

RISTOCETIN COFACTOR ASSAY

(Dosage du Cofacteur Ristocétine - Facteur de von Willebrand)

Code produit : 299 (15 déterminations)

I. Utilisation

Le test CHRONO-LOG® Ristocetin Cofactor Assay est utilisé pour la détermination quantitative de l'activité du Facteur VIII Cofacteur de la Ristocétine dans le plasma citraté.

II. Résumé

L'activité du Cofacteur de la Ristocétine dans le plasma peut être déterminée par agglutination d'une suspension standardisée de plaquettes en présence du facteur de von Willebrand en utilisant l'antibiotique Ristocétine⁽¹⁾. L'activité du Cofacteur de la Ristocétine est l'activité in-vitro du facteur de von Willebrand qui est responsable de l'agglutination des plaquettes en présence de Ristocétine. Bien que les plaquettes jouent un rôle passif dans une telle agglutination, il est absolument nécessaire que le récepteur Ristocétine-dépendant soit intact⁽²⁾. La maladie de von Willebrand est associée à une diminution du facteur de von Willebrand ou de l'activité du cofacteur de la Ristocétine. Il est généralement admis que l'activité du cofacteur de la Ristocétine est le test in-vitro le plus utile pour le diagnostic de la maladie de von Willebrand^(3,4). Les niveaux d'activité du cofacteur de la Ristocétine sont déterminés par la capacité du plasma testé et de la Ristocétine à induire l'agrégation dans une suspension plaquettaire standard⁽⁵⁻⁷⁾.

III. Principe

Après reconstitution, les plaquettes lyophilisées sont traitées avec la Ristocétine en présence de dilutions d'un plasma humain normal standard aux valeurs connues pour l'activité du cofacteur de la Ristocétine. Une courbe standard est préparée, un plasma de patient est ensuite utilisé comme source d'activité du cofacteur de la Ristocétine en présence de Ristocétine et des plaquettes reconstituées. Ensuite, un profil d'agrégation est déterminé ainsi que l'activité du cofacteur de la Ristocétine qui est calculée à l'aide de la courbe standard.

IV. Réactifs

Ristocétine (7,5 mg / flacon). Conserver le réactif lyophilisé entre 2°C et 8°C. Le reconstituer avec 0,75 mL d'eau distillée à température ambiante pour une concentration finale de 10 mg/mL. Le laisser revenir à température ambiante (21°C ± 4°C) tout en l'agitant doucement et occasionnellement pendant 30 minutes. Ne jamais agiter vigoureusement ce réactif. Vérifier que toutes les particules soient bien dissoutes. Maintenir le réactif dans la glace pendant toute son utilisation. Tout volume restant inutilisé peut être stocké et congelé au minimum -20°C pendant 30 jours.

Plaquettes humaines lyophilisées, 6 mL. Stocker les plaquettes lyophilisées entre 2°C et 8°C. Reconstituer un flacon de plaquettes humaines lyophilisées avec 6 mL de tampon Tris Buffered Saline (TBS). Laisser reposer 30 minutes avant utilisation. Avant chaque utilisation, mélanger par inversion douce du flacon. Conserver à température ambiante pendant les tests. Après reconstitution le réactif est stable entre 2°C et 8°C pendant 30 jours ou pendant 30 jours si congelé.

Plasma de référence von Willebrand, normal. Conserver le plasma lyophilisé entre 2°C et 8°C. Plasma humain standard pour l'activité du Cofacteur de la Ristocétine, 1 mL, lyophilisé. Reconstituer dans 1 mL d'eau distillée. Laisser reposer pendant 20 minutes à température ambiante en agitant doucement et occasionnellement. Vérifier que toutes les éléments sont bien dissoutes. Stable après reconstitution entre 2°C et 8°C pendant 4 heures ou à -20°C pendant 30 jours maximum.

Plasma de référence von Willebrand, déficient.

Conserver le plasma lyophilisé entre 2°C et 8°C. Plasma obtenu à partir de patients atteints du syndrome congénital humain de von Willebrand et ayant l'activité normale du cofacteur de la Ristocétine réduite à 30% ; 0,5 mL, lyophilisé. A reconstituer dans 0,5 mL d'eau distillée. Laisser reposer 20 minutes à température ambiante en agitant doucement et occasionnellement. Assurez-vous que toutes les particules sont bien dissoutes. Le réactif reconstitué est stable pendant 4 heures à température ambiante ou peut être conservé à -20°C pendant 30 jours maximum.

