

**DESCRIZIONE DEL PRODOTTO**

Il kit vW Factor Assay® è un sistema di reagenti e plasmi di controllo per la valutazione della Sindrome di von Willebrand.

**UTILIZZO PREVISTO**

Il kit vW Factor Assay® (Cofattore Ristocetina) è un sistema di reagenti e plasmi di controllo che provoca l'agglutinazione di piastrine liofilizzate in presenza di plasma povero di piastrine e ristocetina del paziente per la valutazione della Sindrome di von Willebrand.

**PRINCIPIO**

Il cofattore della ristocetina è l'attività in vitro del fattore di von Willebrand, responsabile dell'agglutinazione delle piastrine in presenza di ristocetina. 12-14 La diminuzione del fattore di von Willebrand è associata alla Sindrome di von Willebrand, rendendo così la quantificazione dell'attività del cofattore ristocetina molto preziosa nella diagnosi e nella valutazione di questa coagulopatia. 13-15 I livelli di attività del cofattore ristocetina sono determinati dalla capacità, di un plasma di prova e della ristocetina, di indurre l'agglutinazione di una sospensione piastrinica standardizzata. 16

**PRECAUZIONI**

Il vW Factor Assay è inteso SOLO PER USO PROFESSIONALE DI LABORATORIO, SOLO PER USO DIAGNOSTICO IN VITRO E NON DEVE ESSERE INIETTATO O INGERITO. Il plasma e le piastrine sono stati analizzati alla fonte e sono risultati negativi per HIV-1Ag, anti-HIV-1/2, antigene di superficie dell'epatite B, anticorpi dell'epatite C, T-tropico di tipo I e II (anti-HTLV I/II) e negativi al test sierologico per la sifilide. Tuttavia, tutto il plasma e le piastrine di origine umana devono essere trattati come potenzialmente pericolosi.

**NOTA PER L'UTENTE:** Qualsiasi incidente grave che si dovesse verificare in relazione a questo dispositivo deve essere segnalato al fabbricante e all'autorità competente dello Stato Membro in cui risiede l'utilizzatore e/o il paziente.

**MATERIALE FORNITO**

1. Piastrine liofilizzate, 4.0mL. Conservare a 2° - 8° C prima della ricostituzione.
2. Reagente Ristocetina, 0.5mL. Conservare a 2° - 8° C prima della ricostituzione.
3. Plasma normale di Riferimento (Fattore di von Willebrand), 0,5 mL standardizzati al 90-110% di attività del fattore di von Willebrand con un materiale di riferimento tracciabile dell'Organizzazione Mondiale della Sanità. Conservare a 2° - 8° C prima della ricostituzione.
4. Plasma di controllo anormale (Deficit del fattore di von Willebrand), 0,5mL. Conservare a 2° - 8° C prima della ricostituzione.
5. Soluzione Fisiologica, pH 7.5, 10.0mL. Conservare a 2° - 8° C.
6. Carta millimetrata, log-log a 2 cicli.

**Nota:** Per il kit da 10 test, viene fornita 1 fiala di ciascun prodotto sopra elencato; per il kit da 20 test, vengono fornite 2 fiale di ciascun prodotto sopra elencato. Per volumi di test maggiori, i reagenti di 2 o più kit (stesso numero di lotto) possono essere messi in comune. La curva standard deve essere derivata dal pool di reagenti. I componenti supplementari del test sono disponibili anche singolarmente. (Fare riferimento a DISPONIBILITA' DEL PRODOTTO)

**MATERIALE NECESSARIO MA NON FORNITO**

1. Aggregometro piastrinico
2. Acqua purificata (distillata, deionizzata o di grado reagente), pH 5.3 - 7.2
3. Pipettatori (volumi da 4.0mL, 1.0mL, 0.5mL, 0.45mL, 0.05mL)
4. Barre di Agitazione Monouso
5. Provette per Aggregometro
6. Rocker (Dispositivo Meccanico di Rotazione)

**STRUMENTAZIONE**

Il vW Factor Assay funziona come descritto quando viene utilizzato sulla maggior parte degli aggregati piastrinici ottici. 1 Seguire le istruzioni del produttore per il funzionamento dell'aggregometro in uso.

