

## CHRONO-PAR® RISTOCETIN

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

### INTRODUZIONE

Il reagente CHRONO-PAR® Ristocetin 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

La Ristocetina nei soggetti normali induce una reazione irreversibile per concentrazioni che vanno da 0,9 a 1,5 mg/mL (La ristocetina viene utilizzata per la diagnosi della malattia di von Willebrand (un difetto quantitativo o qualitativo del fattore di von Willebrand plasmatico), della sindrome di Bernard Soulier (una carenza della glicoproteina di membrana piastrinica GPIb) e della tromboastenia di Glanzmann con pattern di aggregazione-disaggregazione (reazione reversibile). Per mettere in evidenza la presenza di Malattia di Willebrand di tipo 2B o Platelet-Type è necessario eseguire il test a basse concentrazioni (0,2-0,6 mg/mL) per osservare l'eventuale aumentata risposta a questo agonista. Per distinguere tra VWD e Bernard-Soulier aggiungere plasma normale al campione: mentre nel caso di malattia di Willebrand il difetto viene corretto dal fattore esogeno, nel caso di Bernard Soulier non si ha nessun cambiamento. L'assunzione di aspirina si può manifestare con un difetto qualitativo della reazione.

### CONTENUTO DELLA CONFEZIONE

**Ristocetin:** Ristocetina liofilizzata stabilizzata

### 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 100 µL a 1 mL
6. Soluzione fisiologica sterile per irrigazione (0,85% o 0,9% w/v) per la diluizione dei campioni di sangue intero; acqua purificata per la diluizione del reagente CHRONO-PAR® Ristocetin

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 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

Picchiare delicatamente la fiala per far scendere il contenuto sul fondo. Rimuovere il tappo e ricostituire con **0,5 mL di acqua purificata**. Richiudere il tappo e lasciare riposare per 10-15 minuti. Ispezionare visivamente il fondo della fiala per verificare che il reagente sia completamente in sospensione. Capovolgere delicatamente per raccogliere il reagente rimasto nel tappo e lasciare riposare per altri 10-15 minuti fino a quando tutto il particolato non si sarà ben sciolto. Dopo la ricostituzione, la sospensione potrebbe presentare un colore da trasparente a marroncino.

Non agitare mai il reagente. Mescolare delicatamente poco prima dell'uso.

### 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](mailto: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%. 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 AGGLUTINAZIONE PIASTRINICA INDOTTA DA RISTOCETINA:**

Nella norma la Ristocetina induce una reazione irreversibile per concentrazioni che vanno da 0,75 a 1,5 mg/mL.

Ref.	Descrizione	Volume/conf	Conc. Stock WB/PRP	Conc. finale		Volume per test		Test per conf.	
				WB*	PRP**	WB*	PRP**	WB	PRP
396	Ristocetin	0,5 mL	125 mg/mL	1 mg/mL	1,25 mg/mL	8 µL	5 µL	62	100

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

(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

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**

- 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.

La ristocetina è utilizzata per la rilevazione della malattia di von Willebrand (un difetto quantitativo o qualitativo del fattore vW plasmatico) e di Bernard Soulier (una carenza di glicoproteina di membrana piastrinica (GPIb). Nei campioni di sangue periferico, si osservano risultati normali con concentrazioni comprese tra 0,5 e 1,0 mg/mL [0,4 mg/mL con elettrodo monouso]. Per rilevare il tipo 2B o vW di tipo piastrinico, testare un'iper-risposta a una bassa concentrazione di 0,25 mg/mL [0,15 mg/mL con elettrodo monouso]. Nei campioni di PRP, si osservano risultati normali con concentrazioni comprese tra 0,9 e 1,5 mg/mL. Per rilevare il tipo 2B o vW di tipo piastrinico, testare un'iper-risposta a basse concentrazioni (0,2-0,6 mg/mL).

Per distinguere tra vW e Bernard Soulier, aggiungere plasma normale o crioprecipitato al campione del paziente. Il paziente con vW risponderà, il paziente con Bernard Soulier no. Un difetto qualitativo come un modello a denti di sega può essere osservato nei pazienti affetti da sindrome di Glazmann o nei soggetti che assumono aspirina.

Non sono note ragioni cliniche per misurare il rilascio di ATP con questo agonista.

**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 effettuare il test 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**

**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 per 3 mesi a -20°C suddivisa in aliquote di dimensioni opportune alla propria routine di lavoro. NON CONSERVARE 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 +/- 2 SD)		
Reagente	Conc.	Agg. (%) <sup>2</sup>
Ristocetina	1,25 mg/mL	87 – 102 <sup>9</sup>
Valori normali in Sangue intero (Media +/- 2 SD)		
Reagente	Conc.	Agg. (ohms) <sup>16</sup>
Ristocetina	1,0 mg/mL	>5 ohms; lag-time <70 sec <sup>8</sup> .

**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 AGGLUTINAZIONE e DIFETTI PIASTRINICI SELEZIONATI					
Reagente	Conc. Finale	Assunzione di Aspirina*	Von Willebrand & Bernard Soulier	Storage Pool / Difetti di secrezione	Tromboastenia di Glanzmann
Ristocetina	0.25 – 1.0 mg/mL [WB] 0.5 – 1.25 mg/mL [PRP]	Difetti qualitativi <sup>6</sup>	** A,R,H *** Lag-time > 70 sec.	N	Difetti qualitativi <sup>14</sup>

\* Risposta tipica di donatori che assumono 250 mg di aspirina.<sup>12</sup>

\*\* Nel von Willebrand di tipo 2B e di tipo Platelet-type la risposta è aumentata a basse concentrazioni (0,25 mg/mL nel sangue intero e 0,25 - 0,5 mg/mL nel PRP<sup>10, 11</sup>). Aggiungendo il crioprecipitato al campione del paziente con VWD Platelet-type, la risposta alla bassa concentrazione di ristocetina rimarrà invariata mentre un paziente di tipo 2B non mostrerà alcuna risposta.

\*\*\* Per distinguere tra von Willebrand e Bernard Soulier, aggiungere plasma normale o crioprecipitato al campione del paziente. Il paziente von Willebrand risponderà, Bernard Soulier no.<sup>11</sup>

**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](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>