

VWF & Propeptide Assay

EINSATZ

Der VWF & Propeptide Assay ist ein quantitativer Festphasenzymimmunoassay (ELISA) zur Messung des von Willebrand Faktor (VWF) und von Willebrand Faktor Propeptide (VWF-PP) in humanem Plasma und zur Kalkulation der PP : VWF Ratio. Eine erhöhte PP : VWF Ratio bei Typ 1 VWD Patienten ist Hinweis für eine verringerte VWF Halbwertszeit in der Zirkulation.

Zum in-vitro Gebrauch.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERLÄUTERUNG

Der von Willebrand Faktor (VWF) ist ein multimeres, hoch molekulares Protein im Plasma und spielt eine zentrale Rolle bei der erfolgreichen Rekrutierung und Aktivierung von Thrombozyten bei vaskulären Verletzungen. Darüber hinaus dient er als Trägerprotein für den Gerinnungsfaktor Faktor VIII und schützt den Faktor VIII vor dem Zerfall.^{1,2}

Die von Willebrand Disease (VWD) wird durch einen Mangel an VWF verursacht. Typ 1 VWD ist ein quantitativer Mangel mit dem Nachweis von verringertem Level von VWF im Plasma. Typ 2 VWD ist ein qualitativer Mangel mit dem Nachweis von normalem oder verringertem Level von VWF im Plasma. TYP 3 VWD ist ein komplett quantitativer Mangel von VWF mit Plasma Levels < 1 IU/dl. Erworbenes von Willebrand Syndrom (AVWS) ist eine seltene Blutungsstörung einhergehend mit Lympho- und Myeloproliferativen Störungen, Tumoren, immunologischen und kardiovaskulären Erkrankungen.³ AVWS ist vergleichbar mit VWD in Bezug auf Labor und klinische Manifestation. Die Diagnose und Subtypisierung von VWD und AVWS basieren auf einer Vielfalt von Testergebnissen wie der FVIII Aktivität, VWF Antigen Level, VWF Aktivität, multimerer Analyse von VWF wie auch auf der Blutungshistorie des Patienten.^{3,4}

Das VWF Propeptide wird als Teil eines pro-VWF Protein synthetisiert und nachfolgend gespalten, gespeichert und in einer äquimolekularen Ratio mit reifem VWF freigesetzt.^{5,6} Der VWF Propeptide Spiegel in der Zirkulation kann als Marker der VWF-Synthese benutzt werden.⁷ Bei Individuen mit einer niedrigen VWF-Synthese ist der Propeptide Level ähnlich verringert mit einer Propeptide : VWF Ratio von ca. 1.0. Bei Individuen mit einer normalen VWF-Synthese und verringerter Überlebensdauer von VWF in der Zirkulation, wird eine erhöhte Propeptide : VWF Ratio beobachtet.⁷ Eine quantitative Mangel, beobachtet im Typ 1 VWD, kann durch ineffektive Synthese und Einlagerung oder durch Verringerung der Halbwertszeit des VWF in der Zirkulation verursacht werden. Verschiedene Punktmutationen wurden als Ursache für eine verringerte VWF Halbwertszeit nachgewiesen.^{7,8} Klinisch ist es wichtig, diesen erhöhten Clearance-Phenotyp zu erkennen, da eine erhöhte Clearance des VWF das Ansprechen auf eine effiziente Behandlung mit Desmopressin vermindert.^{7,9,10} Die VWF : Propeptide Ratio kommt auch bei der Diagnose vom AVWS zum Einsatz, wenn der Propeptide Level normal oder erhöht ist und der VWF Spiegel verringert ist, was eine erhöhte PP:VWF Ratio bewirkt.^{11,12} Zusätzlich können die Propeptide Level und die Propeptide : VWF Ratio im Plasma benutzt werden, um den Umfang der Endothelzell Aktivierung zu beurteilen.¹³

TESTPRINZIP

Die verdünnten Kalibratoren, Kontrollen und Probenplasmen werden in Mikrowells pipettiert, in denen monoklonale Antikörper gegen VWF oder Propeptide immobilisiert sind. In einem Inkubationsschritt binden VWF oder Propeptide an die immobilisierten monoklonalen Antikörper. Nach einem Waschschrift, bei dem alle nicht gebundenen Plasmaproteine entfernt werden, werden die Mikrowells mit einem Biotin markierten monoklonalen Antikörper, spezifisch für das in den Vertiefungen gebundene VWF oder Propeptide, inkubiert. In einem weiteren Waschvorgang werden alle ungebundenen Antikörper entfernt. Danach werden die Vertiefungen mit Streptavidin markierter Meerrettich-Peroxidase inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift, der das nicht gebundene Strep-HRP aus den Vertiefungen entfernt, wird ein Fluoreszenzsubstrat zugegeben und inkubiert. Die Reaktion wird nach der Inkubation mit Zugabe einer Stopplösung abgestoppt und die Fluoreszenz im Fluororeader mit 315 - 340 nm Anregung (Ex) und 370 - 470 nm Emission (Em) gemessen. Aus den Durchschnittswerten der Kalibratoren wird die Standardkurve graphisch erstellt. Die Durchschnittswerte der positiven Kontrollen und der Patientenwerte werden aus der Standardkurve bestimmt. Die Werte werden für VWF in IU/dl und für Propeptide in U/dl angegeben.

Die Testpackung beinhaltet 2 positive Kontrollen. Die positiven Kontrollen bestätigen die Richtigkeit der Verdünnungen der Kalibratoren und die richtige Wiederfindung von Proben mit Antigen Level aus verschiedenen Bereichen der Standardkurve. Die zu erwartenden Werte beider Kontrollen sind Chargenspezifisch und befinden sich in der beiliegenden Analysis Software. Kontrollwerte außerhalb der akzeptablen Bereiche weisen auf einen invaliden Test hin.