**PRELIEVO DEI CAMPIONI E PREPARAZIONE DEL TEST**

Per le istruzioni dettagliate sulla raccolta dei campioni e sulla loro preparazione, consultare le attuali Linee Guida H18 A2 approvate dall'NCCLS.6

**1. PREPARAZIONE DEL PAZIENTE**

I pazienti devono astenersi dall'assunzione di aspirina o di altri medicinali contenenti aspirina, nonché di preparati o integratori alimentari che hanno effetti sulla funzionalità piastrinica durante i 7 - 10 giorni che precedono la raccolta del campione. I pazienti devono essere a digiuno ed essersi astenuti dall'assunzione di cibi grassi e latticini durante le 12 ore precedenti la raccolta del campione.6

**2. PRELIEVO DEL CAMPIONE:**

Il prelievo di sangue deve essere eseguito con attenzione per evitare stasi, emolisi, contaminazione da fluidi tissutali o esposizione al vetro. Conservare i campioni a temperatura ambiente. 8

Ciascuno dei seguenti elementi può causare l'imprecisione dei risultati del test; e i campioni interessati devono essere scartati: emolisi, contaminazione dei globuli rossi, lipemia, chilos, ittero, trombocitopenia (<75.000/mm3), coaguli nel campione e ipofibrinogenemia. Il riutilizzo di materiale monouso può determinare inaccuratezza dei risultati d'analisi.

Osservare le precauzioni standard durante i processi di raccolta, preparazione e analisi dei campioni. 2,3 Smaltire gli oggetti taglienti e i rifiuti biologici in conformità alle regole di laboratorio.

**NOTA:** Quando l'ematocrito del paziente è <30% o >55%, è necessario regolare i volumi di sangue e di anticoagulanti.4

**Tecnica della Provetta Evacuata**

1. Utilizzare un ago a farfalla per la venopuntura
2. Prelevare il sangue utilizzando provette (di plastica) contenenti Citrato di Sodio 0,11 M come anticoagulante
3. Capovolgere delicatamente 4-5 volte per mescolare il contenuto.

**NOTA:** quando si utilizzano provette per il prelievo sottovuoto, controllare l'etichetta per accertarsi che la concentrazione del citrato anticoagulante sia 0.11.M. I tappi colorati della provette infatti non variano al variare delle concentrazioni di citrato. Seguire le istruzioni della ditta produttrice per la raccolta del campione.

**PREPARAZIONE DEL PLASMA POVERO DI PIASTRINE**

1. Centrifugare il sangue a 2500 x g per 20 minuti.
2. Rimuovere il plasma dalle cellule, facendo attenzione a non disturbare il "buffy coat". Il plasma deve essere privo di globuli rossi e piastrine.
3. Se il test viene ritardato, refrigerare il plasma a 2° - 8° C per un massimo di 2 ore.

**RICOSTITUZIONE**

**NOTA:** I reagenti devono essere a temperatura ambiente (15° - 28°C) prima della ricostituzione. Il reagente conservato deve essere portato a temperatura ambiente prima dell'uso.

1. Risospensione delle Piastrine Liofilizzate: Ad una fiala di piastrine liofilizzate, aggiungere 4,0 mL della Soluzione Fisiologica fornita, e lasciare riposare per almeno 30 minuti. Le piastrine ricostituite sono stabili per 30 giorni se conservate a 2°-8°C. Dopo la refrigerazione e prima dell'uso è inoltre necessario mescolare meccanicamente per almeno 30 minuti a temperatura ambiente, per consentire al reagente di equilibrarsi e di degassificare.
2. Reagente Ristocetina: Ricostituire con 0,5 mL di acqua purificata per una concentrazione di lavoro di 10 mg/mL. Invertire delicatamente per mescolare e lasciare reidratate per 30 minuti a temperatura ambiente. La Ristocetina ricostituita è stabile per 7 giorni se conservata nel contenitore originale chiuso a 2° - 8°C.
3. Plasma Normale di Riferimento: Ricostituire con 0,5 mL di acqua purificata. Lasciare riposare per 20 minuti a temperatura ambiente. Invertire per mescolare. Il plasma ricostituito è stabile per 8 ore se conservato nel contenitore originale chiuso a 2°-8°C. Quando viene diluito, la stabilità del plasma di riferimento è di 45 minuti a temperatura ambiente.
4. Plasma di Controllo Anormale: Ricostituire con 0,5 mL di acqua purificata. Lasciare riposare per 20 minuti a temperatura ambiente. Invertire per mescolare. Il plasma ricostituito è stabile per 8 ore se conservato nel contenitore originale, chiuso, a 2°-8°C. Se diluito, la stabilità del plasma di controllo è di 45 minuti a temperatura ambiente.

