

DESCRIPTION DU PRODUIT

Le vW Factor Assay® est un système de réactifs et de plasmas témoins pour l'évaluation de la maladie de von Willebrand.

USAGE PRÉVU

Le vW Factor Assay permet la quantification spécifique de l'activité du cofacteur de la ristocétine dans le plasma.

PRINCIPE DU TEST

Le cofacteur ristocétine est l'activité *in vitro* du facteur von Willebrand lequel est responsable de l'agrégation plaquettaire en présence de ristocétine.¹²⁻¹⁴ Un facteur von Willebrand diminué est associé à la maladie de von Willebrand, donc la quantification de l'activité du cofacteur de la ristocétine est très précieuse pour le diagnostic et l'évaluation de cette coagulopathie.¹³⁻¹⁵ Les niveaux d'activité du cofacteur de la ristocétine sont déterminés par la capacité d'un plasma à tester et de la ristocétine d'induire l'agrégation d'une suspension de plaquettes normalisée.¹⁶

PRÉCAUTIONS

Le vW Factor Assay est destiné au **DIAGNOSTIC IN VITRO UNIQUEMENT ET NE PEUT ÊTRE NI INJECTÉ NI INGÉRÉ**. Les plasmas et plaquettes ont été testés à la source et se sont montrés négatifs pour HIV-1Ag, anti-HIV-1/2, l'antigène de surface de l'hépatite B, l'anticorps de l'hépatite C, le virus humain lymphotrope T de type I et II (anti-HTLV I/II) et négatifs lors du test sérologique pour la syphilis. Cependant, tous les plasmas et plaquettes d'origine humaine doivent être manipulés comme s'ils étaient potentiellement dangereux.

Note à l'intention de l'utilisateur : tout incident grave lié à ce produit doit être signalé au fabricant et à l'autorité compétente de l'État membre dans lequel l'utilisateur et/ou le patient sont établis.

MATÉRIEL FOURNI

1. Plaquettes lyophilisées, 4,0 ml. Conserver entre 2 ° à 8 °C avant reconstitution.
2. Réactif de la ristocétine 0,5 ml. Conserver entre 2 ° à 8 °C avant reconstitution.
3. Le plasma de référence normal (Facteur von Willebrand), 0,5 ml activité du facteur von Willebrand normalisée à 90-110 % au moyen de matériel de référence étalonné à l'Organisation mondiale de la santé. Conserver entre 2 ° à 8 °C avant reconstitution.
4. Plasma témoin anormal (pauvre en facteur von Willebrand), 0,5 ml. Conserver entre 2 ° à 8 °C avant reconstitution.
5. Sérum physiologique TBS, pH 7,5, 10 ml. Conserver à 2 ° - 8 °C.

Remarque : pour le kit de test de 20 dosages, 2 flacons de chaque réactif sont fournis. Pour les plus grands volumes de test, des réactifs de 2 à plusieurs kits (même numéro de lot) peuvent être regroupés. La courbe standard doit être dérivée des réactifs groupés. Des composants de dosage supplémentaires sont aussi disponibles individuellement. (Consulter la **DISPONIBILITÉ DES PRODUITS**)

MATÉRIEL NÉCESSAIRE MAIS NON FOURNI

1. Agrégomètre de plaquettes
2. Eau purifiée (distillée, désionisée ou de qualité réactif), pH 5,3 – 7,2
3. Pipettes (contenances de 1,0 ml, 0,5 ml, 0,45 ml, 0,05 ml)
4. Agitateurs jetables
5. Cuvettes pour agrégomètre
6. Bascule (Appareil de rotation mécanique)

INSTRUMENTATION

Le vW Factor Assay fonctionnera comme décrit lorsque utilisé avec la plupart des agrégomètres de plaquettes optiques.¹ Suivre les consignes du fabricant pour faire fonctionner l'agrégomètre utilisé.

