

Ristocetin Cofactor Assay

Per la determinazione dell'attività del Cofattore Ristocetinico nel plasma citrato

Il kit determina l'attività in-vitro del fattore di von Willebrand, responsabile dell'agglutinazione delle piastrine in presenza di Ristocetina. Sebbene le piastrine giochino un ruolo passivo in tale agglutinazione, è necessario che i recettori Ristocetina-dipendenti siano intatti². La malattia di von Willebrand è associata a una diminuzione del fattore di von Willebrand o della sua attività. La determinazione dell'attività del cofattore della Ristocetina è il metodo in-vitro più usato per diagnosticare la malattia di von Willebrand.^{3,4} L'attività del cofattore della Ristocetina dipende dalla capacità del plasma e della Ristocetina di indurre agglutinazione in una sospensione standard di piastrine.^{5,7}

Dopo ricostituzione, le piastrine liofilizzate sono trattate con Ristocetina in presenza di diluizioni di plasma umano normale standardizzato, a titolo noto di attività del Cofattore Ristocetina. Si prepara così una curva Standard. Quindi si ripete il test con il plasma del paziente da studiare; l'attività del fattore di Willebrand viene determinato per interpolazione della curva standard.

Preparazione paziente: non sono richieste particolari preparazioni

Preparazione del campione:

- a) Anticoagulante: tampone sodio citrato, 3,8% o 3,2%.
- b) Raccolta del campione:
 - 1) ottenere sangue attraverso puntura venosa.
 - 2) Miscelare immediatamente 9 parti di sangue con 1 parte di anticoagulante, miscelare per inversione la provetta.
 - 3) Centrifugare a 1000 rpm per 15 minuti.
 - 4) Rimuovere il plasma sovrastante entro 60 minuti usando una pipetta in plastica e conservare in una provetta di plastica.

Conservazione: testare il campione di plasma entro 2 ore. In alternativa conservare congelato e congelare subito prima dell'uso.

Strumenti: Aggregometro Chrono-log con 1, 2 o 4 canali di tipo ottico; interfaccia AGGRO/LINK; software Chrono-log von Willebrand Assay

Preparazione del test:

1. Aprire il kit Chrono-log RISTOCETIN CO-FACTOR ASSAY e ricostituire i reagenti secondo le istruzioni

Reagenti contenuti nel kit:

- a) **Ristocetina (7,5 mg/vial):** conservare a 2°-8°C prima della ricostituzione. Ricostituire con 0,75 ml (750 µl) di acqua distillata ottenendo una concentrazione finale di 10 mg/ml. Lasciare a temperatura ambiente (21°C ± 4°C) per 20 minuti, agitando per inversione occasionalmente. Accertarsi che tutto il liofilo sia ben sciolto. Il reagente non utilizzato può essere conservato alla temperatura di -20°C o inferiore.
- b) **Piastrine umane liofilizzate, 6 ml.** Conservare a 2°-8°C prima della ricostituzione. Ricostituire con 6 ml di Tampone TBS. Lasciare riposare per 20 minuti prima di utilizzare. Agitare delicatamente per inversione prima di ogni uso. Dopo ricostituzione la sospensione è stabile per 30 giorni a 2°-8°C o per periodi più lunghi se congelata.
- c) **Plasma di riferimento von Willebrand, Normale.** Conservare a 2°-8°C prima della ricostituzione. Plasma umano standardizzato in forma liofila per l'attività del Cofattore Ristocetina, corrispondente a 1,0 ml. Ricostituire con 1,0 ml di acqua distillata. Lasciare 20 minuti a temperatura ambiente agitando qualche volta delicatamente per inversione. Assicurarsi che tutto il liofilo sia ben sciolto. Dopo ricostituzione stabile 4 ore a 2°-8°C o 30 giorni a -20°C.
- d) **Tampone Tris (TBS), 12 ml.** Conservare a 2°-8°C. Da usare per la ricostituzione delle piastrine umane liofilizzate e per la diluizione del plasma da testare e del plasma di riferimento. Non usare dopo la scadenza indicata sull'etichetta.
- e) **Plasma di riferimento per Emostasi, Normale, 1 ml.** Conservare a 2°-8°C prima della ricostituzione. Ricostituire una provetta alla volta con 1,0 ml di acqua distillata purissima. Lasciare 15-20 minuti a temperatura ambiente, agitando delicatamente per inversione prima dell'uso. Assicurarsi che tutto il liofilo sia ben sciolto. Poiché varia la stabilità delle singole proteine contenute in esso, si consiglia di usare il prodotto entro 1 ora dalla ricostituzione.
- f) **Plasma di riferimento per Emostasi, Patologico, 1 ml.** Conservare a 2°-8°C prima della ricostituzione. Ricostituire una provetta alla volta con 1,0 ml di acqua distillata purissima. Lasciare 15-20 minuti a temperatura ambiente, agitando delicatamente per inversione prima dell'uso. Assicurarsi che tutto il liofilo sia ben sciolto. Poiché varia la stabilità delle singole proteine contenute in esso, si consiglia di usare il prodotto entro 1 ora dalla ricostituzione.

