

CHRONO-PAR® ADP

Per la valutazione dell'aggregazione piastrinica su sangue intero e su PRP indotta da ADP

INTRODUZIONE

Il reagente CHRONO-PAR® ADP è usato per confermare la normale funzione piastrinica e per diagnosticare disfunzioni piastriniche. CHRONO-PAR® ADP è adatto per l'utilizzo sia con sangue intero che con plasma ricco in piastrine (PRP).

Lo studio dell'aggregazione su PRP è basato sulla valutazione delle variazioni di trasmittanza in un campione di plasma durante l'aggregazione.

Lo studio dell'aggregazione su sangue intero è basato sulla valutazione delle variazioni della resistenza elettrica in un campione di sangue durante l'aggregazione. Due elettrodi immersi nel campione al primo contatto con il sangue vengono rapidamente rivestiti da piastrine che al microscopio elettronico appaiono disposte in un monostrato. All'aggiunta dell'agente aggregante nuove piastrine aggregano alle piastrine del monostrato che ricopre gli elettrodi, determinando un aumento dell'impedenza fra i due elettrodi.

PRINCIPIO DEL TEST

Nel PRP, l'ADP a basse concentrazioni (<1 µM), induce un'aggregazione primaria indotta dall'ADP esogeno seguita da disaggregazione.

A concentrazioni più elevate, pari a 1-5 µM, il rilascio di ADP endogeno si manifesta in una seconda onda di aggregazione, spesso visibile, (curva bifasica) che è irreversibile. L'aggregazione della seconda ondata richiede il rilascio di ADP endogeno e la sintesi di trombossano A2 ed è influenzata dagli inibitori della cicloossigenasi come l'aspirina.

L'aggregazione con ADP nel sangue intero richiede concentrazioni più elevate di ADP (tipicamente da 5 a 20 µM).

CONTENUTO DELLA CONFEZIONE

ADP: 2,5 mg di una preparazione liofilizzata di adenosina difosfato.

MATERIALE RICHIESTO MA NON FORNITO

1. Aggregometro
2. Cuvette
3. Barre di agitazione
4. Micropipette – da 0.5 a 100 µL per i reagenti
5. Pipette – da 100 µL a 1 mL
6. Soluzione salina fisiologica sterile per irrigazione (0.85% o 0.9% w/v) per la diluizione dei reagenti CHRONO-PAR® e per la diluizione dei campioni di sangue intero.

NOTA: Evitare la soluzione salina fisiologica della banca del sangue perché potrebbe avere un'osmolarità non corretta. I diluenti per contatori cellulari non sono adatti perché contengono EDTA, che inibisce l'aggregazione piastrinica. Le soluzioni saline per infusione non sono adatte perché contengono alcool benzilico o altri conservanti/additivi. Tali conservanti inibiscono la funzione piastrinica.

7. Ghiaccio per mantenere alla giusta temperatura i reagenti di lavoro ricostituiti
8. Salviette Kimwipes monouso (non utilizzare salviette di carta monouso)
9. Provette di plastica a fondo conico
10. Elettrodi (multiuso)
11. Elettrodi (monouso)

vedi il Manuale dello strumento per Istruzioni dettagliate

PREPARAZIONE del REAGENTE e STABILITA' del REATTIVO di LAVORO

Picchiettare delicatamente la fiala per far scendere il contenuto sul fondo. Ricostituire con 5 mL di soluzione salina per irrigazione. Lasciare riposare per 10 minuti capovolgendola di tanto in tanto.