PRÉLÈVEMENT DES SPÉCIMENS ET PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS À TESTER

Consulter la directive H21 A2 approuvée par NCCLS en vigueur pour prendre connaissance des instructions détaillées.⁶

1. PRÉPARATION DU PATIENT :

Sept à 10 jours avant le prélèvement du spécimen, les patients doivent s'abstenir de prendre de l'aspirine ou des médicaments qui contiennent de l'aspirine ou tout autre médicament et supplément diététique connu pour modifier la fonction plaquettaire. Les patients doivent jeûner et éviter les nourritures grasses et les produits laitiers pendant 12 heures précédant le prélèvement du spécimen.⁶

2. PRÉLÈVEMENT DU SPÉCIMEN :

Le prélèvement sanguin doit être effectué avec soin pour éviter la stase, l'hémolyse, la contamination par des liquides tissulaires ou l'exposition au verre. Garder les spécimens à température ambiante.⁸

Chacun des facteurs suivants peut entraîner des résultats inexacts d'analyse, et les échantillons affectés doivent être rejetés : présence d'hémolyse, de contamination par des globules rouges, de lipémie, de chyle, d'ictère, de caillots de thrombocytopénie (< 75 000 /mm³) dans le spécimen et de l'hypofibrinogénémie. La réutilisation d'articles jetables peut entraîner l'inexactitude des résultats d'analyse.

Suivre les précautions d'usage pendant le prélèvement des échantillons, la préparation de l'étalon et le processus d'analyse.^{2,3} Jeter les objets contondants et les déchets biologiques conformément au règlement du laboratoire.

Technique à la seringue (recommandée)⁸

- a. Utiliser une aiguille papillon pour la ponction veineuse.
- b. Prélever 9,0 ml de sang dans une seringue en plastique. Éviter une succion excessive.
- c. Retirer l'aiguille de la seringue et transvaser immédiatement et doucement le sang dans un tube en plastique [polypropylène]4 contenant 1,0 ml d'anticoagulant au citrate de sodium 0,11 M. La proportion doit être de 9 parties de sang pour 1 partie d'anticoagulant.⁵
- d. Couvrir et retourner 4 - 5 fois doucement pour mélanger.
- e. Conserver à température ambiante (entre 15 ° et 28 °C).

REMARQUE : lorsque l'hématocrite du patient est < 30 % ou > 55 %, les volumes de sang par rapport à l'anticoagulant doivent être ajustés.⁴

Technique du tube de prélèvement sous vide

1. Utiliser une aiguille papillon pour la ponction veineuse.
2. Prélever le sang dans des tubes (en plastique) contenant l'anticoagulant au citrate de sodium 0,11 M.
3. Retourner 4 à 5 fois doucement pour mélanger.

REMARQUE : Si on utilise des tubes de prélèvement en plastique sous vide, vérifier sur l'étiquette que l'anticoagulant au citrate est bien à 0,11 M. La couleur des bouchons ne change pas avec les différentes concentrations en citrate. Suivre les consignes du fabricant pour le prélèvement des spécimens.

PRÉPARATION DE PLASMA RICHE (PRP) ET PAUVRE (PPP) EN PLAQUETTES

1. Préparer du plasma riche en plaquettes en centrifugeant du sang anticoagulé à 150 x g pendant 10 minutes à température ambiante (15 ° à 28 °C).
2. Vérifier qu'il n'y a pas de globules rouges dans la couche de plasma. Si des globules rouges sont présents, recentrifuger à 150 x g pendant 5 minutes supplémentaires.
3. Au moyen d'une pipette de transfert en plastique, observer et retirer avec soin la couche de plaquettes sans déranger la couche leuco-plaquettaire ou des globules rouges, et transférer dans un récipient étiqueté (PRP). Boucher le récipient et le laisser à température ambiante.
4. Préparer le plasma pauvre en plaquettes en centrifugeant le restant du spécimen de sang à 2500 x g pendant 20 minutes. Vérifier que le plasma pauvre en plaquettes soit dépourvu d'hémolyse, puis transférer dans un tube en plastique étiqueté PPP.
5. La numération plaquettaire du PRP doit être de 250 000 ± 50 000 /mm³. La numération plaquettaire peut être réduite par l'utilisation de PPP préparé à partir de l'échantillon.

REMARQUE : Si de l'acide arachidonique est utilisé comme agoniste, ne pas ajuster la numération plaquettaire.

RECONSTITUTION

REMARQUE : les réactifs doivent être amenés à température ambiante (entre 15 ° et 28 °C) avant la reconstitution. Les réactifs conservés doivent être amenés à température ambiante avant d'être utilisés.