2. Accendere l'aggregometro e aspettare 15 minuti affinché il sistema raggiunga la temperatura di lavoro o comunque fino a quando l'indicatore raggiunga i 37°C.

3. Accendere il computer e aprire il software AGGRO/LINK® vW Cofactor assay e seguire la procedura relativa alla creazione della curva standard: cliccare su **aggregometer** e **run standard** per richiamare la pagina relativa e riempire gli spazi richiesti.

Per una curva a 3 punti seguire il procedimento seguente:

- 1) Numero di standard **3** (minimo 3)
- 2) Numero di replicazioni dello standard **1**
- 3) Numero di replicazioni sconosciute **1**
- 4) Limite CV **10%**

- 5) Tempo corsa **3** minuti
- 6) Tempo di incubazione **120** secondi
- 7) Lotto Piastrine # **inserire il numero che si trova sul flacone**
- 8) Lotto del Plasma standard # **inserire il numero che si trova sul flacone**
- 9) Lotto Ristocetina # **inserire il numero che si trova sul flacone**
- 10) 100% attività = diluizione **1:2**
- 11) Diluizioni dello standard

1	1:2
2	1:4
3	1:8
4	N/A
5	N/A
6	N/A

4. A questo punto selezionare **save as current**, selezionare **aggregometer** dalla barra Menu e infine selezionare **run standard**: si aprirà sullo schermo un box con istruzioni per ogni canale.
 - Test ad un canale: Il box informativo relativo al canale 1 si installa automaticamente per la concentrazione 1:2. **Nota: ogni test completato viene salvato, il box si installerà quindi automaticamente per la concentrazione 1:4 e così via fino all'accettazione di tutti gli standard.**
 - Test a due canali: il box di istruzione del canale 1 si installa automaticamente per la concentrazione 1:2 e il box per il canale 2 si installa automaticamente per la concentrazione 1:4. **Nota: ogni test completato viene salvato, il box Canale 1 si setterà quindi automaticamente per la concentrazione 1:8.**
 - Test a quattro canali: il box di istruzione del Canale 1 si installa automaticamente per la concentrazione 1:2; il box Canale 2 si installa per la concentrazione 1:4 e il box Canale 3 si installa per la concentrazione 1:8. **Nota: Se si usano quattro canali, il box Canale 4 sarà settato automaticamente per la concentrazione 1:16.**
5. Predisporre 3 provette di plastica contrassegnate 100%, 50%, 25% per i tre punti della curva di calibrazione e 1 provetta di plastica per ogni campione da testare. Dispensare 200 ul di TBS (fornita con il kit) in ogni provetta.

Nelle provette dei campioni aggiungere 200ul del plasma da testare.

Nella provetta contrassegnata con 100% aggiungere 200 ul di plasma di riferimento (fornito con il kit), mescolare con cura, prelevare 200 ul del plasma diluito e aggiungerlo nella provetta contrassegnata 50%, mescolare con cura, prelevare 200 ul del nuovo plasma diluito e aggiungerlo nella provetta contrassegnata 25%.

6. Preparare 1 cuvetta per aggregometria contenente **250ul di TBS** e **250ul della sospensione di piastrine** da utilizzare come bianco.

NOTA – Se il modello di aggregometro in uso (come il Mod. 560CA) non è in grado di lavorare con un solo bianco, bisogna preparare e inserire negli appositi alloggiamenti un numero di bianchi pari al numero di canali. Preparare un lotto di bianco e poi ripartirlo nelle cuvette, in modo da avere lo stesso conteggio piastrinico (es. per preparare due bianchi miscelare 600 µl di TBS con 600 µl di piastrine ricostituite. Dispensare 500 µl nelle due cuvette e posizionarle negli alloggiamenti appropriati.)