**PROCEDURA DEL TEST**

È ESSENZIALE CHE VENGA PREPARATA UNA CURVA STANDARD PER OGNI SERIE DI ANALISI.

- A. Preparazioni delle Diluzioni del Plasma Normale di Riferimento e del Plasma di Prova
  1. Preparare le Diluzioni del Plasma Normale di Riferimento per la curva standard come segue:
    - Etichettare 3 Provette: 100%, 50%, e 25%.
    - Pipettare 0.2mL di Soluzione Fisiologica in ogni provetta.
    - Pipettare 0.2mL di Plasma Normale di Riferimento nella provetta con l'etichetta 100%. Mescolare accuratamente.
    - Trasferire 0.2 mL dalla provetta etichettata 100% alla provetta etichettata 50%. Mescolare accuratamente.
    - Trasferire 0.2 mL dalla provetta etichettata 50% alla provetta etichettata 25%. Mescolare accuratamente.
  2. Preparare la Diluzione del Plasma di Prova come segue:
    - Etichettare una provetta (per identificazione del campione) per ogni plasma da analizzare.
    - Preparare una diluizione 1:2 di ciascun plasma da analizzare pipettando 0.1 mL di Soluzione Fisiologica e 0.1 mL di plasma da analizzare nella provetta. Mescolare accuratamente.
- B. Preparazione del valore di riferimento dell'Aggregometro: Pipettare 0.25 ml di piastrine ricostituite e 0.25 ml di Soluzione Fisiologica in una provetta dell'aggregometro e mescolare accuratamente. Questa prova deve essere utilizzata per impostare le linee di base del 100% per ogni diluizione durante il test. Miscelare ogni volta prima di impostare il valore di riferimento.
- C. Esecuzione del Test:
  1. Pipettare 0.4 ml di piastrine ricostituite in una provetta dell'aggregometro.
  2. Aggiungere 0,05 mL di Ristocetina nella provetta, facendo attenzione a non introdurre bolle d'aria.
  3. Aggiungere una nuova barra di agitazione assicurandosi che questa sia sul suo lato. Fare attenzione a non far cadere gocce sul lato della provetta.
  4. Incubare la provetta a 37°C per un minuto senza agitare.
  5. Impostare il valore di riferimento secondo le istruzioni del produttore dell'aggregometro in uso.
  6. Posizionare la provetta nel pozzetto di test e lasciare che l'incubazione continui per altri 2 minuti, agitando.
  7. Avviare il canale e aggiungere 0.05 mL della diluizione al 100% del plasma normale di riferimento. Non lasciare che la diluizione del plasma scorra lungo il lato della provetta. Inoltre, prestare attenzione a non far colare la sospensione piastrinica con la tecnica del pipettaggio.
  8. Osservare l'agglutinazione sul registratore grafico fino al completamento della reazione. (Non si osserva un ulteriore aumento della trasmissione della luce in condizioni ottimali.)
  9. Per le diluizioni al 50% e al 25% del Plasma Normale di Riferimento, ripetere i passaggi 1-8, sostituendo ciascuna di queste diluizioni con la diluizione al 100% di Plasma Normale di Riferimento di cui al precedente passaggio 7.
  10. Per la diluizione del plasma di prova, ripetere i passaggi 1-8, sostituendo il plasma di prova con la diluizione al 100% del Plasma Normale di Riferimento di cui al precedente passaggio 7.