1. Nouvelle suspension de plaquettes lyophilisées : Ajouter 4,0 ml du flacon de sérum physiologique TBS fourni à un flacon de plaquettes lyophilisées et bercer à température ambiante pendant au moins 30 minutes. Les plaquettes reconstituées sont stables pendant 30 jours si conservées entre 2 ° et 8 °C. Après réfrigération et avant usage, il faut aussi mélanger les plaquettes mécaniquement pendant au moins 30 minutes à température ambiante pour permettre aux réactifs de s'équilibrer et de dégazer.
2. Réactif de la ristocétine: Reconstituer avec 0,5 ml d'eau purifiée pour arriver à la concentration active de 10 mg/ml. Inverser doucement pour mélanger et permettre de réhydrater pendant 30 minutes à température ambiante. La ristocétine reconstituée est stable pendant 7 jours si conservée dans son récipient d'origine fermé entre 2 ° et 8 °C.
3. Plasma de référence normal: Reconstituer avec 0,5 ml d'eau purifiée. Laisser pendant 20 minutes à température ambiante. Le plasma reconstitué est stable pendant 8 heures si conservé dans son récipient d'origine fermé entre 2 ° et 8 °C. Une fois dilué, la stabilité de plasma de référence est de 45 minutes à température ambiante.
4. Plasma anormal témoin: Reconstituer avec 0,5 ml d'eau purifiée. Laisser pendant 20 minutes à température ambiante. Le plasma reconstitué est stable pendant 8 heures si conservé dans son récipient d'origine fermé entre 2 ° et 8 °C. Une fois dilué, la stabilité du plasma témoin est de 45 minutes à température ambiante.

PROCÉDURE DU TEST

IL EST ESSENTIEL DE PRÉPARER UNE COURBE STANDARD POUR CHAQUE SERIE DE TEST.

A. Préparation de référence normale et des dilutions du plasma à tester

1. Préparer comme suit des dilutions du plasma de référence normale pour la courbe standard :
 - a. Étiqueter 3 tubes à essais : 100 %, 50 % et 25 %.
 - b. Pipeter 0,2 ml de sérum physiologique TBS dans chaque tube.
 - c. Pipeter 0,2 ml de plasma de référence normale dans le tube étiqueté 100 %. Bien mélanger.
 - d. Transférer 0,2 ml du tube étiqueté 100 % dans le tube étiqueté 50 %. Bien mélanger.
 - e. Transférer 0,2 ml du tube étiqueté 50 % dans le tube étiqueté 25 %. Bien mélanger.

2. Préparer la dilution du plasma à tester comme suit:

- a. Étiqueter un tube (identification de l'échantillon) pour chaque plasma à tester.
- b. Préparer une dilution 1:2 de chaque plasma à tester en pipétant 0,1 ml de sérum physiologique TBS et 0,1 ml de plasma à tester dans le tube. Bien mélanger.

B. Préparation du blanc de l'agrégomètre: La pipette 0,25 ml de plaquettes reconstituées et 0,25 ml de sérum physiologique TBS dans une cuvette d'agrégomètre et bien mélanger. Ce blanc sera utilisé pour déterminer des références à 100 % pour chaque dilution tout au long du dosage. Mélanger chaque fois avant de placer le blanc.

C. Réalisation le dosage:

1. Pipeter 0,4 ml de plaquettes reconstituées dans une cuvette de l'agrégomètre.
2. Ajouter 0,05 ml de ristocétine à la cuvette, en ayant soin d'éviter l'introduction de bulles d'air.
3. Ajouter un nouvel agitateur en s'assurant qu'il soit de côté. Faire attention de ne pas produire de gouttelettes sur le côté de la cuvette.
4. Incuber la cuvette à 37 °C pendant une minute sans remuer.
5. Placer le blanc selon les directives du fabricant de l'agrégomètre utilisé.
6. Placez la cuvette dans le puits de test et laissez incuber encore 2 minutes supplémentaires en remuant.
7. Démarrer le canal et ajouter 0,05 ml de la dilution du plasma de référence normale à 100 %. Ne pas laisser la dilution de plasma couler le long de la paroi de la cuvette. Faire aussi attention de ne pas altérer la suspension de plaquettes avec technique de pipetage.
8. Observer l'agrégation sur l'enregistreur graphique jusqu'à la fin de la réaction. (Plus d'augmentation de transmission de la lumière observée.)
9. La répétition les étapes 1-8 pour les dilutions à 50 % et 25 % du plasma de référence normale, en substituant chacune de ces dilutions à la dilution à 100 % du plasma de référence normale dans l'étape 7 ci-dessus.

