



ZYMUTEST™ vWF:CBA

REF RK038A

96 tests



HYPHEN BioMed

155 rue d'Eragny, 95000 Neuville-sur-Oise, France

Tél : +33 (0)1 34 40 65 10

Fax : +33 (0)1 34 48 72 36

www.hyphen-biomed.com

info@hyphen-biomed.com

Méthode ELISA pour la détermination quantitative de l'activité de liaison au collagène du Facteur von Willebrand.

Français, dernière révision : 05-2021

UTILISATION:

Le coffret ZYMUTEST™ vWF:CBA est une méthode ELISA pour la détermination quantitative de l'activité de liaison au collagène (« Collagen Binding Activity », CBA) du Facteur von Willebrand (vWF), sur plasma humain.

RESUME ET EXPLICATION:

Technique :

Le vWF est une protéine multimérique produite par les cellules endothéliales et les mégacaryocytes. Il circule dans le sang sous forme de multimères allant de 500 à plus de 20 000 kDa.

Le vWF favorise l'adhésion des plaquettes au sous-endothélium des vaisseaux sanguins endommagés et, en se fixant au Facteur VIII, prolonge sa demi-vie dans la circulation sanguine.

Les multimères ultra-larges sont clivés par protéolyse par ADAMTS13 en formes moins actives du vWF. La fonction biologique du vWF dépend largement de la taille de ses multimères. Les multimères larges sont plus susceptibles de se lier aux plaquettes et au collagène, et de promouvoir l'adhésion des plaquettes dans la circulation sanguine^{1,2}.

Clinique :

Les défauts fonctionnels ou quantitatifs du vWF induisent la maladie de von Willebrand (vWD), qui peut être divisée en 3 groupes :

- Type 1 : vWD caractérisée par un déficit quantitatif partiel de vWF (le plus fréquent).
- Type 2 : vWD caractérisée par une activité anormale d'adhésion du vWF. Il est divisé en 4 sous-types : 2A, 2B, 2M et 2N, dépendant de l'anomalie fonctionnelle des multimères.
- Type 3 : vWD caractérisée par un sévère déficit quantitatif de vWF.

Le dosage vWF:CBA est basé sur la capacité du vWF (formes de haut poids moléculaire) à se lier au collagène afin de mieux caractériser le type de vWD.³

PRINCIPE:

Dans un premier temps, le plasma dilué à tester ou l'échantillon est introduit dans les puits de la microplaque sensibilisés avec du collagène fibrillaire. Lorsqu'il est présent, le vWF se fixe à la phase solide via sa capacité de liaison au collagène. Après une étape de lavage, l'immunoconjugué, qui est un anticorps polyclonal couplé à la peroxydase (HRP), est introduit, et se lie aux épitopes libres du vWF immobilisé. Après une étape de lavage, le substrat Tetraméthylbenzidine (TMB), en présence d'eau oxygénée (H₂O₂), est introduit dans les puits de la plaque et une coloration bleue se développe. Lorsque la réaction est arrêtée avec l'acide sulfurique, une couleur jaune est obtenue. Cette coloration est directement proportionnelle à la concentration de vWF:CBA humain dans le plasma ou dans l'échantillon à doser.

REACTIFS:

1. **COAT** Microplaque ELISA : **12x8** contenant 12 barrettes de 8 puits, coatées par du collagène (cheval, type I et III), puis stabilisées et emballées dans un sachet aluminium en présence d'un déshydratant.
2. **SD ELISA** Diluant échantillon : 2 flacons de 50 mL, prêt à l'emploi. Contient du Proclin et de la BSA.
3. **CAL vWF** Etalon vWF : 3 flacons de 2 mL. Plasma humain, lyophilisé, contenant une quantité titrée de vWF comprise entre 120 et 160%. Le taux du standard a été déterminé par rapport au standard international du NIBSC. Contient de la BSA.
4. **CI vWF** vWF contrôle haut : 1 flacon de 0,5 mL, lyophilisé.
5. **CII vWF** vWF contrôle bas : 1 flacon de 0,5 mL de vWF plasma Control II, lyophilisé.
6. **IC ANTI-(h)-vWF HRP** Immunoconjugué (Anti-(h)-vWF-HRP immunoconjugate) : 3 flacons de 7,5 mL, anticorps polyclonal de lapin, spécifique du vWF et couplé à la peroxydase, lyophilisé. Contient de la BSA.
7. **CD ELISA** Diluant pour immunoconjugué : 1 flacon de 25 mL, prêt à l'emploi. Contient du Proclin et de la BSA.
8. **WS ELISA** Solution de lavage : 1 flacon de 50 mL, **20x** 20 fois concentrée. Contient du Proclin.
9. **TMB 3,3',5,5'-Tetraméthylbenzidine** : 1 flacon de 25 mL de substrat, prêt à l'emploi. Contient de l'eau oxygénée.
10. **Stop** Acide sulfurique 0,45M : 1 flacon de 6 mL, prêt à l'emploi.

