

von Willebrand Factor Antigen Rocket EIA

Instructions For Use

REF 5361

**EID en fusée, antigène du facteur von Willebrand
Fiche technique**

**von Willebrand Faktor Antigen Rocket-IEA
Anleitung**

**Rocket EIA per l'antigene del fattore von Willebrand
Istruzioni per l'uso**

**EIA Rocket de antígeno del factor von Willebrand
Instrucciones de uso**

Contents

English	1
Français	8
Deutsch	15
Italiano	22
Español	29



INTENDED PURPOSE

The von Willebrand Factor (vWF) Antigen Rocket System is intended for the quantitative determination of von Willebrand Factor Antigen in human plasma by Laurell rocket electroimmunoassay^{1,2}.

The accurate quantitative measurement of von Willebrand Factor Antigen (vWF:Ag) in human plasma aids in differentiating patients with von Willebrand's disease from those with Hemophilia A and in detecting carriers of Hemophilia A³. Quantitation of von Willebrand Factor Antigen by rocket electroimmunoassay (EIA) is a procedure which combines the specificity of immunochemistry with the speed of electrophoresis⁴.

The Helena von Willebrand Factor Antigen Rocket EIA Method is performed in an agarose gel medium containing a monospecific antiserum to the von Willebrand Factor Antigen. After plasma samples are applied to the wells in the agarose, electrophoresis is used to migrate the proteins into the antibody field. A rocket-shaped precipitin pattern forms along the axis of migration with the length of this rocket pattern being proportional to the antigen concentration.

WARNINGS AND PRECAUTIONS

The reagents contained in this kit are for *in-vitro* diagnostic use only - **DO NOT INGEST**. Wear gloves when handling all kit components. Refer to the product safety data sheets for risk and safety phrases and disposal information. Plasma products have been screened and found negative (unless otherwise stated on the kit box or vial) for the presence of Hepatitis B Antigen (HbsAg) HIV 1 and 2 antibody and HCV antibody, however they should be handled with the same precautions as a human plasma sample.

COMPOSITION

1. von Willebrand Factor Antigen Rocket Plates (Cat. No. 5361)

Each plate contains antiserum to human von Willebrand Factor Antigen in barbital buffered agarose⁵ and sodium azide as preservative.

Preparation: Remove the plate from the bag, remove the plastic lid and allow 5-10 minutes for the agarose to reach 15...30°C.

2. Electra™ BI Buffer (Cat. No. 5016 - not provided)

When dissolved, the buffer contains barbital-sodium barbital buffer with sodium azide as preservative.

Preparation: Dissolve one package of buffer in 1000ml deionized water. The buffer is ready for use when all material is completely dissolved.

3. Rocket Stain (Cat. No. 5362 not provided)

Rocket Stain is a preparation of Coomassie Brilliant Blue stain.

Preparation: Dissolve the contents of one vial in 450ml methanol, 450ml deionized water and 100ml acetic acid.

4. Other Kit Components

Each kit contains Instructions For Use, a rocket ruler and report form.

STORAGE AND SHELF-LIFE

Unopened reagents are stable until the given expiry date when stored under conditions indicated on the vial or kit label.

1. von Willebrand Factor Antigen Rocket Plates (Cat. No. 5361)

Rocket Plates MUST be stored at 2...6°C and maintained within the bag. **DO NOT FREEZE.**

The plates are stable until the expiry date indicated on the package.

Signs of Deterioration: Discard the plate if dry in appearance or if the wells are not round. A crystalline appearance indicates the agarose has been frozen and should be discarded.

2. Electra™ B1 Buffer (Cat. No. 5016)

The buffer should be stored at 15...30°C. Diluted buffer is stable for 2 months at 15...30°C.

Signs of Deterioration: Discard packaged buffer if the material shows signs of dampness or discoloration. Discard diluted buffer if it becomes turbid.

3. Rocket Stain (Cat. No. 5362)

The stain should be stored at 15...30°C.

Signs of Deterioration: If methanol evaporation occurs, a metallic sheen will be visible on the stain surface. Discard the stain if it does not adequately stain protein rockets as described in this procedure.

ITEMS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

Cat. No. 5016 Electra B₁ Buffer

Cat. No. 5362 Rocket Stain

Cat. No. 5185 SARP reference plasma

Cat. No. 5037 Titan Blotter Pads

Cat. No. 9015 Sponge Wicks

Cat. No. 1283 Zip Zone Chamber

Cat. No. 5014 Development Weight

Cat. No. 9036 Humidity Chamber

Cat. No. 1520 EWS Power Supply

Cat. No. 5116 Incubator, Oven, Drier

Cat. No. 6210, 6211 Microdispenser and Tubes (10µl)

Laboratory rotator

Lint free tissue

Destain solution: Mix 200ml deionized water, 200ml methanol and 50ml glacial acetic acid.

SAMPLE COLLECTION AND PREPARATION

Plastic or siliconised glass should be used throughout. Blood (9 parts) should be collected into 3.2% or 3.8% sodium citrate anticoagulant (1 part). Separate plasma after centrifugation at 2000-3000g for 15 minutes. Plasma should be kept at 2...6°C. Testing should be completed within 2 hours of sample collection, or plasma can be stored frozen at -20°C for 2 weeks or -70°C for one month. Thaw quickly at 37°C prior to testing. **DO NOT** keep at 37°C for more than 5 minutes.

STEP-BY-STEP PROCEDURE

NOTE: Remove the plate from the refrigerator, allow approximately 5-20 minutes for the plate to reach 15...30°C and for excess moisture to be absorbed before use.

1. Make dilutions of reconstituted S.A.R.P. for preparation of the Standard Curve as follows:

Percent Activity	Dilution	Parts S.A.R.P.	Parts 0.85% Saline
100%	* Use reconstituted S.A.R.P. undiluted		
50%	1:2	1	1
25%	1:4	1	3
12.5%	1:8	1	7

NOTE: If desired, S.A.R.P. may be prediluted 1:2 with 0.85% saline to enable the use of a reference value which is one-half the published reference value. This choice increases sensitivity when undiluted reference value exceeds 100%. Under those circumstances, the prediluted material will be used as reconstituted S.A.R.P. and one-half the reference value would be used in the calculations.

- Dilute each patient sample and control with 0.85% saline. Prepare a 1:2 dilution (1 part patient plasma and 1 part saline) and a 1:4 dilution (1 part patient plasma and 3 parts saline). **NOTE:** Additional dilutions may be necessary depending on the patient history. Suspected von Willebrand's samples may need to be tested undiluted.
- Pour 200ml of dissolved buffer into each of the outer sections of the chamber (requires a total of 400ml buffer).
- Place one sponge wick in the buffer along each inner wall of the chamber.
- Remove any excess moisture from the wells of the plate. **NOTE:** Excess moisture on the plate can result in poor rockets.
- Apply 10µl of each patient sample or dilution to the designated wells. **NOTE:** Standard curve samples must be run on each plate. Duplicate applications of patient samples are advisable. When applying the samples to the plate wells, do not allow the pipette tip to touch the sides of the wells as this may cause damage.
- Allow 5 minutes for specimens to diffuse into the agarose.
- Place the plate, agarose side down, into the chamber on the sponge wicks. Place the application point (wells) toward the cathode (-) side
- Electrophorese the plates at a constant current of 16 mA per plate (2 plates = 32 mA) for 4 hours.
- Following electrophoresis, remove the plates from the chamber. **NOTE:** Discard the chamber buffer after each run. **NOTE:** Use the Humidity Chamber (Cat. No. 9036) as a staining and rinsing chamber. A laboratory rotator should not be used during the rinsing process.
- Rinse the plate with deionized water and wash in 0.85% saline, agarose side up, overnight.
- After the overnight wash, rinse the plate again and then wash in deionized water for 15 minutes. Drain or shake the excess water from the plate.
- Place the plate on a flat surface, agarose side up. Cover the agarose with a single, lint-free tissue.
- Place 4-5 Titan Blotter Pads and then a Development Weight on the plate for 5 minutes. Remove the weight and the top 2-3 Blotter Pads. Replace with 2 fresh Blotter Pads and then a weight for an additional 10 minutes and remove.
- Score the edges of the plate with a sharp instrument to prevent peeling.

16. Dry the plate in a drying oven at 60...70°C for 10-20 minutes. Periodically inspect the agarose for transparency. The plate will be transparent when completely dry. DO NOT over-dry the plates. If the agarose starts to peel at the edges before the entire plate is dry, reduce the temperature. **NOTE:** If a dryer/oven is not available, the plates may be covered with the wet lint-free tissue and allowed to dry at 15...30°C overnight or under a fan for 3 hours at 15...30°C.
17. Following drying, pour the stain over the entire surface of the plate, agarose side up, for 20 minutes.
18. Place the plate in destain solution for up to 3 minutes. **NOTE:** Discontinue destaining as soon as the background sufficiently clears in order to easily distinguish rocket peaks. Excessive destaining may fade the rockets making correct measurements difficult. If over destaining does occur, repeat Step F.8. and stain the rockets again.
19. Rinse the plate twice in deionized water for 5-10 minutes each rinse.
20. Dry the plates at 37°C for 5 minutes or at 15...30°C until dry. After drying, tape the edges of the agarose to the plastic backing with clear tape. This will prevent peeling of the agarose and prolong the life of the plate.
21. Place the plate on a light box or white paper and mark the apex of each rocket peak with a sharp pencil or marker.
22. Using the Helena Rocket Ruler, measure the length of each peak in millimeters. The peak is measured from the top of each well to the apex of the rocket. Each box of plates contains one Helena Rocket Ruler.
23. Plot the percent activity of the reference curve versus each rocket height on the Helena Factor VIII Related Antigen Report Form or on 2 cycle semi-logarithmic paper. Draw the 'line of best fit' for the four points. Refer to Figures 1 and 2 in INTERPRETATION OF RESULTS for an example of a completed Rocket Plate and a standard curve drawn on 2 cycle semi-logarithmic paper.

INTERPRETATION OF RESULTS

Read the patient or control values from the standard curve and multiply each by the appropriate dilution factor. Use of a pre-diluted standard would be treated the same with no change in the dilution factors used. The only difference would be the final reference value used. If Coagulation S.A.R.P. is used to prepare the standard curve, the patient value read from that curve must be multiplied by the assigned or pre-diluted von Willebrand Factor Antigen value of the appropriate lot of Coagulation S.A.R.P. as well as the dilution factor.

Patient value from curve = 30%
 S.A.R.P. assigned value (from assay sheet) = 95%
 Dilution factor = 2
 Actual Patient Factor VIII
 Related Antigen = $30\% \times 2 \times 0.95 = 57.0\%$

Unknown patient samples with von Willebrand Factor Antigen levels greater than the range of the standard curve must be reassayed using the appropriate dilutions.

VON WILLEBRAND FACTOR ANTIGEN ROCKET EIA

Figure 1: Rocket patterns on a von Willebrand Factor Antigen Rocket Plate. The lengths of the rockets (in millimeters) of the Coagulation S.A.R.P. (the standard) dilutions are used to prepare the standard curve. Patient results are read from the curve. In this illustration, Patient #3 has no rocket formation indicating a von Willebrand Factor Antigen deficiency.

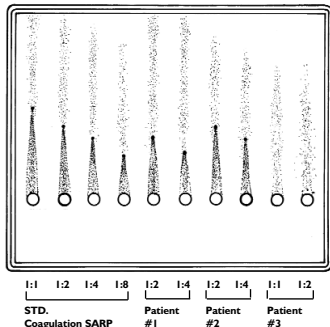
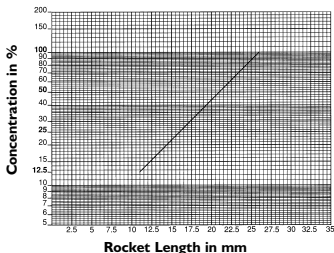


Figure 2: Standard Curve prepared with Coagulation S.A.R.P. on 2 cycle semi-logarithmic paper.



The rocket lengths of the standards are as follows:

100% activity = 26 mm

50% activity = 21 mm

25% activity = 16 mm

12.5% activity = 11 mm

From the curve, a patient with a rocket length of 17 mm for 1:2 dilution would have 30% activity. See Step G.4. of the STEP-BY-STEP PROCEDURE for complete patient calculations.