REAGENZIEN

Maximale Anzahl an Tests/Packung: 41 in Doppelbestimmung

Alle Reagenzien sollten entsprechend den Angaben auf den Etiketten gelagert werden.

- | | |
|--------------|--|
| MSVW | 1. Mikrowells: die schwarzen Flachbodenvertiefungen der Teststreifen sind beschichtet mit spezifischen VWF-Antikörpern (gelb markiert) und Propeptide-Antikörpern (grün markiert). Enthält Material von der Maus und vom Rind. Gebrauchsfertig. Die Teststreifen befinden sich in einem wieder verschließbaren Beutel. Lagerung bei 2-8°C. |
| MSPRP | |
| 5XCW | 2. Waschlösungskonzentrat (5 x konzentriert): Phosphat gepufferte saline Lösung mit TWEEN 20 und 0,05% ProClin 300. Vor Gebrauch mit deionisiertem oder destilliertem Wasser verdünnen. Lagerung bei 2-8°C. |
| VPK | 3. Streptavidin-HRP (200x): Streptavidin markierte Meerrettich- Peroxidase in einem HRP-Stabilisator. Vor Gebrauch mit Probenverdünnungspuffer verdünnen. Lagerung bei 2-8°C. |
| VPD | 4. Probenverdünnungspuffer: Phosphat gepufferte saline Lösung; enthält Rinderalbumin und 0,05% ProClin 300. Gebrauchsfertig. Lagerung bei 2-8°C. |
| VCAL | 5. Kalibrator: gepooltes humanes Plasma. Nur zum einmaligen Gebrauch. Die zu erwartenden Werte finden Sie in der beiliegenden Analysis Software. Vor Gebrauch mit Probenverdünnungspuffer verdünnen. Lagerung bei $\leq -15^{\circ}\text{C}$. |
| VDA | 6. VWF Detection Antibody (200x): Biotin markierter monoklonaler Maus-Antikörper mit 0,05% ProClin 300. Vor Gebrauch mit Probenverdünnungspuffer verdünnen. Lagerung bei 2-8°C. |
| PDA | 7. Propeptide Detection Antibody (200x): Biotin markierter monoklonaler Maus-Antikörper mit 0,05% ProClin 300. Vor Gebrauch mit Probenverdünnungspuffer verdünnen. Lagerung bei 2-8°C. |
| QA | 8. Substratlösung A: vor Gebrauch 9 Teile Substratlösung A mit 1 Teil Substratlösung B verdünnen. Lagerung bei 2-8°C. |
| QB | 9. Substratlösung B: vor Gebrauch 9 Teile Substratlösung A mit 1 Teil Substratlösung B verdünnen. Lagerung bei 2-8°C. |
| QSS | 10. Stopplösung: Gebrauchsfertig. Lagerung bei 2-8°C. |
| PS | 11. Abklebefolien |
| AS | 12. VWF & Propeptide Analysis Software auf CD-ROM |

VORSICHTSMASSNAHMEN

- Verwenden Sie keine trüben oder kontaminierten Reagenzien.
- Verwenden Sie keine Reagenzien nach ihrem Verfallsdatum.
- Verwenden Sie weder die Teststreifen noch die Reagenzien aus der Testpackung in Verbindung mit einem anderen Test.
- Verwenden Sie nur die Reagenzien aus der Testpackung bzw. tauschen Sie keine Reagenzien aus, um widersprüchliche oder falsche Ergebnisse auszuschließen.
- Verwerfen Sie nach jedem Testansatz den aufgetauten Kalibrator und die benutzten Streifen.
- Verwerfen Sie nach jedem Testansatz den verdünnten Kalibrator, die verdünnten Detection Antibodies, das verdünnte Strep-HRP und die verdünnte Substratlösung.

- Verwenden Sie für die Herstellung der Verdünnungen ausschließlich kalibriertes Material in der entsprechenden Technik.
- Pipettieren Sie für die Verdünnungen der Reagenzien und Proben nie weniger als 5 µl. Geringere Volumina als 5 µl für die Verdünnungen erhöhen die Ungenauigkeiten.
- Verwenden Sie nur korrekt kalibrierte Pipetten für die Verteilung der Reagenzien.
- Die enzymatische Substratreaktion ist temperaturabhängig und sollte bei 22-25°C durchgeführt werden.
- Die Fläschchen enthalten mehr Reagenz als auf den Labels angegeben.

WARNHINWEISE

- Alle eingesetzten humanen Plasmen für den Kalibrator wurden auf die Abwesenheit von HIV/HCV/HBs-AG mit FDA zugelassenen Testsystemen untersucht. Dennoch sollten alle Materialien als potentiell infektiös behandelt und entsprechend entsorgt werden, da keine Methode eine 100% Sicherheit bietet.
- Entsorgen Sie alle restlichen Packungsbestandteile fachgerecht.

PROBENGEWINNUNG

Probengewinnung und Probenvorbereitung

Hinweis: Verwenden Sie für diesen Test nur Plättchenarmes Plasma, entnommen in Natrium-Citrat. Entnehmen Sie Details zur Entnahme, Lagerung und Abarbeitung von Blutproben für Gerinnungsteste aus Plasmaproben und molekular basierten Hämostasetesten der Approved Guideline CLSI H21-A5, Volume 28, Number 5, December 2008.

Entnahme des Plättchenarmen Plasma:

1. Entnehmen Sie das Blut in gepufferten Natrium-Citrat (3,8% oder 3,2%) Entnahmeröhrchen.

Hinweis: Entnehmen Sie immer die vollständige Menge Blut für das Entnahmeröhrchen, um das Verhältnis Blut zur Antikoagulanzen von 9:1 sicherzustellen.

