

DESCRIPCIÓN DEL PRODUCTO

El vW Factor Assay® es un sistema de reactivos y plasmas de control para la evaluación del síndrome de von Willebrand.

USO PREVISTO

El ensayo del factor vW es para la determinación cuantitativa específica de la actividad del cofactor ristocetina en plasma.

PRINCIPIO

El cofactor ristocetina es la actividad in vitro del factor von Willebrand que es responsable de la aglutinación de las plaquetas en presencia de ristocetina.¹²⁻¹⁴ La disminución del factor von Willebrand se asocia con el síndrome de von Willebrand, lo que hace que la determinación cuantitativa de la actividad del cofactor ristocetina sea valiosa en el diagnóstico y en la evaluación de esta coagulopatía.¹³⁻¹⁵ Los niveles de actividad del cofactor ristocetina se determinan por la capacidad del plasma a analizar y de la ristocetina para inducir la aglutinación de una suspensión de plaquetas estandarizada.¹⁶

PRECAUCIONES

El ensayo del factor vW es para **DIAGNÓSTICO IN-VITRO EXCLUSIVAMENTE Y NO PARA INYECCIÓN O INGESTIÓN**. Se ha analizado el plasma y las plaquetas del medio fuente y se ha encontrado que son negativos para la presencia de antígeno del VIH-1, anticuerpos anti VIH 1/2, antígeno de superficie del virus de la hepatitis B, anticuerpos contra el virus de la hepatitis C, virus linfotrófico de células T humano, tipos I y II (anti-HTLV I/II) y negativos para sífilis mediante un análisis serológico.

Sin embargo, todos los plasmas y plaquetas de origen humano deben manipularse como si fueran potencialmente peligrosos.

MATERIALES SUMINISTRADOS

1. Plaquetas liofilizadas, 4,0 ml. Guarde a 2-8 °C antes de su reconstitución.
2. Reactivo de ristocetina, 0,5 ml. Guarde a 2-8 °C antes de su reconstitución.
3. Plasma normal de referencia (factor von Willebrand), 0,5 ml estandarizado para una actividad del factor von Willebrand del 90-110% con un material de referencia trazable de la Organización Mundial de la Salud. Guarde a 2-8 °C antes de su reconstitución.
4. Plasma anómalo de control (deficiente en factor von Willebrand), 0,5 ml. Guarde a 2-8 °C antes de su reconstitución.
5. Solución salina tamponada con Tris, pH 7,5; 10,0 ml. Guarde a 2-8 °C.
6. Papel gráfico, logarítmico de 2 ciclos.

NOTA: En el kit de 10 ensayos, se suministra 1 vial de cada producto indicado; en el kit de 20 ensayos, se suministran 2 viales de cada reactivo. Para volúmenes de análisis más grandes, pueden agruparse los reactivos de 2 o más kits (mismo número de lote). La curva estándar debe sacarse a partir de los reactivos agrupados. También se dispone de componentes complementarios individuales para el ensayo. (Consulte "DISPONIBILIDAD DEL PRODUCTO")

MATERIALES NECESARIOS NO SUMINISTRADOS

1. Agregómetro de plaquetas
2. Agua purificada (destilada, desionizada o de grado reactivo), pH 5,3-7,2
3. Pipeteadores (volumen de 4,0 ml; 1,0 ml; 0,5 ml; 0,45 ml y 0,05 ml)
4. Barras agitadoras desechables
5. Cubetas para el agregómetro
6. Agitador (dispositivo de rotación mecánica)

INSTRUMENTACIÓN

El ensayo del factor vW funcionará según se ha descrito cuando se utilice en la mayoría de los agregómetros ópticos de plaquetas.¹ Siga las instrucciones de funcionamiento del fabricante del agregómetro en uso.

RECOGIDA DE MUESTRAS Y PREPARACIÓN DE LA MUESTRA A ANALIZAR

Consulte la normativa aprobada actual H18 A2 del NCCLS para obtener instrucciones detalladas sobre la recogida y preparación de las muestras.⁶

1. PREPARACIÓN DEL PACIENTE:

Los pacientes deben abstenerse de tomar aspirina o medicamentos que contengan aspirina, otros medicamentos y complementos alimenticios conocidos por afectar la función plaquetaria durante 7-10 días antes de la recogida de muestras. Los pacientes deben ayunar y evitar los alimentos grasos y los productos lácteos durante 12 horas antes de la recogida de muestras.⁶

2. RECOGIDA DE MUESTRAS:

La recogida de sangre debe realizarse con cuidado para evitar situaciones de estasis, hemólisis, contaminación por fluidos tisulares o la exposición al vidrio. Mantenga las muestras a temperatura ambiente.⁸

Los siguientes factores pueden producir resultados incorrectos en la prueba; deben rechazarse las muestras afectadas: hemólisis, contaminación con eritrocitos, lipemia, quilo, ictericia, trombocitopenia (<75.000/mm³), coágulos en la muestra e hipofibrinogenemia. La reutilización de artículos desechables puede producir resultados no correctos en la prueba.