**CONTROLLO DI QUALITÀ**

Un plasma carente di fattore di von Willebrand è catalogato come controllo anormale e deve essere considerato come un plasma di prova con un risultato atteso di ≤ 45% di attività. Questo controllo assicura che il sistema di analisi sia specifico per il fattore di von Willebrand e che l'agglutinazione non sia influenzata da altre proteine plasmatiche normali. Inoltre, si suggerisce di eseguire controlli sul Plasma di Riferimento Normale e Anormale per convalidare le curve standard. (Consultare Disponibilità del Prodotto.)

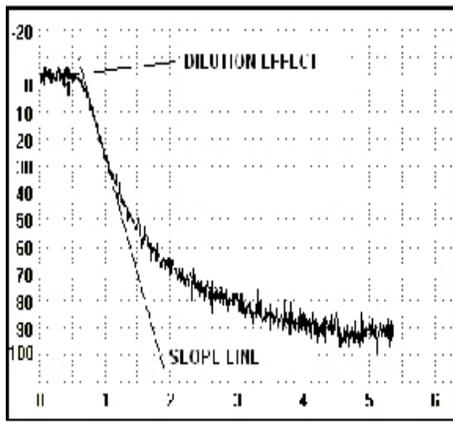


FIGURA 1  
Tracciare una linea di pendenza lungo la porzione lineare più ripida della curva di agglutinazione.

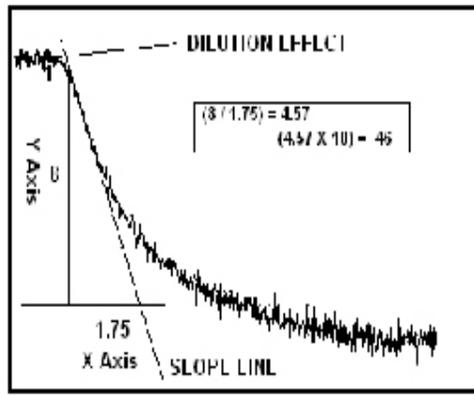


FIGURA 2  
Selezionare due punti sulla linea. Misurare l'asse Y (verticale) e l'asse X (orizzontale) (vedere Figura 1). Calcolare la pendenza dividendo l'asse Y per l'asse X. Moltiplicare la somma per 10 e arrotondare al numero intero più vicino.

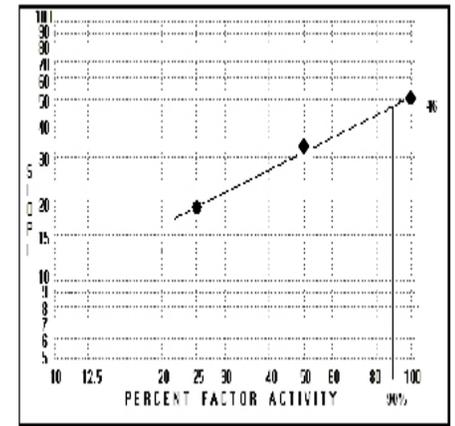


FIGURA 3  
TEST DELL'ATTIVITA' PLASMATICA  
Valore della Pendenza = 46  
Attività di von Willebrand = 90%

## RISULTATI

### A. Determinazione del valore di pendenza:

1. Tracciare una linea lungo la porzione lineare più ripida di ogni curva di agglutinazione (vedi Fig. 1). Questo è il punto in cui la velocità di reazione è massima e si verifica subito dopo l'inizio dell'agglutinazione. Inoltre, c'è una fase di latenza (tempo di ritardo) dall'aggiunta della diluizione di plasma all'inizio dell'agglutinazione. Questa fase di latenza aumenta con la diminuzione della pendenza e dell'estensione dell'agglutinazione ed è utile per differenziare l'agglutinazione effettiva dalle variazioni artefatte della densità ottica.
2. Selezionare due punti sulla linea. Misurare l'asse Y (verticale) e l'asse X (orizzontale) (vedere Figura 1).
3. Calcolare la pendenza dividendo l'asse Y per l'asse X. Moltiplicare la somma per 10 e arrotondare al numero intero più vicino.