Tampon Tris Salin (TBS), 12 mL. Conserver entre 2°C et 8°C. A utiliser pour la reconstitution des plaquettes lyophilisées. Conserver à température ambiante pendant le test. Ne pas utiliser après la date de péremption indiquée sur l'étiquette.

Usage de *Diagnostic in-vitro*.

V.

Préparation de l'échantillon

- Anticoagulant. Utiliser une solution de citrate de sodium tamponnée à 3,2%⁹.
- Collecte des échantillons. (Voir, en exemple, la réf. 8)
 - Obtenir du sang veineux par une ponction veineuse propre.
 - Mélanger immédiatement 9 volumes de sang dans 1 volume d'anticoagulant, bien mélanger en inversant le tube tête en bas.
 - Centrifuger l'échantillon entre 1000g et 2400 g pendant 15 minutes.
 - Extraire le plasma du tube dans les 60 minutes à l'aide d'une pipette en plastique et le conserver dans un tube en plastique.
 - Tester l'échantillon de plasma dans les 2 heures, sinon le conserver à -20°C pendant deux semaines ou à -70°C pendant 6 mois maximum et le décongeler juste avant l'utilisation.

VI.

Procédure

- Matériels fournis :
 - Ristocétine
 - Plaquettes lyophilisées
 - Plasma de référence von Willebrand, Normal
 - Plasma de référence von Willebrand, Déficient
 - Tampon Tris Salin (TBS)
- Matériel requis :
 - Méthode de mesure de l'agrégation plaquettaire avec l'agrégomètre CHRONO-LOG® et le logiciel de contrôle.
 - Cuvettes d'agrégomètre.
 - Agitateurs.
 - Pipettes de précision pour 1 mL, 0,5 mL, 0,4 mL et 0,05 mL.
 - Pipettes de transfert en plastique.
 - Eau distillée CHRONO-LOG® Réf. 398) sans agent de conservation ni additif. Ne PAS utiliser d'eau provenant du système de filtration Millipore du laboratoire.
- Performance du test
 - Préparation de la courbe standard (Doit être préparée pour chaque série de tests).
 - Préparer les dilutions du plasma de référence, normal pour une courbe standard.
 - Identifier 3 tubes test en plastique (12 x 75 mm) avec 100%, 50%, 25%.
 - Déposer 0,2 mL de TBS à chaque tube.

- iii. Déposer 0,2 mL de plasma normal de référence, dans un tube identifié 100%. Bien mélanger.
 - iv. Transférer 0,2 mL du tube 100% dans le tube 50%. Bien mélanger.
 - v. Transférer 0,2 mL du tube 50% dans le tube 25%. Bien mélanger.
- b. Préparer le contrôle et le test de la dilution plasmatique en ajoutant 0,1 mL de test de plasma dans 0,1 mL de tampon TBS dans un tube en plastique. Bien mélanger.
2. Préparation du blanc :
- Déposer 0,25 mL de tampon TBS et 0,25 mL de plaquettes reconstituées dans la cuvette de l'agrégomètre. Bien mélanger.
3. Le blanc sera utilisé pour définir la ligne de base pour chaque échantillon.

Procédure du test :

- a. Déposer 0,4 mL de plaquettes reconstituées dans une cuvette d'agrégomètre préchauffée contenant un agitateur.
- b. Déposer 0,05 mL de Ristocétine dans la cuvette échantillon. Agiter pour bien mélanger juste avant l'utilisation.
- c. Insérer la cuvette dans l'agrégomètre.
- d. Incuber pendant deux minutes.
- e. Régler les lignes de base 0% et 100% selon les instructions de l'instrument.
- f. Après avoir bien mélangé manuellement, commencer l'agrégation en ajoutant 0,05 mL du plasma normal de référence 100% dans la cuvette échantillon contenant le mélange Plaquettes-Ristocétine. Observer et enregistrer le modèle d'agrégation jusqu'à ce qu'il soit terminé. Le logiciel CHRONO-LOG® enregistre automatiquement la courbe d'agrégation et détermine la pente.
- g. Répéter les étapes a. à e. pour les dilutions de plasma normal de référence 50% et 25%.
- h. Répéter les étapes a. à e. pour les dilutions de plasma de référence 50% et 25%.
- i. Répéter les étapes a. à e. pour le test du plasma (Préparer antérieurement des dilutions au demi).