Severe von Willebrand's patients often show no detectable rocket precipitation by this method. Other patients with von Willebrand's disease have been reported with normal levels of von Willebrand Factor Antigen⁴. The diagnosis of von Willebrand's syndrome should not be made on the basis of this test alone. Factor VIII coagulant activity, ristocetin aggregation, template bleeding times and a thorough history and physical are essential for an accurate diagnosis of this disease. On the basis of the results from various tests, von Willebrand's patients may be classified into several categories. Suspected von Willebrand's patients should be tested on several different occasions due to the variability in the test results observed. There are fluctuations in the levels of the immunologically detectable protein as well as in the functional activity in the Factor VIII molecule^{5,7,8}. Each laboratory should establish its own reference range for this procedure.

QUALITY CONTROL

Each laboratory should establish a quality control program. Normal and abnormal control plasmas should be tested prior to each batch of patient samples, to ensure satisfactory instrument and operator performance. If controls do not perform as expected, patient results should be considered invalid.

Helena BioSciences supply the following controls available for use with this product:

Cat. No. 5301 SAC1

Cat. No. 5302 SAC2

REFERENCE VALUES

von Willebrand Factor Antigen values are generally expressed in relative percents as compared to a standard or pooled normal plasma. The expected normal range for the Helena von Willebrand Factor Antigen Rocket EIA Method is 50% to 160%. This range was established by testing a total of 50 individuals, 25 males and 25 females. Testing on male donors versus female donors showed no significant difference in mean values. This normal range compared favorably with normal ranges reported by Zimmerman⁴ and Johnson⁵.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Helena BioSciences or their representatives have determined the following performance characteristics as a guideline. Each laboratory should establish its own performance data.

Precision Studies

Precision of the Helena von Willebrand Factor Antigen Rocket EIA Method was determined by reconstituting seven vials of Coagulation S.A.R.P. on eight different days and performing the test in duplicate each day. The S.A.R.P. was run undiluted, and in dilutions of 1:2, 1:4 and 1:8. The mean coefficient of variation was 7.8%.

Sensitivity

The sensitivity limits are defined by the von Willebrand Factor Antigen Reference Standards (S.A.R.P.). Patient values greater than the highest value on the standard curve must be diluted and reassayed. Patient values less than the lowest value on the curve must be reported as such but no absolute value may be extrapolated.

BIBLIOGRAPHY

1. Laurell, C.B., Electroimmuno Assay, *Scan J Clin Lab Invest*, 29 Suppl 124:21-37, 1972.
2. Laurell, C.B., Quantitative Estimation of Proteins by Electrophoresis in Agarose Gel Containing Antibodies, *Anal Biochem*, 15:45-52, 1966.
3. Eyster, M.E. et al., Carrier Detection in Classic Hemophilia by Combined Measurement of Immunologic (VIII AGN) and Procoagulant (VIII AHF) Activities, *AJCP*, 65:975-981, 1976.
4. Zimmermann, T.S., et al., Determination of the von Willebrand's Disease Antigen (Factor VIII-Related Antigen) in Plasma by Quantitative Immunoelectrophoresis. *J Lab Clin Med* 86:152-159, 1975.
5. Johnson, S.S. et al., Newborn Factor VIII Complex: Elevated Activities in Term Infants and Alterations in Electrophoretic Mobility Related to Illness and Activated Coagulation, *Brit J Haem* 47:597-606, 1981.
6. Peake, I.R., et al., Inherited Variants of Factor VIII-Related Protein in von Willebrand's Disease, *N Eng J Med* 291:113, 1974.
7. Moehring, C., A Rapid Factor VIII-Related Antigen Electroimmunoassay, *AJCP*, 72:21-28, 1979.
8. Brown, J.E. et al., Effect of Exercise on the Factor VIII Complex: A Correlation of the von Willebrand Antigen and Factor VIII Coagulation Antigen Increase, *Thromb Res* 15:61-67, 1979.

UTILISATION

La méthode EID en fusée de l'antigène du facteur von Willebrand (FvW) est utilisée pour la détermination quantitative de l'antigène du facteur von Willebrand dans le plasma humain moyennant électro-immunodiffusion par la méthode de Laurell^{1,2}.

Un dosage précis de l'antigène du facteur von Willebrand (AgFvW) dans le plasma humain aide à différencier les patients atteints d'une maladie de von Willebrand de ceux souffrant d'une hémophilie A et à dépister les porteurs de l'hémophilie A³. Le dosage de l'antigène du facteur von Willebrand par électro-immunodiffusion (EID) est une méthode qui combine la spécificité de l'immunochimie et la vitesse de l'électrophorèse⁴.

La méthode d'EID en fusée de l'antigène du facteur von Willebrand est réalisée sur un gel d'agarose contenant un antisérum monospécifique dirigé contre l'antigène du facteur von Willebrand. Une fois que les échantillons de plasma sont déposés dans les puits d'agarose, une électrophorèse est mise en œuvre pour faire migrer les protéines dans la zone des anticorps. Un arc de précipitine en forme de fusée, dont la longueur est proportionnelle à la concentration en antigène, se développe le long de l'axe de migration.

PRÉCAUTIONS

Les réactifs du kit sont à usage diagnostic *in vitro* uniquement. **NE PAS INGÉRER.** Porter des gants pour la manipulation de tous les composants. Se reporter aux fiches de sécurité des composants du kit pour la manipulation et l'élimination. Un dépistage des produits à base de plasma a été réalisé et a donné un résultat négatif (sauf indication contraire sur la boîte du kit ou sur le flacon) pour les antigènes de l'hépatite B (AgHBs), les anticorps anti VIH 1 et 2 et les anticorps anti VHC ; il est malgré tout nécessaire de les manipuler avec les mêmes précautions que pour les échantillons de plasma humain.

COMPOSITION

1. Plaques d'EID en fusée, antigène du facteur von Willebrand (réf. 5361)

Chaque plaque contient un antisérum dirigé contre l'antigène du facteur von Willebrand humain dans de l'agarose tamponnée avec du barbital et de l'azide de sodium comme conservateur.

Préparation : Sortir la plaque de l'emballage, enlever le couvercle en plastique et attendre 5-10 minutes que la température de l'agarose s'équilibre entre 15...30°C.

2. Tampon Electra® BI (réf. 5016, non fourni)

Une fois dissous, la solution contient un tampon barbital-barbital sodique et l'azide de sodium comme conservateur.

Préparation : Dissoudre un sachet de tampon dans 1000ml d'eau désionisée. Le tampon est prêt à l'emploi lorsque la dissolution est complète.

3. Colorant d'EID en fusée (réf. 5362, non fourni)

Le colorant pour l'EID en fusée est une préparation de bleu de Coomassie brillant.

Préparation : Dissoudre le contenu d'un flacon avec 450ml de méthanol, 450ml d'eau désionisée et 100ml d'acide acétique.

4. Autres composants du kit

Chaque kit contient une fiche technique, une règle à fusée et une fiche de résultats.

STOCKAGE ET CONSERVATION

Les flacons de réactif non ouverts sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée s'ils sont conservés dans les conditions indiquées sur l'étiquette du kit ou du flacon.

1. Plaques d'EID en fusée, antigène du facteur von Willebrand (réf. 5361)

Les plaques d'EID en fusée doivent être conservées entre 2...6°C dans l'emballage. **NE PAS CONGELER.** Elles sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'emballage.

Signes de détérioration : Jeter la plaque si elle a séché, si les puits ne sont pas ronds ou si l'agarose présente un aspect cristallin (cela indique qu'elle a été congelée).

2. Tampon Electra® BI (réf. 5016)

Le tampon doit être conservé entre 15...30°C. Après reconstitution, le tampon est stable 2 mois entre 15...30°C.

Signes de détérioration : Jeter le tampon non reconstitué s'il présente des signes d'humidité ou de décoloration. Jeter le tampon reconstitué s'il devient trouble.

3. Colorant d'EID en fusée (réf. 5362)

Le colorant doit être conservé entre 15...30°C.

Signes de détérioration : En cas d'évaporation de méthanol, la surface du colorant émet un reflet brillant métallique. Jeter le colorant s'il ne colore pas correctement les fusées de protéines comme indiqué dans le protocole.

MATÉRIELS NÉCESSAIRES NON FOURNIS

Réf. 5016 Tampon Electra BI

Réf. 5362 Colorant d'EID en fusée

Réf. 5185 Plasma de référence SARP

Réf. 5037 Blocs buvards Titan

Réf. 9015 Éponges de contact

Réf. 1283 Chambre Zip Zone

Réf. 5014 Poids à développement

Réf. 9036 Chambre humide

Réf. 1520 Générateur EWS

Réf. 5116 Appareil IOD (incubateur, étuve, sécheur)

Réf. 6210, 6211 Micropipette et capillaires (10ml)

Agitateur orbital

Papier absorbant non pelucheux

Solution décolorante : Mélanger 200ml d'eau désionisée, 200ml de méthanol et 50ml d'acide acétique glacial.

PRÉLÈVEMENT DES ÉCHANTILLONS

Utiliser tout au long du prélèvement du plastique ou du verre silicé. Mélanger 9 volumes de sang et 1 volume de citrate de sodium à 3,2% ou 3,8%. Séparer le plasma après centrifugation à 2000-3000 x g pendant 15 minutes. Conserver le plasma entre 2...6°C. L'analyse doit être terminée dans les 2 heures suivant le prélèvement de l'échantillon ; sinon, il est possible de congeler le plasma 2 semaines à -20°C ou un mois à -70°C. Décongeler rapidement à 37°C avant de réaliser l'analyse. Ne pas laisser à 37°C plus de 5 minutes.

MÉTHODOLOGIE

REMARQUE : Sortir la plaque du réfrigérateur et attendre environ 5–20 minutes pour que la température de la plaque s'équilibre entre 15...30°C et que l'excès d'humidité soit absorbé.

1. Réaliser les dilutions suivantes de SARP reconstitué afin de préparer la courbe d'étalonnage :

Activité en %	Dilution	Vol. de SARP	Vol. de solution physiologique à 0,85%
100%		* Utiliser du SARP reconstitué non dilué	
50%	1:2	1	1
25%	1:4	1	3
12,5%	1:8	1	7

- REMARQUE :** Si vous le désirez, il est possible de réaliser une pré-dilution du SARP au 1:2 avec de la solution physiologique pour pouvoir utiliser comme valeur de référence la moitié de celle indiquée. Cette option augmente la sensibilité lorsque la valeur de référence du SARP non dilué dépasse 100%. Dans ce cas, le plasma de référence pré-dilué doit être utilisé comme du SARP reconstitué et la moitié de la valeur de référence doit être utilisée dans les calculs.
2. Diluer chaque échantillon patient et contrôle avec de la solution physiologique à 0,85%. Préparer une dilution au 1:2 (1 volume de plasma du patient plus 1 volume de solution physiologique) et une dilution au 1:4 (1 volume de plasma du patient plus 3 volumes de solution physiologique).
REMARQUE : Il est possible que d'autres dilutions soient nécessaires suivant les cas. Il est possible qu'il soit nécessaire d'analyser les échantillons soupçonnés de maladie de von Willebrand sans les diluer.
3. Verser 200 ml de tampon reconstitué dans chaque compartiment extérieur de la chambre (vous avez besoin de 400ml de tampon au total).
4. Placer une éponge de contact dans le tampon, le long de chaque paroi intérieure de la chambre.
5. Éliminer tout excès d'humidité dans les puits de la plaque. **REMARQUE :** Une humidité excessive sur la plaque risque de produire des fusées de mauvaise qualité.
6. Déposer 10 μ l de chaque dilution d'étalon ou d'échantillon patient dans les puits appropriés.
REMARQUE : Il est nécessaire de réaliser une courbe d'étalonnage pour chaque plaque. Il est conseillé de déposer en double les échantillons patients. Lors du dépôt des échantillons dans les puits de la plaque, veiller à ce que l'embout de la pipette ne touche pas les parois des puits car ils risqueraient d'être endommagés.
7. Attendre 5 minutes que les échantillons diffusent dans l'agarose.
8. Placer la plaque, agarose vers le bas, dans la chambre sur les éponges de contact. Orienter les points de dépôt (puits) vers la cathode (-).
9. Faire migrer les plaques à un courant constant de 16 mA par plaque (2 plaques = 32 mA) pendant 4 heures.
10. Une fois l'électrophorèse terminée, enlever les plaques de la chambre. **REMARQUE :** Jeter le tampon de la chambre après chaque analyse.
REMARQUE : Utiliser une chambre humide (réf. 9036) comme chambre de coloration et de rinçage. Ne pas utiliser d'agitateur orbital dans la phase de rinçage.
11. Rincer la plaque avec de l'eau désionisée et la laver, agarose vers le haut, dans de la solution physiologique à 0,85% toute la nuit.
12. Après ce lavage, rincer la plaque à nouveau puis la laver dans de l'eau désionisée pendant 15 minutes. Égoutter ou agiter la plaque pour éliminer l'eau en excès.