7. preparare **3 cuvette** per aggregometria (per la curva standard) + **1 cuvetta** per ogni campione da testare con all'interno il magnetino e inserirle nei pozzetti da incubazione dello strumento.



8. Inserire la cuvetta contenente la TBS e le piastrine risospese nel pozzetto contrassegnato PPP

Curva Standard:

1. Per ogni punto della curva (canale 1,2,3 o 4), prelevare una cuvetta preincubata e pipettare 400 µl di piastrine ricostituite. Incubare per almeno 4 minuti nei pozzetti d'incubazione.
2. Dopo l'incubazione pipettare nelle cuvette 50 µl di Ristocetina. **Cliccare con il mouse su OK**. Il tempo di incubazione per il Canale 1 inizierà a scorrere.

NOTA: Ogni box informativo mostrerà la scritta: "**Insert sample with Stir Bar for Incubation and click 'OK'**". Il campione contiene 400 µl di Piastrine + 50 µl di Ristocetina + magnete.

NOTA: pulire il puntale della pipetta prima di inserirlo nel campione e pulire la cuvetta test prima di riporla nel pozzetto PRP.

3. Quando il periodo di incubazione per il Campione 1 sarà terminato, comparirà la seguente istruzione: "SET BASELINE, ADD PLASMA; CLICK OK". Seguire i passaggi sotto riportati. **Quando appare questa istruzione si attiva la traccia blu per il Canale 1 e si vedrà la corsa sullo schermo. Se dovesse servire più tempo per l'inizio del test, si può far ritornare la traccia all'inizio cliccando su RESET per il Canale 1.**
 - **Premere il tasto per la linea di base** del Canale 1 dell'aggregometro (tenere premuto per 2 secondi, quindi rilasciare)
 - **Miscelare** bene la provetta con il plasma di riferimento alla concentrazione 1:2 e quindi prelevarne 50 µl con la pipetta e aggiungere il plasma alla cuvetta test. **Nota: assicurarsi che il puntale sia immerso nel campione.**
 - **Cliccare con il mouse su OK** subito dopo l'aggiunta del plasma.
NOTA: se si ritarda questa operazione, il software non sarà in grado di calcolare la pendenza e il test dovrà essere ripetuto.
4. **Durante la corsa del primo test, preparare la cuvetta successiva aggiungendo 400 µl di piastrine in una cuvetta preriscaldata e riponendola nel pozzetto d'incubazione.**
5. Dopo che il campione nel Canale 1 ha corso per 3 minuti, il programma calcolerà la massima pendenza della curva e sul display nel box informativo del relativo canale comparirà la scritta MAX SLOPE = XXX. E' possibile ricalcolare la curva nel caso in cui ci siano dei valori aberranti: premere RECALC, quindi con il mouse posizionarsi sulla banda colorata relativa alla curva da modificare cliccando su di essa, poi posizionarsi su Recalc per avere la nuova curva. Questo passaggio può essere ripetuto più volte. Cliccare OK per procedere. A questo punto comparirà la scritta PRESS OK TO SAVE OR PRESS ABANDON MAX SLOPE = XXX. Premere OK per salvare. Abbandonare solo quando c'è un errore e quindi è necessario ripetere. Nell'incertezza salvare sempre; è sempre possibile tornare al test una volta visualizzata la curva di standard.
6. Ripetere tutti i passaggi per tutti i punti della curva standard.
Quando sono state calcolate tutte le curve relative agli standard, cliccare la lettera "M" sulla barra di lavoro. Questo permette al programma di ritornare al menu principale. Selezionare **standards** e **standards list** dal box di dialogo. Selezionare **view current** per visionare la curva con gli standard. Per vedere se la curva è ottimale è possibile visualizzare il coefficiente di determinazione (r^2), più è vicino a 1 migliore è la curva.

Test:

1. scegliere dal menu **aggregometer** e **run test** ed inserire i dati dei pazienti nelle apposite caselle.
2. Inserire nelle cuvette dei campioni da testare **400 ul di piastrine** risospese, incubare 4 minuti.
3. Dopo incubazione, aggiungere 50 µl di Ristocetina. Controllare se ci sono delle bolle d'aria e trasferire le cuvette nel pozzetto del PRP. Cliccare su **OK** per far partire il conteggio del tempo di incubazione. Dopo i 2 minuti di incubazione previsti dal programma comparirà l'istruzione seguente per il canale 1:

1) SET BASELINE 2) ADD PLASMA 3) PRESS OK

4. Premere il pulsante Set Baseline per il Canale 1 (tenere premuto per 2 secondi, quindi rilasciare) e dispensare **50 ul del campione del paziente precedentemente diluito**.
5. **Cliccare su OK**. Comparirà il messaggio RUNNING TEST e dopo 3 minuti calcolerà la pendenza e l'attività.

