

CHRONO-PAR® COLLAGEN

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

INTRODUZIONE

I reagenti CHRONO-PAR® e CHRONO-LUME® sono usati per confermare la normale funzione piastrinica e per diagnosticare disfunzioni piastriniche.

I reagenti sono adatti 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

Quando il Collagene viene aggiunto al plasma ricco di piastrine o al sangue intero, esso stimola le piastrine a modificare la propria forma e ad aderire al collagene stesso. Le piastrine attivate rilasciano ADP endogeno e vanno incontro ad aggregazione. Subito dopo l'aggiunta di Collagene si ha una *fase di latenza* durante la quale esso polimerizza in fibrille che stimolano l'attivazione delle piastrine.

Il collagene a bassa concentrazione (1-2 µg/mL) è inibito dagli inibitori della ciclossigenasi, come l'aspirina; normalmente, concentrazioni più elevate (5 µg/mL) non ne sono influenzate.

CONTENUTO DELLA CONFEZIONE

Collagen (1 mL): sospensione contenente 1 mg/mL di fibrille di collagene native da tendine equino (tipo 1) in soluzione isotonica di glucosio, pH 2,7

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 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 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. Acqua purificata – o acqua distillata sterile per irrigazione per la diluizione dei reagenti CHRONO-PAR®

NOTA: deve essere priva di pirogeni (ATP free) per la ricostituzione dei reagenti e non deve contenere conservanti come alcol benzilico che inibisce la funzione piastrinica. Non utilizzare acqua proveniente da un sistema Millipore.

8. Ghiaccio per il mantenere alla giusta temperatura i reagenti di lavoro ricostituiti
9. Panni monouso asciutti
10. Provette di plastica a fondo conico
11. Elettrodi (multiuso)
12. Elettrodi (monouso)

vedi il Manuale dello strumento per Istruzioni dettagliate

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.

PREPARAZIONE del REAGENTE e STABILITA' del REATTIVO di LAVORO

Il reagente può essere utilizzato tal quale come fornito. Invertire o agitare il flaconcino prima dell'uso poiché le fibrille di collagene sono in sospensione. **Non congelare.** Se richiesto, il collagene può essere ulteriormente diluito con la soluzione di glucosio isotonica a pH 2,7.

NOTA: A causa del pH molto basso, gli organismi non crescono facilmente nella soluzione di collagene nella confezione originale. Se si utilizzano tecniche asettiche (siringa e ago sterili per trasferire in una provetta conica da microcentrifuga la quantità di reagente che serve per un giorno di lavoro), il reagente rimanente, conservato a 2 - 8°C, è stabile fino alla data di scadenza. Mettere del parafilm sia sulla fiala originale che sull'aliquota.

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 mkto@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.

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

Nella norma Il collagene induce aggregazione piastrinica e rilascio di ATP in concentrazioni comprese tra 1 e 5 µg/mL

Nella tabella, un esempio di volumi per l'esecuzione del test di aggregazione con conc. finale di 2 µg/mL con il reagente INDILUITO

Ref.	Descrizione	Volume/conf	Conc. Stock WB/PRP	Conc. finale WB/PRP	Volume per test		Test per conf.	
					WB*	PRP**	WB	PRP
385	Collagen	1.0 mL	1 mg/mL	2 µg/mL	2 µL	1 µL	500	1000

*WB = sangue intero: in 1 mL di campione (500 µL di sangue intero+500 µL di fisiologica oppure 450 µL di sangue intero+450 µL di fisiologica+100 µL di Chrono- Lume se si effettua il test del rilascio di ATP)

**In 500 mL di PRP (450 mL PRP+ 50 mL Chrono-Lume se si effettua il test del rilascio di ATP)

Poiché ogni test richiede solo microvolumi di reagente, è essenziale evitare l'introduzione di reagente in eccesso. Pertanto, rimuovere il reagente in eccesso che aderisce all'esterno del puntale pulendo l'esterno del puntale della micropipetta dopo aver prelevato il reagente.

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 ATP 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.

Nell'interpretazione dei risultati tenere conto dei seguenti fattori:

- Il Collagene e l'Acido Arachidonico rilasciano ATP in quantità pari o superiore al 50% di quello rilasciato in risposta alla Trombina. L'ADP e l'epinefrina inducono un minor rilascio di ATP.
- In uno studio condotto su 106 pazienti con Storage Pool Deficiency (SPD), il 23% presentava risposte di aggregazione ottica (PRP) normali ad ADP, epinefrina e collagene, mentre il 44% presentava anomalie di aggregazione varie. Gli autori hanno concluso che la SPD è comune, eterogenea e non necessariamente associata ad anomalie di aggregazione ottica (PRP)⁷.
- La misurazione simultanea dell'aggregazione e del rilascio di ATP fornisce una prova inequivocabile della secrezione dei granuli densi⁵. Il valore soglia sotto il quale si dovrebbe considerare la presenza di SPD è stato riportato come inferiore a 0,5 nmoli di ATP in risposta a 1U di Trombina⁴.

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 225.000/µL, l'aggregazione indotta da ADP nel sangue intero deve essere effettuata sul campione INDILUITO
- Per confermare la diagnosi devono essere prese in considerazione ulteriori valutazioni cliniche e di laboratorio.

CONTROLLO QUALITA'

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

Dopo il ricevimento conservare a 2-8°C fino alla data di scadenza stampata sull'etichetta.

Aliquote di reagente prelevate dal flacone e poste in provette da microcentrifuga coniche, sono stabili per una settimana a 2-8°C chiuse con parafilm.

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)
Collagene	2 µg/mL	70 – 94	0.74 – 1.92 ⁹
Valori normali in Sangue intero (Media +/- 2 SD)			
Reagente	Conc.	Agg. (ohms) ¹⁶	ATP (nmole) ¹⁶
Collagene	1 µg/mL	12 – 33	0.43 – 2.2

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.

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:

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

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
Collagene	1, 2, 5 µg/mL	1,2 µg/mL	5 µg/mL	N	N	A
		R	N			

* Risposta tipica di donatori che assumono 250 mg di aspirina.¹²

REALZIONE 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
Collagene	1 – 5 µg/mL	R	N	A,R	R

* Concentrazioni più elevate di qualsiasi agonista, compresa la trombina fino a 5 unità, indurranno la secrezione di ATP con un difetto della secrezione, ma non con un difetto tipo Storage Pool.⁵

** Risposta tipica di donatori che assumono 250 mg di aspirina.¹²

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, Dille 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 Pharmacol., (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>