MISE EN GARDE ET AVERTISSEMENTS:

- Certains réactifs de ce coffret contiennent des produits d'origine animale. Ces réactifs d'origine biologique doivent être manipulés avec les précautions d'usage s'agissant de produits potentiellement infectieux.
- L'acide sulfurique, même dilué à 0,45M, est caustique. Comme pour tout réactif chimique semblable, manipuler l'acide sulfurique avec précaution, en particulier en utilisant des gants et en portant des lunettes de protection. Eviter tout contact avec la peau et les yeux.

- L'élimination des déchets doit être effectuée conformément aux réglementations locales en vigueur.
- Utiliser uniquement les réactifs d'un même lot de coffret.
- Les études de vieillissement montrent que les réactifs peuvent être expédiés à température ambiante sans aucun dommage.
- Ce dispositif de diagnostic *in vitro* est destiné à une utilisation professionnelle en laboratoire.

PREPARATION DES REACTIFS:

Laisser stabiliser les barrettes et réactifs pour le dosage au moins 30 min à température ambiante avant utilisation. Retirer délicatement le bouchon de lyophilisation des réactifs lyophilisés, pour s'affranchir de toute perte de produit à l'ouverture du flacon.

COAT Ouvrir le sachet aluminium et sortir le nombre de barrettes nécessaires pour le dosage. Les barrettes doivent être utilisées dans les 30 minutes.

Reconstituer chaque flacon avec exactement :

CI vWF → 0,5 mL d'eau distillée au moins 30 minutes avant utilisation. Agiter vigoureusement jusqu'à dissolution complète.

CII vWF → 0,5 mL d'eau distillée au moins 30 minutes avant utilisation. Agiter vigoureusement jusqu'à dissolution complète.

CAL vWF → 2 mL de **SD ELISA** afin d'obtenir une solution titrant « C » % de vWF :CBA (déjà dilué au 1/50). Agiter vigoureusement jusqu'à dissolution complète.

IC ANTI-(h)-vWF HRP → 7,5 mL de **CD ELISA** au moins 15 minutes avant utilisation. Agiter délicatement jusqu'à dissolution complète.

SD ELISA **TMB** **Stop** **CD ELISA**

Réactif prêt à l'emploi.

WS ELISA Agiter le flacon et diluer la solution de lavage au 1/20 en eau distillée (les 50 mL de solution concentrée permettent de préparer 1 litre de solution de lavage après dilution). Incuber, si nécessaire, le flacon dans un bain-marie à 37°C jusqu'à dissolution totale des cristaux.

STOCKAGE ET STABILITE:

Les réactifs non ouverts doivent être conservés à 2-8°C dans leur emballage d'origine. Ils sont alors utilisables jusqu'à la date de péremption imprimée sur le coffret.

COAT Les barrettes non utilisées peuvent être conservées jusqu'à 4 semaines à 2-8°C dans leur emballage d'origine en aluminium (hermétiquement refermé, en présence du déshydratant) placé dans le sachet en plastique pour microplaque fourni (minigrip) à l'abri de l'humidité.

La stabilité du réactif après reconstitution, sous réserve de toute contamination ou d'évaporation, conservé fermé est de :

- CAL vWF** → 8 heures à température ambiante (18-25°C).
- CI vWF** **CII vWF** → 24 heures à 2-8°C.
8 heures à température ambiante (18-25°C).
2 mois congelé à -20°C ou moins*

IC ANTI-(h)-vWF HRP → 4 semaines à 2-8°C.
24 heures à température ambiante (18-25°C).

*Décongeler une seule fois le plus rapidement possible à 37°C et utiliser immédiatement.

La stabilité du réactif après ouverture, sous réserve de toute contamination ou d'évaporation, conservé fermé est de :

- SD ELISA** **CD ELISA** **TMB** → 4 semaines à 2-8°C.
- WS ELISA** → 4 semaines à 2-8°C.
7 jours à 2-8°C pour la solution diluée.
- Stop** → 8 semaines à 2-8°C.

REACTIFS ET MATERIELS REQUIS MAIS NON FOURNIS:

Réactifs:

- Eau distillée.

Matériels:

- Pipettes à 8 canaux permettant de distribuer des volumes de 50 à 300 µL.
- Pipettes à volume variable de 0 à 20 µL, de 20 à 200 µL et de 200 à 1000 µL.

- Matériel de lavage pour microplaques et agitateur.
- Lecteur de microplaques ELISA réglé à une longueur d'ondes de 450 nm.