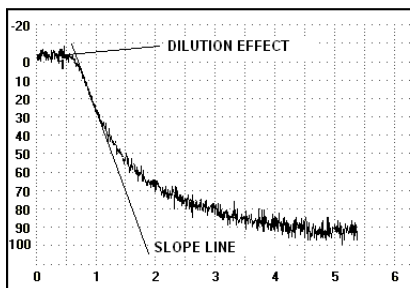


FIGURE 1
Draw a slope line along the steepest linear portion of the agglutination curve.

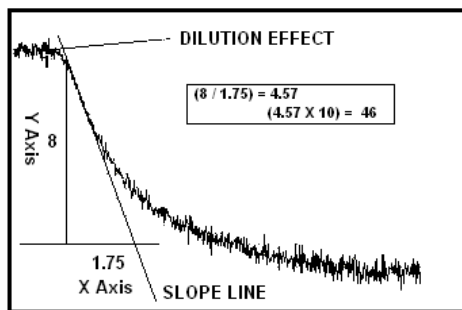


FIGURE 2
Select two points on the line. Measure the Y (vertical) axis and the X (horizontal) axis (see Figure 1). Calculate the Slope by dividing the Y axis by the X axis. Multiplying the sum by 10 then round off to the closest whole number.

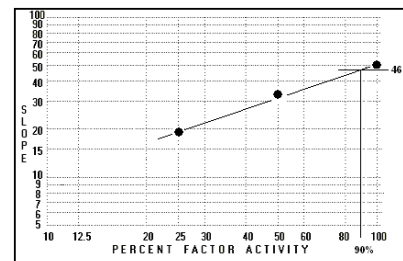


FIGURE 3
TEST PLASMA ACTIVITY
Slope Value =46
von Willebrand Activity =90%

10. Répéter les étapes 1-8 pour la dilution du plasma à tester en substituant celui-ci à la dilution à 100 % du plasma de référence normal dans l'étape 7.

CONTRÔLE DE QUALITÉ

Un plasma pauvre en facteur von Willebrand est inclus comme contrôle anormal et doit être dosé comme un plasma à tester avec un résultat attendu de $\leq 45\%$ d'activité. Ce contrôle assure que le système de dosage est spécifique pour le facteur von Willebrand et cette aggrégation ne sera pas influencée par d'autres protéines normales du plasma. En outre, il est suggéré que des contrôles des plasmas de référence dosés normaux et anormaux soient effectués pour valider les courbes standard. (Voir DISPONIBILITÉ DES PRODUITS)

RÉSULTATS

A. Déterminer la valeur de la pente:

- Tirer une ligne le long du segment linéaire le plus pentu de chaque courbe d'aggrégation (voir Fig. 1). C'est là où le taux de réaction est le plus grand et se produit immédiatement après le début de l'aggrégation. En outre, il y a une phase de latence (délai) entre l'ajout du plasma dilué et le début de l'aggrégation. Cette phase de latence augmente en même temps que la pente et l'ampleur de l'aggrégation décline et elle est utile pour différencier des aggrégations réelles des changements artificiels de la densité optique.
- Sélectionner deux points sur la ligne. Mesurer l'ordonnée Y (verticale) et l'abscisse X (horizontale) (voir Figure 1).
- Calculer la pente en divisant l'ordonnée Y par l'abscisse X, multiplier la somme par 10, puis arrondir au nombre entier le plus proche.

$$\text{PENTE} = (Y/X) \times 10$$
 exemple (voir figure 2): $(8/1,75) = 4,57$
 $4,57 \times 10 = 45,7$
 $45,7$ arrondi = 46

B. Préparation de la courbe standard? (Voir Figure 3):

- Sur papier quadrillé fourni, tracer le pourcentage d'activité du facteur von Willebrand les dilutions à 100 %, 50 % et 25 % du Plasma de référence normal sur l'axe horizontal et leur valeur de pente correspondante sur l'axe vertical.
- Tracer une droite de meilleur ajustement passant par ces points.

C. Détermination de l'activité du facteur von Willebrand du plasma à tester ou du plasma témoin anormal :

- Tracer la valeur de pente pour le plasma à tester sur l'axe vertical de la courbe standard.
- Lire le pourcentage du taux d'activité correspondant du facteur von Willebrand sur l'axe horizontal.