NOTA: se si ritarda questa operazione, il software non sarà in grado di calcolare la pendenza e il test dovrà essere ripetuto.

Dopo che il test ha corso per 3 minuti, il programma calcolerà la pendenza massima della curva e la visualizzerà nel box informativo come **MAX SLOPE = XXX**. E' possibile ricalcolare la curva nel caso in cui ci siano dei valori aberranti:

premere **RECALC**, quindi con il mouse posizionarsi sulla banda colorata relativa alla curva da modificare cliccando su di essa, poi posizionarsi su Recalc per avere la nuova curva. Questo passaggio può essere ripetuto più volte. Cliccare **OK** per procedere.

A questo punto comparirà la scritta **PRESS OK TO SAVE OR ABANDON**. Nel box informativo del Canale 1 verranno visualizzati i valori per la pendenza e per l'attività del fattore vW. Premere **OK** per salvare. Abbandonare solo quando c'è un errore e quindi è necessario ripetere

6. Ripetere i passaggi per ogni canale.

Il valore dell'attività del Cofattore della Ristocetina verrà calcolato automaticamente dal programma vW CoFactor Assay e una pagina contenente la curva del campione testato, i 3 punti della curva di calibrazione ed i relativi valori di slope e attività verrà proposta per la stampa.

I risultati vengono riportati come percentuale dell'attività del Fattore, calcolata per intersezione del valore della pendenza della curva del campione sulla retta di interpolazione degli standard.

NOTE:

Quando si utilizza il Chrono-log Cofactor Assay Kit si considerano anormali e quindi indicativi della malattia di von Willebrand curve che presentano valori inferiori al 40%. Tuttavia ogni laboratorio che utilizza il suo strumento con il kit deve stabilire i propri valori di normalità.

Il test per la determinazione dell'attività del cofattore della ristocetina (RiCof) è considerato da molti studiosi uno dei migliori test per la determinazione della malattia di von Willebrand. Tuttavia, per avere una diagnosi completa e per poter determinare le diverse forme di questa coagulopatia è necessaria la valutazione di altri fattori, come l'attività del Fattore VIII-Rag e VIII-C, il tempo di sanguinamento e la storia famigliare.

CONSIGLI TECNICI:

Assicurarsi che i circuiti ottici siano calibrati in modo appropriato (auto calibrazione)

Miscelare il plasma di controllo o il plasma dei pazienti completamente prima dell'uso

assicurarsi di usare garze orlate asciutte e pulite per pulire le cuvette prima di porle nei pozzetti di lettura.

usare sempre puntali puliti per ogni serie di diluizione e assicurarsi che siano sempre puliti prima di dispensare il liquido.

Se l'aggregometro richiede 2 bianchi, prepararli entrambi dallo stesso campione per non avere differenze nella conta piastrinica.

Se bisogna eseguire test per un periodo molto lungo, agitare il bianco ogni tanto.

BIBLIOGRAFIA:

1. Weiss HJ, Hoyer LW, Rickles FR, Varma A e Rogers J.: J. Clin. Invest. 52:2708, 1973
2. MorisatoDK e Grainick HR.: Blood 55:9, 1980
3. Olson JD, Brockway WJ, Fass DN, Magnuson MA e Bowie EJW: Am. J. Clin. Path. 63:210, 1975
4. George JN, Nurden AT e Phillips DR: N. Eng. J. Med. 311:1084, 1984
5. Allain JP, Cooper HA, Wagner RH e coll.: J. Lab. Clin. Med. 85:318, 1975
6. Brinkhous KM, Graham JC, Cooper HA, Allain JP e Wagner RH: Thromb. Res. 6:267, 1975
7. Ramsey R e Evatt BL: Am. J. Clin. Path. 72:996, 1979
8. Favaloro EJ, Koutts J: Laboratory Assays for von Willebrand Factor: Relative Contribution to the Diagnosis of von Willebrand's Disease.