2. Lagern Sie das Röhrchen nach Entnahme bis zur Zentrifugation aufrecht bei Raumtemperatur.

Hinweis: Um optimale Ergebnisse zu erhalten, sollten die Proben zwischen 15 Minuten und 2 Stunden nach Entnahme ab zentrifugiert werden.

3. Mischen Sie die Proben vor dem Zentrifugieren, indem Sie die Röhrchen vorsichtig 8 – 10 Mal wenden.
4. Zentrifugieren Sie die Proben bei Raumtemperatur in einem horizontalen Rotor (swing-out Rotor) für 15 – 20 Minuten bei 1500 – 1800 rcf (Relative Centrifugal Force).

Warnhinweis: Zu hohe Zentrifugationsgeschwindigkeiten (über 2000 rcf) können zum Bruch der Röhrchen und damit zum Kontakt mit Blut und auch zu Verletzungen führen.

5. Pipettieren Sie nach der Zentrifugation 2/3 des Plasma-Layer in ein neues Polypropylenröhrchen.
6. Zentrifugieren Sie dieses gesammelte Plasma für 15-20 Minuten bei 1500 - 1800 rcf, um alle Erythrozyten- und Thrombozytenreste zu entfernen.
7. Überführen Sie die obersten 2/3 des Plasmaüberstandes in ein neues Polypropylenröhrchen, und vermeiden sie dabei den Kontakt mit den Zellen am Boden.

Probenlagerung

1. Das Plasma muss bei Raumtemperatur gelagert und innerhalb von 4 Stunden getestet werden **oder** aliquotiert und bei -15°C oder kälter bis zum Einsatz eingefroren werden.
2. Die gefrorenen Plasmen und der gefrorene Kalibrator werden bei 37°C aufgetaut und vor Gebrauch bei 37°C für weitere 10 Minuten inkubiert, um die Antigene vollständig zu lösen. Aufgetautes Plasma bei Raumtemperatur lagern und innerhalb von 4 Stunden einsetzen.

DURCHFÜHRUNG

Mitgelieferte Materialien:

Die Fläschchen enthalten mehr Reagenz, als auf den Labels angegeben. Entnehmen Sie deshalb immer die benötigten Mengen für die Verdünnungen mit kalibrierten Pipetten bzw. Materialien.

Box A:

1. 6 x 0,5 ml Vials Kalibrator

Box B:

1. 12 – 1 x 8 schwarze Mikrowell-Teststreifen in einem Rahmen für den Nachweis von VWF (gelb markiert)
2. 12 – 1 x 8 schwarze Mikrowell-Teststreifen in einem Rahmen für den Nachweis von Propeptide (grün markiert)
3. 3 x 50 ml Probenverdünnungspuffer
4. 1 x 125 ml Waschlösungskonzentrat
5. 1 x 40 μl VWF Detection Antibody
6. 1 x 40 μl Propeptide Detection Antibody
7. 1 x 75 μl Streptavidin-HRP
8. 1 x 14 ml Substratlösung A
9. 1 x 2 ml Substratlösung B
10. 1 x 14 ml Stopplösung
11. 12 Abklebefolien
12. Analysis Software auf CD-ROM

Zusätzlich benötigte Materialien:

1. Polypropylenröhrchen oder Eppendorfgefäße für die Verdünnungen
2. Transferpipetten
3. Präzisionspipetten mit verstellbarem Volumen 1-10 μl , 10-100 μl und 100-1000 μl und Pipettenspitzen
4. Timer
5. Fluororeader mit Anregungswellenlänge (Ex) 315-340 nm und Emissionswellenlänge (Em) 370-470nm
6. Deionisiertes oder destilliertes Wasser
7. Papiertücher
8. Washer oder Handwaschgerät
9. Zentrifuge
10. Wasserbad oder Inkubator bei 37°C
11. Computer mit Microsoft[®] Excel[®] 2003 oder 2007

Testdurchführung

1. Bringen Sie alle Reagenzien aus Box B auf Raumtemperatur ($22-25^{\circ}\text{C}$).

Hinweis: Alle Reagenzien und Verdünnungen können für die Dauer der Testdurchführung bei Raumtemperatur gelagert werden. Keine Reagenz ist lichtempfindlich.

2. Legen Sie die Anzahl der zu testenden Proben fest. Weisen Sie mit Hilfe des Protokollbogen/Recording Sheet jeder Probe eine Positionen zu (2 Vertiefungen je Probe) und dokumentieren Sie die Proben-ID-Nummer.

3. Stellen Sie die benötigte Waschlösung her, indem Sie das Waschlösungskonzentrat (5XCW) 1:5 (1 Teil Waschlösungskonzentrat mit 4 Teilen deionisiertem oder destilliertem Wasser (DI Water) verdünnen und gut mischen. Die gebrauchsfertige Waschlösung kann bis zu 2 Wochen bei 2-8°C gelagert werden.

Teststreifen:	4 – 1 x 8	12 – 1 x 8	24 – 1 x 8
5XCW	20 ml	60 ml	120 ml
DI Water	80 ml	240 ml	480 ml

4. Entnehmen Sie dem Beutel nur die benötigte Anzahl an Streifen (VWF und PP) und verschließen Sie den Beutel sofort wieder nach Entnahme. Beschriften Sie die Streifen, um Verwechslungen auszuschließen.

Hinweis: Jede Testpackung enthält nur zwei Rahmen. Heben Sie die Rahmen für weitere Tests auf.

5. Tauen Sie bei 37°C ein Aliquot der Kalibrator-Stocklösung aus Box A und ihre gefrorene Patientenplasmen auf.
6. Inkubieren Sie die aufgetaute Stocklösung und Proben bei 37 °C für weitere 10 Minuten, um VWF vollständig vor dem Ansatz der Verdünnungen zu lösen.
7. Stellen Sie die Verdünnungen der Kalibratoren A-E mit Hilfe der folgenden Tabelle her, indem Sie das entsprechende Plasmavolumen mit dem Probenverdünnungspuffer (VPD) verdünnen. Die Menge reicht aus, um die Kalibratoren und Kontrollen in Doppelbestimmung auf beiden Streifentypen anzusetzen.

