

PRINCIPIO

Le piastrine liofilizzate Helena sono concepite per l'utilizzo nella determinazione quantitativa di un'attività che rispecchia l'attività del fattore von Willebrand nel plasma¹.

L'uso previsto consiste nel misurare la capacità del plasma del paziente di agglutinare le piastrine fissate con formalina in presenza di ristocetina.

La percentuale d'agglutinazione delle piastrine indotta da ristocetina è correlata alla concentrazione del fattore von Willebrand.

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

I reagenti contenuti in questo kit sono destinati esclusivamente alla diagnostica in vitro - **NON INGERIRE**. Indossare guanti protettivi durante l'uso dei componenti del kit. Fare riferimento alle schede tecniche e dati di sicurezza per le avvertenze sui componenti dei Kit 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

- Piastrine liofilizzate 5371 (5 × 5ml), 5356 (5 × 10ml)**
Ogni fiala contiene piastrine liofilizzate fissate con formalina e agenti di massa.
Preparazione: Ricostituire ogni flacone con 5ml o 10ml di salina tamponata con Tris. Agitare delicatamente e lasciare riposare per 10 minuti. Miscelare delicatamente prima dell'uso. Non scuotere.
- Altri componenti del kit**
Ogni kit contiene un foglio procedurale.

CONSERVAZIONE E STABILITÀ

- Piastrine liofilizzate (5ml /10ml)**
I flaconi non aperti sono stabili fino alla data di scadenza indicata se conservati nelle condizioni riportate sul flacone o sull'etichetta del kit. Dopo la ricostituzione, il reagente è stabile per 1 giorno (24 ore) a 2...6°C e per 30 giorni a -20°C.

MATERIALI NECESSARI MA NON IN DOTAZIONE

REF 5185 SARP 10 x 1ml
REF 5365 Salina tamponata con Tris 1 x 125ml o
REF 5355 Salina tamponata con Tris 10 x 35ml
REF 5372 Reagente a base di ristocetina

RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Nel corso dell'intera procedura è necessario utilizzare plastica o vetro silicizzato. 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 x g per 10 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

Preparare tutti i reagenti come da istruzioni per ogni singola confezione. Installare l'aggregometro per piastrine come indicato nel manuale d'istruzioni.

- Preparazione della curva standard**
Preparare le diluizioni indicate di seguito in salina tamponata con Tris:

Provetta	Diluizione	SARP ml	Tampone ml	Attività %
1	1:2	0,1	0,1	50
2	1:4	0,1	0,3	25
3	1:8	0,1	0,7	12,5

Miscelare senza scuotere.

- Preparazione del campione del paziente**
Preparare diluizioni 1+1 e 1+3 del plasma del paziente o del plasma di controllo in una salina tamponata con Tris. Miscelare senza scuotere.
- Preparazione in bianco dell'aggregazione**
Pipettare 0,25ml di sospensione piastrinica e 0,25ml di salina tamponata con Tris nella cuvetta di un aggregometro con una sbarretta d'agitazione. Ciò serve per impostare il livello d'attività al 100%.
- Esecuzione dei test**
 - Impostare il 100% di attività in ciascun canale utilizzando il campione in bianco dell'aggregazione.
 - Pipettare 400µl di sospensione piastrinica in una cuvetta dell'aggregometro per ogni campione da testare. Aggiungere una sbarretta d'agitazione a ciascuna cuvetta.
 - Collocare la cuvetta nell'aggregometro ed aggiungere 50µl di ristocetina alla cuvetta. Incubare a 37°C per 3 minuti esatti.
 - Aggiungere 50µl di diluizione standard di plasma del controllo o del paziente.
 - Monitorare l'aggregazione piastrinica per 5 minuti.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Rappresentare l'attività di diluizione SARP (asse X) rispetto alla discesa d'aggregazione (asse Y) su carta millimetrata log-log. Tracciare una retta di regressione. Interpolare i valori di discesa del paziente dal grafico per indicare l'attività %. Correggere i risultati ottenuti per la diluizione e l'attività dosata del plasma SARP.

CONTROLLO DI QUALITÀ

Ogni laboratorio deve definire un programma di controllo qualità. I plasmidi di controllo normali e anormali 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 come non validi.

Helena BioSciences mette a disposizione i seguenti controlli utilizzabili con questo prodotto:
REF 5301 SAC-1
REF 5302 SAC-2
REF 5373 Kit di controllo anormale cofattore ristocetina

LIMITI

L'attività del cofattore ristocetina non è in grado di rispecchiare con precisione la malattia di von Willebrand in parecchie situazioni quali gravidanza², infusione di concentrati commerciali del fattore VIII^{3,4} o somministrazione di DDAVP⁵. In questi casi, il vWF R:Co può essere corretto, ma il tempo dell'emorragia rimane prolungato. Inoltre, i livelli di vWF R:Co possono essere normali nella malattia di von Willebrand di tipo II B anche se il tempo dell'emorragia è prolungato⁶.