VII. Résultats

- A. Détermination de la pente.
1. La plupart des agrégomètres disponibles dans le commerce fournissent une lecture directe de la pente.
- B. Préparer la courbe standard des valeurs de pente.
1. En utilisant le papier graphique log-log fourni, tracer l'activité % de Ristocétine Cofacteur selon la dilution du plasma de référence Normal (100%, 50%, 25%) sur l'axe indiqué par rapport à ses valeurs de pente correspondantes sur l'autre axe.
 2. Tracer une courbe d'extrapolation à l'aide des 3 points.
(Le logiciel CHRONO-LOG® Ristocetin Cofactor Assay trace les points et calcule la ligne standard la mieux adaptée automatiquement) Le calcul du coefficient de détermination "CD" sera également indiqué. Un CD de $\geq 0,95$ peut être utilisé pour les tests.
- C. Déterminer l'activité du cofacteur de la Ristocétine dans le plasma à tester.
1. À partir de la valeur de la pente du plasma à tester, croiser la ligne de meilleur ajustement, étendre la ligne à l'axe du cofacteur de Ristocétine, interpoler le niveau de l'activité du cofacteur Ristocétine dans l'échantillon à tester. (Voir l'exemple sur papier graphique).
(Le logiciel CHRONO-LOG® Ristocetin Cofactor Assay trace les points et calcule la ligne standard la mieux adaptée automatiquement.)

REMARQUE : Le plasma de référence von Willebrand utilisé pour créer le standard a une plage de 100 ± 15 %, par rapport aux normes internationales de l'OMS.

REMARQUE : La pente du plasma de test doit se situer dans la partie linéaire de la courbe standard. Il peut être nécessaire de faire varier la dilution du plasma à tester pour obtenir une valeur dans cette plage.

VIII. Valeurs attendues

Les résultats de moins de 40% d'activité du cofacteur de la Ristocétine (von Willebrand) sont généralement considérés comme anormaux et révélateurs de la maladie de von Willebrand⁽¹⁻⁴⁾. La gamme normale devrait être déterminée par le laboratoire en fonction du couple réactif / instrument utilisé.

IX. Contrôle qualité

Le plasma Von Willebrand Reference Plasma, Deficient est inclus dans le kit comme un contrôle anormal. La valeur du cofacteur de la Ristocétine de ce contrôle est inférieure à 30%. Lorsqu'il est utilisé à la place du plasma de test, il devrait engendrer une réduction de l'agrégation, une pente réduite et une valeur extrapolée de moins de 30% d'activité du cofacteur de la Ristocétine.

Si le plasma de référence de von Willebrand, Deficient ne mesure pas moins de 30%, répéter la courbe et le contrôle standard. Si le contrôle anormal est à nouveau faible, cela révèle une détérioration du réactif ou une erreur technique. Contacter Chrono-Log.

X. Limites

Le test du cofacteur la Ristocétine est considéré par de nombreux chercheurs comme l'un des tests les plus importants pour la maladie de von Willebrand. Cependant, un diagnostic complet et une détermination des variantes de cette coagulopathie nécessitent une évaluation d'autres facteurs, tels que le facteur VIII-RAG, l'activité VIII:C, le temps de saignement et les antécédents familiaux.

XII. Références

1. Weiss, H.J., Hoyer, L.W., Rickles, F.R., Varma, A. and Rogers, J.; J. Clin. Invest. 52:2708, 1973.
2. Morisato, D.K. and Gralnick, H.R.; Blood 55:9, 1980.
3. Olson, J.D., Brockway, W.J., Fass, D.N., Magnuson, M.A. and Bowie, E.J.W.; Am. J. Clin. Path. 63:210, 1975.
4. George, J.N., Nurdan, A.T. and Phillips, D.R.; N. ng. J. Med. 311:1084, 1984.
5. Allain, J.P., Cooper, H.A., Wagner, R.H., et al; J. ab. Clin. Med. 85:318, 1975.
6. Brinkhous, K.M., Graham, J.C., Cooper, H.A., Allain, J.P. and Wagner, R. H.; Thromb. Res. 6:267, 1975.
7. Ramsey, R. and Evatt, B.L.; Am. J.Clin. Path. 72:996, 1979.
8. National Committee for Clinical Laboratory Standards: Guidelines for the Standardized Collection, Transport and Preparation of Blood Specimens for Coagulation Testing and Performance of Coagulation Assays.
9. Am J Clin Pathol 1997; 107:105-110