Siga las precauciones estándares durante los procesos de recogida, preparación y análisis de las muestras.^{2,3} Deseche los residuos biológicos y artículos afilados siguiendo las normas del laboratorio.

NOTA: Cuando el hematocrito del paciente es < 30% o > 55%, los volúmenes de sangre: anticoagulante deben ajustarse.⁴

Técnica con tubo evacuado para recogida de muestras

1. Utilice una aguja con aletas para la venipunción.
2. Extraiga la sangre utilizando tubos (de plástico) con anticoagulante citrato sódico 0,11 M.
3. Invierta suavemente el tubo 4-5 veces para mezclar.

NOTA: Cuando se utilicen tubos de plástico para recogida de muestras por vacío, compruebe la etiqueta para verificar que la concentración del anticoagulante citrato es 0,11 M. Las tapas coloreadas no varían con concentraciones diferentes de citrato. Siga las instrucciones del fabricante para la recogida de muestras.

PREPARACIÓN DEL PLASMA POBRE EN PLAQUETAS (PPP)

1. Centrifuge la sangre a 2500 x g por 20 minutos.
2. Separe el plasma de los glóbulos rojos y plaquetas, sin molestar la capa suave. La plasma debe estar libre de glóbulos rojos y plaquetas.
3. Si el examen tiene que ser puesto en espera refrigere el plasma a 2°-8°C por un máximo de 2 horas.

RECONSTITUCIÓN

NOTA: Los reactivos deben estar a temperatura ambiente (15-28 °C) antes de su reconstitución. Los reactivos almacenados deben equilibrarse a temperatura ambiente antes de usarlos.

1. Resuspensión de plaquetas liofilizadas: A un vial de plaquetas liofilizadas, añada 4,0 ml de la solución salina tamponada con Tris suministrada, agite durante al menos 30 minutos. Las plaquetas reconstituidas son estables durante 60 días cuando se almacenan a 2-8 °C. Tras la refrigeración y antes de usar, también es necesario mezclarlas mecánicamente durante al menos 30 minutos a temperatura ambiente para permitir que el reactivo se equilibre y se desgasifique.
2. Reactivo de ristocetina: Reconstituya con 0,5 ml de agua purificada para obtener una concentración de trabajo de 10 mg/ml. Invierta suavemente para mezclar y deje que se rehidrate durante 30 minutos a temperatura ambiente. La ristocetina reconstituida es estable durante 7 días cuando se almacena en su envase original cerrado a 2-8 °C.
3. Plasma normal de referencia: Reconstituya con 0,5 ml de agua purificada. Deje reposar durante 20 minutos a temperatura ambiente. Invierta suavemente para mezclar. El plasma reconstituido es estable durante 8 horas cuando se almacena en su envase original cerrado a 2-8 °C. Cuando se diluye, la estabilidad del plasma de referencia es 45 minutos a temperatura ambiente.
4. Plasma anómalo de control: Reconstituya con 0,5 ml de agua purificada. Deje reposar durante 20 minutos a temperatura ambiente. Invierta suavemente para mezclar. El plasma reconstituido es estable durante 8 horas cuando se almacena en su envase original cerrado a 2-8 °C. Cuando se diluye, la estabilidad del plasma de control es 45 minutos a temperatura ambiente.

PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA

ES ESENCIAL QUE SE PREPARE UNA CURVA ESTÁNDAR CON CADA SERIE DE ENSAYOS.