Kalibrator	Volumen Plasma	Volumen Verdünnungspuffer
Kalibrator A	20 µl Kalibrator Stocklösung	1.080 µl VPD
Kalibrator B	200 µl Kalibrator A	80 µl VPD
Kalibrator C	200 µl Kalibrator A	260 µl VPD
Kalibrator D	200 µl Kalibrator A	1.000 µl VPD
Kalibrator E	-----	300 µl VPD

8. Stellen Sie die beiden positiven Kontrollen mit Hilfe der folgenden Tabelle her, indem Sie das entsprechende Plasmavolumen (Kalibrator Stocklösung) mit dem Probenverdünnungspuffer (VPD) verdünnen. Die Menge reicht aus, um die Kontrollen in Doppelbestimmung auf beiden Streifentypen anzusetzen.

Kontrollen	Volumen Plasma	Volumen Verdünnungspuffer
Positive Control High	5 µl Kalibrator Stocklösung	495 µl VPD
Positive Control Low	5 µl Kalibrator Stocklösung	995 µl VPD

9. Verdünnen Sie jede zu testende Patientenprobe in Probenverdünnungspuffer (VPD) wie in der folgenden Tabelle beschrieben. Eine 1:200 Verdünnung ist für die Mehrzahl aller Proben ausreichend und ermöglicht eine untere Nachweisgrenze von 6 IU/dl oder 6 U/dl. Zur Bestätigung einer schwachen Probe empfehlen wir eine Verdünnung von 1:20. Eine 1:20 Verdünnung ermöglicht eine untere Nachweisgrenze vom <1 IU/dl oder <1Udl. Verdünnungen zwischen 1:300 und 1:20 eignen sich für diesen Test.

Probenverdünnung	Volumen Patientenplasma	Volumen Verdünnungspuffer
1 : 200	5 µl	995 µl VPD
1 : 20	13 µl	247 µl VPD

10. Pipettieren Sie 50 µl jedes Kalibrators (A-E) in Doppelbestimmung in die entsprechenden Vertiefungen der VWF (gelb) und Propeptide (grün) Streifen.
11. Pipettieren Sie 50 µl der hoch positiven Kontrolle („High“) in Doppelbestimmung in die entsprechenden Vertiefungen der VWF und Propeptide Streifen.
12. Pipettieren Sie 50 µl der schwach positiven Kontrolle („Low“) in Doppelbestimmung in die entsprechenden Vertiefungen der VWF und Propeptide Streifen.

13. Pipettieren Sie 50 µl jedes verdünnten Patientenplasmas aus Schritt 9 in Doppelbestimmung in die entsprechenden Vertiefungen der VWF und Propeptide Streifen.

Hinweis: Wenn mehrere Patientenproben pro Ansatz getestet werden, wird nur ein Satz Kontrollen und Kalibratoren für jeden Streifentyp benötigt

Hinweis: Beschriften Sie die Streifen, um Verwechslungen auszuschließen.

14. Versiegeln Sie die Vertiefungen mit Abklebefolie und inkubieren Sie sie für 15 Minuten bei 37°C.

Hinweis: Weil die Inkubationszeit mit 15 Minuten sehr kurz ist, ist es ganz wichtig, alle Proben immer in der gleichen Reihenfolge möglichst schnell zu verteilen. Die Probenverteilung sollte innerhalb von 5 Minuten abgeschlossen sein.

15. Verdünnen Sie den VWF Detection Antibody (VDA) mit Probenverdünnungspuffer (VPD) wie in der folgenden Tabelle beschrieben. Der verdünnte VDA wird in alle VWF-Mikrowells pipettiert.

Teststreifen:	2 – 1 x 8	4 – 1 x 8	12 – 1 x 8
VDA	6 µl	10 µl	30 µl
VPD	1,2 ml	2 ml	6 ml

16. Verdünnen Sie den Propeptide Detection Antibody (PDA) mit Probenverdünnungspuffer (VPD) wie in der folgenden Tabelle beschrieben. Der verdünnte PDA wird in alle Propeptide-Mikrowells pipettiert.

Teststreifen:	2 – 1 x 8	4 – 1 x 8	12 – 1 x 8
PDA	6 µl	10 µl	30 µl
VPD	1,2 ml	2 ml	6 ml

17. Waschschritt:

- Verwerfen Sie den Inhalt aller Vertiefungen und klopfen Sie den Rahmen auf einem saugfähigen Papiertuch aus.
- Pipettieren Sie 300 µl Waschlösung in jede Vertiefung.
- Verwerfen Sie den Inhalt aller Vertiefungen.
- Waschen Sie die Vertiefungen weitere 3x wie unter b) und c) beschrieben.
- Verwerfen Sie abschließend den Inhalt aller Vertiefungen und klopfen Sie den Rahmen auf einem saugfähigen Papiertuch aus, um alle Flüssigkeitsreste zu entfernen.

Hinweis: Es ist ganz wichtig, dass nach dem letzten Waschschritt alle Flüssigkeitsreste entfernt werden.

18. Pipettieren Sie in jede Vertiefung der VWF-Platte (gelb markiert) 50 µl des verdünnten VWF Detection Antibody (VDA).

19. Pipettieren Sie in jede Vertiefung der Propeptide-Platte (grün markiert) 50 µl des verdünnten Propeptide Detection Antibody (PDA).