Précautions

Chaque unité de plasma source, utilisée dans la préparation de ce produit a été testée par des méthodes approuvées par la FDA pour la présence d'anticorps contre le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) Type I et Type II, l'antigène de surface de l'hépatite B (HBsAg) ainsi que pour l'hépatite C (HCV) et a trouvé négatif (pas de réactivement à plusieurs reprises). Les donateurs ont été dépistés négatifs pour la maladie de Creutzfeldt-Jakob (MCJ) et la nouvelle variante de la maladie de Creutzfeldt-Jakob (nvCJD). Cependant, aucun test ne peut offrir une assurance complète que les produits issus du sang humain ne transmettront pas de maladies infectieuses. Comme pour tous les matériaux d'origine humaine, ce produit doit être traité comme un matériau potentiellement infectieux. Tous les déchets contenant du matériel biologique doivent être correctement étiquetés et stockés séparément des autres déchets. Éliminer tous les déchets conformément aux réglementations internationales, nationales et locales en vigueur.

Le test doit être utilisé conjointement avec les observations cliniques et les résultats d'autres tests de laboratoire.

Ce produit est garanti pour fonctionner conformément à son étiquetage et à sa littérature. Chrono-Log décline toute garantie implicite de qualité du produit ou du conditionnement physique à toute autre fin et, en aucun cas, Chrono-Log ne sera responsable des dommages consécutifs résultant de la garantie expresse susmentionnée.

Dosage du cofacteur Ristocétine Chrono-log

Exemple :

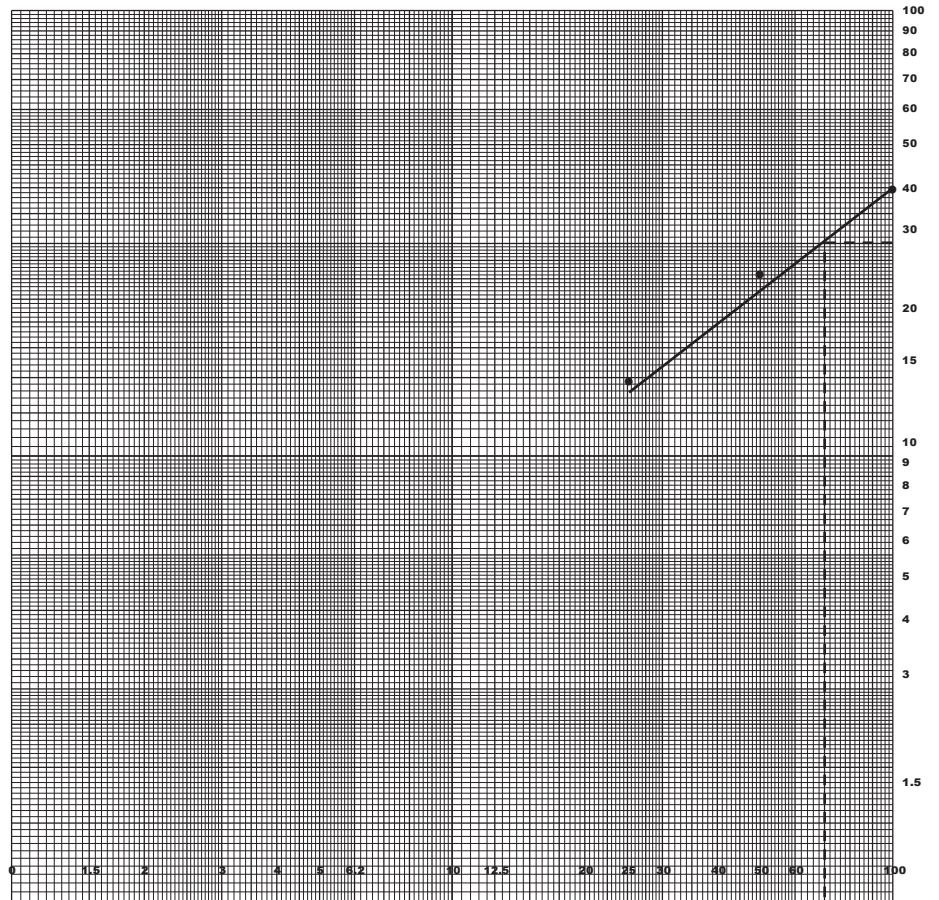
Plasma référence

Normal	Pente
100%	37
50%	24
25%	13

Test échantillon :

Pente : 30

Activité cofacteur ristocétine : 70 %
(Interpolé)



