenta al evaluar los resultados.

Garantía

Se garantiza que este producto funcionará según se describe en este prospecto. Corgenix, Inc. desautoriza cualquier garantía implícita de comerciabilidad o aptitud para un uso particular, y en ningún caso Corgenix, Inc. se hará responsable de daños emergentes.

Para obtener servicio técnico o de atención al cliente en los EE.UU., llame al 1-800-729-5661. Fuera de los EE.UU., llame al (303) 457-4345, envíe un fax al (303) 457-4519 o un correo electrónico a technicalsupport@corgenix.com, o póngase en contacto con un distribuidor autorizado de Corgenix.

**REAADS® VON WILLEBRAND
FACTOR ACTIVITY TEST KIT**

Per uso diagnostico *in vitro*

USO PREVISTO

Dosaggio immunoenzimatico (ELISA) per la determinazione quantitativa dell'attività del fattore Von Willebrand (VWF:Act) nel plasma umano citrato.

PRINCIPIO DEL TEST

Il dosaggio REAADS per VWF:Act è un dosaggio ELISA a sandwich. Piastre in polistirene a 96 micropozzetti vengono rivestite con anticorpo monoclonale di cattura specifico per la porzione del VWF che si lega alle piastrine.^{9,10} Il plasma diluito prelevato viene incubato nei pozzetti, consentendo all'eventuale antigene presente di legarsi all'anti-corpo monoclonale presente sulla superficie dei pozzetti. Le piastre vengono quindi lavate per eliminare le proteine libere e altre molecole di plasma. La determinazione quantitativa dell'antigene legato viene eseguita utilizzando anticorpi di individuazione di anti-VWF umano coniugati con perossidasi di rafano (HRP). Dopo l'incubazione, il coniugato libero viene eliminato mediante lavaggio. Per sviluppare una reazione colorata, si aggiunge un substrato cromogeno a base di tetrametilbenzidina (TMB) e perossido di idrogeno (H₂O₂). L'intensità del colore si misura in unità di densità ottica (O.D.) con uno spettrofotometro a 450 nm. Il VWF:Act dei pazienti, in concentrazioni percentuali relative, viene determinato rispetto ad una curva preparata con il plasma di riferimento incluso nel kit.

REAGENTI

Conservare a 2-8°C. Non congelare.



Ogni kit REAADS per il dosaggio dell'attività del fattore Von Willebrand (VWF) (96 micropozzetti) contiene i seguenti reagenti.

- 12 x 8 micropozzetti rivestiti con (topo) anticorpo stabilizzato (12 strisce di 8 pozzetti amovibili), con telaio. I pozzetti sono rivestiti con un anticorpo monoclonale specifico per la regione funzionale del VWF.
- 60 ml di diluente per campioni (soluzione blu-verde); contiene sodio azide.
- 3 x 0,5 ml di plasma di riferimento liofilizzato per la preparazione della curva di riferimento, con foglio di analisi.
- 12 ml di soluzione di anticorpo (leporini) anti-VWF umano coniugato con HRP (soluzione blu).
- 13 ml di substrato (TMB/ H₂O₂).
- 15 ml di soluzione di arresto (0,36 N acido solforico).
- 30 ml di concentrato di lavaggio (soluzione fisiologica 33X tamponata con fosfato (PBS) e 0,01% di detergente tipo Tween 20). Nota - Il concentrato di lavaggio può esibire un aspetto torbido che non influisce sulle prestazioni dei componenti e che dovrebbe scomparire durante la preparazione della diluizione pronta all'uso.

ATTENZIONE: contiene di sodio azide

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

Per uso diagnostico in vitro

1. Il materiale di origine umana usato per preparare il plasma di riferimento incluso in questo kit è stato analizzato in osservanza dei requisiti della FDA ed è risultato negativo per gli anticorpi anti-HBsAg, HCV e HIV I e II. Tuttavia, tutti i derivati di sangue umano, inclusi i campioni prelevati dai pazienti, devono essere trattati come materiali potenzialmente infetti.
2. Non pipettare con la bocca.
3. Non fumare, mangiare o bere nelle aree in cui si manipolano i campioni o i reagenti del kit.
4. Indossare guanti monouso quando si maneggiano i reagenti del kit e lavarsi bene le mani subito dopo.
5. Il substrato può essere irritante per gli occhi e la cute. È possibile l'assorbimento attraverso la cute. Durante la manipolazione del substrato, indossare un paio di guanti e lavarsi bene le mani subito dopo. Tenere i reagenti lontano da fonti di ignizione. Evitare il contatto con agenti ossidanti.
6. Alcuni componenti sono etichettati come segue:
Irritante per gli occhi (R 36). Evitare il contatto con la pelle (S 24). Evitare il contatto con gli occhi (S 25). In caso di contatto con gli occhi, risciacquare immediatamente con abbondante acqua e consultare un medico (S 26). In caso di ingestione, consultare immediatamente un medico, mostrandogli il contenitore o l'etichetta (S46).
Avvertimento . Rischio biologico .