D. Valeurs en dehors de l'intervalle de la courbe standard :

- Les valeurs supérieures à 100 % d'activité du facteur peuvent être vérifiées en préparant une dilution de 1:4 du plasma à tester (3 parties de sérum physiologique TBS, 1 partie de plasma à tester), répéter la procédure du dosage et multiplier le résultat du test par deux (2).
- Les valeurs inférieures à 25 % d'activité du facteur peuvent être testées en répétant la procédure de dosage sur le plasma à tester non dilué et divisant le résultat du test par 2.

VALEURS ATTENDUES

Un résultat inférieur à 40 % du facteur von Willebrand est considéré anormal et suppose une maladie de von Willebrand.⁷ Cependant, d'autres propriétés de la molécule de von Willebrand doivent être considérées pour le diagnostic des différentes formes de la maladie de von Willebrand. Puisque les intervalles de référence pour le facteur von Willebrand dépendent du groupe sanguin, chaque laboratoire doit établir des intervalles de référence spécifiques des groupes sanguins de sa population de patients.¹⁷

Le plasma témoin anormal donnera des résultats de dosage du facteur von Willebrand $\leq 45\%$. La capacité de produire une valeur quantitative dans cet intervalle dépend de la sensibilité du système de dosage utilisé.

LIMITES

La quantification du facteur von Willebrand est considérée par certains comme le seul dosage important pour le diagnostic de la maladie de von Willebrand. Cependant, le diagnostic des différentes formes de cette coagulopathie nécessite une série d'évaluations cliniques et de laboratoire y compris les antécédents du patient et de sa famille, le temps de saignement, l'antigène lié au facteur VIII et l'activité coagulante du facteur VIII,^{3,4,9,10} ainsi que des études multimériques.^{9,10} Des dosages en série peuvent être nécessaires pour confirmer le diagnostic.

CARACTÉRISTIQUES DES PERFORMANCES

Les composants du vW Factor Assay ont été testés sur des plasmas de patients chez qui la maladie de von Willebrand a été diagnostiquée ainsi que sur des patients normaux. Des études ont montré que l'exactitude et la sensibilité de ces composants sont telles que des niveaux variables du facteur von Willebrand ont été détectés.

RÉFÉRENCES

- 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. Annal 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 Willebrand 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.
- Miller CH, Graham JB, Goldin LR, Elston RC: Genetics of Classic vonWillebrand's Disease, I. Phenotypic Variation within Families. Blood 54:117, 1979.
- Nelson IM, Holmberg L: von Willebrand's Disease Today. Clinics in Hematology Vol.8 No. 1, 1979.
- 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 Standards Institute: Assays of von Willebrand Factor Antigen and Ristocetin Cofactor Activity: Approval Guideline (H57-A) 2002.

Pour une liste complète des produits disponibles s'il vous plaît aller à notre site Web ou www.biodatacorp.com contacter le service client ci-dessous.

LA GAMME DE PRODUITS BIO/DATA CORPORATION COMPREND DES RÉACTIFS À USAGE GÉNÉRAL ET PROFESSIONNEL DE LABORATOIRE DESTINÉS À INDIQUER ET À SIGNALER L'ACTIVITÉ ET LES RÉPONSES DE LA FONCTION PLAQUETTAIRE. CE PRODUIT EST GARANTI POUR FONCTIONNER COMME DÉCRIT DANS SON ÉTIQUETAGE, Y COMPRIS LES INSTRUCTIONS D'UTILISATION. BIO/DATA CORP-ORATION NE FAIT AUCUNE RÉCLAMATION NI NE DONNE AUCUNE GARANTIE, EXPRESSE OU IMPLICITE, QUANT À LA CAPACITÉ, L'APTITUDE OU LA QUALITÉ MARCHANDE POUR TOUT AUTRE USAGE. EN AUCUN CAS BIO/DATA CORPORATION NE POURRA ÊTRE TENUE RESPONSABLE DE TOUT DOMMAGE CONSECUTIF RESULTANT DE LA GARANTIE EXPRIMÉE CI-DESSUS.



155 Gibraltar Road, Horsham, PA 19044 États-Unis
 (800) 257-3282 États-Unis (215) 441-4000 International
 Télécopie : (215) 443-8820 International
 Courriel : customer.service@biodatacorp.com
 Internet : www.biodatacorp.com

An ISO 13485 Registered Company



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



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