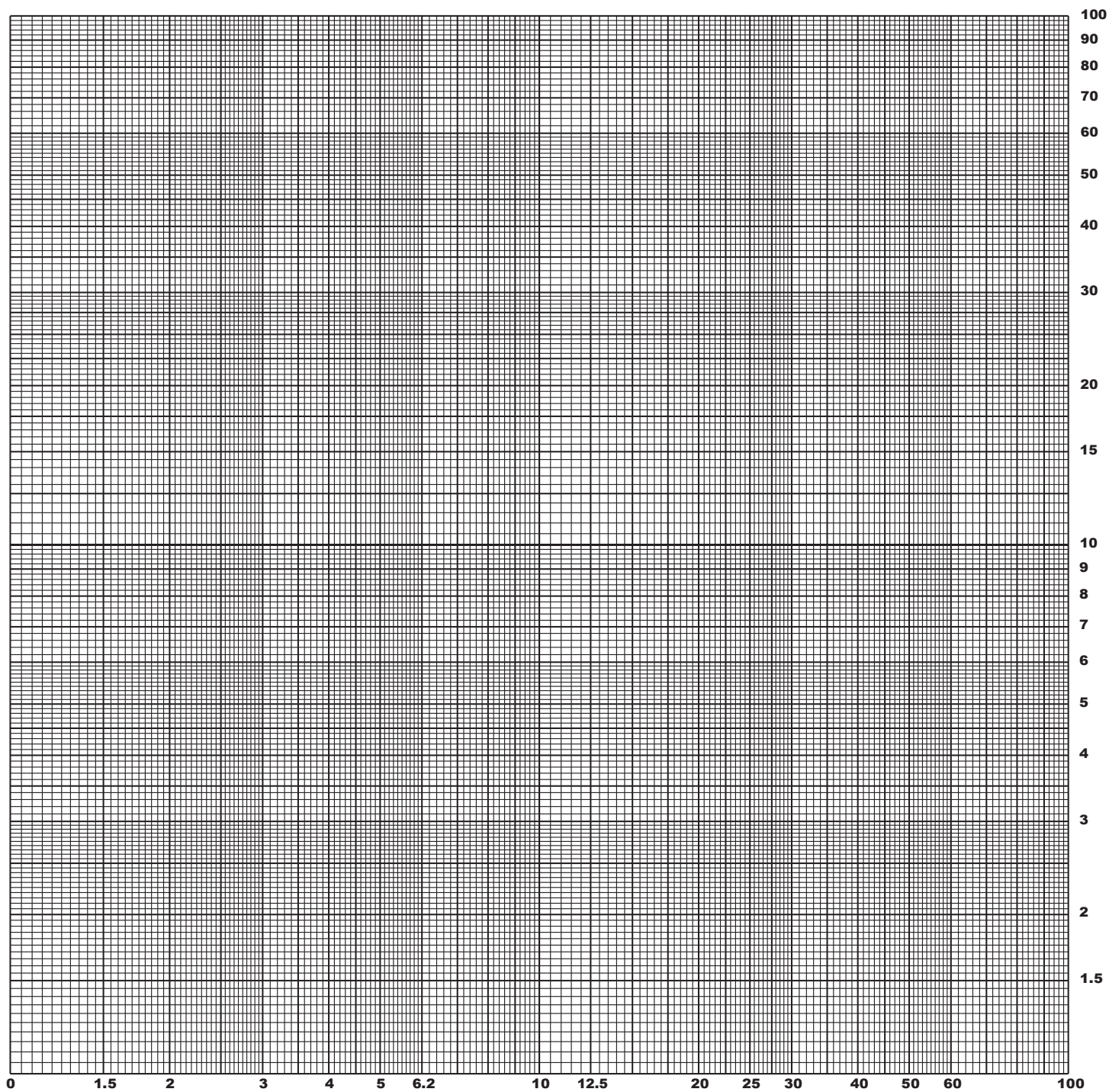
Activité cofacteur Ristocétine
(%)

Compte-rendu de résultat

Courbe standard	Pente	Id échantillon	Pente	Activité
100%	_____	1. _____	_____	_____
50%	_____	2. _____	_____	_____
25%	_____	3. _____	_____	_____
		4. _____	_____	_____
		5. _____	_____	_____

Dosage du cofacteur Ristocétine Chrono-log

(Voir l'inverse pour les calculs d'échantillons)



**Activité cofacteur Ristocétine
(%)**