EID EN FUSÉE, ANTIGÈNE DU FACTEUR VON WILLEBRAND

13. Placer la plaque, agarose vers le haut, sur une surface plane. Couvrir l'agarose avec un papier absorbant non pelucheux.
14. Placer sur la plaque 4 ou 5 blocs buvards Titan, puis un poids à développement pendant 5 minutes. Enlever le poids et les 2 ou 3 premiers blocs buvards. Remplacer 2 nouveaux blocs buvards, puis un poids pendant 10 minutes supplémentaires ; les enlever ensuite.
15. Entailler les bords de la plaque avec un objet coupant pour éviter qu'elle ne se décolle.
16. Sécher la plaque dans une étuve de séchage entre 60...70°C pendant 10–20 minutes. Vérifier périodiquement si l'agarose est transparente ou non. La plaque doit être transparente une fois sèche. Ne pas trop la sécher. Si les bords de l'agarose commencent à se détacher avant que toute la plaque soit sèche, réduire la température.
REMARQUE : Si vous ne disposez pas d'étuve de séchage ou de dispositif similaire, il est possible de couvrir la plaque avec un papier absorbant non pelucheux humide et de laisser sécher entre 15...30°C toute la nuit ou 3 heures sous un ventilateur.
17. Une fois le séchage terminé, verser le colorant sur la surface de plaque, agarose vers le haut, pendant 20 minutes.
18. Placer la plaque dans la solution décolorante pendant 3 minutes au maximum. **REMARQUE** : Arrêter la décoloration dès que le fond de bande se distingue suffisamment des pics des fusées. Une décoloration excessive risquerait d'estomper les fusées, ce qui rendrait les mesures plus difficiles. S'il se produit une décoloration excessive, répéter l'étape 17 et colorer à nouveau les fusées.
19. Rincer la plaque dans deux bains d'eau désionisée de 5 à 10 minutes chacun.
20. Sécher la plaque à 37°C pendant 5 minutes ou entre 15...30°C jusqu'à ce qu'elle soit sèche. Une fois sèche, fixer les bords de l'agarose dans le support en plastique avec le couvercle transparent. Cela évite que l'agarose ne pèle et la durée de vie de la plaque est ainsi prolongée.
21. Placer la plaque sur un négatoscope ou sur une feuille de papier blanc et repérer le sommet de chaque fusée avec un crayon pointu ou avec un marqueur.
22. Mesurer à l'aide de la règle à fusée Helena la longueur de chaque pic en millimètres. La mesure doit s'effectuer entre la partie supérieure de chaque puits et le sommet de la fusée. Chaque kit de plaques contient une règle à fusée Helena.
23. Tracer, point par point, une courbe d'étalonnage représentant l'activité en pourcentage en fonction de la longueur de chaque fusée sur la fiche de résultats des antigènes par EID en fusée ou sur du papier semi-logarithmique à 2 modules. Déterminer la droite de meilleur ajustement à partir des quatre points. Les figures 1 et 2 de la section INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS sont des exemples de plaque terminée et de courbe d'étalonnage tracée sur du papier semi-logarithmique à 2 modules.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Lire les résultats du patient ou du contrôle à partir de la courbe d'étalonnage et les multiplier par le facteur de dilution correspondant. Si vous utilisez un étalon pré-dilué, le traiter de la même façon, sans changer les facteurs de dilution utilisés. La valeur de référence utilisée est la seule différence dans ce cas. Si du plasma SARP est utilisé pour préparer la courbe d'étalonnage, les résultats du patient déterminés à partir de cette courbe doivent être multipliés par le taux assigné au plasma de référence (ou à la pré-dilution) pour l'antigène du facteur von Willebrand ainsi que par le facteur de dilution.

Résultat du patient à partir de la courbe = 30%
 Taux assigné au SARP (de la fiche de dosage) = 95%
 Facteur de dilution = 2
 Facteur VIII réel du patient
 Antigène corrélé = $30\% \times 2 \times 0,95 = 57,0\%$

Les échantillons présentant des taux d'antigène du facteur von Willebrand dépassant l'intervalle de la courbe d'étalonnage doivent être analysés à nouveau en utilisant des dilutions appropriées.

Figure 1 : Fusées sur une plaque d'EID en fusée pour les antigènes du facteur von Willebrand. Les longueurs des fusées (en millimètres) des dilutions de SARP (étalon) sont utilisées pour préparer la courbe d'étalonnage. Les résultats du patient sont obtenus à partir de la courbe. Sur cette illustration, le patient n° 3 n'a pas de fusée, ce qui indique un déficit en antigène du facteur von Willebrand.

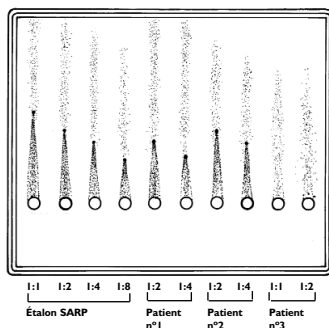
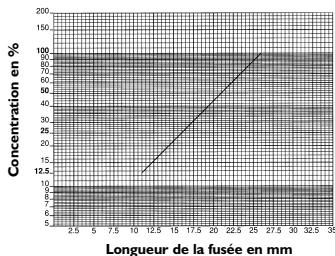


Figure 2 : Courbe d'étalonnage préparée avec du plasma SARP sur du papier semi-logarithmique à 2 modules.



EID EN FUSÉE, ANTIGÈNE DU FACTEUR VON WILLEBRAND

Les longueurs des fusées des étalons sont les suivantes :

Activité 100% = 26 mm

Activité 50% = 21 mm

Activité 25% = 16 mm

Activité 12,5% = 11 mm

D'après la courbe, un patient dont la fusée est longue de 17 mm pour une dilution de 1:2 a une activité de 30%. L'étape 22 de la section Méthodologie indique comment réaliser les mesures.

Les patients atteints d'une forme grave de la maladie de von Willebrand ne présentent souvent aucune précipitation en forme de fusée avec cette méthode. Il a été signalé que certains patients ayant la maladie de von Willebrand ont des taux normaux d'antigène du facteur von Willebrand⁶. Le diagnostic de la maladie de von Willebrand ne doit pas se baser uniquement sur cette analyse. L'activité coagulante du facteur VIII, l'agrégation à la ristocétine, le temps de saignement, les antécédents et l'examen physique sont des éléments essentiels pour réaliser un diagnostic exact. Les résultats des différents tests permettent de classer les patients en plusieurs catégories. Les patients soupçonnés d'avoir la maladie de von Willebrand doivent être analysés à plusieurs reprises en raison de la variabilité des résultats. Des fluctuations sont observées aussi bien pour le taux de protéine immunologiquement détectable que pour l'activité fonctionnelle de la molécule du facteur VIII^{5,7,8}. Chaque laboratoire doit établir ses propres valeurs usuelles pour cette méthode.

CONTRÔLE QUALITÉ

Chaque laboratoire doit établir un programme de contrôle qualité. Les plasmas de contrôle, normaux et anormaux, doivent être testés avant chaque lot d'échantillons patients afin de s'assurer que l'instrument et l'opérateur offrent des performances satisfaisantes. S'ils ne donnent pas les résultats prévus, les résultats du patient doivent être considérés comme non valables.

Helena BioSciences distribue les contrôles suivants à utiliser avec ce produit :

Réf. 5301 SAC1

Réf. 5302 SAC2

VALEURS DE RÉFÉRENCE

Le taux d'antigène du facteur von Willebrand est en général exprimé en un pourcentage relatif par rapport à un étalon ou à un pool de plasma normal. Les valeurs usuelles pour la méthode d'EID en fusée de l'antigène du facteur von Willebrand Helena se situent entre 50% et 160%. Cet intervalle a été déterminé en analysant 50 donneurs, 25 hommes et 25 femmes. Aucune différence significative n'a été établie en raison du sexe. Les valeurs usuelles obtenues sont comparables à celles indiquées par Zimmerman⁴ et par Johnson⁵.

PERFORMANCES

Helena BioSciences ou ses représentants ont déterminé à titre indicatif les performances suivantes. Chaque laboratoire doit établir ses propres données de performance.

Études de précision

Des études de précision de la méthode Helena d'EID en fusée de l'antigène du facteur von Willebrand ont été réalisées en reconstituant sept flacons de SARP à huit jours différents et en réalisant le test en double chaque jour. Le SARP a été analysé non dilué et dilué (1:2, 1:4 et 1:8). Le coefficient de variation moyen est de 7,8%.

Sensibilité

Les seuils de sensibilité sont déterminés par les étalons de référence (SARP) de l'antigène du facteur von Willebrand. Les échantillons donnant des taux dépassant l'intervalle de la courbe d'étalonnage doivent être dilués puis analysés à nouveau. Les échantillons donnant des taux inférieurs à la plus petite valeur de la courbe doivent être notés en indiquant cette circonstance, mais il est impossible d'extrapoler un taux concret.

BIBLIOGRAPHIE

1. Laurell, C. B., Electroimmuno Assay, Scan J Clin Lab Invest 29 Suppl 124 : 21-37, 1972.
2. Laurell, C. B., Quantitative Estimation of Proteins by Electrophoresis in Agarose Gel Containing Antibodies. Anal Biochem, 15 : 45-52, 1966.
3. Eyster, M. E. et al., Carrier Detection in Classic Hemophilia by Combined Measurement of Immunologic (VIII AGN) and Procoagulant (VIII AHF) Activities, AJCP, 65 : 975-981, 1976.
4. Zimmermann, T. S., et al., Determination of the von Willebrand's Disease Antigen (Factor VIII-Related Antigen) in Plasma by Quantitative Immunoelectrophoresis. J Lab Clin Med 86 : 152-159, 1975.
5. Johnson, S. S. et al., Newborn Factor VIII Complex: Elevated Activities in Term Infants and Alterations in Electrophoretic Mobility Related to Illness and Activated Coagulation, Brit J Haem 47 : 597-606, 1981.
6. Peake, I. R., et al., Inherited Variants of Factor VIII-Related Protein in von Willebrand's Disease, N Eng J Med 291 : 113, 1974.
7. Moehring, C., A Rapid Factor VIII-Related Antigen Electroimmunoassay, AJCP, 72 : 21-28, 1979.
8. Brown, J. E. et al., Effect of Exercise on the Factor VIII Complex: A Correlation of the von Willebrand Antigen and Factor VIII Coagulation Antigen Increase, Thromb Res 15 : 61-67, 1979.

ANWENDUNGSBEREICH

Das von Willebrand Faktor-Antigen (vWF) Rocket-System ist zur quantitativen Bestimmung des von Willebrand Faktor-Antigens in humanem Plasma mit dem Laurell Rocket-Immunelektrophoreseassay bestimmt^{1,2}.

Die genaue quantitative Messung des von Willebrand Faktor-Antigens (vWF:Ag) in humanem Plasma hat sich bei der Differenzierung von Patienten mit von Willebrand-Jürgens-Syndrom und denen mit Hämophilie A, und bei dem Nachweis von Hämophilie A-Trägern als nützliches Hilfsmittel erwiesen³. Die Quantifizierung des von Willebrand Faktor-Antigens mit dem Rocket-Immunelektrophoreseassay (IEA) ist ein Verfahren, dass die Spezifität der Immunchemie mit der Schnelligkeit der Elektrophorese verbindet⁴.