PROCEDURE

Le procedure per l'esecuzione dei test di aggregazione piastrinica con gli aggregometri CHRONO-LOG:

- Aggregazione su sangue intero
- Aggregazione su sangue intero con rilascio di ATP
- Aggregazione ottica con PRP
- Aggregazione ottica con rilascio di ATP

sono descritte nel manuale d'uso degli strumenti e possono essere richieste, in lingua italiana, all'indirizzo mktg@masciabrunelli.it

RACCOLTA DEI CAMPIONI DEL PAZIENTE E DEL CONTROLLO NORMALE: raccogliere i campioni di controllo normali, privi di farmaci noti per influenzare le piastrine, e i campioni del paziente, in provette sterili sottovuoto con un rivestimento impermeabile contenenti un volume pari a 1/10 di sodio citrato tamponato al 3,2%. Prelevare 20-30 mL di sangue per il test su PRP o 5-10 mL di sangue per il test su sangue intero. Nel sangue intero, piccole quantità di ADP rilasciate dai globuli rossi durante il prelievo possono causare un effetto desensibilizzante. Si raccomanda pertanto di ritardare il test con ADP di 20-30 minuti dopo il prelievo venoso.

INDICAZIONI GENERALI PER L'ESECUZIONE DEL TEST DI AGGREGAZIONE PIASTRINICA INDOTTA DA ADP:

Nella norma L'ADP induce

- Nel PRP una reazione irreversibile e normale secrezione di ATP per concentrazioni che vanno da 5 a 10 µM.
- Nel sangue intero una reazione irreversibile e normale secrezione di ATP per concentrazioni che vanno da 5 a 20 µM.

Ref.	Descrizione	Volume/conf	Conc. Stock WB/PRP	Conc. finale		Volume per test		Test per conf.	
				WB*	PRP**	WB*	PRP**	WB	PRP
384	ADP	5 mL	1 mM	10 µM	10 µM	10 µL	5 µL	500	1000

*WB = sangue intero: in 1 mL di campione (500 µL di sangue intero+500 µL di soluzione salina)

- * WB-Lumi (Sangue intero): 1 mL di campione = 450 µL di sangue intero + 450 µL di soluzione salina + 100 µL di Chrono-lume
- ** PRP-Lumi: 500 µL di campione = 450µL di PRP + 50µL di Chrono-lume

È importante che la punta della micropipetta sia **immersa** nel campione e che il reagente venga aggiunto con decisione. NON introdurre il reagente nella cuvetta al di sopra del campione né farlo scorrere lungo la parete, poiché il reagente aderirà alla parete della cuvetta e non si mescolerà adeguatamente con il campione.

NOTA: per risultati migliori, tenere il reagente di lavoro ricostituito in ghiaccio.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Le curve di aggregazione e di secrezione di ADP nel sangue intero e nel PRP possono essere interpretate:

- Con confronto diretto con un controllo normale privo di farmaci, che fornisce anche un controllo di qualità in tempo reale.
- Confrontando i risultati con valori normali pubblicati che possono essere verificati e riprodotti da qualsiasi laboratorio.
- Sia nel PRP che nel sangue intero, l'ADP espone il sito di legame del fibrinogeno sul complesso glicoproteico di membrana GPIIb/IIIa. Il test di aggregazione viene in genere eseguito nel PRP con concentrazioni comprese tra 1 µM e 10 µM. A concentrazioni inferiori, fino a 3 µM, una prima onda di aggregazione sarà seguita da disaggregazione. A concentrazioni più elevate, la prima onda di aggregazione si fonderà con la seconda, mascherando l'onda bifasica. Spesso è necessario eseguire test dose-risposta con concentrazioni multiple per ottenere una risposta bifasica (non richiesto con Luminescence). Il test di aggregazione viene in genere eseguito su sangue intero con concentrazioni che vanno da 5 µM a 20 µM. L'effetto dell'aspirina può essere osservato con concentrazioni intermedie, come 5 µM. Il farmaco antiaggregante Plavix inibisce l'aggregazione a concentrazioni di ADP comprese tra 5 µM e 20 µM.
- L'ADP ha la risposta più debole nel sangue intero e richiede concentrazioni più elevate, pari a 10 o 20 µM. Tipicamente utilizzato nell'aggregometria ottica per rilevare l'aggregazione della seconda onda. Il rilascio normale di ATP è relativamente basso (0,3 +/- 0,2 con 5 µM) ed è <0,1 in caso di aspirina, tromboastenia o difetti del pool di stoccaggio.

