

## CHRONO-LUME KIT

Per uso diagnostico *in Vitro*

### Kit per la valutazione della funzionalità piastrinica su test di secrezione

#### I. DESTINAZIONE D'USO

Il kit CHRONOLUME® si utilizza per il test di funzionalità piastrinica, tramite studi di secrezione su sangue intero e su plasma ricco in piastrine (PRP)

#### II. PRINCIPIO DEL TEST

Il test permette la quantificazione del rilascio dell'ATP nella diagnostica dell'uso di aspirina e di altri farmaci antinfiammatori di ultima generazione (Plavix, Reopro...) e per la diagnosi di disturbi di secrezione. L'enzima Luciferina-Luciferasi si lega con l'ATP secreto dai granuli densi, generando un segnale luminoso, che è proporzionale alla quantità di ATP rilasciato dalla piastrine nel campione. Il kit perciò permette la misurazione del rilascio di ATP da parte delle piastrine.

#### III. REAGENTI E MATERIALI

##### Ogni kit contiene:

- A. 4 provette di Chrono-lume, 0,2 mg di Luciferina (22.000 unità di d-Luciferasi con aggiunta di magnesio solfato, albumina umana, stabilizzatori e buffer)
- B. 1 flacone di adenosina 5' trifosfato utilizzato come ATP standard

**NOTA:** la reazione del kit CHRONO-Lume è tempo e temperatura dipendente. E' importante assicurarsi che l'incubazione di ogni campione sia di due minuti nel momento prima di iniziare il test.

##### **MATERIALE RICHIESTO MA NON FORNITO**

- Provette per il prelievo, provette da centrifuga, provette e pipette con cui si tratta il sangue prelevato e il PRP, in vetro siliconato o in plastica, acqua sterile distillata, acqua fisiologica, agitatori magnetici
- Aggregometri modelli 700-2 / 700-4

#### IV. CONSERVAZIONE

##### A) ATP STANDARD

Reagente Liofilo: fino alla data di scadenza, conservare congelato a temperature inferiori agli 0°C

Reagente ricostituito: 2 settimane, conservare congelato in aliquote a -20°C

Soluzione di lavoro: 24 ore, conservare a 2-8°C

##### B) CHRONOLUME

Reagente Liofilo: fino alla data di scadenza, conservare congelato a temperature inferiori gli 0°C

Reagente ricostituito: 30 giorni, conservare congelato a -20°C in aliquote di volumi adatti ai test svolti in una giornata

Soluzione di lavoro: 8 ore 2-8°C al buio

#### V. RACCOLTA DEL CAMPIONE

Raccogliere il sangue con puntura venosa atraumatica senza stasi, aspirando lentamente con la siringa ed espellendo, dopo aver rimosso l'ago, altrettanto lentamente il sangue nelle provette; evitare l'emolisi. Effettuare il prelievo con una siringa di plastica e mescolare 9 volumi di sangue con 1 volume di trisodio citrato 3,2% in una provetta di plastica o di vetro siliconato.

Usare 20-30 mL di sangue per il PRP test e 5-10 mL di sangue per il test su sangue intero.

Centrifugare il sangue a 200g per 10 minuti, aspirare con cura il supernatante (PRP) e su di esso eseguire un normale conteggio piastrinico.

Ricentrifugare il rimanente sangue citratato a 2000g per 30 minuti e decantare il supernatante (PPP).

Diluire il PRP con il PPP in modo da ottenere un plasma contenente circa 300.000 piastrine per mm<sup>3</sup>. Mantenere il PRP a temperatura ambiente ed eseguire le determinazioni entro 4 h.

#### VI. PROCEDURA

##### C) ATP STANDARD

Per la quantificazione del rilascio di ATP e per la preparazione della curva standard

##### PREPARAZIONE

Il reagente viene fornito liofilo.

Prendere il flacone contenente l'ATP Standard. Rimuovere il tappo e aggiungere 5 mL di **soluzione fisiologica** per ottenere una concentrazione di stock di 2µmole. Dopo l'aggiunta di acqua chiudere il flacone e invertire delicamente. Invertire il flacone ogni volta che viene utilizzato.

Lasciare riposare per 10 minuti, invertendo occasionalmente.

NOTA: l'aspetto dell'ATP liofilizzato in alcuni casi può variare da sospensione di particolato con un sottile strato di pellicola. Entrambe le morfologie sono adatte per l'uso dopo la ricostituzione.

##### VOLUMI

Sangue intero: aggiungere 5µL a 1mL di campione per ottenere uno standard di 2 nmoli di concentrazione finale

PRP: aggiungere 5 µL a 500 µL di campione per uno standard di 2 nmoli di concentrazione finale



**D) TEST CON CHRONOLUME**

Per la misurazione della bioluminescenza

**PREPARAZIONE**

Ogni flacone contiene 0.2 mg di Luciferina (22000 unità) d-Luciferasi, magnesio solfato, siero-albumina umana, stabilizzatore e buffer  
Picchiare il flaconcino per mandare il contenuto verso il fondo. Rimuovere il tappo e ricostituire con **1.25 ml di acqua distillata sterile**.

**VOLUMI**

Sangue intero: aggiungere 100 µL di reagente ricostituito a 900 µL di sangue diluito per misurare il rilascio di ATP.

PRP: aggiungere 50 µL di reagente ricostituito a 450 µL di PRP per misurare il rilascio di ATP.

**VII. CODICI**

Codice	Descrizione	Volume stock	Final Conc.	Volume per test		Test per unità	
				WB	PRP	WB	PRP
<b>28395</b>	Chrono-Lume (Luciferina e ATP standard)	N/A	4x1.25 mL	100µl	50µl	50	100
<b>28387</b>		ATP Standard	5.0 mL	2 µmole	5µl	5µl	1000

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

**Fornitore:** Chrono-log Corp.  
2 West Park Road  
Havertown, PA 19083, USA  
FAX 610-853-3972  
E-MAIL [chronolog@chronolog.com](mailto:chronolog@chronolog.com)  
INTERNET <http://www.chronolog.com>

**Distributore:** Mascia Brunelli  
Viale Monza 272  
20125 Milano  
Email: [info@masciabrunelli.it](mailto:info@masciabrunelli.it)  
Web: <http://www.masciabrunelli.it>