$$\text{PENDEZA} = (Y/X) \times 10$$

esempio (vedi Figura 2):  $(8/1.75) = 4.57$   
 $4.57 \times 10 = 45.7$   
 45.7 arrotondato = 46

### B. Preparazione della Curva Standard (Vedi Figura 3):

1. Utilizzando la carta millimetrata in dotazione, tracciare sull'asse orizzontale l'attività percentuale del fattore di von Willebrand per le diluizioni al 100%, al 50% e al 25% del Plasma Normale di Riferimento rispetto al corrispondente valore di pendenza sull'asse verticale.
2. Disegnare una linea che meglio si adatti attraverso questi punti.

### C. Determinazione dell'attività del fattore di von Willebrand del Plasma di Prova o del Plasma di Controllo Anormale:

1. Tracciare il valore della pendenza del plasma in esame sull'asse verticale della curva standard
2. Leggere il corrispondente livello percentuale di attività del fattore di von Willebrand sull'asse orizzontale

### D. Valori al di fuori dell'Intervallo della Curva Standard:

1. Valori superiori al 100% di attività del fattore possono essere verificati preparando una diluizione 1:4 del plasma in esame (3 parti di Soluzione Fisiologica, 1 parte di plasma in esame), ripetendo la procedura di analisi e moltiplicando i risultati del test per due (2).
2. I valori inferiori al 25% di attività del fattore possono essere testati ripetendo la procedura di analisi sul plasma non diluito e dividendo i risultati del test per 2.

## VALORI ATTESI

Un risultato inferiore al 40% del fattore di von Willebrand è considerato anormale e suggestivo della sindrome di von Willebrand. Tuttavia, altre proprietà della molecola di von Willebrand devono essere considerate per la diagnosi delle forme varianti della sindrome di von Willebrand. Poiché gli intervalli di riferimento per il fattore di von Willebrand dipendono dal gruppo sanguigno, ogni laboratorio deve stabilire intervalli di riferimento specifici per il proprio gruppo di pazienti. 17

Il Plasma di Controllo Anormale restituirà risultati del dosaggio del fattore di von Willebrand  $\leq 45\%$ . La capacità di generare un valore quantitativo in questo intervallo dipende dalla sensibilità del sistema di analisi in uso.

## LIMITAZIONI

La quantificazione del fattore di von Willebrand è considerata da alcuni il singolo test più importante per la diagnosi della sindrome di von Willebrand. Tuttavia, la diagnosi delle forme varianti di questa coagulopatia richiede una serie di valutazioni cliniche e di laboratorio, tra cui l'anamnesi del paziente e della famiglia, il tempo di sanguinamento, l'antigene correlato al fattore VIII, l'attività coagulante del fattore VIII<sub>3,4,9,10</sub> e studi multimetrici<sub>9,10</sub>. Per confermare la diagnosi possono essere necessari test seriali.

## PERFORMANCE

I componenti del vW Factor Assay sono stati testati sul plasma di pazienti con sindrome di von Willebrand diagnosticata e di pazienti normali. Gli studi hanno dimostrato che l'accuratezza e la sensibilità di questi componenti erano tali da rilevare livelli variabili di fattore di von Willebrand.