PRELEVEMENTS ET PREPARATION DES ECHANTILLONS:

Le sang (9 volumes) doit être collecté sur l'anticoagulant citrate trisodique (1 volume) (0.109M, 3,2%) avec précautions, par ponction veineuse franche. Le premier tube doit être éliminé.

La préparation et la conservation des échantillons doivent être réalisées selon les recommandations locales en vigueur (pour les Etats-Unis, se référer aux recommandations du CLSI GP44-A4⁹ (et CLSI H21-A5¹⁰) pour plus d'informations concernant le prélèvement, la manipulation et la conservation). Pour la conservation des plasmas, se référer aux références.

PROCEDURE:

Méthode de dosage:

1. Diluer les échantillons et contrôles dans le **SD ELISA** comme décrit dans le tableau ci-dessous :

Echantillons	Dilution
CI vWF et CII vWF	1/50
Echantillons	1/50

Pour des taux attendus de vWF supérieurs à « C »%, diluer les échantillons au **1/100** (D=100) ou plus.

2. En utilisant l'étalon **CAL vWF** avec une concentration en % de « C », préparer la gamme d'étalonnage selon le tableau ci-dessous :

Concentration de vWF (%)	C	C/2	C/4	C/10	C/20	0
Vol. d'étalon vWF	1 mL	0,5 mL	0,25 mL	0,1 mL	0,05 mL	0 mL
Vol. de Sample Diluent	0 mL	0,5 mL	0,75 mL	0,9 mL	0,95 mL	1 mL

Agiter pour homogénéiser.

Les dilutions sont stables **6 heures** à température ambiante (18-25°C).

3. Placer dans le cadre fourni. Introduire les réactifs dans les puits des micro-barrettes ELISA et réaliser le dosage comme indiqué dans le tableau ci-après :

Réactif	Volume	Procédure
CAL vWF ou CI vWF ou CII vWF ou Echantillons à doser dilués ou SD ELISA (blanc)	200µL	Introduire la gamme d'étalonnage ou le plasma dilué dans les puits sur la micro plaque ELISA
Incuber 2 heures à température ambiante (18-25°C) (a)		
WS ELISA	300µL	Effectuer une série de 10 lavages (b).
IC ANTI-(h)-vWF HRP	200µL	Introduire IC ANTI-(h)-vWF HRP dans les puits de la microplaque ELISA
Incuber 1 heure à température ambiante (18-25°C) (a)		
WS ELISA	300µL	Effectuer une série de 10 lavages (b).
TMB	200µL	Immédiatement après le lavage, introduire le substrat dans les puits (b, c). Nota : la répartition du substrat, barrette par barrette, doit se faire précisément et à un intervalle de temps précis.
Incuber pendant 15 minutes exactement à température ambiante (18-25°C) (a)		
Stop	50µL	En respectant le même intervalle de temps, barrette par barrette, que celui utilisé pour l'ajout du substrat, arrêter la réaction en introduisant l'acide sulfurique 0.45M (c).
Attendre 10 minutes pour laisser stabiliser la coloration puis mesurer l'absorbance à 450 nm. Soustraire les valeurs de blancs (d).		

Déposer les dilutions de l'étalon, les contrôles et les échantillons, le plus rapidement possible, pour obtenir une cinétique homogène du dosage. Un délai trop important (> 10 min) entre les premiers et derniers dépôts peut influencer la cinétique immunologique et fausser les résultats (sous-estimation des valeurs pour les derniers puits).

- Eviter de laisser la plaque en pleine lumière lors des incubations et plus particulièrement lors du développement de la coloration. L'utilisation d'un agitateur pour microplaque ELISA est possible.
- Ne jamais laisser les puits de la plaque ELISA vides entre l'addition des réactifs ou après les étapes de lavage afin de préserver les protéines immobilisées. Le réactif suivant doit être ajouté dans les trois minutes afin d'éviter l'assèchement de la plaque, qui pourrait endommager les protéines immobilisées et réduire la réactivité de la plaque. Si nécessaire, garder les puits remplis de solution de lavage et les vider juste avant distribution du réactif suivant. Régler le laveur de manière à effectuer un lavage doux. Une vidange trop violente des puits, lors de l'aspiration, peut endommager le coating et réduire la réactivité.
- Lors de la distribution du substrat, l'intervalle de temps entre chaque rangée doit être défini et respecté avec précision.
- Pour une lecture bichromatique, la longueur d'onde de référence utilisée peut être à 620 nm ou à 690 nm.

CONTRÔLE QUALITE:

L'utilisation de contrôles de qualité permet de valider la conformité de la méthode ainsi que l'homogénéité des dosages entre les différents essais pour un même lot de réactifs.

