

## CHRONO-PAR® ARACHIDONIC ACID

Per la valutazione dell'agglutinazione piastrinica su sangue intero e su PRP indotta da Acido Arachidonico

### INTRODUZIONE

Il reagente CHRONO-PAR® Arachidonic Acid è usato per confermare la normale funzione piastrinica e per diagnosticare disfunzioni piastriniche.

Il reagente 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

L'Acido Arachidonico nei soggetti normali induce una reazione irreversibile e rilascio di ATP alla concentrazione 0,5 mM nel sangue intero e a concentrazioni che vanno da 0,5 a 1,0 mM nel PRP.

L'aggregazione con stimolo di Acido Arachidonico rappresenta un test diretto per la sintesi dei prostanoidei poiché richiede la conversione in trombassano A2 da parte della cicloossigenasi, un processo inibito dall'aspirina. Risposte ridotti o assenti indicano spesso l'assunzione di aspirina nei giorni precedenti all'esame.

### CONTENUTO DELLA CONFEZIONE

**AA:** 10 mg (minimo) di acido arachidonico con una purezza superiore al 99%

**Albumina:** 100 mg di albumina bovina, frazione V, in polvere. Purezza 96-99%

### MATERIALE RICHIESTO MA NON FORNITO

1. Aggregometro
2. Cuvette
3. Barre di agitazione
4. Micropipette – da 0.5 a 10 µL per i reagenti
5. Pipette 10-100µL
6. Pipette – da 100 µL a 1 mL
7. Soluzione salina sterile per irrigazione (0.85% o 0.9% w/v) per la diluizione dei campioni di sangue intero; e per la ricostituzione dell'acido arachidonico.

NOTA: Evitare la soluzione salina 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.

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

vedi il Manuale dello strumento per Istruzioni dettagliate

### PREPARAZIONE del REAGENTE e STABILITA' del REATTIVO di LAVORO

Picchiettare delicatamente il contenuto sul fondo della fiala di albumina. Rimuovere il tappo e ricostituire l'albumina con 1 mL di soluzione salina fisiologica per irrigazione. Lasciare riposare, quindi vortexare di tanto in tanto. Attendere da 15 a 30 minuti affinché l'albumina si dissolva completamente (controllare visivamente) e capovolgere delicatamente per sciogliere anche l'albumina presente nel tappo.

L'acido arachidonico nella fiala è una goccia oleosa, che deve essere picchiettata sul fondo della fiala. Rompere la punta della fiala con il Cap Cracker™ fornito. Pipettare l'albumina ricostituita sia nella punta che nel corpo della fiala in aliquote da 100 µL fino a un volume totale di 700 µL. Mescolare l'acido arachidonico all'interno della punta o del corpo della fiala ruotando la fiala durante l'aggiunta dell'albumina. Ripetere l'operazione alcune volte in ogni sezione della fiala, quindi mescolare energicamente la sospensione utilizzando una pipetta da trasferimento. Unire la sospensione nella punta con quella nel corpo della fiala e continuare a mescolare fino a raggiungere la massima torbidità. Trasferire il reagente nella provetta da microcentrifuga e agitare alla massima velocità per 5 minuti. Il reagente ricostituito dovrebbe apparire molto lattiginoso con numerose piccole bolle. Agitare al vortex per 2 minuti appena prima di eseguire il test.

### 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](mailto: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%. Per l'esecuzione di un pannello di aggregazione di base con i diversi agonisti, 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 ACIDO ARACHIDONICO:

Nella norma l'Acido Arachidonico induce una reazione irreversibile e rilascio di ATP alla concentrazione 0,5 mM nel sangue intero e a concentrazioni che vanno da 0,5 a 1,0 mM nel PRP.

Ref.	Descrizione	Volume/conf	Conc. Stock WB/PRP	Conc. finale		Volume per test		Test per conf.	
				WB*	PRP**	WB*	PRP**	WB	PRP
390	Arachidonic Acid	0,7 mL	50 mM	0,5 mM	0,5 mM	10 µL	5 µL	70	140

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

WB-Lumi = Sangue intero: in un campione da 1 mL (450 µL di sangue intero + 450 µL di soluzione fisiologica e 100 µL di Chrono-lume) (1 mL di campione di WB non diluito per campioni con bassa conta piastrinica come descritto nelle linee guida sulla conta piastrinica, nelle procedure WB e WB-Lumi)

\*\*In 500 di PRP

In PRP-Lumi (450uL PRP +50uL 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 e al riparo dalla luce.

### INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Le curve di aggregazione e secrezione di ATP con stimolo di Acido Arachidonico 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.
- L'acido arachidonico viene convertito in trombassano A2 in presenza di cicloossigenasi. L'aspirina inibisce la via della cicloossigenasi, causando una significativa riduzione dell'aggregazione con questo agonista. Un'aggregazione normale si osserva con concentrazioni comprese tra 0,5 mM e 1,0 mM. L'aspirina inibisce la via della cicloossigenasi, causando una significativa riduzione dell'aggregazione con questo agonista. Risposte intermedie tra assenza di aggregazione e il range di normalità indicano spesso l'assunzione di farmaci nei giorni precedenti. Altri difetti nella sintesi del trombassano daranno un quadro simile all'inibizione della cicloossigenasi.
- L'acido arachidonico è particolarmente utile per rilevare difetti simili a quelli indotti dall'aspirina. L'aggregazione e la secrezione in risposta all'acido arachidonico dipendono completamente dalla sintesi del trombassano. L'assenza di aggregazione e di secrezione in risposta all'acido arachidonico conferma un'alterazione della sintesi del trombassano. L'aggregazione ma non la secrezione possono essere indicative di una carenza dei granuli di deposito o di un difetto di secrezione.

### 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 100.000/µL, l'aggregazione indotta da AA nel sangue intero deve essere effettuata sul campione INDILUITO
- L'aggregazione indotta da AA con Luminescenza nel sangue intero, deve essere eseguita su un campione non diluito quando la conta piastrinica è inferiore a 125.000/µL.
- 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

**Reagenti liofilici: Albumina:** dopo il ricevimento conservare a 2-8°C fino alla data di scadenza stampata sull'etichetta.

**Goccia oleosa di AA:** conservare a T ≤ -20°C fino alla data di scadenza.

**Reagente ricostituito:** la soluzione può essere conservata **al buio** in aliquote da 100 µL per 3 mesi a -70°C o per 1 mese a -20°C

Le aliquote possono essere scongelate tenendole in mano e devono essere risospese energicamente per 2 minuti con un agitatore vortex appena prima dell'uso.

**Soluzione di lavoro:** una volta scongelata la soluzione è stabile per 8 ore a 2-8°C al riparo dalla luce perché l'albumina è fotosensibile.

**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. (%) <sup>2</sup>	ATP (nmole)
Acido Arachidonico	0.5 mM	74 – 99 <sup>9**</sup>	0.56 - 1.40 <sup>9</sup>
Valori normali in Sangue intero (Media +/- 2 SD)			
Reagente	Conc.	Agg. (ohms) <sup>16</sup>	ATP (nmole) <sup>16</sup>
Acido Arachidonico	0.5 mM	7-29	0.45 – 2.7

(\*\* +/- 2 SD)

**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
Acido Arachidonico	0.5 mM	A	N	N	A

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
Acido Arachidonico	0.5 mM	A	N	A,R	R

**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 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. *Jrnl 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](mailto: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](mailto:info@masciabrunelli.it)  
 Web: <http://www.masciabrunelli.it>