## BIBLIOGRAFIA

1. Born, GVR and Cross, MJ. The Aggregation of Blood Platelets. J. Physiol (London) 168:178, 1963.
2. Centers for Disease Control and Prevention. Guidelines for Isolation Precautions in Hospitals. Centers for Disease Control and Prevention. 1996; Vol 17; 1:53 - 80.
3. National Committee for Clinical Laboratory Standards. NCCLS: Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections: Approved Guideline. NCCLS document M29. Wayne, PA.
4. McCabe-White, M and Jennings, LK. Platelet protocols: Research and Clinical laboratory Procedure. Academic Press. London. 1999, p 35.
5. Newhouse, P and Clark, C. The Variability of Platelet Aggregation., in Triplett, DA, ed. Platelet Function: Laboratory Evaluation and Clinical Application. ASCP. Chicago. 1978. p 69.
6. National Committee for Clinical Laboratory Standards. NCCLS Collection, Transport and Processing of Blood Specimens Approved Guideline- Second Edition. NCCLS Document H 18-A2. Wayne, PA.
7. Weiss HJ: Aspirin and platelets in drugs and hematologic reactions. Dimitov and Nodine (eds.). Grune and Stratton, New York, 1974.
8. Triplett DA, Harms CS, Newhouse P, Clark C: Platelet Function. Laboratory Evaluation and Clinical Application. ASCP, 1978.
9. Day HJ, Holmsen H: Laboratory tests of platelet function. Ann Clin Lab Sci, 2:63, 1972.
10. Owen CA, Bowie EJW, Thompson JH: The diagnosis of bleeding disorder. Little, Brown and Co., 1975.
11. William WJ, Beutler, E, Erslev AJ, Rundles RW: Hematology. McGraw-Hill, 1977.
12. Brinkhous KM, Graham JE, Cooper HA, Allain JP, Wagner RH: Assay of von Willebrand Factor in von Willebrand Disease and Hemophilia. Use of a Macroscopic Platelet Aggregation Test. Thromb Res 6:267, 1975.
13. Olson JD, Brockway WJ, Fass DN, Magnuson MA, Bowie EJW: Evaluation of Ristocetin - von Willebrand Factor Assay and Ristocetin-Induced Platelet Aggregation. Am J Clin Path 63:210, 1975.
14. Miller CH, Graham JB, Goldin LR, Elston RC: Genetics of Classic vonWillebrand's Disease, I. Phenotypic Variation within Families. Blood 54:117, 1979.
15. Nelson IM, Holmberg L: von Willebrand's Disease Today. Clinics in Hematology Vol.8 No. 1, 1979.
16. Brinkhous KM, Read MS: Preservation of Platelet Receptors for Platelet Aggregating Factor by Air Drying, Freezing, or Lyophilization: New Stable Platelet Preparations for von Willebrand Factor Assays. Thromb Res 13:591, 1978.
17. Clinical Laboratory Standards Institute: Assays of von Willebrand Factor Antigen and Ristocetin Cofactor Activity: Approval Guideline (H57 A) 2002.

Per un elenco completo dei prodotti disponibili, visitate il nostro sito web [www.biodatacorp.com](http://www.biodatacorp.com) o contattate il servizio clienti qui di seguito.

LA LINEA DI PRODOTTI DI BIO/DATA CORPORATION COMPRENDE REAGENTI PER USO GENERALE E PROFESSIONALE IN LABORATORIO, DESTINATI A INDURRE E SEGNALARE L'ATTIVITÀ E LE RISPOSTE DELLA FUNZIONE PIATRINICA. QUESTO PRODOTTO È GARANTITO PER LE PRESTAZIONI DESCRITTE NELL'ETICHETTATURA, COMPRESO LE ISTRUZIONI PER L'USO. BIO/DATA CORPORATION NON RILASCIATA ALCUNA DICHIARAZIONE O GARANZIA, ESPRESSA O IMPLICITA, CIRCA LA CAPACITÀ, L'IDONEITÀ O LA COMPARABILITÀ PER QUALSIASI ALTRO SCOPO. IN NESSUN CASO BIO/DATA CORPORATION SARÀ RESPONSABILE DI EVENTUALI DANNI CONSEGUENTI DERIVANTI DALLA SUDETTA GARANZIA ESPRESSA.



**BIO/DATA CORPORATION**

155 Gibraltar Road, Horsham, PA 19044 U.S.A.  
 (800) 257-3282 U.S.A.  
 (215) 441-4000 Internazionale  
 (215) 443-8820 Fax Internazionale  
 E-mail: [customer.service@biodatacorp.com](mailto:customer.service@biodatacorp.com)  
 Internet: [www.biodatacorp.com](http://www.biodatacorp.com)

Azienda Registrata ISO 13485



Alpha Laboratories Ltd, 40 Parham Drive, Eastleigh, Hampshire, SO50 4NU United Kingdom



mdi Europa GmbH, Langenhagener Str. 71, 30855 Langenhagen, GERMANY

