

CHRONO-PAR® EPINEPHRINE

Per la valutazione dell'agglutinazione piastrinica PRP indotta da Epinefrina (Adrenalina)

INTRODUZIONE

I reagenti CHRONO-PAR® Epinefrina è usato 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

L'Epinefrina induce aggregazione irreversibile e rilascio di ATP nel PRP ad una concentrazione tra 5 e 10 μM . Nel sangue intero si **PUO'** osservare una aggregazione normale e rilascio di ATP alla concentrazione 50 μM , tuttavia l'epinefrina non è raccomandata come agonista standard per i test su sangue intero in ambito clinico, poiché meno del 50% dei pazienti risponde a questo agonista.

Nel PRP concentrazioni $\geq 5 \mu\text{M}$ producono una curva bifasica con seconda onda dipendente dalla sintesi del trombossano A2.

Con questo agonista non si osserva il cambiamento di forma.

NOTA: i soggetti normali presentano una variabilità considerevole che non è correlata all'età, al sesso, allo stress, alla dieta, alla conta piastrinica o all'ematocrito.

CONTENUTO DELLA CONFEZIONE

Preparazione liofilizzata di bitartrato di 1-epinefrina con stabilizzanti.

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 – da 10 a 100 μL per i Chrono-lume®
6. Pipette – da 100 μL a 1 mL
7. Soluzione salina fisiologica sterile per irrigazione (0.85% o 0.9% w/v); acqua purificata per la diluizione del reagente CHRONO-PAR® Epinephrine.

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.

8. 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 alcool benzilico che inibisce la funzione piastrinica. Non utilizzare acqua proveniente da un sistema Millipore.

9. Ghiaccio per mantenere alla giusta temperatura i reagenti di lavoro ricostituiti
10. Salviette Kimwipes monouso (non utilizzare salviettine di carta monouso)
11. Provette di plastica a fondo conico
12. Elettrodi (multiuso)
13. 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. Rimuovere il tappo e ricostituire con 5,0 mL di acqua purificata per il test su sangue intero.

Diluire il liquido di partenza 1:10 con soluzione fisiologica per il test PRP. Lasciare riposare per 10 minuti capovolgendo di tanto in tanto.

PROCEDURE

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

- 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 mkgt@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

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

L'Epinefrina induce aggregazione irreversibile e rilascio di ATP nel PRP ad una concentrazione tra 5 e 10 μM .

Nel sangue intero si **PUO'** osservare una aggregazione normale e rilascio di ATP alla concentrazione 50 μM .

L'anticoagulante raccomandato per i test su sangue intero con epinefrina è il citrato trisodico all'1,5% con 2 U di eparina per mL di citrato.

Ref.	Descrizione	Volume/conf	Conc. Stock PRP	Conc. finale PRP**	Volume per test PRP**	Test per conf. PRP
393	Epinefrina	5 mL/50 mL	1 mM	5 µM	2.5 µL	10000

**In 500 di PRP (450 µL di plasma ricco + 50 µL 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 e al riparo dalla luce.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Le curve di aggregazione e secrezione di ATP con stimolo di Epinefrina 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.

Con questo agonista non si osservano alterazioni della forma. Concentrazioni più elevate ($\geq 5 \mu\text{M}$) producono una curva bifasica con aggregazione della seconda onda dipendente dalla sintesi del trombossano A2. "L'epinefrina è l'agonista meno costante utilizzato nella valutazione dell'aggregazione piastrinica e, se la risposta all'epinefrina è l'unica anomalia osservata nei test, si dovrebbe essere molto cauti nel formulare una diagnosi di "disturbo" sulla base di questo risultato.⁵

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

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

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

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)
Epinefrina	5 µM	78-88	0,40-0,52 ²

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
Epinefrina	5 -50 µM	R*	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
Epinefrina	5 -50 µM	A	N	A,R	A

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

BIBLIOGRAFIA

1. 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.
2. White M MC, Jennings LK: Platelet Protocols: Research and Clinical Laboratory Procedures. Academic Press, 1999.
3. Podczasy JJ, Lee J, Vucenik I: Evaluation of Whole-Blood Lumiaggregation. Clin Appl. Thrombosis/Hemostasis, 3(3):190-195, 1997.
4. 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.
5. 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.
6. Sirridge, M: Laboratory Evaluation of the Bleeding Patient. Clinics in Laboratory Medicine, Vol. 4, No. 2, June 1984.
7. 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.
8. Sweeney JD, Hoernig LA and Fitzpatrick JE: Whole Blood Aggregation in von Willebrand Disease. Am J Hematol 32: 190-193 (1989).
9. 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.
10. 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.
11. Miller JL: Platelet-Type von Willebrand's Disease. Thrombosis and Hemostasis Vol. 7, No. 4, 1985.
12. 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.
13. Ingham Medical Center, Lansing, MI.
14. 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.
15. 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.
16. 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>