Die Helena von Willebrand Faktor-Antigen Rocket-IEA-Methode wird in einem Agarose-Gel-Medium durchgeführt, das ein monospezifisches Antiserum gegen von Willebrand Faktor-Antigen enthält. Nachdem Plasmaproben in die Vertiefungen der Agarose appliziert wurden, wandern die Proteine mit Hilfe der Elektrophorese in den Antikörperbereich. Entlang der Migrationsachse bildet sich ein raketenförmiges Präzipitationsmuster, wobei die Länge dieses „Rocket“-Musters der Antigenkonzentration entspricht.

WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

Die Reagenzien dieses Kits sind nur zur *in-vitro* Diagnostik bestimmt. – **NICHT EINNEHMEN.** Beim Umgang mit den Kit-Komponenten ist das Tragen von Handschuhen erforderlich. Siehe die Sicherheitsdatenblätter mit Gefahrenhinweisen und Sicherheitsvorschlägen sowie Informationen zur Entsorgung. Die Plasmaprodukte sind mit negativem Befund auf Hepatitis B Antigen (HBsAg), HIV-1 und HIV-2 Antikörper und HCV-Antikörper getestet worden (wenn nicht auf Kit-Verpackung oder Fläschchen anders bezeichnet). Sie sollten trotzdem mit derselben Vorsicht wie humane Plasmaproben behandelt werden.

INHALT

1. von Willebrand Faktor-Antigen Rocket-Platten (Kat. Nr. 5361)

Jede Platte enthält Antiserum gegen humanes von Willebrand Faktor-Antigen in barbitalgepufferter Agarose⁵ und Natriumazid als Konservierungsmittel.

Vorbereitung: Platte aus dem Beutel nehmen, Plastikfolie entfernen und die Agarose 5-10 Minuten auf 15...30°C anwärmen lassen.

2. Electra™ BI-Puffer (Kat. Nr. 5016 – nicht mitgeliefert)

Aufgelöst enthält der Puffer Barbitalnatrium-Barbital-Puffer mit Natriumazid als Konservierungsmittel.

Vorbereitung: Eine Packung Puffer in 1.000ml entionisiertem Wasser auflösen. Der Puffer ist gebrauchsfertig, wenn das ganze Material vollständig aufgelöst ist.

3. Rocket-Farbstoff (Kat. Nr. 5362, nicht mitgeliefert)

Der Rocket-Farbstoff besteht aus einer Zubereitung mit Coomassie Brilliant Blue.

Vorbereitung: Den Inhalt eines Fläschchens in 450ml Methanol, 450ml entionisiertes Wasser und 100ml Essigsäure auflösen.

4. Weitere Kit-Komponenten

Jedes Kit enthält eine Gebrauchsanweisung, einen Rocket-Lineal und ein Befundformblatt.

LAGERUNG UND STABILITÄT

Ungeöffnete Reagenzien sind unter den auf Verpackung oder Fläschchen angegebenen Lagerbedingungen bis zum aufgedruckten Verfallsdatum stabil.

1. von Willebrand Faktor-Antigen Rocket-Platten (Kat. Nr. 5361)

Die Rocket-Platten müssen im Beutel bei 2...6°C gelagert werden. **NICHT EINFRIEREN.** Die Platten sind bis zum auf der Verpackung angegebenen Verfallsdatum stabil.

Anzeichen für Verfall: Die Platten verwerfen, wenn sie angetrocknet oder die Vertiefungen nicht ganz rund sind. Kristallisierung weist darauf hin, dass die Agarose eingefroren wurde. Diese Platte sollte verworfen werden.

2. Electra™ BI-Puffer (Kat. Nr. 5016)

Der Puffer sollte bei 15...30°C gelagert werden. Verdünnter Puffer ist bei 15...30°C 2 Monate stabil.

Anzeichen für Verfall: Verpackten Puffer verwerfen, wenn er Anzeichen von Feuchtigkeit oder Verfärbung zeigt. Verdünnten Puffer verwerfen, wenn er trübe aussieht.

3. Rocket-Farbstoff (Kat. Nr. 5362)

Der Farbstoff sollte bei 15...30°C gelagert werden.

Anzeichen für Verfall: Verdunstung von Methanol hinterlässt auf der Farbstoffoberfläche einen metallischen Schimmer. Farbstoff verwerfen, sollte er die Protein-Rockets nicht ausreichend, wie in diesem Verfahren beschrieben, anfärben.

NICHT MITGELIEFERTES, ABER BENÖTIGTES MATERIAL

Kat. Nr. 5016 Electra BI Puffer

Kat. Nr. 5362 Rocket-Farbstoff

Kat. Nr. 5185 SARP Referenzplasma

Kat. Nr. 5037 Titan Blotter Pads

Kat. Nr. 9015 Pufferschwämme

Kat. Nr. 1283 Zip Zone Kammer

Kat. Nr. 5014 Entwicklungsgewicht

Kat. Nr. 9036 feuchte Kammer

Kat. Nr. 1520 EWS Netzteil

Kat. Nr. 5116 Inkubator, Trockenschrank, Trockner

Kat. Nr. 6210, 6211 Mikrodispenser und Röhren (10ml)

Labor-Rotator

Fusselfreie Papiertücher

Entfärbelösung: 200ml entionisiertes Wasser, 200ml Methanol und 50ml Eisessig mischen.

PROBENENTNAHME UND VORBEREITUNG

Nur Plastik oder Silikonglas verwenden. Blut (9 Teile) sollte in 3,2% oder 3,8% Natriumcitrat als Antikoagulanzen (1 Teil) entnommen werden. 15 Minuten bei 2000-3000 g zentrifugieren und Plasma abpipettieren. Plasma bei 2...6°C lagern. Plasma sollte innerhalb von 2 Stunden verarbeitet oder tief gefroren bei -20°C für 2 Wochen oder -70°C für einen Monat gelagert werden. Vor dem Testen schnell bei 37°C auftauen. Nicht länger als 5 Minuten bei 37°C belassen.

SCHRITT-FÜR-SCHRITT METHODE

BITTE BEACHTEN: Platte aus dem Kühlschrank nehmen, circa 5-20 Minuten auf 15...30°C aufwärmen lassen und überschüssige Feuchtigkeit vor Gebrauch aufsaugen.

1. Zur Erstellung der Standardkurve Verdünnungen von rekonstituiertem S.A.R.P. wie folgt herstellen:

Aktivität in Prozent	Verdünnung	Teile S.A.R.P	Teile 0,85 % Kochsalz
100%	* rekonstituiertes S.A.R.P. unverdünnt verwenden		
50%	1:2	1	1
25%	1:4	1	3
12.5%	1:8	1	7

- BITTE BEACHTEN:** Falls erwünscht kann S.A.R.P. 1:2 mit 0,85% Kochsalz vorverdünnt werden, zur Verwendung eines Referenzwerts, welcher der Hälfte des angegebenen Referenzwerts entspricht. Dieses Verdünnen steigert die Sensitivität, sollte unverdünnter Referenzwert 100% übersteigen. Unter diesen Umständen wird das vorverdünnte Material als rekonstituiertes S.A.R.P. verwendet und die Hälfte des Referenzwerts geht in die Berechnung ein.
2. Patientenproben und Kontrolle mit 0,85% Kochsalz verdünnen. Eine 1:2 Verdünnung (1 Teil Patientenplasma und 1 Teil Kochsalz) und eine 1:4 Verdünnung (1 Teil Patientenplasma und 3 Teile Kochsalz) vorbereiten. **BITTE BEACHTEN:** Je nach Patientenanamnese können weitere Verdünnungen erforderlich sein. Proben mit Verdacht auf von Willebrand müssen möglicherweise unverdünnt getestet werden.
3. 200ml aufgelösten Puffer in jede der äußeren Kammerbereiche gießen (benötigt insgesamt 400ml Puffer).
4. Je einen Schwammstreifen längs der inneren Kammerwände legen.
5. Überschüssige Feuchtigkeit aus den Stanzlöchern der Platte entfernen. **BITTE BEACHTEN:** Überschüssige Flüssigkeit auf der Platte kann zu schlechten Ergebnissen führen.
6. 10µl Patientenprobe oder Verdünnung in die vorgesehenen Stanzlöcher geben. **BITTE BEACHTEN:** Auf jeder Platte müssen Proben für die Standardkurve mitlaufen. Ein Doppelsatz der Patientenproben wird empfohlen. Beim Pipettieren der Proben in die Stanzlöcher der Platte darauf achten, dass die Pipettenspitze nicht die Wände berührt, da das Gel dadurch beschädigt werden kann.
7. Die Proben 5 Minuten in die Agarose diffundieren lassen.
8. Die Platte mit der Agarose-Seite nach unten auf die Schwammstreifen in die Kammer legen. Der Applikationspunkt (Stanzlöcher) zeigt dabei zur Kathoden-Seite (-) hin.
9. Die Elektrophorese der Platten mit einem Konstantstrom von 16 mA pro Platte (2 Platten = 32 mA) 4 Stunden laufen lassen.
10. Die Platten nach Elektrophorese aus der Kammer nehmen. **BITTE BEACHTEN:** Den Kammerpuffer nach jedem Lauf verwerfen.
- BITTE BEACHTEN:** Die feuchte Kammer (Kat. Nr. 9036) als Färbe- und Spülkammer verwenden. Während des Spülvorgangs einen Labor-Rotator verwenden.
11. Die Platte mit entionisiertem Wasser abspülen und in 0,85% Kochsalz mit der Agarose-Seite nach oben über Nacht waschen.
12. Nach diesem Waschvorgang über Nacht die Platte noch mal abspülen und anschließend 15 Minuten in entionisiertem Wasser waschen. Überschüssiges Wasser von der Platte abfließen lassen oder abschütteln.

13. Die Platte mit der Agarose-Seite nach oben auf eine gerade Oberfläche legen. Die Agarose mit einem einzigen, fusselfreien Papiertuch abdecken.
14. Für 5 Minuten 4-5 Titan Blotter Pads mit einem Entwicklungsgewicht darauf auf die Platte legen. Das Gewicht und die oberen 2-3 Blotter Pads entfernen. Mit 2 frischen Blotter Pads ersetzen, das Gewicht wieder auflegen, weitere 10 Minuten stehen lassen und entfernen.
15. Die Kanten der Platte mit einem scharfen Gegenstand anritzen, um ein Abschälen zu vermeiden.
16. Die Platte 10-20 Minuten in einem Trockenschrank bei 60...70°C trocknen. Von Zeit zu Zeit die Agarose auf Transparenz hin überprüfen. Vollständig getrocknet ist die Platte transparent. Die Platten nicht zu lange trocknen lassen. Temperatur reduzieren, wenn die Agarose, bevor die ganz Platte trocken ist, anfängt sich zu schälen.
BITTE BEACHTEN: Steht kein Trockenschrank zur Verfügung können die Platten, abgedeckt mit einem nassen, fusselfreien Papiertuch, über Nacht bei 15...30°C trocknen oder unter einem Gebläse 3 Stunden bei 15...30°C.
17. Nach dem Trocknen die Farbe über die gesamte Oberfläche der Platte mit der Agarose-Seite nach oben gießen, 20 Minuten stehen lassen.
18. Die Platte bis zu 3 Minuten in Entfärbelösung geben. **BITTE BEACHTEN:** Sobald der Hintergrund für ein leichtes Differenzieren der Rockets klar genug ist, den Entfärberprozess abbrechen. Übermäßiges Entfärben kann die Rockets verblassen lassen und damit eine korrekte Messung erschweren. Bei einem übermäßigen Entfärben den Schritt F.8. wiederholen und die Rockets neu anfärben.
19. Die Platte zweimal für jeweils 5-10 Minuten in entionisiertem Wasser spülen.
20. Die Platten bei 37°C 5 Minuten trocknen lassen oder bei 15...30°C bis sie trocken sind. Nach dem Trocknen die Kanten der Agarose mit klarem Tesafilm auf eine Plastikplatte kleben. Das verhindert das Schälen der Agarose und verlängert die Lebenszeit der Platte.
21. Die Platte auf einen Lichtkasten oder weißes Papier legen und die Spitze der einzelnen Rockets mit einem spitzen Bleistift oder Marker markieren.
22. Mit dem Helena Rocket-Lineal die Länge der einzelnen Peaks in Millimeter messen. Ein Peak wird von der oberen Kante des Stanzlochs bis zur Spitze des Rockets gemessen. Jede Schachtel Platten enthält ein Helena Rocket-Lineal.
23. Die Aktivität der Referenzkurve in Prozent auf dem Helena Befundblatt für Faktor VIII-Related Antigen oder 2 zyklischem halblogarithmischen Papier gegen die einzelnen Rocket-Längen auftragen. Durch diese vier Punkte eine Ausgleichsgerade ziehen. Siehe Abbildungen I und 2 unter AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE für ein Beispiel einer fertigen Rocket-Platte und einer auf 2-zyklischem, halblogarithmischem Papier erstellten Standardkurve.

AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

Patienten- und Kontrollwerte aus der Standardkurve ablesen und jeden mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor multiplizieren. Bei Verwendung eines vorverdünnten Standards wird genau so verfahren, ohne Änderung der verwendeten Verdünnungsfaktoren. Der einzige Unterschied ist der benutzte End-Referenzwert. Bei Verwendung von Koagulation-S.A.R.P. für die Standardkurve muss der aus dieser Kurve abgelesene Patientenwert mit dem zugeordneten oder vorverdünnten Wert des Willebrand Faktor-Antigens der entsprechenden Charge des Koagulation-S.A.R.P. sowie dem Verdünnungsfaktor multipliziert werden.

VON WILLEBRAND FAKTOR ANTIGEN ROCKET-IEA

Patientenwert aus der Kurve = 30 %

S.A.R.P. zugeordneter Wert (aus den Testdatenblatt) = 95 %

Verdünnungsfaktor = 2

Tatsächlicher Faktor VIII

Related Antigen des Patienten = $30 \% \times 2 \times 0,95 = 57,0 \%$

Unbekannte Patientenproben mit Werten von Willebrand Faktor-Antigen außerhalb des Bereichs der Standardkurve müssen in entsprechender Verdünnung wiederholt getestet werden.

Abbildung 1: Rocket-Muster einer Willebrand Faktor-Antigen Rocket-Platte. Die Länge der Rockets (in Millimeter) der Koagulation-S.A.R.P. (Standard) Verdünnungen werden zur Erstellung der Standardkurve verwendet. Die Patientenwerte liest man aus dieser Kurve ab. In der Darstellung weist Patient Nr. 3 keine Rocket-Bildung auf, was auf einen von Willebrand Faktor-Antigen-Mangel hinweist.

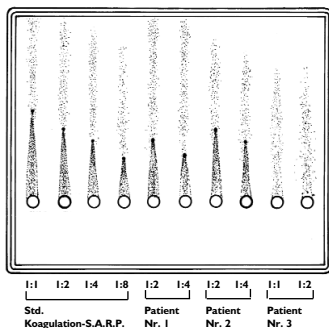
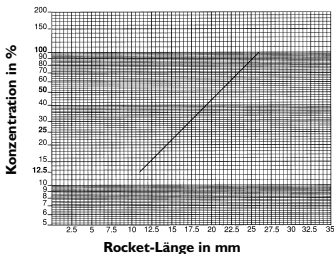


Abbildung 2: Mit Koagulation-S.A.R.P. hergestellte Standardkurve auf 2-zyklischem, halblogarithmischem Papier.



Die Rocket-Längen der Standards sind wie folgt:

100 % Aktivität = 26 mm

50% Aktivität = 21 mm

25% Aktivität = 16 mm

12,5% Aktivität = 11 mm

Ein Patient mit einer Rocket-Länge von 17 mm in einer Verdünnung von 1:2 würde aus dieser Kurve eine Aktivität von 30% haben. Siehe Schritt G.4. der Schritt-für-Schritt Anleitung für vollständige Patientenberechnung.

Patienten mit einem schweren von Willebrand-Jürgens-Syndrom zeigen mit dieser Methode häufig keine nachweisbaren Rocket-Präzipitate. Es ist von anderen Patienten mit von Willebrand-Jürgens-Syndrom mit normalen Werten an von Willebrand Faktor Antigen berichtet worden⁶. Die Diagnose eines von Willebrand-Jürgens-Syndroms sollte nicht auf Grund dieses Tests alleine gestellt werden. Faktor VIII Koagulan-Aktivität, Ristocetin-Aggregation, Blutungszeit und eine ausführliche Anamnese und Untersuchung sind für eine exakte Diagnose dieser Erkrankung unerlässlich. Auf Basis verschiedener Testergebnisse können von Willebrand-Patienten in mehrere Kategorien eingeteilt werden. Patienten mit Verdacht auf von Willebrand-Jürgens-Syndrom sollten wegen Schwankungen in den gefundenen Testergebnissen bei mehreren verschiedenen Gelegenheiten getestet werden. Es gibt Fluktuationen in den Werten des immunologisch nachweisbaren Proteins sowie in der funktionalen Aktivität des Faktor VIII-Moleküls^{5,7,8}. Jedes Labor sollte seinen eigenen Referenzbereich für dieses Verfahren ermitteln..

QUALITÄTSKONTROLLE

Jedes Labor muss für eine eigene Qualitätskontrolle sorgen. Vor jeder Testreihe mit Patientenproben müssen normale und abnormale Kontrollplasmen getestet werden, um eine zufrieden stellende Geräteleistung und Bedienung zu gewährleisten. Liegen die Kontrollen außerhalb des Normbereichs, sind die Patientenergebnisse nicht zu verwenden.

In Verbindung mit diesem Produkt bietet Helena BioSciences die folgenden Kontrollen an:

Kat. Nr. 5301 SAC1

Kat. Nr. 5302 SAC2

REFERENZWERTE

Die Werte für das von Willebrand Faktor-Antigen werden im Allgemeinen als relative Prozentanteile verglichen mit einem Standard oder gepoolten Normalplasma angegeben. Der erwartete Normalbereich für die Helena von Willebrand Faktor Rocket IEA-Methode ist 50 bis 160%. Dieser Bereich wurde durch Tests an insgesamt 50 Personen, 25 Männer und 25 Frauen, erstellt. Weibliche und männliche Spender zeigten in den Mittelwerten keine signifikanten Unterschiede. Dieser Normalbereich entsprach den von Zimmermann⁴ und Johnson⁵ berichteten Normalbereichen.

LEISTUNGSEIGENSCHAFTEN

Die folgenden Leistungseigenschaften wurden von Helena BioSciences oder in ihrem Auftrag als Richtlinien ermittelt. Jedes Labor muss seine eigenen Werte ermitteln.

Präzisionsstudien

Präzision der Helena von Willebrand Faktor-Antigen Rocket IEA-Methode wurde durch Rekonstituieren von sieben Fläschchen Koagulation-S.A.R.P. an acht verschiedenen Tagen und jeweils in Doppelbestimmung bestimmt. S.A.R.P. wurde unverdünnt und in den Verdünnungen 1:2, 1:4 und 1:8 verwendet. Der Mittelwert des Variationskoeffizienten betrug 7,8%.

Empfindlichkeit

Die Grenzen der Sensibilität wurde durch die „Willebrand Faktor Antigen Referenz Standards“ (S.A.R.P.) definiert. Patientenwerte über dem höchsten Wert der Standardkurve müssen verdünnt und erneut getestet werden. Patientenwerte unter dem unteren Wert der Kurve sind als solche anzugeben. Es kann kein absoluter Wert extrapoliert werden.

LITERATUR

1. Laurell, C.B., Electroimmuno Assay, Scan J Clin Lab Invest, 29 Suppl 124:21-37, 1972.
2. Laurell, C.B., Quantitative Estimation of Proteins by Electrophoresis in Agarose Gel Containing Antibodies, Anal Biochem, 15:45-52, 1966.
3. Eyster, M.E. et al., Carrier Detection in Classic Hemophilia by Combined Measurement of Immunologic (VIII AGN) and Procoagulant (VIII AHF) Activities, AJCP, 65:975-981, 1976.
4. Zimmermann, T.S., et al., Determination of the von Willebrand's Disease Antigen (Factor VIII-Related Antigen) in Plasma by Quantitative Immunoelectrophoresis. J Lab Clin Med 86:152-159, 1975.
5. Johnson, S.S. et al., Newborn Factor VIII Complex: Elevated Activities in Term Infants and Alterations in Electrophoretic Mobility Related to Illness and Activated Coagulation, Brit J Haem 47:597-606, 1981.
6. Peake, I.R., et al., Inherited Variants of Factor VIII-Related Protein in von Willebrand's Disease, N Eng J Med 291:113, 1974.
7. Moehring, C., A Rapid Factor VIII-Related Antigen Electroimmunoassay, AJCP, 72:21-28, 1979.
8. Brown, J.E. et al., Effect of Exercise on the Factor VIII Complex: A Correlation of the von Willebrand Antigen and Factor VIII Coagulation Antigen Increase, Thromb Res 15:61-67, 1979.

PRINCIPIO

Il sistema rocket per l'antigene del fattore von Willebrand (vWF) è previsto per la determinazione quantitativa dell'antigene del fattore von Willebrand nel plasma umano mediante rocket elettroimmunodosaggio di Laurell^{1,2}.

La determinazione precisa dell'antigene del fattore von Willebrand (vWF:Ag) nel plasma umano facilita la differenziazione di pazienti con malattia di von Willebrand da quelli affetti da emofilia A e l'identificazione di portatori di emofilia A³. La quantificazione dell'antigene del fattore von Willebrand mediante rocket elettroimmunodosaggio (EIA) è una procedura che combina la specificità dell'immunochimica con la velocità dell'elettroforesi⁴.

Il metodo rocket EIA per l'antigene del fattore von Willebrand Helena è eseguito in un terreno con gel di agarosio contenente un antisiero monospecifico per l'antigene del fattore von Willebrand. Dopo aver applicato i campioni di plasma ai pozzetti nell'agarosio, l'elettroforesi viene utilizzata per far migrare le proteine nel campo dell'anticorpo. Lungo l'asse di migrazione si forma così un pattern di precipitina a forma di razzo (rocket), la cui lunghezza è proporzionale alla concentrazione di antigene.

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

I reagenti contenuti in questo kit sono destinati esclusivamente alla diagnostica *in vitro* - **NON INGERIRE**. Indossare i guanti durante la manipolazione di tutti i componenti del kit. Fare riferimento alle schede tecniche e ai dati di sicurezza per le avvertenze sulla sicurezza e sui rischi e per le informazioni sullo smaltimento. I prodotti plasmatici sono stati esaminati dando esito negativo (salvo diversamente indicato sulla confezione del kit o sul flacone) relativamente alla presenza dell'antigene dell'epatite B (HbsAg), dell'anticorpo anti-HIV 1 e 2 e dell'anticorpo anti-HCV; questi prodotti devono tuttavia essere manipolati con le stesse misure precauzionali adottate per un campione di plasma umano.

COMPOSIZIONE

1. Piastre rocket per l'antigene del fattore von Willebrand (Cod. N. 5361)

Ogni piastra contiene antisiero per l'antigene del fattore von Willebrand in agarosio tamponato con barbital5 e sodio azide come conservante.

Preparazione: Togliere la piastra dalla busta, togliere il coperchio di plastica ed attendere 5-10 minuti per consentire all'agarosio di raggiungere 15...30°C.

2. Tampone Electra BI (Cod. N. 5016 - non fornito)

Una volta dissolto, il tampone contiene barbital-sodio con sodio azide come conservante.

Preparazione: Sciogliere una confezione di tampone in 1000ml di acqua deionizzata. Il tampone è pronto per l'uso non appena tutto il materiale appare completamente disciolto.

3. Colorazione rocket (Cod. N. 5362 non fornita)

La colorazione rocket è una preparazione di tipo Coomassie Brilliant Blue.

Preparazione: Sciogliere il contenuto di un flacone in 450ml di metanolo, 450ml di acqua deionizzata e 100ml di acido acetico.