A. Preparación de las diluciones del plasma a analizar y del plasma normal de referencia

1. Prepare diluciones del plasma normal de referencia para la curva estándar de la siguiente manera:
 - a. Marque 3 tubos: 100%, 50% y 25%.
 - b. Pipetee 0,2 ml de solución salina tamponada con Tris en cada tubo.
 - c. Pipetee 0,2 ml de plasma normal de referencia en el tubo con la etiqueta "100%". Mezcle bien.
 - d. Transfiera 0,2 ml del tubo con la etiqueta "100%" al tubo con la etiqueta "50%". Mezcle bien.
 - e. Transfiera 0,2 ml del tubo con la etiqueta "50%" al tubo con la etiqueta "25%". Mezcle bien.
2. Prepare la dilución del plasma a analizar de la siguiente manera:
 - a. Etiquete un tubo (identificación de la muestra) para cada plasma que se vaya a analizar.
 - b. Prepare una dilución 1:2 de cada plasma a analizar pipeteando 0,1 ml de solución salina tamponada con Tris y 0,1 ml de plasma a analizar en el tubo. Mezcle bien.

- B. Preparación del blanco para el agregómetro: Pipetee 0,25 ml de plaquetas reconstituidas y 0,25 ml de solución salina tamponada con Tris en una cubeta del agregómetro y mezcle bien. Este blanco se utilizará para establecer los valores de referencia del 100% para cada dilución durante todo el ensayo. Mezcle antes de ajustar el blanco cada vez.

C. Realización del ensayo:

1. Pipetee 0,4 ml de plaquetas reconstituidas en una cubeta del agregómetro.
2. Añada 0,05 ml de ristocetina en la cubeta, teniendo cuidado para evitar introducir burbujas de aire.
3. Añada una barra agitadora nueva asegurándose que la barra agitadora está a un lado. Tenga cuidado para que no gotee por la pared de la cubeta.
4. Incube la cubeta a 37 °C durante un minuto sin agitar.
5. Ajuste el blanco siguiendo las instrucciones del fabricante del agregómetro en uso.
6. Coloque la cubeta en el pocillo de análisis y continúe la incubación durante 2 minutos más mientras agita.
7. Inicie el canal y añada 0,05 ml de la dilución "100%" del plasma normal de referencia. No deje que la dilución de plasma chorree por la pared de la cubeta. También, tenga cuidado para no perturbar la suspensión de plaquetas con la técnica de pipeteo.
8. Observe la aglutinación en el registrador sobre cinta de papel hasta que la reacción haya terminado. (No se observa un aumento mayor de la transmisión de la luz).
9. Repita los pasos 1-8 para las diluciones "50%" y "25%" del plasma normal de referencia, sustituyendo cada una de estas diluciones por la dilución "100%" del plasma normal de referencia en el paso 7 anterior.
10. Repita los pasos 1-8 para la dilución del plasma a analizar, sustituyendo el plasma a analizar con la dilución "100%" del plasma normal de referencia en el paso 7.

CONTROL DE CALIDAD

Un plasma deficiente en factor von Willebrand se incluye como control anómalo y debe ensayarse como un plasma a analizar con un resultado de actividad previsto ≤ 45%. Este control garantiza que el sistema de ensayo es específico del factor von Willebrand y que la aglutinación no se verá influenciada por otras proteínas plasmáticas normales. Además, se sugiere que se ejecuten controles de los plasmas de referencia normal y anómalo ensayados para validar las curvas estándar. (Véase "Disponibilidad del producto").

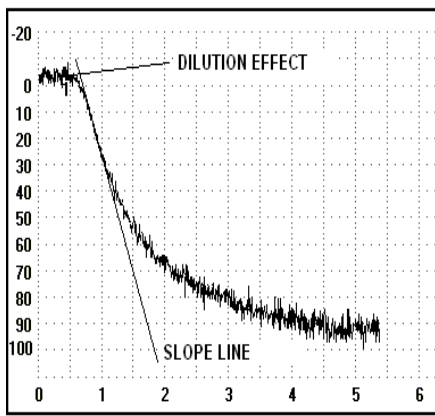


FIGURE 1
Draw a slope line along the steepest linear portion of the agglutination curve.

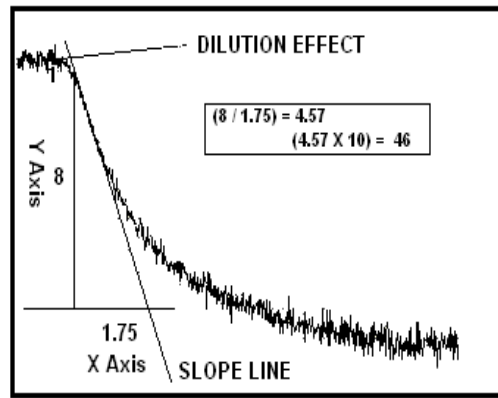


FIGURE 2
Select two points on the line. Measure the Y (vertical) axis and the X (horizontal) axis (see Figure 1). Calculate the Slope by dividing the Y axis by the X axis. Multiplying the sum by 10 then round off to the closest whole number.