VALORI DI RIFERIMENTO

Ogni singolo laboratorio dovrebbe determinare i propri valori normali per lo strumento / sistema reagente usato di routine. I valori di riferimento possono variare da un laboratorio all'altro in funzione delle tecniche e dei sistemi in uso. Per tale motivo ciascun laboratorio dovrà elaborare un proprio range normale. I valori previsti per l'attività del cofattore ristocetina negli adulti sono 58-166% (0,58-1,66 unità/ml).

CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI

Le caratteristiche prestazionali sotto riportate sono state determinate da Helena BioSciences o dai propri rappresentanti a titolo di linee guida. Ciascun laboratorio dovrà pertanto elaborare i propri dati prestazionali. Con l'impiego dei reagenti Helena BioSciences, il dosaggio del cofattore ristocetina è concepito per ottenere una curva di calibrazione lineare dal 10 al 60%, senza pre-diluizione. I CV entro la serie si prevedono <10%.

BIBLIOGRAFIA

- Zimmerman, T.S and Ruggeri, Z.M.'von Willebrands' Disease', Progress in Thrombosis and Haemostasis, Spaett (Ed), 1982, 6: 203-236.
- Ratnoff, O.D. and Bennett, B. 'Clues to Pathogenesis of Bleeding in von Willebrands' Disease', N. Eng. J. Med., 1973, 289 : 1182-1183.
- Blatt, P.M. et al. 'Antihemophilic factor Concentrate Therapy in von Willebrands' Disease' J. Am. Med., Assn., 1976, 236 : 2770-2772.
- Green, D. and Potter, E.V., 'Failure of AHF Concentrate to Control Bleeding in von Willebrands' Disease' Am. J. Med., 1976, 60 : 357-360.
- Mannucci, P.M. et al. 'Studies on the Prolonged Bleeding Time in von Willebrands' Disease', J. Lab. Clin. Med., 1976, 88 : 662-671.
- Ruggeri, Z.M. et al., 'Heightened Interaction Between Platelets and Factor VIII/von Willebrand Factor in a New Subtype of von Willebrands' Disease.', N. Eng. J. Med., 1980, 302 : 1047-1051.

USO PREVISTO

Las plaquetas liofilizadas Helena están diseñadas para la determinación cuantitativa de una actividad que refleja la actividad del factor de von Willebrand en el plasma¹.

Se usa para medir la capacidad del plasma de un paciente para aglutinar plaquetas fijadas en formol en presencia de ristocetina.

La velocidad de la aglutinación plaquetaria inducida por la ristocetina tiene relación con la concentración de factor de von Willebrand.

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 de los componentes, avisos de seguridad y consejos para su eliminación.

Los productos plasmáticos se han sometido a pruebas 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 de VIH 1 y 2 y anticuerpo del VHC; sin embargo, deben manipularse con las mismas precauciones que una muestra de plasma humano.

COMPOSICIÓN

- Plaquetas liofilizadas 5371 (5 × 5ml), 5356 (5 × 10ml)**
Cada vial contiene plaquetas liofilizadas fijadas en formol y agentes formadores de masa.
Preparación: Reconstituir cada vial con 5 o 10ml de solución salina tamponada con Tris. Agitar suavemente y dejar reposar durante 10 minutos. Mezclar suavemente antes de su uso. No agitar.
- Otros componentes del kit**
Cada kit contiene instrucciones de uso.

ALMACENAMIENTO Y PERÍODO DE VALIDEZ

- Plaquetas liofilizadas (5ml / 10ml)**
Los viales 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. Una vez reconstituido, el reactivo es estable durante 1 día (24 horas) a 2...6°C y 30 días a -20°C.

ARTÍCULOS NECESARIOS NO SUMINISTRADOS

REF 5185 SARP 10 x 1ml
REF 5365 Solución salina tamponada con Tris 1 x 125ml o
REF 5355 Solución salina tamponada con Tris 10 x 35ml
REF 5372 Reactivo ristocetina

RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

Debe usarse siempre plástico o vidrio silicizado. Debe recogerse sangre (9 partes) en el anticoagulante citrato sódico al 3,2% o al 3,8% (1 parte). Se separa el plasma después de la centrifugación a 2000 xg durante 10 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

Preparar todos los reactivos siguiendo las instrucciones de cada paquete. Configurar el agregómetro de plaquetas como se indica en el manual de instrucciones.

- Preparación de la curva estándar**
Preparar las siguientes diluciones en solución salina tamponada con Tris:

Tubo	Dilución	SARP ml	Tampón ml	Actividad %
1	1:2	0,1	0,1	50
2	1:4	0,1	0,3	25
3	1:8	0,1	0,7	12,5

Mezclar sin agitar.