PRELIEVO E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Come matrice dei campioni, usare plasma prelevato con 3,2% o 3,8% di citrato di sodio come anticoagulante. Il sangue deve essere prelevato mediante venipuntura e il campione deve essere centrifugato immediatamente. Rimuovere il plasma e conservarlo a 2-8°C fino al momento di eseguire l'analisi. Se non viene analizzato entro 8 ore dal prelievo, il campione va conservato a -70°C e analizzato entro 1 mese.

ISTRUZIONI PER L'USO

Materiali forniti

Kit REAADS per il dosaggio dell'attività del fattore von Willebrand; per un elenco completo, vedere "Reagenti" a pagina 2.

Materiali richiesti ma non forniti

- Plasma di controllo per VWF:Act. Per ricostituire il plasma di controllo selezionato per l'uso, seguire le istruzioni della ditta produttrice e conservarlo come raccomandato.
- Acqua distillata (circa 1 litro) per preparare la soluzione di lavaggio PBS/Tween 20, per ricostituire il plasma di riferimento e per tarare o azzerare il lettore della piastra nella fase finale del dosaggio.
- Cilindri graduati
- Pipette di precisione in grado di erogare quantità comprese tra 5 e 1000 µl, con le punte appropriate.
- Vetreria assortita adatta a piccoli volumi di liquidi
- Beuta o flacone da 1 litro
- Flaconi per lavaggio, preferibilmente con punta parzialmente tagliata per allargare il getto, o un sistema di lavaggio automatico o semiautomatico
- Guanti monouso, preferibilmente senza talco
- Spettrofotometro per piastra in grado di rilevare l'assorbanza a 450 nm (possibilmente con riferimento a 650 nm, se disponibile)
- Pipette multicanale per la dispensazione simultanea in 8 pozzetti
- Provette per microdiluizione da usare per la preparazione dei campioni prelevati da pazienti.

Note procedurali

1. Portare i campioni di plasma e i reagenti a temperatura ambiente (18-26°C) e mescolarli bene prima dell'uso; evitare la formazione di schiuma. Rimettere al più presto nel congelatore (2-8°C) tutti i campioni e i reagenti non utilizzati.
2. Tutte le diluizioni del plasma di riferimento, del plasma di controllo selezionato per l'uso e dei campioni devono essere preparate immediatamente prima di essere usate nel dosaggio.
3. Preparare un pozzetto bianco da includere in ogni piastra per ciascuna analisi. A questo pozzetto non bisogna aggiungere campioni o reagenti del kit. Aggiungervi invece 200 µl di acqua distillata immediatamente prima di leggere la piastra nello spettrofotometro. Questo pozzetto bianco è utile per la taratura o l'azzeramento del lettore di piastre.
4. Una buona tecnica di lavaggio è molto importante per la riuscita ottimale del dosaggio. Per un lavaggio adeguato, dirigere nel fondo dei pozzetti un getto forte di soluzione di lavaggio erogata da un flacone di plastica morbida con punta larga. La presenza di soluzione di lavaggio nel pozzetto bianco non interferisce con la procedura. È anche possibile usare un sistema di lavaggio automatico per piastre di microtitolazione.
5. **IMPORTANTE** - I residui di PBS/Tween 20 possono causare uno sviluppo inadeguato della colorazione della soluzione di substrato.
6. Se possibile, utilizzare una pipetta multicanale che possa dispensare in 8 pozzetti simultaneamente. Ciò accelera l'esecuzione di questa procedura e consente di sottoporre tutti i pozzetti a tempi di incubazione e di reazione uniformi.
7. Un controllo accurato del tempo in tutte le fasi è importantissimo. Tutte le diluizioni del plasma di riferimento, i controlli, e i campioni vanno dispensati nei pozzetti entro cinque minuti. Il volume dei campioni non deve superare la quantità che può essere aggiunta entro questi cinque minuti.
8. Per tutte le incubazioni, il periodo di incubazione comincia al termine dell'aggiunta dei reagenti o dei campioni.
9. L'aggiunta di tutti i campioni e reagenti deve essere effettuata alla stessa velocità e con la stessa sequenza.
10. Temperature di incubazione più alte o più basse della normale temperatura ambiente (18-26°C) possono generare risultati errati.
11. Durante il prelievo delle aliquote dalle fiale, evitare la contaminazione dei reagenti.
12. Non utilizzare componenti del kit scaduti.
13. I micropozzetti rivestiti, il coniugato e il substrato sono componenti che fanno parte di un lotto specifico e non devono essere usati con kit di lotti diversi.