20. Versiegeln Sie die Vertiefungen mit Abklebefolie und inkubieren Sie sie für 15 Minuten bei 37°C.

21. Verdünnen Sie das Streptavidin-HRP (VPC) mit Probenverdünnungspuffer (VPD) in einem Polypropylenröhrchen wie in der folgenden Tabelle beschrieben. Das verdünnte Streptavidin-HRP wird in alle benutzten Vertiefungen beider Streifentypen pipettiert.

Teststreifen:	4 – 1 x 8	8 – 1 x 8	24 – 1 x 8
VPC	10 µl	20 µl	60 µl
VPD	2 ml	4 ml	12 ml

22. Waschschritt:

- a) Verwerfen Sie den Inhalt aller Vertiefungen und klopfen Sie den Rahmen auf einem saugfähigen Papiertuch aus.
- b) Pipettieren Sie 300 µl Waschlösung in jede Vertiefung.
- c) Verwerfen Sie den Inhalt aller Vertiefungen.
- d) Waschen Sie die Vertiefungen weitere 3x wie unter b) und c) beschrieben.
- e) Verwerfen Sie abschließend den Inhalt aller Vertiefungen und klopfen Sie den Rahmen auf einem saugfähigen Papiertuch aus, um alle Flüssigkeitsreste zu entfernen.

23. Geben Sie 50 µl des verdünnten Streptavidin-HRP aus Punkt 21 in alle VWF und Propeptide Vertiefungen.

24. Versiegeln Sie die Vertiefungen mit Abklebefolie und inkubieren Sie sie für 15 Minuten bei 37°C.

25. Geben Sie 9 Teile der Substratlösung A (QA) zu 1 Teil Substratlösung B (QB). Verwenden Sie für diese Mischung ein Polypropylengefäß. Gut mischen. Dieses Material ist nicht lichtempfindlich. Es wird in alle benutzten Vertiefungen beider Streifentypen pipettiert.

Teststreifen:	4 – 1 x 8	8 – 1 x 8	24 – 1 x 8
Substratlösung A (QA)	1,8 ml	3,6 ml	10,8 ml
Substratlösung B (QB)	200 µl	400 µl	1,2 ml

26. Waschschritt:

- a) Verwerfen Sie den Inhalt aller Vertiefungen und klopfen Sie den Rahmen auf einem saugfähigen Papiertuch aus.
- b) Pipettieren Sie 300 µl Waschlösung in jede Vertiefung.
- c) Verwerfen Sie den Inhalt aller Vertiefungen.
- d) Waschen Sie die Vertiefungen weitere 3x wie unter b) und c) beschrieben.
- e) Verwerfen Sie abschließend den Inhalt aller Vertiefungen und klopfen Sie den Rahmen auf einem saugfähigen Papiertuch aus, um alle Flüssigkeitsreste zu entfernen.

Hinweis: Es ist ganz wichtig, dass nach dem letzten Waschschritt alle Flüssigkeitsreste entfernt werden.

27. Pipettieren Sie 50 µl des Substratlösung-Mix aus Schritt 25 in jede benutzte Vertiefung beider Streifentypen.

28. Versiegeln Sie die Vertiefungen mit Abklebefolie und inkubieren Sie sie für 15 Minuten bei Raumtemperatur (22-25°C). Diese Reaktion ist nicht lichtempfindlich.

29. Stoppen Sie die Reaktion, indem Sie 50 µl Stopplösung (QSS) in der gleichen Reihenfolge wie das Substrat in die Vertiefungen geben. Lesen Sie die Reaktionen innerhalb von 60 Minuten nach Zugabe der Stopplösung.

30. Stellen Sie den/die Rahmen in den Fluororeader und messen Sie bei Raumtemperatur (22-25°C) mit Anregungswellenlänge (Ex) von 315-340 nm und Emissionswellenlänge (Em) von 370-470 nm.

DETAILS ZUR KALIBRATION

Der Kalibrator im VWF & PP Assay ist gefrorenes, gepooltes, normales, humanes Plasma. Der Pool wird aus 35 gesunden, nicht medikamentös behandelten, männlichen und weiblichen Spendern im Alter von 18 – 56 Jahren, alle Nichtraucher, erstellt. Der Kalibrator-Stock ist auf einen VWF und PP Wert eingestellt mit einem Test relativ zum SSC/ISTH Secondary Coagulation Standard Lot #3. Dem SSC/ISTH Secondary Coagulation Standard Lot #3 wurde ein VWF Antigen Level von 106 IU/dL zugeordnet. Dem SSC/ISTH Secondary Coagulation Standard Lot #3 wurde ein Propeptide Level zugeordnet. Solange es keinen international bekannten Standard für Propeptide, und solange davon ausgegangen werden kann, dass die durchschnittliche VWF:PP Ratio bei normalen Spendern bei 1,0 liegt⁷, ordnet GTI Diagnostics intern in Anlehnung an den SSC/ISTH Secondary Coagulation Standard Lot #3 dem Propeptide ein Level von 106 U/dl gleich dem VWF Level zu. Die VWF und Propeptide Werte des Kalibrator Stock sind chargenspezifisch und dokumentiert in der mitgelieferten Analysis Software.

QUALITÄTSKONTROLLE

Alle Kalibrator Level, Kontrollen und Proben werden in Doppelbestimmung getestet. Die relativen Fluoreszenz Units (RFU) sollten in beiden Vertiefungen ähnlich ausfallen. Die Abweichungen bei den Kalibratoren A-D, den Kontrollen und Proben sollten nicht mehr als 20% betragen.