- Preparación de la muestra del paciente**
Preparar diluciones 1+1 y 1+3 del plasma del paciente o el plasma control en solución salina tamponada con Tris. Mezclar sin agitar.
- Preparación del blanco de agregación**
Pipetear 0,25ml de suspensión de plaquetas y 0,25ml de solución salina tamponada con Tris en una cubeta de agregómetro con una barra de agitación. Esto se usa para establecer el nivel de actividad del 100%.
- Realización de las pruebas**
 - Establecer la actividad 100% en cada canal usando la muestra blanco de agregación.
 - Pipetear 400µl de la suspensión de plaquetas en una cubeta de agregómetro para cada muestra a estudiar. Añadir una barra de agitación a cada cubeta.
 - Colocar la cubeta en el agregómetro y añadir 50µl de ristocetina a la cubeta. Incubar a 37°C durante 3 minutos exactos.
 - Añadir 50µl de dilución del plasma estándar, del paciente o control.
 - Vigilar la agregación plaquetaria durante 5 minutos.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Representar la actividad de dilución SARP (eje X) frente a la pendiente de agregación (eje Y) en un papel de gráficos log-log. Dibujar una línea recta de mejor ajuste. Interpoler los valores de pendiente del paciente del gráfico para dar una actividad en %. Corregir estos resultados en cuanto a dilución y actividad valorada del plasma SARP.

CONTROL DE CALIDAD

Cada laboratorio debe establecer un programa de control de calidad. Los plasmias de control 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:
REF 5301 SAC-1
REF 5302 SAC-2
REF 5373 Kit de control anormal en cofactor de ristocetina

LIMITACIONES

La actividad del cofactor de la ristocetina no refleja con exactitud la enfermedad de von Willebrand en varias situaciones como el embarazo², la infusión de concentrados comerciales de factor VIII^{3,4} o la administración de DDAVP⁵. En tales casos, podría corregirse el vWF R:Co, pero el tiempo de sangrado sigue prolongado. Además, los niveles de vWF R:Co pueden ser normales en la enfermedad de von Willebrand de tipo II B incluso aunque el tiempo de sangrado esté prolongado⁶.

VALORES DE REFERENCIA

Cada laboratorio deberá establecer sus propios valores normales esperados para el sistema instrumento/reactivo en uso habitual. Los valores de referencia pueden variar entre los laboratorios dependiendo de las técnicas y sistemas usados. Por esta razón, cada laboratorio debe establecer su propio intervalo normal. Los valores esperados de actividad del cofactor de ristocetina para adultos son 58-166% (0,58-1,66 unidades/ml).

CARACTERÍSTICAS FUNCIONALES

Las siguientes características de rendimiento han sido determinadas por Helena BioSciences o sus representantes como guía. Cada laboratorio debe establecer sus propios datos de rendimiento. La valoración del cofactor de ristocetina está diseñada para dar una curva de calibración lineal del 10-60%, sin predilución, utilizando reactivos Helena BioSciences. Se espera que los CV dentro de cada prueba sean <10%.

BIBLIOGRAFÍA

- Zimmerman, T.S and Ruggeri, Z.M.'von Willebrands' Disease', Progress in Thrombosis and Haemostasis, Spaett (Ed), 1982, 6: 203-236.
- Ratnoff, O.D. and Bennett, B. 'Clues to Pathogenesis of Bleeding in von Willebrands' Disease', N. Eng. J. Med., 1973, 289 : 1182-1183.
- Blatt, P.M. et al. 'Antihemophilic factor Concentrate Therapy in von Willebrands' Disease' J. Am. Med. Assn., 1976, 236 : 2770-2772.
- Green, D. and Potter, E.V., 'Failure of AHF Concentrate to Control Bleeding in von Willebrands' Disease' Am. J. Med., 1976, 60 : 357-360.
- Mannucci, P.M. et al. 'Studies on the Prolonged Bleeding Time in von Willebrands' Disease', J. Lab. Clin. Med., 1976, 88 : 662-671.
- Ruggeri, Z.M. et al., 'Heightened Interaction Between Platelets and Factor VIII/von Willebrand Factor in a New Subtype of von Willebrands' Disease.', N. Eng. J. Med., 1980, 302 : 1047-1051.

Lyophilised Platelets

Instructions for use

REF 5371 (5 × 5ml)
REF 5371US (5 × 5ml)
REF 5356 (5 × 10ml)

Plaquettes lyophilisées
Fiche technique

Lyophilisierte Thrombozyten
Anleitung

Piastrine liofilizzate
Istruzioni per l'uso

Plaquetas liofilizadas
Instrucciones de uso

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-2-1110P 2007/05 (4)