LIMITI DEL METODO

- Il test deve essere effettuato entro 3 ore dal prelievo.
- Molti farmaci inibiscono la funzionalità piastrinica. A meno che lo scopo del test non sia quello di dimostrare l'inibizione indotta da un farmaco, i pazienti non devono assumere farmaci noti per influenzare le piastrine per due settimane prima dell'esecuzione del test.
- Con un conteggio piastrinico inferiore a 200.000/µL, l'aggregazione indotta da ADP nel sangue intero deve essere effettuata sul campione INDILUITO
- L'aggregazione indotta da ADP con Luminescenza nel sangue intero, deve essere eseguita su un campione non diluito quando la conta piastrinica è inferiore a 225.000/µL.
- Per confermare la diagnosi devono essere prese in considerazione ulteriori valutazioni cliniche e di laboratorio.

CONTROLLO QUALITÀ

È buona prassi di laboratorio eseguire un test su un donatore normale, che non assuma farmaci noti per influenzare le piastrine, ogni volta che i reagenti vengono ricostituiti o scongelati.

CONSERVAZIONE E SCADENZA

Reagente liofilo: dopo il ricevimento conservare sotto gli 0°C fino alla data di scadenza stampata sull'etichetta.

Reagente ricostituito: la soluzione può essere conservata per 1 anno o fino alla data di scadenza a -70°C suddivisa in aliquote di dimensioni opportune alla propria routine di lavoro.

Soluzione di lavoro: una volta scongelata la soluzione è stabile per 8 ore a 2-8°C.

NOTA: Tutti i reagenti CHRONO-PAR® dovrebbero essere scongelati a temperatura ambiente o scaldandoli con le mani e non dovrebbero essere posti in un bagnomaria a caldo.

NOTA: i reagenti CHRONO-PAR possono essere spediti a temperatura ambiente. Una volta ricevuto il prodotto conservarlo come indicato in etichetta.

VALORI NORMALI

Valori normali in Plasma Ricco in Piastrine (Media +/- 1 SD)			
Reagente	Conc.	Agg. (%) ²	ATP (nmole)
ADP	5 µM	69-88	0,41-0,63 ²
	10 µM	71-88	0,5-1,06 ⁹
Valori normali in Sangue intero (Media +/- 2 SD)			
Reagente	Conc.	Agg. (ohms) ¹⁶	ATP (nmole) ¹⁶
ADP	5 µM	5-26	0,11-2,0
	10 µM	6-33	0,21-1,9

CALCOLO del RILASCIO di ATP

Il software AGGROLINK® calcola il rilascio di ATP. Se viene usato un registratore a carta utilizzare la seguente formula per il calcolo:

$$\frac{\text{Luminescenza del test}}{\text{Gain del test}} \times \frac{\text{Gain dello standard}}{\text{Luminescenza dello standard}} \times 2 \text{ nmoli}$$

NOTA: I seguenti intervalli di normalità sono stati ottenuti da vari laboratori e pubblicazioni. Devono essere utilizzati solo come linee guida. **Ciascun laboratorio dovrebbe stabilire i propri intervalli di riferimento per l'aggregazione e il rilascio di ATP utilizzando un numero adeguato di campioni normali.**

RISULTATI ATTESI

RELAZIONE tra AGGREGAZIONE e DIFETTI PIASTRINICI SELEZIONATI					
Reagente	Conc. Finale	Assunzione di Aspirina*	Von Willebrand & Bernard Soulier	Storage Pool / Difetti di secrezione	Tromboastenia di Glanzmann
ADP	5-20 µM	N-R*	N	N-R*	A

* Seconda onda inibita

REALIZIONE tra SECREZIONE di ATP e DIFETTI PIASTRINICI SELEZIONATI					
Reagente	Conc. Finale	Assunzione di Aspirina **	Von Willebrand & Bernard Soulier	Storage Pool // Difetti di secrezione *	Tromboastenia di Glanzmann
ADP	5-20 µM	A-R	N	A-R	A

