

**ZYMUTEST™ vWF**

REF RK030A

96 tests



Dosage ELISA du Facteur von Willebrand

Français, dernière révision : 11-2022

UTILISATION:

Le coffret ZYMUTEST™ vWF est une méthode ELISA sandwich pour le dosage quantitatif *in vitro* du Facteur von Willebrand (vWF) dans le 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.

Des déficits en vWF peuvent être associés à diverses autres pathologies, constituant alors une maladie de von Willebrand acquise.

En cas d'atteinte de l'endothélium vasculaire, le taux de vWF peut être augmenté en lien avec les processus inflammatoires^{3,4}.

PRINCIPE:

ZYMUTEST™ vWF est une méthode ELISA, basée sur une réaction antigène-anticorps : l'antigène vWF de l'échantillon réagit avec un anticorps polyclonal anti-vWF stabilisé.

Le plasma à tester est introduit dans l'un des puits de la plaque sensibilisée. Le vWF se fixe sur l'anticorps immobilisé. Après lavage, le vWF fixé sur la plaque est révélé par l'immunoconjugué, anticorps polyclonal couplé à la peroxydase (HRP), qui réagit avec les épitopes libres du vWF. Après lavage, le substrat, 3,3',5,5' - Tetraméthylbenzidine (TMB) en présence d'eau oxygénée (H₂O₂), est introduit dans les puits et une coloration bleue se développe. L'arrêt de la réaction par l'acide sulfurique fait virer la coloration au jaune. Cette coloration est proportionnelle au taux de vWF présent dans l'échantillon testé.

REACTIFS:

1. **COAT** Microplaque ELISA : **12x8** contenant 12 barrettes de 8 puits, coâtées avec de l'anticorps polyclonal de lapin, spécifique du vWF humain, stabilisées et emballées dans un sachet aluminium hermétiquement fermé en présence d'un déshydratant. Contient de faibles quantités d'azide de sodium (0,9 g/L).
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, lyophilisé. Chaque flacon doit être reconstitué par 2 mL de diluant pour échantillon afin d'obtenir un standard contenant un taux « C % » de vWF humain (déjà dilué au 1/50), précisément déterminé pour chaque lot. Ce taux « C » est compris entre 120 et 160% selon les lots. Le standard est raccordé 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, lyophilisé.
6. **IC ANTI-(h)-vWF HRP** Immunoconjugué anti-(h)-vWF-HRP : 3 flacons de 7,5 mL, anticorps polyclonal de lapin, spécifique du vWF et couplé à la peroxydase (HRP), 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.

Les concentrations des étalons et contrôles peuvent légèrement varier de lot à lot. Pour le dosage, se référer aux valeurs fournies sur le papillon du coffret utilisé.

MISE EN GARDE ET AVERTISSEMENTS:

- Certains réactifs de ce coffret contiennent des produits d'origine humaine et animale. Lorsque du plasma humain a été utilisé dans la préparation de ces réactifs, la recherche de l'antigène HBs, des anticorps anti-HCV, anti-HIV 1 et anti-HIV 2 a été effectuée et trouvée négative. Cependant aucun test ne peut garantir de façon absolue l'absence de tout agent infectieux. Aussi, ces réactifs d'origine biologique doivent être manipulés avec les précautions d'usage s'agissant de produits potentiellement infectieux.
- 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** au moins 30 minutes avant utilisation afin d'obtenir une solution titrant « C » % de vWF (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-A4⁵ (et CLSI H21-A5⁶) 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. de CAL vWF	1 mL	0,5 mL	0,25 mL	0,1 mL	0,05 mL	0 mL
Vol. de SD ELISA	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 microbarrettes 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 5 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 5 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 5 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).

(a) 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.

(b) 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.

(c) Lors de la distribution du substrat, l'intervalle de temps entre chaque rangée doit être défini et respecté avec précision.

(d) 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 (%) 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 dans le plasma humain normal est d'environ 10 µg/mL. Le vWF 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%.
- Variabilité intra essais : 3-8 %
- Variabilité inter essais : 5-10 %
- Interférences :** Aucune interférence n'a été observée avec les molécules et jusqu'aux concentrations suivantes:

Héparine	Bilirubine	Hémoglobine
2 UI/mL	0,05 mg/mL	10 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.
- Schwameis M. et al, vWF excess and ADAMTS13 deficiency: a unifying pathomechanism linking inflammation to thrombosis in DIC, malaria, and TTP. Thrombosis and Haemostasis. 2015.
- Farkas P. et al, Complement activation, inflammation and relative ADAMTS13 deficiency in secondary thrombotic microangiopathies. Immunobiology. 2017..
- 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.

SYMBLES:

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.

Changement par rapport à la précédente version.