PREPARAZIONE DEI REAGENTI

1. **Soluzione di lavaggio (PBS/Tween 20):** misurare 30 ml di concentrato di lavaggio (PBS 33X/Tween 20) e portare a 1 l con acqua distillata. Il pH della soluzione finale deve essere pari a $7,35 \pm 0,1$. Conservare la soluzione PBS inutilizzata in frigorifero a 2-8°C. Eliminare la soluzione se mostra segni di contaminazione crociata o batterica.
2. Ricostituire il plasma di riferimento aggiungendo 0,5 ml di acqua distillata. Roteare leggermente per miscelare. Lasciare riposare per 10 minuti prima dell'uso, per dissolvere completamente il composto. Il composto è stabile per 8 ore se conservato a 2-8°C. Per ricostituire il plasma di controllo appropriato, seguire le istruzioni della ditta produttrice e conservarlo come raccomandato.

Procedura di dosaggio

1. Staccare dal telaio tutte le strisce di pozzetti non utilizzate e riporle nella busta in dotazione.
2. Analizzare in duplicato ciascuna diluizione di plasma di riferimento. Si consiglia di eseguire determinazioni in duplicato anche per quanto riguarda i campioni e i controlli. Analizzare un pozzetto come bianco reagente; dispensare nel pozzetto il diluente per campioni senza plasma, come spiegato nel passaggio 6 di questa sezione. In tutte le fasi successive del dosaggio, questo pozzetto viene trattato come un campione prelevato da paziente. Con ogni piastra occorre includere un pozzetto bianco, che dovrà rimanere vuoto fino all'aggiunta di 200 µl di acqua distillata al termine del dosaggio, immediatamente prima della lettura della piastra. Questo bianco va utilizzato per azzerare il lettore di piastre.

- Usando il plasma di riferimento fornito con il kit, preparare cinque diluizioni di plasma di riferimento come descritto qui sotto.

<u>Volume del plasma di riferimento</u>		<u>Volume del diluente per campioni</u>		<u>*Livello di riferimento (%)</u>
100 µl	+	1 000 µl	=	200
50 µl	+	1 000 µl	=	100
25 µl	+	1 000 µl	=	50
25 µl	+	2 000 µl	=	25
25 µl	+	4 000 µl	=	12,5