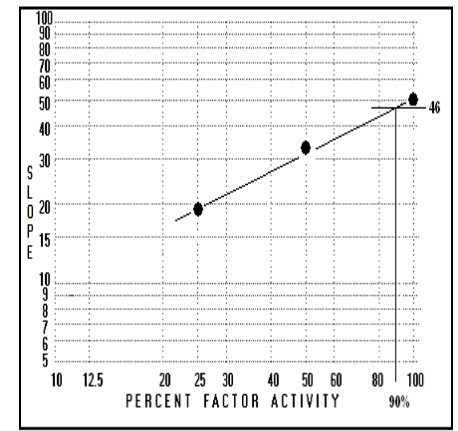


FIGURE 3
TEST PLASMA ACTIVITY
Slope Value = 46
von Willebrand Activity = 90%

RESULTADOS

A. Determine el valor de la pendiente:

- Trace una línea a lo largo de la porción lineal más inclinada de cada curva de aglutinación (véase fig. 1). Aquí es donde se encuentra la velocidad de reacción más alta y se produce inmediatamente después del inicio de la aglutinación. Además, hay una fase de retardo (tiempo de retraso) desde la adición de la dilución de plasma al inicio de la aglutinación. La fase de retardo aumenta a medida que la pendiente y el grado de aglutinación disminuyen y es útil para diferenciar la aglutinación real de los cambios producidos por artefactos en la densidad óptica.
- Selección dos puntos en la línea. Mida el eje Y (vertical) y el eje X (horizontal) (véase figura 1).
- Calcule la pendiente dividiendo el eje Y por el eje X, multiplicando la suma por 10, a continuación redondee hasta el número entero más cercano.

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

ejemplo (véase figura 2).

$$(8/1,75) = 4,57$$

$$4,57 \times 10 = 45,7$$

$$45,7 \text{ redondeado} = 46$$

B. Preparación de la curva estándar² (véase figura 3):

- Utilice el papel de gráficos suministrado para representar el porcentaje de actividad del factor von Willebrand para las diluciones 100%, 50% y 25% del plasma normal de referencia en el eje horizontal frente a su valor de pendiente correspondiente en el eje vertical.
- Traza la línea que "mejor se ajuste" a estos puntos.

C. Determinación de la actividad del factor von Willebrand del plasma a analizar o del plasma anómalo de control:

- Represente el valor de la pendiente del plasma a analizar en el eje vertical de la curva estándar.
- Lea el porcentaje correspondiente del nivel de actividad del factor von Willebrand en el eje horizontal.

D. Valores que están fuera del límite de la curva estándar:

- Los valores de actividad del factor superiores al 100% pueden verificarse preparando una dilución 1:4 del plasma a analizar (3 partes de solución salina tamponada con Tris, 1 parte de plasma a analizar), repitiendo el procedimiento del ensayo y multiplicando los resultados de la prueba por dos (2).
- Los valores de la actividad del factor inferiores al 25% pueden analizarse repitiendo el procedimiento de ensayo en plasma a analizar sin diluir y dividiendo los resultados de la prueba por 2.

VALORES PREVISTOS

Un resultado del factor von Willebrand inferior al 40% se considera anómalo y hace pensar en el síndrome de von Willebrand.⁷ Sin embargo, deben considerarse otras propiedades de la molécula del factor von Willebrand en el diagnóstico de las variantes del síndrome de von Willebrand. Puesto que los valores de referencia del factor von Willebrand dependen del tipo sanguíneo, cada laboratorio debe establecer los valores de referencia específicos del tipo sanguíneo para su población de pacientes.¹⁷

El plasma anómalo de control arrojará resultados en el ensayo del factor von Willebrand $\leq 45\%$. La capacidad para generar un valor cuantitativo en este intervalo depende de la sensibilidad del sistema de análisis en uso.

LIMITACIONES

La determinación cuantitativa de factor von Willebrand es considerada por algunas personas como el ensayo más importante para el diagnóstico del síndrome de von Willebrand. Sin embargo, el diagnóstico de las variantes de esta coagulopatía necesita una serie de evaluaciones clínicas y de laboratorio, incluyendo el historial del paciente y de su familia, tiempo de hemorragia, antígeno relacionado con el factor VIII y actividad coagulante del factor VIII^{3,4,9,10} y estudios multiméricos.^{9,10} Puede que se necesiten ensayos seriados para confirmar el diagnóstico.