Der VWF & Propeptide Assay nutzt zwei positive Kontrollen (Hoch Positive und Schwach Positive Kontrolle). Die hoch positive Kontrolle ist so verdünnt, das sich die RFU-Werte im mittleren bis oberen Bereich der Standardkurve wiederfinden. Die schwach positive Kontrolle ist so verdünnt, das sich die RFU-Werte im mittleren bis unteren Bereich der Standardkurve wiederfinden. Die Analysis Software kalkuliert die Ergebnisse der Kontrollen, indem die Antigen Level anhand der Standardkurve in der entsprechenden Verdünnung errechnet werden. Weil beide Kontrollen Verdünnungen aus demselben Material sind, müssen die endgültigen Werte vergleichbar sein und die erzielten Werte sollten in einem akzeptablen Range liegen, wie in der beiliegenden Analysis Software festgelegt. Wenn die Kontrollen außerhalb dieses Bereiches liegen, muss der Test wiederholt werden. Wenn nur eine Kontrolle außerhalb dieses Bereiches liegt, muss der Test nur für dieses Antigen wiederholt werden.

INTERPRETATION DER TESTERGEBNISSE

Erstellen Sie eine Kalibrationskurve, indem Sie die Fluoreszenz-Mittelwerte (n=2) jedes Kalibrators gegen die entsprechenden Konzentrationen von VWF und Propeptide in die Analysis Software, die sich auf der mitgelieferten CD-Rom befindet, eintragen. Die Chargenspezifischen Werte für VWF und PP finden Sie in der Analysis Software. Die Standardkurve muss für jeden Streifentyp und Ansatz erstellt werden. Die Anleitung zum Gebrauch finden Sie auf der ersten Seite der Analysis Software. Die Analysis Software berechnet die durchschnittlichen RFU-Werte aus den Doppelbestimmungen der Kalibratoren, Kontrollen und Proben. Bestimmen Sie die Konzentrationen von VWF und Propeptide in den Kontrollen und Patientenplasmen mit der Analysis Software. Die Analysis Software unterstützt Sie mit graphischer Darstellung und löst die Gleichungen, um die Ergebnisse in IU/dl für VWF oder U/dl für Propeptide für Ihre Proben und Kontrollen zu erstellen. Die Analysis Software berechnet auch die VWF:PP Ratio für jede getestete Probe.

Wenn die Plasmaproben höhere Fluoreszenzwerte als die des größten Kalibrators aufweisen, wird das Ergebnis als „ORR“ (over reportable range) ausgewiesen und die Probe muss in einer höheren Verdünnung noch einmal getestet werden, damit der Wert der Probe innerhalb des Kalibrationsbereichs liegt. Die unterste Nachweisgrenze im Test liegt bei 6 IU/dl oder 6 U/dl bei einer 1:200 Verdünnung. Wenn das Ergebnis einer Plasmaprobe kleiner als 6 IU/dl für VWF oder 6 U/dl für Propeptide ausfällt, sollten Sie diese Probe mit einer 1:20 Verdünnung getestet werden. Eine 1:20 Verdünnung setzt die untere Nachweisgrenze des Assays auf < 1 IU/dl oder < 1 U/dl herab. Probenverdünnungen zwischen 1:300 und 1:20 eignen sich für diesen Test.

EINSCHRÄNKUNGEN

Weil der Test monoklonale Mausantikörper zur Bindung und dem Nachweis beider Antigene nutzt, kann die Anwesenheit von humanen Anti-Maus Antikörpern in einer Probe zu falschen Ergebnissen führen. Ähnlich ungünstig wirkt sich auch die Anwesenheit von Rheumafaktoren auf die Testergebnisse aus.

Die Ergebnisse nur aus diesem Test sollten nicht als Grundlage für eine klinische Entscheidung genommen werden.

ZU ERWARTENDE WERTE

Der Normalbereich für VWF Antigen variiert abhängig von der Blutgruppe; Plasma von Individuen der Blutgruppe O haben verringerte Levels verglichen mit anderen Blutgruppen. Der publizierte Normalbereich für VWF Antigen ist 50 bis 150 U/dL bei Blutgruppe O Individuen und 90 bis 200 U/dL bei nicht O Blutgruppen.⁴ Jedes Labor sollte seinen eigenen Blutgruppenspezifischen Normalbereich für VWF Antigen bestimmen.

Der Normalbereich von Propeptide wird von der Blutgruppe nicht beeinflusst. Der publizierte Normalbereich für Propeptide ist 55 bis 219 U/dL für alle Blutgruppen.⁷ Jedes Labor sollte seinen eigenen Blutgruppenspezifischen Normalbereich für PP Antigen bestimmen.

KLINISCHER CUTOFF

Proben wurden von 2 für die klinische Studie ausgewählten Stellen gesammelt und mit dem VWF & Propeptide Assay eluiert: 115 Type 1 VWD Patienten wurden getestet, diagnostiziert auf der Basis von VWF Antigen Level, Ristocetin Co-Faktor Aktivität und zurückliegenden Blutungsepisoden, und 23 Typ 1 VWD Patienten mit erhöhter Clearance von VWF (Type 1c), diagnostiziert auf der Basis von VWF Antigen Level, Ristocetin Co-Faktor Aktivität, zurückliegenden Blutungsepisoden und bei Vorliegen von Punktmutationen, die schon als Ursache für eine erhöhte Clearance von VWF nachgewiesen wurde.