*** Valore del livello di riferimento da usare solo per costruire la curva di riferimento.**

- Preparare diluizioni in rapporto 1:21 di ciascun campione e di plasma di controllo selezionato per l'uso con diluente per campioni (soluzione blu-verde); ad esempio, aggiungere 25 µl di campione a 500 µl di diluente per campioni. Miscelare accuratamente.
- Dispensare nei pozzetti appropriati 100 µl delle diluizioni (plasma di riferimento x 5, campioni e controlli).
- Dispensare 100 µl di diluente per campioni nel pozzetto bianco reagente. Lasciare vuoto il pozzetto bianco.
- Incubare per 15 minuti a temperatura ambiente. Terminata l'incubazione, capovolgere con cautela i pozzetti ed eliminare il liquido. Evitare di contaminare con i campioni gli altri pozzetti.
- Lavare 4 volte con la soluzione di lavaggio pronta all'uso (PBS/Tween 20). Per il lavaggio, ciascun pozzetto deve essere riempito con soluzione di lavaggio. La presenza di soluzione di lavaggio nel pozzetto bianco non interferirà con la procedura. Capovolgere i pozzetti tra un lavaggio e l'altro per eliminare il liquido. Con un movimento a scatto del polso, scuotere i pozzetti provocando la fuoriuscita del liquido. Per trattenere i moduli dei micropozzetti durante il lavaggio, afferrarne il telaio ponendo un dito sul bordo inferiore e uno sul bordo superiore. Asciugare il liquido residuo picchiettando su carta assorbente. Evitare l'essiccazione dei pozzetti tra le varie fasi dell'analisi.
- Dispensare 100 µl di soluzione di anticorpo coniugato con HRP (blu) in ciascun pozzetto (ad eccezione del pozzetto bianco).
- Incubare per 15 minuti a temperatura ambiente. Terminata l'incubazione, capovolgere con cautela i pozzetti ed eliminare la soluzione di coniugato .
- Lavare 4 volte con la soluzione di lavaggio pronta all'uso (PBS/Tween 20), come indicato nel passaggio 8. La presenza di soluzione di lavaggio nel pozzetto bianco non interferisce con la procedura. Drenare il liquido con un movimento a scatto e asciugare con carta assorbente dopo l'ultimo lavaggio. Evitare l'essiccazione dei pozzetti.
- Dispensare 100 µl di substrato in ciascun pozzetto (ad eccezione del pozzetto bianco) e incubare a temperatura ambiente per 10 minuti. Aggiungere il substrato ai pozzetti a velocità costante. Nei pozzetti con campioni positivi si sviluppa una colorazione blu.
- Dispensare 100 µl di soluzione di arresto (0,36 N acido solforico) in ciascun pozzetto (tranne che nel pozzetto bianco) per la reazione enzimatica. Fare attenzione ad aggiungere la soluzione di arresto ai pozzetti nello stesso ordine ed alla stessa velocità in cui si è precedentemente aggiunto il substrato. La soluzione blu di substrato diventa gialla, mentre il substrato incolore rimane tale. Non aggiungere la soluzione di arresto nel pozzetto bianco. Al pozzetto bianco aggiungere invece 200 µl di acqua distillata. Tarare o azzerare il lettore di piastre sul pozzetto bianco. Leggere la densità ottica di ciascun pozzetto a 450 nm, confrontandola ad un filtro di riferimento a 650 nm (se disponibile). Per ottenere risultati ottimali, i valori della densità ottica devono essere misurati entro 30 minuti dall'aggiunta della soluzione di arresto.

RISULTATI

I valori plasmatici dell'attività del VWF vengono espressi come percentuale relativa (%) rispetto al pool di plasma normale.

1. Calcolare i valori medi della densità ottica per i duplicati delle diluizioni del plasma di riferimento, dei controlli selezionati per l'uso e dei campioni.
2. Tracciare un grafico del valore medio della densità ottica ottenuto per ciascuna diluizione del plasma di riferimento (asse x) rispetto al valore corrispondente del livello di riferimento (asse y). Si consiglia di tracciare la curva su un grafico log-log.
3. Utilizzando il valore medio della densità ottica, determinare in base al grafico i valori relativi del controllo e del paziente, oppure usare la regressione lineare per eseguire il calcolo in base alla curva di riferimento.
4. Per calcolare il livelli di VWF:Act come percentuale (%) del valore normale, moltiplicare i valori relativi dei controlli e dei pazienti (ricavati dalla curva di riferimento), per il valore assegnato del plasma di riferimento REAADS (vedere il foglio del Saggio su plasma di riferimento, incluso nel foglio illustrativo del prodotto).

Ad esempio:

Valore relativo del paziente (curva di riferimento): 40

Valore assegnato del plasma di riferimento (dal foglio del Saggio su plasma di riferimento): 105% del Valore normale

Valore effettivo di VWF:Act del paziente (come % del valore normale): $40 \times 1,05 = 42\%$

5. Prima di riportare i risultati del dosaggio, assicurarsi che siano stati soddisfatti tutti i parametri di controllo di qualità (vedere Controllo di qualità).

CONTROLLO DI QUALITÀ

1. Quando lo spettrofotometro è stato tarato sul pozzetto bianco, la densità ottica media del bianco reagente deve essere inferiore a 0,1. Valori più alti di 0,1 potrebbero indicare una possibile contaminazione del reagente, o insufficiente lavaggio della piastra.
2. I valori di densità ottica dei duplicati dei controlli o dei campioni prelevati dai pazienti devono rimanere entro il 20% del valore medio della densità ottica per i campioni con valori di assorbanza maggiori di 0,200.
3. I valori di VWF:Act ottenuti per i controlli devono essere compresi nei range ELISA assegnati dalla ditta produttrice. Tuttavia, piccole ed occasionali deviazioni al di fuori di questi range possono essere accettabili.
4. Ogni laboratorio deve determinare periodicamente il proprio range di riferimento per questo dosaggio.