Inclure des contrôles qualité dans chaque série, selon les bonnes pratiques de laboratoire, afin de valider le test. Une nouvelle courbe de calibration doit être établie pour chaque série d'essai.

Chaque laboratoire doit établir les zones d'acceptation et vérifier les performances attendues dans son système analytique.

RESULTATS:

- Les DO450 obtenues peuvent varier en fonction de la température réelle à laquelle est effectuée le dosage.
- Tracer la droite de calibration en portant en ordonnées la DO à 450 nm et en abscisses la concentration de vWF en %, en choisissant le mode d'interpolation « best fit » (se reporter au papillon contenu dans le coffret).
- Les résultats sont exprimés à l'aide des DO450 obtenues pour les échantillons et les contrôles en utilisant la courbe de calibration.
- La concentration de vWF:CBA (%) dans l'échantillon à doser, à la dilution standard 1/50 est déduite directement de la courbe de calibration.
- Si d'autres dilutions sont utilisées le taux obtenu doit être multiplié par le facteur de dilution complémentaire utilisé.
- Alternativement, un logiciel spécifique (ex: Dynex, Biolise, etc...) peut être utilisé pour le calcul des concentrations.
- Pour les **CI vWF** et **CII vWF**, la concentration mesurée est obtenue en lecture directe.
- Les résultats doivent être interprétés selon l'état clinique et biologique du patient.

LIMITATIONS:

- Pour obtenir les performances optimales du test et répondre aux spécifications, suivre scrupuleusement les instructions techniques validées par HYPHEN BioMed.
- Tout réactif présentant un aspect inhabituel ou des signes de contamination doit être rejeté.
- Tout échantillon suspect ou présentant des signes d'activation doit être rejeté.
- Si les étapes de lavage ne sont pas réalisées correctement, cela peut induire un "bruit de fond" élevé et une valeur trop forte du contrôle négatif. Afin d'éviter tout développement de coloration non spécifique, vérifier que le lavage est efficace et correctement effectué.

VALEURS ATTENDUES:

La concentration de vWF:CBA dans le plasma humain normal est d'environ 10 µg/mL. Le vWF:CBA présente une large distribution (de 50 à 160%) dans la population générale.

Ce taux est fortement influencé par le groupe sanguin ABO (abaissé d'environ 25% chez les individus de type O), le sexe (taux plus important chez les femmes), et l'origine ethnique (taux plus faible chez les caucasiens). Il est corrélé positivement avec le diabète, et augmente avec l'âge.

PERFORMANCES:

- Zone de mesure : 0 à 150%.
- La limite de détection est ≤ 5%.
- CV intra essais : ≤ 10 %
- CV inter essais : ≤ 10 %
- **Interférences** : Aucune interférence n'a été observée avec les molécules et jusqu'aux concentrations suivantes:

Héparine	Bilirubine	Hémoglobine	Triglycérides
2 UI/mL	0,5 mg/mL	5 mg/mL	1,25 mg/mL

REFERENCES:

- Luo GP. et al. von Willebrand Factor: more than a regulator of hemostasis and thrombosis. *Acta Haematol.* 2012.
- Peyvandi F. et al. Role of von Willebrand Factor in the haemostasis. *Blood Transfus.* 2011.
- Favaloro EJ. Towards personalized therapy for von Willebrand disease: a future role for recombinant products. *Blood Transfus.* 2016
- Ruggeri Z.M. Von Willebrand factor, platelets and endothelial cells interactions. *J. Thromb. Haemost.* 2003.
- Castaman G. et al. Von Willebrand's disease in the year 2003: towards the complete identification of gene defects for correct diagnosis and treatment. *Haematologica.* 2003.
- Miller C.H. et al. Measurement of von Willebrand factor activity: relative effects of ABO blood type and race. *J Thromb Haemost.* 2003.
- Kamphuisen P.W. et al. Familial clustering of factor VIII and von Willebrand factor levels. *Thromb Haemost.* 1998.
- Lip G.Y.H. and Blann A.D. Von Willebrand factor and its relevance to cardiovascular disorders. *Br Heart J.* 1995.
- CLSI Document GP44-A4: "Procedures for the handling and processing of blood specimens for common laboratory tests".
- CLSI Document H21-A5: "Collection, transport, and processing of blood specimens for testing plasma -based coagulation assays and molecular hemostasis assays; approved guideline". 2008.

SYMBOLES:

Symboles utilisés et signes énumérés dans la norme ISO 15223-1, se référer au document Définition des symboles.

SD ELISA **CD ELISA** **WS ELISA** H317 : Peut provoquer une allergie cutanée.

Changements par rapport à la précédente version.