CARACTERÍSTICAS DE EFICACIA

Los componentes del ensayo del factor vW se analizaron con plasmas de pacientes diagnosticados con síndrome de von Willebrand así como con plasmas de pacientes normales. Los estudios han demostrado que la exactitud y la sensibilidad de estos componentes es tal que se detectaron concentraciones variables de factor von Willebrand.

BIBLIOGRAFÍA

- Born, GVR and Cross, MJ. The Aggregation of Blood Platelets. J. Physiol (London) 168:178, 1963.
- Centers for Disease Control and Prevention. Guidelines for Isolation Precautions in Hospitals. Centers for Disease Control and Prevention. 1996; Vol 17; 1:53 - 80.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. NCCLS: Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections: Approved Guideline. NCCLS document M29. Wayne, PA.
- McCabe-White, M and Jennings, LK. Platelet protocols: Research and Clinical Laboratory Procedure. Academic Press. London. 1999, p 35.
- 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.
- 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.
- Weiss HJ: Aspirin and platelets in drugs and hematologic reactions. Dimittov and Nodine (eds.). Grune and Stratton, New York, 1974.
- Triplett DA, Harms CS, Newhouse P, Clark C: Platelet Function. Laboratory Evaluation and Clinical Application. ASCP, 1978.
- Day HJ, Holmsen H: Laboratory tests of platelet function. Ann Clin Lab Sci, 2:63, 1972.
- Owen CA, Bowie EJW, Thompson JH: The diagnosis of bleeding disorder. Little, Brown and Co., 1975.
- William WJ, Beutler, E, Erslev AJ, Rundles RW: Hematology. McGraw-Hill, 1977.
- Brinkhous KM, Graham JE, Cooper HA, Allain JP, Wagner RH: Assay of von Willebrand Factor in von Willbrand Disease and Hemophilia. Use of a Macroscopic Platelet Aggregation Test. Thromb Res 6:267, 1975.
- 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.
- 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.
- Clinical Laboratory Standard Institute: Assays of von Willebrand Factor Antigen and Ristocetin Cofactor Activity: Approval Guideline (H57-A) 2002.

DISPONIBILIDAD DEL PRODUCTO

PRODUCTO	CONTENIDO NETO	NÚMERO DE CATÁLOGO
vW Factor Assay®	10 determinaciones	101246
Ensayo factor vW	20 determinaciones	103025
ADP	3 x 0,5 ml	101312
Ácido araquidónico	3 x 0,5 ml	101297
BETA/Pak®		
(ADP, colágeno, ristocetina)	1 x 0,5 ml de cada uno	101580
Colágeno	3 x 0,5 ml	101562
Epinefrina	3 x 0,5 ml	101311
Plaquetas liofilizadas	3 x 4 ml	101595
Plaquetas liofilizadas	1 x 10 ml	101258
PAR/Pak® II		
(ADP, colágeno, epinefrina)	2 x 0,5 ml de cada uno	101310
Ristocetina		
AggRecetin® 1,5 mg/ml	15 mg	100968
AggRecetin 1,0-1,5 mg/ml	15 mg	100970
AggRecetin a granel	100 mg	101241
Plasma de control anómalo de vW	3 x 0,5 ml	101270
Plasma de referencia normal de vW	3 x 0,5 ml	101269
Plasma de control normal de vW	3 x 0,5 ml	106426

SE GARANTIZA QUE ESTE PRODUCTO FUNCIONARÁ SEGÚN LO DESCRITO EN LAS ETIQUETAS Y EN LAS PUBLICACIONES DE BIO/DATA CORPORATION. BIO/DATA CORPORATION NIEGA CUALQUIER GARANTÍA IMPLÍCITA DE COMERCIALIZACIÓN O IDONEIDAD PARA CUALQUIER OTRO FIN Y EN NINGÚN CASO BIO/DATA CORPORATION SERÁ RESPONSABLE POR NINGÚN DAÑO CONSECUCIONAL DERIVADO DE LA SUSODICHA GARANTÍA EXPRESA.



155 Gibraltar Road, PO Box 347, Horsham, PA 19044-0347 EE.UU.
(800) 257-3282 EE.UU. (215) 441-4000 Internacional
Fax: (215) 443-8820 Internacional
Correo electrónico: bdc@biodatacorp.com
Internet: www.biodatacorp.com



EMERGO EUROPE, Molenstraat 15, 2513 BH La Haya, Los Países Bajos