Die Receiver Operator Characteristics (ROC) Kurvenanalyse wurde für die Bestimmung des diagnostischen Cutoff für die erhöhte Clearance von VWF auf der Basis der Propeptide : VWF Ratio benutzt. Aus der ROC Analyse wurde der optimale Cutoff Wert von ≥ 3.0 für eine optimale klinische Sensitivität und Spezifität ausgewählt zur Unterscheidung zwischen Type 1 VWD und Type 1 VWD mit erhöhter VWF Clearance (Type 1c). Eine Ratio von ≥ 3.0 brachte eine 100.0% Sensitivität, charakterisierte alle bekannten Type 1c Patienten richtig und brachte 95.7% Spezifität, wobei 5 Type 1 Patienten als Typ 1c charakterisiert wurden. Drei der 5 falsch charakterisierten Patienten hatten Blutgruppe 0, ein Patient hatte die Blutgruppe A, die Blutgruppe der fünften Probe war nicht bekannt. Seit nachgewiesen ist, dass Patienten mit Blutgruppe 0 grundsätzlich niedrigere VWF Level und entsprechend eine höhere Propeptide : VWF Ratio haben, empfehlen wir folgenden Graubereich: Propeptide : VWF Ratios von 3.0 – 4.1 erscheinen angemessen für den Nachweis einer erhöhten VWF Clearance oder sind das Ergebnis eines Type 1 VWD Patienten mit Blutgruppe 0. Ratios von ≥ 4.1 sind deutlicher Hinweis für Type 1c VWD unabhängig von der Blutgruppe.

SPEZIFISCHE CHARAKTERISTIKA DER DURCHFÜHRUNG

Zur Absicherung der Spezifität und Sensitivität wird jede Charge des VWF & Propeptide Assay vor Freigabe mit Proben, die normale und verringerte Level von VWF und Propeptide enthalten, getestet.

Präzision

Der within run, between run und die total imprecision des VWF & Propeptide Assay wurden bestimmt. Fünf Proben mit verschiedenen Spiegeln von VWF und PP wurden mit dem VWF & Propeptide Assay in Doppelbestimmung in 20 separaten Ansätzen getestet. Um die Ungenauigkeit der Ergebnisse zu erhalten, wurden die Daten mit ANOVA gemäß den CLSI Dokumenten EP-5A2 analysiert. Die Berechnungen finden Sie in der folgenden Tabelle. Für die Messung des VWF Antigen lag der Total % CV für alle Proben $< 11.5\%$. Eine Probe mit verringertem VWF wurde mitgetestet und lag bei < 1 IU/dL VWF in allen 20 Testansätzen. Für die Messung des Propeptide Antigen lag der Total % CV für die Proben 1-3 bei $< 6\%$. Probe 4 hatte einen Total % CV von 25.0%, obwohl die Werte nur zwischen 1 bis 6 U/dL Propeptide in den 20 Testansätzen lagen. Eine Probe mit verringertem PP Spiegel wurde mitgetestet und mit < 1 U/dL Propeptide in allen 20 Testansätzen bestimmt.

Probe	Durchschnitt IU/dL VWF	Within Run SD	Within Run % CV	Between Run SD	Between Run % CV	Total SD	Total % CV
1 Normal	93	3.4	3.7	5.5	6.0	6.1	6.6
2 Normal	114	3.0	2.6	12.8	11.2	13.0	11.4
3 Medium	53	2.0	3.8	4.1	7.7	4.4	8.3
4 Schwach	18	0.9	5.0	1.4	7.8	1.6	8.9

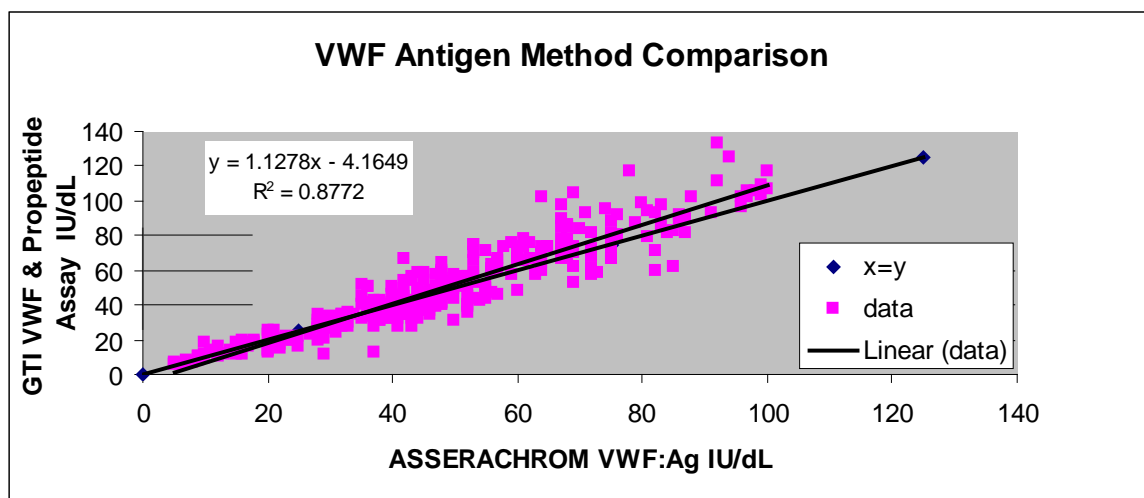
Probe	Durchschnitt U/dL Propeptide	Within Run SD	Within Run % CV	Between Run SD	Between Run % CV	Total SD	Total % CV
1 Normal	89	2.7	3.0	4.8	5.4	5.1	5.7
2 Normal	105	1.8	1.7	4.5	4.5	4.9	4.7
3 Medium	52	1.8	3.5	2.5	4.8	2.8	5.4
4 Schwach	4	0.4	10.0	1.0	25.0	1.0	25.0

Grenzen der Nachweisbarkeit und Testbereich

Die Nachweisgrenze liegt bei 0,021 IU/dL für VWF und 0,021 U/dL für Propeptide und wird mit jeder Charge bestätigt. Wenn eine Probe in einer 1:200 Verdünnung getestet wird, liegt die untere Nachweisgrenze des Tests bei 4 IU/dL VWF oder 4 U/dL Propeptide. Wir empfehlen, alle Proben, mit Antigen Werten < 6 IU/dL VWF oder < 6 U/dL Propeptide in einer Probenverdünnung von 1:20 zu wiederholen. Wenn eine Probe in einer 1:20 Verdünnung getestet wird, liegt die untere Nachweisgrenze des Tests bei 0,42 IU/dL VWF oder 0,42 U/dL Propeptide. Die Analysis Software weist diese Ergebnisse mit <1 IU/dL VWF oder <1 U/dL Propeptide aus. Es gibt keine klinische Signifikanz zur Dokumentation von Antigenwerten von < 1 IU/dL VWF oder <1 U/dL Propeptide. Die obere Nachweisgrenze des Tests hängt vom chargenspezifischen Kalibrator des Assays ab und liegt bei ca. 273 IU/dL VWF oder 273 U/dL Propeptide.