4. Altri componenti del kit

Ogni kit contiene le istruzioni per l'uso, una riga per i rocket e un modulo di resoconto.

CONSERVAZIONE E STABILITÀ

I reagenti non aperti sono stabili fino alla data di scadenza indicata se conservati nelle condizioni riportate sul flacone o sull'etichetta del kit.

1. Piastre rocket per l'antigene del fattore von Willebrand (Cod. N. 5361)

Le piastre rocket devono essere conservate a 2...6°C e tenute dentro la busta. **NON CONGELARE.** Le piastre sono stabili fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta.

Segni di deterioramento: Gettare la piastra se è secca e se i pozzetti non sono rotondi. Un aspetto cristallino indica che l'agarosio è stato congelato e deve essere gettato.

2. Tampone Electra BI (Cod. N. 5016)

Il tampone deve essere conservato a 15...30°C. Il tampone diluito è stabile per 2 mesi a 15...30°C.

Segni di deterioramento: Gettare il tampone confezionato se il materiale mostra segni di umidità o scolorimento. Gettare il tampone diluito se diventa torbido.

3. Colorazione rocket (Cod. N. 5362)

Il colorante deve essere conservato al buio a 15...30°C.

Segni di deterioramento: Se il metanolo evapora, sarà visibile una lucentezza metallica sulla superficie del colorante. Gettare il colorante se non colora adeguatamente i rocket di proteine come descritto in questa procedura.

MATERIALI NECESSARI MA NON IN DOTAZIONE

Cod. N. 5016 Tampone Electra BI

Cod. N. 5362 Colorazione Rocket

Cod. N. 5185 Plasma di riferimento SARP

Cod. N. 5037 Compresse per blotter Titan

Cod. N. 9015 Stuelli di spugna

Cod. N. 1283 Camera Zip Zone

Cod. N. 5014 Peso di sviluppo

Cod. N. 9036 Camera di umidità

Cod. N. 1520 Alimentatore EWS

Cod. N. 5116 Incubatore, forno, essiccatore

Cod. N. 6210 6211 Microdispenser e provette (10ml)

Rotatore da laboratorio

Salvietta non filacciosa

Soluzione decolorante: Miscelare 200ml di acqua deionizzata, 200ml di metanolo e 50ml di acido acetico glaciale.

RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Nel corso dell'intera procedura è necessario utilizzare plastica o vetro siliconizzato. Il sangue (9 parti) deve essere raccolto in sodio citrato al 3,2% o al 3,8% come anticoagulante (1 parte). Separare il plasma in seguito a centrifugazione a 2000-3000 x g per 15 minuti. Il plasma deve essere conservato a 2...6°C. I test devono essere completati entro 2 ore dalla raccolta dei campioni; in alternativa, il plasma può essere conservato congelato a -20°C per 2 settimane o a -70°C per un mese. Decongelare rapidamente a 37°C prima di eseguire i test. Non conservare a 37°C per oltre 5 minuti.

PROCEDURA

NOTA: Togliere la piastra dal frigorifero, lasciare trascorrere circa 5-20 minuti affinché la piastra raggiunga 15...30°C e l'umidità in eccesso venga assorbita prima dell'uso.

1. Preparare le diluizioni della S.A.R.P. ricostituita per la preparazione della curva standard nel seguente modo:

Attività percentuale	Diluizione	Parti di S.A.R.P	Parti di salina allo 0,85%
100%		* Usare la S.A.R.P. ricostituita non diluita	
50%	1:2	1	1
25%	1:4	1	3
12.5%	1:8	1	7

- NOTA:** Se lo si desidera, la S.A.R.P. può essere prediluita 1:2 con salina allo 0,85% per consentire l'impiego di un valore di riferimento che è pari alla metà del valore di riferimento pubblicato. Questa scelta aumenta la sensibilità quando il valore di riferimento non diluito supera il 100%. In queste circostanze, il materiale prediluito sarà usato come S.A.R.P. ricostituita ed una metà del valore di riferimento sarà usata nei calcoli.
2. Diluire ogni campione di paziente ed ogni controllo salina allo 0,85%. Preparare una diluizione a 1:2 (1 parte di plasma del paziente ed 1 parte di salina) ed una diluizione 1:4 (1 parte di plasma paziente e 3 parti di salina). **NOTA:** In base all'anamnesi del paziente possono rendersi necessarie ulteriori diluizioni. È possibile che si renda necessario testare i campioni con sospetto di von Willebrand senza alcuna diluizione.
 3. Versare 200ml di tampone disciolto in ognuna delle sezioni esterne della camera (è necessaria una quantità totale di 400 ml di tampone).
 4. Mettere uno stuello di spugna nel tampone lungo ogni parete interna della camera.
 5. Eliminare l'umidità in eccesso dai pozzetti se presente. **NOTA:** La presenza di umidità in eccesso sulla piastra può determinare rocket scadenti.
 6. Applicare 10 μ l di ciascun campione di paziente o di diluizione ai pozzetti assegnati. **NOTA:** Su ogni piastra devono essere testati campioni con curva standard. Sono consigliabili applicazioni in doppio di campioni dei pazienti. Quando i campioni vengono applicati ai pozzetti della piastra, non toccare con la punta della pipetta i lati dei pozzetti poiché potrebbero essere danneggiati.
 7. Attendere 5 minuti affinché i campioni si diffondano nell'agarosio.
 8. Mettere la piastra, con lato agarosio rivolto verso il basso, nella camera sugli stuelli di spugna. Rivolgere il punto di applicazione (pozzetti) verso il lato del catodo (-)
 9. Sottoporre ad elettroforesi le piastre con una corrente costante di 16 mA per piastra (2 piastre = 32 mA) per 4 ore.
 10. Terminata l'elettroforesi, togliere le piastre dalla camera. **NOTA:** Gettare il tampone della camera dopo ogni ciclo.
NOTA: Usare la camera d'umidità (Cod. N. 9036) come camera per la colorazione e il lavaggio. Durante il processo di lavaggio non deve essere usato un rotatore da laboratorio.
 11. Lavare overnight la piastra con acqua deionizzata e con salina allo 0,85%, con lato agarosio rivolto verso l'alto.
 12. Dopo il lavaggio overnight, sciacquare di nuovo la piastra, lavare in acqua deionizzata per 15 minuti. Eliminare o scuotere l'acqua in eccesso dalla piastra.
 13. Sistemare la piastra su una superficie piana, con il lato dell'agarosio rivolto verso l'alto. Coprire l'agarosio con una salvietta singola non filacciosa.

ROCKET EIA PER L'ANTIGENE DEL FATTORE VON WILLEBRAND

14. Mettere 4-5 compresse per Blotter Titan ed un peso di sviluppo sulla piastra per 5 minuti. Togliere il peso e le 2-3 compresse per Blotter superiori. Sostituire con 2 compresse per Blotter fresche e riapplicare un peso per altri 10 minuti, quindi togliere.
15. Marcare i margini della piastra con uno strumento affilato per impedire il peeling.
16. Asciugare la piastra nel forno a 60...70°C per 10-20 minuti. Ispezionare periodicamente l'agarosio per verificarne la trasparenza. La piastra sarà trasparente quando completamente asciutta. Non asciugare eccessivamente le piastre. Se l'agarosio inizia a staccarsi sui margini prima che l'intera piastra sia asciutta, abbassare la temperatura.
NOTA: Se non è disponibile un'essiccatrice/forno, è possibile coprire le piastre con una salvietta inumidita non filacciosa, lasciandole asciugare a 15...30°C overnight o sotto un ventilatore per 3 ore a 15...30°C.
17. Terminata l'asciugatura, versare il colorante sull'intera superficie della piastra, lato agarosio rivolto verso l'alto, per 20 minuti.
18. Immergere la piastra in una soluzione decolorante per almeno 3 minuti. **NOTA:** Interrompere la decolorazione non appena il background è sufficientemente chiaro allo scopo di distinguere con facilità i picchi rocket. Una decolorazione eccessiva può schiarire i rocket rendendo così difficile eseguire determinazioni corrette. Se si verifica una decolorazione eccessiva, ripetere la fase F.8. e colorare di nuovo i rocket.
19. Lavare la piastra per due volte con acqua deionizzata per 5-10 minuti per ogni lavaggio.
20. Essiccare il gel a 37°C per 5 minuti o a 15...30°C finché non risulterà essiccato. Avvenuta l'essiccazione, fare aderire i margini dell'agarosio al supporto di plastica con nastro trasparente. In questo modo si esclude il peeling dell'agarosio e si prolunga la vita della piastra.
21. Porre la piastra su un tavolo luminoso o su carta bianca e contrassegnare l'apice di ogni picco rocket con una matita o un marker con punta.
22. Con l'impiego della riga per i rocket Helena, misurare la lunghezza di ogni picco in millimetri. Il picco viene misurato dalla sommità di ogni pozzetto fino all'apice del rocket. Ogni box di piastre contiene una riga rocket Helena.
23. Tracciare l'attività percentuale della curva di riferimento rispetto all'altezza di ciascun rocket sul modulo di resoconto per l'antigene correlato al fattore VIII Helena o su carta semi-logaritmica a 2 cicli. Tracciare la "linea di migliore adattamento" dei quattro punti. Fare riferimento alle figure 1 e 2 nella sezione INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI per un esempio di una piastra rocket completata e di una curva standard tracciata su carta semilogaritmica a 2 cicli.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Sulla curva standard leggere i valori del paziente e del controllo e moltiplicarli per il fattore di diluizione corretto. Per l'uso di uno standard prediluito procedere nello stesso modo, senza alcuna variazione nei fattori di diluizione utilizzati. La sola differenza sarebbe il valore di riferimento finale utilizzato. Se la curva standard viene preparata utilizzando S.A.R.P. per coagulazione, il valore del paziente ottenuto da questa curva deve essere moltiplicato per il valore dell'antigene del fattore von Willebrand, prediluito o assegnato, appartenente al lotto corrispondente di S.A.R.P. per coagulazione ad anche per il fattore di diluizione.

Valore del paziente ottenuto dalla curva = 30%

Valore assegnato a S.A.R.P. (dalla scheda del dosaggio) = 95%

Fattore di diluizione = 2

Fattore VIII effettivo del paziente

Antigene correlato = $30\% \times 2 \times 0,95 = 57,0\%$

I campioni non noti dei pazienti con livelli dell'antigene del fattore von Willebrand maggiori del range della curva standard devono essere ridosati con l'impiego delle diluizioni adeguate.

Figura 1. Modelli dei rocket su una piastra rocket per l'antigene del fattore von Willebrand. Per preparare la curva standard vengono utilizzate le lunghezze dei rocket (in millimetri) delle diluizioni di S.A.R.P. (lo standard) per coagulazione. I risultati del paziente sono leggibili sulla curva. In questa illustrazione, il paziente n. 3 non presenta alcuna formazione a "razzo" (rocket) che indichi una deficienza dell'antigene del fattore von Willebrand.

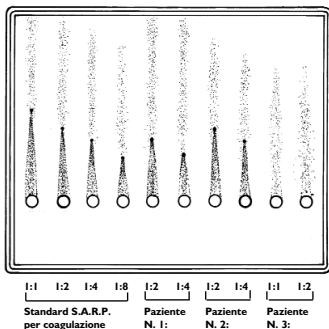
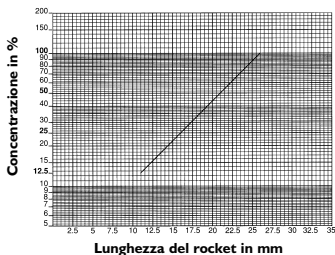


Figura 2. Curva standard preparata con S.A.R.P. per coagulazione su carta semi-logaritmica a 2 cicli.



Le lunghezze del rocket degli standard sono le seguenti:

- 100% di attività = 26 mm
- 50% di attività = 21 mm
- 25% di attività = 16 mm
- 12,5% di attività = 11 mm

In base alla curva, un paziente con una lunghezza del rocket di 17 mm per una diluizione 1:2 dovrebbe avere un 30% di attività. Ved. punto G.4. della procedura per i calcoli completi del paziente.