VALORI ATTESI¹³

Cento campioni normali di plasma sono stati analizzati con dosaggio REAADS per VWF:Act appartenenti a tre lotti diversi. Il valore medio è risultato del 99,3% (DS del 39,0%) con il 90% dei valori per questa popolazione normale > 50%. Il cut-off del dosaggio è stato stabilito al 50%. I 100 campioni normali di plasma sono stati ottenuti da soggetti sani di gruppo sanguigno sconosciuto. I soggetti con gruppo sanguigno "O" hanno riportato livelli di VWF plasmatico inferiori (del 25% circa) rispetto a quelli appartenenti ad altri gruppi sanguigni. Si consiglia agli utilizzatori del kit REAADS per il dosaggio dell'attività del fattore Von Willebrand di stabilire i range di riferimento per la popolazione servita dai rispettivi laboratori.

LIMITI DEL TEST

I livelli di VWF:Act ottenuti con questo dosaggio sono solo uno strumento di ausilio per la diagnosi. Il medico deve interpretare questi risultati tenendo conto dell'anamnesi del paziente, esami clinici e di altre procedure diagnostiche. La normale oscillazione plasmatica di VWF dipende da meccanismi sconosciuti. Per questo motivo, potrebbe essere necessario ripetere i dosaggi. Inoltre, il VWF: si comporta come un reattivo di fase acuta; può aumentare in varie condizioni di stress, nel corso di malattie e a causa di gravidanza, assunzione di contraccettivi orali, interventi chirurgici, epatopatie e malattie autoimmuni, cancro della prostata, ecc.^{4,5}

Il VWF presente nei campioni può essere inavvertitamente sottratto o degradato a causa di errori durante il prelievo del campione o il trattamento in laboratorio. I soggetti con gruppo sanguigno "O" hanno evidenziato livelli plasmatici inferiori di VWF (25%) rispetto a quelli con altri gruppi sanguigni. Il morbo di Von Willebrand acquisito è stato osservato in alcuni pazienti con sindrome linfoproliferativa.⁷

Come per qualsiasi dosaggio che utilizza anticorpi di origine animale (come topo, coniglio, capra, ecc.) per catturare una molecola bersaglio, esiste la possibilità di interferenza nel siero o nel plasma di pazienti che sono stati esposti, per motivi diagnostici o terapeutici, a preparazioni contenenti anticorpi di origine animale. In questi pazienti è possibile osservare valori falsamente elevati o ridotti.

L'analisi di campioni contenenti emoglobina, lipidi e bilirubina non è consigliata in quanto queste sostanze possono interferire con i risultati dell'attività del VWF.

La presenza di fattore reumatoide nei campioni di plasma può talvolta provocare interferenze nel contesto delle analisi ELISA "a sandwich" legandosi agli anticorpi di cattura e/o di rilevamento. Nella valutazione dei risultati dell'analisi ELISA dell'attività del VWF è necessario tenere presente il fatto che l'interferenza causata dal fattore reumatoide non è stata valutata.

Garanzia















Si garantisce che le prestazioni di questo prodotto corrispondono a quanto descritto nel presente foglietto illustrativo. La Corgenix, Inc. non rilascia alcuna garanzia implicita di commerciabilità o idoneità a uno scopo particolare, e in nessuna circostanza la Corgenix, Inc. si riterrà responsabile di eventuali danni indiretti.

Per ottenere assistenza tecnica o per rivolgersi al servizio clienti, negli Stati Uniti chiamare il numero 1-800-729-5661. Fuori dagli Stati Uniti, chiamare il numero +1-303-457-4345, inviare un fax al numero +1-303-457-4519, inviare un'e-mail all'indirizzo: technicalsupport@corgenix.com o rivolgersi ad un distributore Corgenix autorizzato.