Methodischer Vergleich: GTI VWF & Propeptide Assay mit Diagnostica Stago ASSERACHROM® VWF:Ag Assay

Drei separate Studien wurden durchgeführt, in denen die VWF Antigen Werte, erhalten mit dem GTI VWF & Propeptide Assay, mit einem schon FDA zugelassenen Test, dem ASSERACHROM® VWF:Ag Assay von Diagnostica Stago, verglichen wurden. 298 Plasmaproben wurden getestet und die Ergebnisse der 3 Studien kombiniert. Die folgende graphische Darstellung zeigt die Ergebnisse der linearen Regressionsanalyse mit einem Verlauf der Kurve von 1.13 bei einem 95% confidence interval von 1.08 bis 1.18 und einem intercept von -4.16 bei einem 95% confidence interval von -6.72 bis -1.61.



STÖRENDE SUBSTANZEN

Folgende Substanzen zeigen in den angegebenen Konzentrationen keinen Einfluss auf den VWF&PP Assay.

Haemoglobin	≤ 500 mg/dL
Bilirubin	≤ 20 mg/dL
Intralipid	≤ 500 mg/dL

BIBLIOGRAFIE

1. Sadler JE, Blinder M. von Willebrand disease: Diagnosis, classification, and treatment. In: Colman, et al. (eds). *Hemostasis and Thrombosis*. Philadelphia. Lippincott, Williams and Wilkins. 2000:825 – 837.
2. Montgomery RR. Structure and function of von Willebrand factor. In: Colman, et al. (eds). *Hemostasis and Thrombosis*. Philadelphia. Lippincott, Williams and Wilkins. 2000:825 – 837.
3. Federici AB, Rand JH, Bucciarelli P, Budde U, van Genderen PJ, Mohori H, Meyer D, Rodighiero F, Sadler JE, Subcommittee on von Willebrand Factor. Acquired von Willebrand syndrome: data from an international registry. *Thromb Haemost*. 2000; **84**: 345 – 9.
4. CLSI Guideline H51-A. Assays of von Willebrand Factor Antigen and Ristocetin Cofactor Activity; Approved Guideline. Vol. 22, No. 20. 2002.
5. Fay PJ, Kawai Y, Wagner DD, Ginsburg D, Bontron D, Ohlsson-Wilhelm BM, Chavin SI, Abraham GN, Handin RI, Orkin SH, Montgomery RR, Marder VJ. Propolypeptide of von Willebrand factor circulates in blood and is identical to von Willebrand antigen II. *Science* 232:995, 1986.
6. Wagner DD, Fay PJ, Sporn LA, Sinha S, Lawrence SO, Marder VJ. Divergent fates of von Willebrand factor and its propolypeptide (von Willebrand antigen II) after secretion from endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 84:1955, 1987.
7. Haberichter SL, Balistreri M, Christopherson P, Morateck P, Gavazova S, Bellissimo DB, Manco-Johnson MJ, Cox-Gill J, Montgomery, RR. Assay of the von Willebrand factor (VWF) propeptide to identify patients with type 1 von Willebrand disease with decreased VWF survival. *Blood*. 2206; 108: 3344-3351.
8. Schooten CJ, Tjernberg P, Westein E, et al. Cysteine-mutations in von Willebrand factor associated with increased clearance. *J Thromb Haemost*. 2005; 3: 2228-2237.
9. Casonato A, Pontara E, Sartorello F, et al. Reduced von Willebrand factor survival in type 1 von Willebrand disease. *Blood*. 2002; 99: 180-184.
10. Sztukowska M, Gallinaro L, Cattini MG, Pontara E, Sartorello F, Daidone V, Padrini R, Pagnan A, Casonato A. Von Willebrand factor propeptide makes it easy to identify the shorter von Willebrand factor survival in patients with type 1 and type 1 von Willebrand disease. *British Journal of Haematology*, 2008 143, 107–114.
11. van Genderen PJ, Boertjes RC, van Mourik JA. Quantitative analysis of von Willebrand factor and its propeptide in plasma in acquired von Willebrand syndrome. *Thromb Haemost*. 1998; 80: 495-498.
12. Scott JP, Vokac E, Foster PA, Kassay K, Montgomery RR. The von Willebrand factor propolypeptide (vW AgII) as a marker of acquired von Willebrand syndrome. *Blood*. 82, 150a. 12-2-1993.
13. van Mourik JA, Boertjes R, Huisveld IA et al. von Willebrand factor propeptide in vascular disorders: A tool to distinguish between acute and chronic endothelial cell perturbation. *Blood*. 1999; 94: 179-185.



GTi DIAGNOSTICS®
Good science starts with people.®

20925 Crossroads Circle, Suite 200
Waukesha, WI 53186-4054 USA
(262) 754-1000 OR 1-800-233-1843

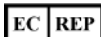
VWF & Propeptide Assay

- Zum *in-vitro* Gebrauch.
- Lagerung bei ≤ -15°C für Box A
- Lagerung bei 2 - 8°C für Box B



REF VP

Rev. 2010-02-12 (G)



Qarad b.v.b.a.
Volmolenheide 13
B-2400 Mol
Belgium

www.gtidiagnostics.com