ROCKET EIA PER L'ANTIGENE DEL FATTORE VON WILLEBRAND

Con questo metodo i pazienti con von Willebrand severo spesso non presentano alcuna precipitazione a forma di razzo (rocket). Per altri pazienti affetti da malattia di von Willebrand sono spesso stati riferiti livelli normali dell'antigene del fattore von Willebrand⁴. La diagnosi della sindrome di von Willebrand non deve essere formulata sulla base di questo singolo test. L'attività coagulante del fattore VIII, l'aggregazione con ristocetina, i tempi di emorragia ed una approfondita anamnesi e valutazione clinica sono indispensabili per una diagnosi accurata di questa malattia. Sulla base dei risultati di vari test, i pazienti von Willebrand sono classificabili in diverse categorie. Data la variabilità osservata nei risultati dei test, i pazienti con sospetto di malattia von Willebrand devono essere testati in numerose e diverse occasioni. Nei livelli delle proteine immunologicamente rilevabili ed anche nell'attività funzionale della molecola del fattore VIII sono presenti delle fluttuazioni^{5,7,8}. Ciascun laboratorio dovrà elaborare il proprio range di riferimento per questa procedura.

CONTROLLO QUALITÀ

Ogni laboratorio deve definire un programma di controllo qualità. I plasmi di controllo normali e anomali devono essere testati prima di ogni lotto di campioni di pazienti, per garantire un livello prestazionale soddisfacente sia per quanto riguarda lo strumento che per l'operatore. Qualora i controlli non funzionassero come previsto, i risultati relativi ai pazienti dovranno essere considerati non validi.

Helena BioSciences mette a disposizione i seguenti controlli utilizzabili con questo prodotto:

Cod. N. 5301 SAC 1

Cod. N. 5302 SAC 2

VALORI DI RIFERIMENTO

I valori dell'antigene del fattore von Willebrand sono generalmente espressi in percentuali relative rispetto ad un plasma standard o ad un pool normale. Il range normale previsto con il metodo rocket EIA per l'antigene del fattore von Willebrand Helena varia dal 50% al 160%. Questo range è stato definito testando un totale di 50 individui, 25 di sesso maschile e 25 di sesso femminile. I test eseguiti su donatori maschili vs donatori femminili non hanno presentato una differenza significativa nei valori medi. Questo range normale si confrontava positivamente con i range normali riferiti da Zimmerman⁵ e Johnson⁴.

CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI

Le caratteristiche prestazionali sotto riportate sono state determinate da Helena BioSciences o dai propri rappresentanti a titolo di linee guida. Ogni laboratorio dovrà definire i propri dati prestazionali.

STUDI DI PRECISIONE

La precisione del metodo EIA Rocket dell'antigene del fattore von Willebrand Helena è stata determinata ricostituendo sette fiale di S.A.R.P. per coagulazione in otto giorni diversi ed eseguendo ogni giorno il test in doppio. La S.A.R.P. è stata determinata non diluita e con diluizioni di 1:2, 1:4 e 1:8. Il coefficiente di variazione medio è risultato pari al 7,8%.

Sensibilità.

I limiti della sensibilità sono definiti dagli standard di riferimento dell'antigene del fattore von Willebrand (S.A.R.P.). I valori dei pazienti superiori al valore massimo sulla curva standard devono essere diluiti e ridosati. I valori dei pazienti inferiori al valore minimo sulla curva devono essere registrati come tali senza tuttavia consentire l'estrapolazione di alcun valore assoluto.

BIBLIOGRAFIA

1. Laurell, C.B., Electroimmuno Assay, *Scan J Clin Lab Invest*, 29 Suppl 124:21-37, 1972.
2. Laurell, C.B., Quantitative Estimation of Proteins by Electrophoresis in Agarose Gel Containing Antibodies, *Anal Biochem*, 15:45-52, 1966.
3. Eyster, M.E. et al., Carrier Detection in Classic Hemophilia by Combined Measurement of Immunologic (VIII AGN) and Procoagulant (VIII AHF) Activities, *AJCP*, 65:975-981, 1976.
4. Zimmermann, T.S., et al., Determination of the von Willebrand Disease Antigen (Factor VIII-Related Antigen) in Plasma by Quantitative Immunoelectrophoresis. *J Lab Clin Med* 86:152-159, 1975.
5. Johnson, S.S. et al., Newborn Factor VIII Complex: Elevated Activities in Term Infants and Alterations in Electrophoretic Mobility Related to Illness and Activated Coagulation, *Brit J Haem* 47:597-606, 1981.
6. Peake, I.R., et al., Inherited Variants of Factor VIII-Related Protein in von Willebrand Disease, *N Eng J Med* 291:113, 1974.
7. Moehring, C., A Rapid Factor VIII-Related Antigen Electroimmunoassay, *AJCP*, 72:21-28, 1979.
8. Brown, J.E. et al., Effect of Exercise on the Factor VIII Complex: A Correlation of the von Willebrand Antigen and Factor VIII Coagulation Antigen Increase, *Thromb Res* 15:61-67, 1979.

USO PREVISTO

El sistema de Rocket de antígeno del factor von Willebrand (FvW) está previsto para la determinación cuantitativa del antígeno del factor von Willebrand en plasma humano mediante el electroinmunoensayo de cohete de Laurell^{1,2}.

La medición cuantitativa exacta del antígeno del factor von Willebrand (FvW:Ag) en plasma humano ayuda a diferenciar a los pacientes con enfermedad de von Willebrand de aquellos con hemofilia A y a detectar a los portadores de hemofilia A³. La cuantificación del antígeno del factor von Willebrand mediante electroinmunoensayo (EIA) de cohete es un procedimiento que combina la especificidad de la inmunoquímica con la velocidad de la electroforesis⁴.

El método de EIA Rocket del antígeno del factor von Willebrand de Helena se realiza en un medio de gel de agarosa que contiene un antisuero mono específico frente al antígeno del factor von Willebrand. Después de aplicarse las muestras de plasma a las paredes en la agarosa, se usa la electroforesis para hacer migrar a las proteínas hacia el campo del anticuerpo. Se forma un patrón de precipitina en forma de cohete a lo largo del eje de migración y la longitud de este patrón de cohete es proporcional a la concentración del antígeno.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

Los reactivos contenidos en este kit son sólo para uso diagnóstico. **NO SE DEBEN INGERIR.** Usar guantes para manejar todos los componentes del kit. Consultar la hoja con los datos de seguridad del producto acerca de los riesgos, avisos de seguridad y consejos para su eliminación. Se han estudiado los productos plasmáticos y han resultado negativos (a menos que se indique otra cosa en la caja del kit o en el vial) para la presencia de antígeno de la hepatitis B (HbsAg), anticuerpos frente a VIH 1 y VIH 2 y anticuerpo del VHC, aunque deben manejarse con las mismas precauciones que una muestra de plasma humano.

COMPOSICIÓN

1. Placas de cohete de antígeno del factor von Willebrand (Nº Cat. 5361)

Cada placa contiene antisuero frente al antígeno del factor von Willebrand humano en agarosa tamponada con barbital⁵ y azida sódica como conservante.

Preparación: Sacar la placa de la bolsa, extraer la tapa de plástico y dejar pasar 5-10 minutos para que la agarosa alcance los 15...30°C.

2. Tampón BI Electra™ (Nº Cat. 5016, no incluido)

Cuando está disuelto, el tampón contiene un tampón de barbital-barbital sódico con azida de sodio como conservante.

Preparación: Disolver un paquete de tampón en 1000ml de agua desionizada. El tampón está listo para usar cuando todo el material está completamente disuelto.

3. Colorante Rocket (Nº Cat. 5362 no incluido)

El colorante Rocket es una preparación del colorante azul brillante de Coomassie.

Preparación: Disolver el contenido de un vial en 450ml de metanol, 450ml de agua desionizada y 100ml de ácido acético.

4. Otros componentes del kit

Cada kit contiene instrucciones de uso, una regla de cohete y un formulario de informe.

ALMACENAMIENTO Y PERÍODO DE VALIDEZ

Los reactivos no abiertos son estables hasta la fecha de caducidad indicada cuando se conservan en las condiciones indicadas en el vial o en la etiqueta del kit.

1. Placas de cohete de antígeno del factor von Willebrand (Nº Cat. 5361)

Las placas Rocket deben conservarse a 2...6°C y mantenerse dentro de la bolsa. **NO CONGELAR.** Las placas permanecen estables hasta la fecha de caducidad indicada en el paquete.

Signos de deterioro: Desechar la placa si parece que está seca o si los pozos no son redondos. Una apariencia cristalina indica que el gel de agarosa se ha congelado y debe desecharse.

2. Tampón BI Electra™ (Nº Cat. 5016)

Debe guardarse el tampón a 15...30°C. El tampón diluido permanece estable durante 2 meses a 15...30°C.

Signos de deterioro: Desechar el tampón envasado si el material muestra signos de humedad o decoloración. Desechar el tampón diluido si se hace turbio.

3. Colorante Rocket (Nº Cat. 5362)

Debe guardarse el colorante a 15...30°C.

Signos de deterioro: Si se evapora el metanol, se podrá apreciar un brillo metálico en la superficie del colorante. Desechar el colorante si no tiñe adecuadamente los cohetes de proteínas como se describe en este procedimiento.

ARTÍCULOS NECESARIOS NO SUMINISTRADOS

Nº Cat. 5016 Tampón Electra BI

Nº Cat. 5362 Colorante Rocket

Nº Cat. 5185 Plasma de referencia SARP

Nº Cat. 5037 Láminas secantes Titan

Nº Cat. 9015 Mechas de esponja

Nº Cat. 1283 Cámara Zip Zone

Nº Cat. 5014 Peso de desarrollo

Nº Cat. 9036 Cámara de humedad

Nº Cat. 1520 Fuente de alimentación EWS

Nº Cat. 5116 Incubador, Horno, Secador

Nº Cat. 6210, 6211 Microdispensador y tubos (10ml)

Girador de laboratorio

Tejido carente de pelusa

Solución decolorante: Mezclar 200ml de agua desionizada, 200ml de metanol y 50ml de ácido acético glacial.

RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

Debe usarse siempre plástico o vidrio siliconizado. Debe recogerse sangre (9 partes) en el anticoagulante citrato sódico al 3,2% o al 3,8% (1 parte). Separar el plasma después de la centrifugación a 2000-3000xg durante 15 minutos. El plasma debe conservarse a 2...6°C. Las pruebas deberían terminarse en 2 horas desde la recogida de las muestras o el plasma puede conservarse congelado a -20°C durante 2 semanas o -70°C durante un mes. Descongelar rápidamente a 37°C antes de realizar la prueba. No conservar a 37°C durante más de 5 minutos.

PROCEDIMIENTO PASO A PASO

NOTA: Sacar la placa del refrigerador, dejar transcurrir aproximadamente 5-20 minutos para que la placa alcance los 15...30°C y para que se absorba cualquier exceso de humedad antes de utilizarla.