REFERENCES

1. Hoyer LW. The Factor VIII Complex: Structure and Function. *Blood* 58:1-12, 1981.
2. Lollar P. The Association of Factor VIII with Von Willebrand Factor. *Mayo Clinic Proceedings* 66:524-534, 1991.
3. Ingerslev J. Von Willebrand Factor, Factor VIII and the Factor VIII/Von Willebrand Factor Complex. *Danish Medical Bulletin* 37:385-397, 1990.
4. Ruggeri ZM. Structure and Function of Von Willebrand Factor: Relationship to von Willebrand's Disease. *Mayo Clinic Proceedings* 66:847-861, 1991.
5. Montgomery RR, Coller BS. Von Willebrand Disease. In *Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice*, p 134-163, 3rd Edition, JB Lippincott, Philadelphia, 1994.
6. Ginsburg, D. Molecular Genetics of Von Willebrand Disease. *Thrombosis and Haemostasis* 82(2):585-591, 1999.
7. Triplett DA. Laboratory Diagnosis of von Willebrand's Disease. *Mayo Clinic Proceedings* 66:832-840, 1991.
8. Konkle BA. Laboratory Evaluation of Von Willebrand Disease. *Clin Chem* 41:489-490, 1995.
9. Goodall AH. An immunoradiometric assay for human factor VIII/Von Willebrand Factor (VIII:VWF) Using a Monoclonal Antibody that Defines a Functional Epitope. *British Journal of Haematology* 59:565-577, 1985.
10. Murdock PJ. Von Willebrand Factor Activity Detected in a Monoclonal Antibody-Based ELISA: an Alternative to the Ristocetin Cofactor Platelet Agglutination Assay for Diagnostic Use. *Thrombosis and Haemostasis* 78(4):1272-1277, 1997.
11. Sadler, JE. Impact, Diagnosis and Treatment of Von Willebrand Disease. *Thrombosis and Haemostasis* 84(2):160-174, 2000.
12. Gill JC, The effect of ABO Blood Group on the Diagnosis of von Willebrand Disease. *Blood* 69:1691-1695, 1987.
13. Data on file.

SYMBOL LEGEND

	Manufacturer Hersteller Fabriqué par Fabricado por Prodotta da
	Authorized Representative Bevoll-mächtiger Représentant agréé Representante autorizado Rappresentante autorizzato
	In vitro diagnostic medical device In-vitro-Diagnostikum Dispositif de diagnostic in vitro Dispositivo médico para diagnóstico in vitro Dispositivo medico-diagnostico in vitro
	Batch Code Chargennummer Code de Lot Código de Lote Codice del lotto
	Use by/Expiry Date Verfallsdatum Utiliser jusqu' à/ Date de péremption Usar antes de/ Fecha de caducidad Scade il/ data di scadenza
	Temperature Limitation Temperatur-beschränkungen Limites de température Limitación de temperatura Limite di temperatura
	Warning Waarschuwing Avertissement Advertencia Avvertimento
	Caution Voorzichtigheid Prudence Precaución Cautela
	Biological Risk Biologisches Risiko Risque biologique Riesgo biológico Rischio biologico
	Catalog Number Katalognummer Número de catalogue Número de catálogo Numero di catalogo
	European Conformity CE-Konformitäts-kennzeichnung Conformité aux normes européennes Conformidad europea Conformità europea
	Consult Instructions for Use/ Package Insert Gebrauchsanweisung im Inneren der Verpackung beachten Consulter le mode d'emploi/ notice jointe au conditionnement Consultar las instrucciones de uso/ prospecto del envase Consultare le istruzioni per l'uso/ il foglietto illustrativo
	Importer Importeur Importateur Importador Importatore
	Prescription Only per U.S. FDA Verschreibungspflichtig nur gemäß US-amerikanischer FDA Prescription uniquement selon la FDA des États-Unis Solo con receta, conforme a la FDA de EE. UU. Solo prescrizione per la FDA degli Stati Uniti



MT Promedt Consulting GmbH
Ernst-Heckel-Straße 7
66386 St. Ingbert
Germany



Endotell AG
Gewerbstrasse 25,
CH-4123 Allschwil
Switzerland



ORGENTEC Diagnostika GmbH
Carl-Zeiss-Straße 49-51
55129 Mainz
Germany



Corgenix, Inc.
11575 Main Street, Suite 400
Broomfield, Colorado 80020, USA
REAADS® is a registered trademark of Corgenix, Inc.
© 2023, Corgenix, Inc.



10755 06
Effective: 2023-09-07

THIS PAGE INTENTIONALLY LEFT BLANK