LEGENDA: A – assente; N – normale; R – ridotta. (rispetto a Intervalli Normali)**BIBLIOGRAFIA**

- Ingerman-Wojenski CM and Silver MJ: A Quick Method for Screening Platelet Dysfunctions Using the Whole Blood LumiAggregometer. Thromb Hemostas 51-2 (154-156) 1984.
- White M MC, Jennings LK: Platelet Protocols: Research and Clinical Laboratory Procedures. Academic Press, 1999.
- Podczasy JJ, Lee J, Vucenik I: Evaluation of Whole-Blood Lumiaggregation. Clin Appl. Thrombosis/Hemostasis, 3(3):190-195, 1997.
- Sweeney JD, Hoernig LA, Michnik A and Fitzpatrick JE: Whole Blood Aggregometry. Influence of Sample Collection and Delay in Study Performance on Test Results. Am J Clin Pathol 1989; 92:676-679.
- Feinman RD, Detwiler TC and Ingerman-Wojenski C: The Lumi-Aggregometer as a Research and Clinical Tool. The Plts.: Physiology and Pharmacology. Copyright 1985 by Academic Press, Inc.
- Sirridge, M: Laboratory Evaluation of the Bleeding Patient. Clinics in Laboratory Medicine, Vol. 4, No. 2, June 1984.
- Nieuwenhuis HK, Akkerman J-W N and Sixma JJ: Patients With a Prolonged Bleeding Time and Normal Aggregation Tests May Have Storage Pool Deficiency: Studies on One Hundred Six Patients. Blood 70-3 (620-623) 1987.
- Sweeney JD, Hoernig LA and Fitzpatrick JE: Whole Blood Aggregation in von Willebrand Disease. Am J Hematol 32: 190-193 (1989).
- Philipp CS, Dilley A, Miller CH, Evatt B, Baranwal A, Scheartz R, Bachmann G and Saidi P: Platelet functional defects in women with unexplained menorrhagia. JTH, 1:477-484.
- Sweeney JD, Hoernig LA, Behrens AN, Novak E, and Swank RT: Von Willebrand's Variant (type II Buffalo). American Journal of Clinical Pathology Vol. 93, No. 4, (522-525) 1990.
- Miller JL: Platelet-Type von Willebrand's Disease. Thrombosis and Hemostasis Vol. 7, No. 4, 1985.
- Taylor ML, Misso NLA, Stewart GA, Thompson PJ: The effects of varying doses of aspirin on human platelet activation induced by PAF, Collagen and arachidonic acid. Br J Clin Pharmac., (1992), 33, 25-31.
- Ingham Medical Center, Lansing, MI.
- Riess H, Braun G, Brehm G and Hiller E.: Critical Evaluation of Platelet Aggregation in Human Whole Blood. Am J Clin Pathol. Vol. 85, No. 1, (50-56) 1986.
- Gengo FM, Rainka M, Robson M, Gengo MF, Forrest A, Hourihane M and Bates V: Prevalence of Platelet Nonresponsiveness to Aspirin in Patients Treated for Secondary Stroke Prophylaxis and in Patients with Recurrent Ischemic Events. Jnl of Clin Pharmacology, Vol 48 No 3, 335-343, 2008.
- Pyle-Eilola, Amy L.; Carter, Chris M.; Cucci, Jodi; Chandler, Wayne L: Establishment of Reference Internals for Whole Blood Luminescent Platelet Aggregometry. AACC 2017 Poster.

Per ulteriori informazioni si rinvia al Manuale d'uso dello strumento corrispondente

Produttore/Fornitore: **Chrono-log Corp.**
2 West Park Road
Havertown, PA 19083, USA
FAX 610-853-3972
E-MAIL chronlog@chronolog.com
Web: <http://www.chronolog.com>**EC REP****BioTop Medical****Importatore/Distributore:** **Mascia Brunelli**Viale Monza 272
20128 Milano
Tel. 02-25209.1,
E-MAIL: info@masciabrunelli.it
Web: <http://www.masciabrunelli.it>