1. Realizar diluciones de S.A.R.P. reconstituido para preparar la Curva estándar como sigue:

Porcentaje de actividad	Dilución	Partes S.A.R.P	Partes de solución salina al 0,85%
100%		* usar S.A.R.P. reconstituido, no diluido	
50%	1:2	1	1
25%	1:4	1	3
12,5%	1:8	1	7

- NOTA:** Si se desea, el S.A.R.P. puede prediluirse 1:2 con solución salina al 0,85% para permitir el uso de un valor de referencia que es la mitad del valor de referencia publicado. Esta elección aumenta la sensibilidad cuando el valor de referencia no diluido supera el 100%. En esas circunstancias, debe usarse el material prediluido como S.A.R.P. reconstituido y se usaría la mitad del valor de referencia en los cálculos.
2. Diluir cada control y muestra de paciente con solución salina al 0,85%. Preparar una dilución 1:2 (1 parte plasma del paciente y 1 parte solución salina) y una dilución 1:4 (1 parte plasma del paciente y 3 partes solución salina). **NOTA:** Es posible que sea necesario realizar diluciones adicionales dependiendo de los antecedentes del paciente. Las muestras con sospecha de von Willebrand podrían tener que ser estudiadas sin diluir.
3. Verter 200ml de tampón disuelto en cada una de las secciones exteriores de la cámara (requiere un total de 400ml de tampón).
4. Colocar una mecha de esponja en el tampón en cada una de las paredes internas de la cámara.
5. Retirar cualquier exceso de humedad de los pozos de la placa. **NOTA:** El exceso de humedad en la placa puede producir malos cohetes.
6. Aplicar 10µl de cada dilución o muestra del paciente en los pozos designados. **NOTA:** Deben realizarse curvas estándar en cada placa. Se recomienda realizar aplicaciones duplicadas de las muestras del paciente. Al aplicar las muestras a los pozos de la placa, no dejar que la punta de la pipeta toque los laterales de los pozos ya que se podrían producir daños.
7. Dejar transcurrir 5 minutos para que las muestras se difundan en la agarosa.
8. Colocar la placa, con la agarosa hacia abajo, en la cámara con las mechas de esponja. Colocar el punto de aplicación (pozos) hacia el lado del cátodo (-)
9. Realizar la electroforesis de las placas a una corriente constante de 16 mA por placa (2 placas = 32 mA) durante 4 horas.
10. Después de la electroforesis, sacar las placas de la cámara. **NOTA:** Desechar el tampón de la cámara después de cada desarrollo.
- NOTA:** Utilizar la Cámara de humedad (Nº Cat. 9036) como cámara de coloración y aclarado. No debe utilizarse un girador de laboratorio durante el proceso de aclarado.
11. Aclarar la placa con agua desionizada y dejar lavando toda la noche en solución salina al 0,85%, con la agarosa hacia arriba.
12. Después de haberse lavado toda la noche, aclarar la placa de nuevo y lavar a continuación en agua desionizada durante 15 minutos. Drenar o sacudir el exceso de agua de la placa.
13. Colocar la placa sobre una superficie plana, con la agarosa hacia arriba. Cubrir la agarosa con un paño sin pelusa.

14. Colocar 4-5 láminas secantes Titan y luego un peso de desarrollo en la placa durante 5 minutos. Retirar el peso y 2-3 láminas secantes superiores. Cambiarlas con 2 láminas secantes nuevas y volver a colocar un peso durante otros 10 minutos y retirarlo.
15. Hacer unos cortes en los bordes de la placa con un instrumento afilado para evitar la descamación.
16. Secar la placa en un horno de secado a 60...70°C durante 10-20 minutos. Inspeccionar de vez en cuando la agarosa para comprobar la transparencia. Cuando la placa esté transparente, estará completamente seca. No secar en exceso las placas. Bajar la temperatura, si la agarosa empieza a descamarse por los bordes antes de que toda la placa esté seca.
NOTA: Si el secador/horno no está disponible, pueden cubrirse las placas con el paño sin pelusa húmedo y dejarlas secar a 15...30°C toda la noche o colocarlas bajo un ventilador durante 3 horas a 15...30°C.
17. Después del secado, verter el colorante sobre toda la superficie de la placa, con la agarosa hacia arriba, durante 20 minutos.
18. Colocar la placa en la solución decolorante durante hasta 3 minutos. **NOTA:** Dejar la decoloración en cuanto el fondo se aclare lo suficiente para poder distinguir fácilmente los picos del cohete. Si se decolora en exceso, puede perderse el color de los cohetes con lo que resultaría difícil realizar una medición correcta. En caso de que se decolore demasiado, volver a repetir el paso F.8. y colorear los cohetes de nuevo.
19. Aclarar la placa dos veces en agua desionizada durante 5-10 minutos cada vez.
20. Secar las placas a 37°C durante 5 minutos o a 15...30°C hasta que se sequen. Después del secado, sujetar los bordes de la agarosa al refuerzo de plástico con cinta transparente. De este modo, se evitará que la agarosa se descame y se prolongará la vida de la placa.
21. Colocar la placa en una caja de luz o en papel blanco y marcar el vértice de cada pico de cohete con un lápiz o rotulador afilado.
22. Usando la regla de cohete Helena, mida la longitud de cada pico en milímetros. El pico se mide desde el extremo superior de cada pozo hasta el vértice del cohete. Cada caja de placas contiene una regla de cohete de Helena.
23. Representar la actividad en porcentaje de la curva de referencia frente a la altura de cada cohete en el Impreso de informe del antígeno relacionado con el Factor VIII de Helena o en papel semilogarítmico de 2 ciclos. Dibujar la "línea de mejor ajuste" para los cuatro puntos. Ver las Figuras 1 y 2 en INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS para ver un ejemplo de placa de cohete terminada y una curva estándar trazada en papel semilogarítmico de 2 ciclos.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Leer los valores de control o del paciente desde la curva estándar y multiplicar cada uno de ellos por el factor de dilución apropiado. El uso de un estándar prediluido se tratará del mismo modo sin variación de los factores de dilución utilizados. La única diferencia será el valor de referencia final utilizado. Si se usa el S.A.R.P. de coagulación para preparar la curva estándar, el valor del paciente leído de la curva debe multiplicarse por el valor del antígeno del factor von Willebrand asignado o prediluido del lote adecuado de S.A.R.P. de coagulación así como el factor de dilución.

Valor del paciente de la curva = 30%

Valor asignado S.A.R.P. (de la hoja de valoración) = 95%

Factor de dilución = 2

Factor VIII real del paciente

Antígeno relacionado = $30\% \times 2 \times 0,95 = 57,0\%$

EIA ROCKET DE ANTÍGENO DEL FACTOR VON WILLEBRAND

Las muestras de paciente desconocido con niveles de antígeno del Factor von Willebrand superiores al intervalo de la curva estándar deben volver a estudiarse utilizando las diluciones apropiadas.

Figura 1: Patrones de cohete en una placa de cohete de antígeno del factor von Willebrand. Se usan las longitudes de los cohetes (en milímetros) de las diluciones del S.A.R.P. de coagulación (el estándar) para preparar la curva estándar. Los resultados del paciente se leen a partir de la curva. En esta ilustración, el paciente n° 3 no tiene formación de cohetes, lo que indica una deficiencia de antígeno del factor von Willebrand.

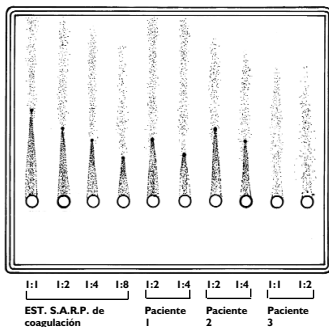
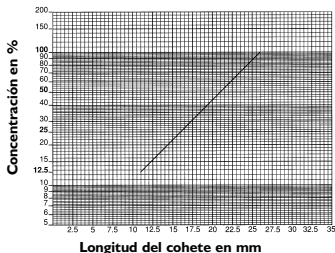


Figura 2: Curva estándar elaborada con S.A.R.P. de coagulación en papel semilogarítmico de 2 ciclos.



Las longitudes de los cohetes de los estándares son las siguientes:

Actividad 100% = 26 mm

Actividad 50% = 21 mm

Actividad 25% = 16 mm

Actividad 12,5% = 11 mm

A partir de la curva, un paciente con una longitud del cohete de 17 mm para una dilución 1:2 tendría una actividad del 30%. Véase el paso G.4. del procedimiento paso a paso para cálculos completos de los pacientes.

Los pacientes con von Willebrand grave a menudo no muestran precipitación detectable de cohetes por este método. Se ha comunicado que otros pacientes con enfermedad de von Willebrand tienen niveles normales de antígeno del factor von Willebrand⁶. El diagnóstico de síndrome de von Willebrand no debe realizarse de acuerdo sólo con esta prueba. La actividad coagulante del factor VIII, la agregación de ristocetina, los tiempos de sangrado de las plantillas y una historia y una exploración física cuidadosas son esenciales para un diagnóstico exacto de esta enfermedad. De acuerdo con los resultados de diversas pruebas, los pacientes con enfermedad de von Willebrand pueden clasificarse en varias categorías. Los pacientes con sospecha de enfermedad de von Willebrand deben estudiarse en varias ocasiones debido a que se ha observado gran variabilidad de los resultados de las pruebas. Hay fluctuaciones en los niveles de proteína detectable inmunológicamente, así como en la actividad funcional de la molécula del Factor VIII^{5,7,8}. Cada laboratorio debe establecer su propio intervalo de referencia para este procedimiento.

CONTROL DE CALIDAD

Cada laboratorio debe establecer un programa de control de calidad. Los controles normales y anormales deben estudiarse antes de cada lote de muestras del paciente, para asegurar un funcionamiento adecuado del instrumento y el operador. Si los controles no se realizan como se esperaba, los resultados del paciente deben considerarse inválidos.

Helena BioSciences suministra los siguientes controles disponibles para usar con este producto:

Nº Cat. 5301 SAC1

Nº Cat. 5302 SAC2

VALORES DE REFERENCIA

Los valores del antígeno del factor de von Willebrand se expresan generalmente como porcentajes relativos en comparación con plasma estándar o normal conservado. El intervalo normal esperado para el método de EIA Rocket de antígeno del factor von Willebrand de Helena es del 50% al 160%. Este intervalo se estableció realizando pruebas de un total de 50 individuos, 25 hombres y 25 mujeres. Las pruebas en donantes hombres frente a las pruebas en donantes mujeres no mostraron gran diferencia en los valores medios. Este intervalo normalmente se comparó favorablemente con los intervalos normales comunicados por Zimmerman⁴ y Johnson⁵.

CARACTERÍSTICAS FUNCIONALES

Helena BioSciences o sus representantes han determinado las siguientes características de rendimiento como directriz. Cada laboratorio debe establecer sus propios datos de rendimiento.

Estudios de precisión

Se determinó la precisión del Método de EIA Rocket de antígeno del factor von Willebrand de Helena reconstituyendo siete viales de S.A.R.P. de coagulación en ocho días diferentes y realizando la prueba por duplicado cada día. El S.A.R.P. se realizó sin dilución y en diluciones de 1:2, 1:4 y 1:8. El coeficiente de variación media fue del 7,8%.

Sensibilidad

Los límites de sensibilidad se ven definidos por los estándares de referencia de antígeno del factor von Willebrand (S.A.R.P.). Los valores del paciente superiores a los valores más altos de la curva estándar deben diluirse y volverse a estudiar. Los valores del paciente inferiores al valor más bajo de la curva deben notificarse como tales pero no se extrapolará ningún valor absoluto.

BIBLIOGRAFÍA

1. Laurell, C.B., Electroimmuno Assay, Scan J Clin Lab Invest, 29 Suppl 124:21-37, 1972.
2. Laurell, C.B., Quantitative Estimation of Proteins by Electrophoresis in Agarose Gel Containing Antibodies, Anal Biochem, 15:45-52, 1966.
3. Eyster, M.E. et al., Carrier Detection in Classic Hemophilia by Combined Measurement of Immunologic (VIII AGN) and Procoagulant (VIII AHF) Activities, AJCP, 65:975-981, 1976.
4. Zimmermann, T.S., et al., Determination of the von Willebrand Disease Antigen (Factor VIII-Related Antigen) in Plasma by Quantitative Immuno-electrophoresis. J Lab Clin Med 86:152-159, 1975.
5. Johnson, S.S. et al., Newborn Factor VIII Complex: Elevated Activities in Term Infants and Alterations in Electrophoretic Mobility Related to Illness and Activated Coagulation, Brit J Haem 47:597-606, 1981.
6. Peake, I.R., et al., Inherited Variants of Factor VIII-Related Protein in von Willebrand Disease, N Eng J Med 291:113, 1974.
7. Moehring, C., A Rapid Factor VIII-Related Antigen Electroimmunoassay, AJCP, 72:21-28, 1979.
8. Brown, J.E. et al., Effect of Exercise on the Factor VIII Complex: A Correlation of the von Willebrand Antigen and Factor VIII Coagulation Antigen Increase, Thromb Res 15:61-67, 1979.

Helena Biosciences Europe
Queensway South
Team Valley Trading Estate
Gateshead
Tyne and Wear
NE11 0SD

Tel: +44 (0) 191 482 8440
Fax: +44 (0) 191 482 8442
Email: info@helena-biosciences.com
www.helena-biosciences.com

HL-2-1415P 2007/05 (3)