



## ISTRUZIONI PER L'USO

## AGP TEST

KIT PER LA VALUTAZIONE DELL'AGGREGAZIONE PIASTRINICA SU PRP E SANGUE INTERO INDOTTA DA ADP, ADRENALINA, COLLAGENE E RISTOCETINA

## 1 – SIGNIFICATO CLINICO E DESTINAZIONE D'USO

Per solo uso diagnostico *in Vitro*

Quando un vaso sanguigno viene danneggiato, le piastrine aderiscono ai bordi della ferita, aggregano, sintetizzano prostaglandine e rilasciano serotonina, ADP e ATP. La sintesi delle prostaglandine e dei prodotti di rilascio causa ulteriore aggregazione. In contemporanea inizia la cascata coagulativa, viene prodotta la trombina, si forma la fibrina e il tappo piastrinico si ancora al vaso danneggiato.

Difetti della funzione piastrinica, dovuti alla mancanza di una glicoproteina della membrana cellulare (tromboastenia di Glanzmann; sindrome di Bernard-Soulier), di granuli citoplasmatici di accumulo (scarsità del pool di deposito), di un enzima piastrinico (scarsità di cicloossigenasi) o di un fattore plasmatico (malattia di von Willebrand) provocano frequenti sanguinamenti post-traumatici, ematomi, epistassi o eccessive perdite di sangue durante le mestruazioni.

Le piastrine vanno incontro ad aggregazione in diverse condizioni ed in presenza di differenti reagenti (stimoli). Il termine "Aggregazione piastrinica" indica l'adesione di una piastrina ad un'altra. Tale fenomeno può essere indotto aggiungendo agenti aggreganti a un plasma ricco di piastrine (PRP) o al sangue intero. L'aggregazione è dipendente dalla presenza di calcio, fibrinogeno, fattori plasmatici ed un agente aggregante. La reazione di aggregazione varia in funzione dell'agente aggregante utilizzato e della sua concentrazione. Per l'aggregometria ottica (su PRP), ADP, Collagene, Epinefrina (Adrenalina) e Ristocetina vengono utilizzati a scopo di screening e sono in grado di fornire utili informazioni per formulare ipotesi diagnostiche preliminari.

La scelta di questi reagenti si basa sul loro meccanismo d'azione. ADP ed Epinefrina (adrenalina) sono contenuti nei granuli piastrinici e vengono rilasciati durante la formazione del tappo emostatico primario potenziando, in tal modo, la reazione di aggregazione. Per tale motivo, la risposta delle piastrine allo stimolo generato in vitro con questi agonisti può essere utile a riconoscere la natura dei disordini emorragici del paziente.

Il collagene non è contenuto nelle piastrine ma si trova nel tessuto connettivo dei vasi sanguigni ed è considerato il primo fattore ad attività pro-aggregante che le piastrine incontrano in seguito ad un trauma vascolare. Per questo lo studio in vitro della risposta delle piastrine al Collagene riveste considerevole importanza. Altri agonisti quali la Trombina, lo ionoforo del calcio A23187, l'Acido Arachidonico, la Ristocetina il Fattore VIII bovino e la Serotonina vengono utilizzati per studiare la risposta delle piastrine in modo più specifico.

L'aggregazione è, al momento, il test di funzionalità piastrinica in vitro più utile. E' lo strumento diagnostico che meglio può fornire una visione difficilmente ottenibile con altre tecniche e che può aiutare a formulare una diagnosi e a mettere a punto una terapia adeguata. L'utilizzo di questa tecnica da parte di personale esperto ha permesso di descrivere e diagnosticare una serie di disfunzioni piastriniche qualitative congenite e acquisite. La capacità o incapacità delle piastrine a rispondere ai diversi stimoli aggreganti è il punto di partenza per identificare il tipo di piastrinopatia cui ci si trova di fronte.

AGP TEST è un kit che contiene diversi agonisti da utilizzare per la valutazione dell'aggregazione piastrinica su PRP e sangue intero.

## 2 – PRINCIPIO DEL METODO

Lo studio dell'aggregazione su PRP è basato sulla valutazione delle variazioni di trasmittanza in un campione di plasma durante l'aggregazione.

Quando l'ADP, l'Adrenalina e il Collagene vengono aggiunti al plasma ricco di piastrine, stimolano le piastrine a modificare la propria forma e ad aggregarsi. L'aggregazione indotta dall'ADP esogeno è considerata aggregazione primaria ed è reversibile. L'aggregazione indotta dall'Adrenalina è considerata aggregazione primaria. Per il Collagene si ha una fase di latenza durante la quale il Collagene polimerizza in fibrille per l'attivazione delle piastrine. Quindi le piastrine normali rispondono rilasciando ADP endogeno dai propri granuli. Il rilascio di ADP endogeno si manifesta in una seconda onda di aggregazione.

La Ristocetina, in concentrazione di 1.0-1.5 mg/ml, aggrega le piastrine normali nel plasma ricco citratato o nel sangue intero attraverso un meccanismo in cui il rilascio di ADP endogeno gioca solo un piccolo ruolo. L'aggregazione piastrinica indotta da ristocetina in concentrazioni di 1.2 mg/ml è assente o nettamente inferiore in pazienti affetti dalla sindrome di von Willebrand. Con concentrazioni di 1.5 mg/ml si ha un minore grado di anormalità. La maggior parte dei pazienti con la sindrome di von Willebrand mostra una risposta negativa, così come i pazienti affetti dalla sindrome di Bernard-Soulier.

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 (Collagene, Ristocetina) nuove piastrine aggregano alle piastrine del monostrato che ricopre gli elettrodi, determinando un aumento dell'impedenza fra i due elettrodi.

## 3 – MATERIALI FORNITI – CONFEZIONAMENTO

Prodotto	Tipologia	REF	Confezione
AGP TEST	Test di aggregazione piastrinica	3115001 (900 test)	2 flaconi di vetro contenenti ADP liofilo Ogni flaconcino deve essere ricostituito con 0,5 mL di Diluent A per avere una soluzione alla concentrazione di 0,1 mM (2 x 0,5 mL) 5 flaconi di vetro contenenti adrenalina liofila. Ogni flaconcino deve essere ricostituito con 0,5 mL di acqua bi distillata per avere una concentrazione di 5 mM. (5 x 0,5 mL) 1 flacone di vetro contenente Collagene. Il flaconcino contiene una sospensione 1 mg/mL di fibrille di collagene di tendine equino di Tipo 1 (1 x 0,5 mL) 1 flacone di vetro contenente Ristocetina A solfato liofila; antibiotico isolato da Nocardia lurida, contenente oltre il 90% di Ristocetina A (1 x 0,5 mL) 1 vial di vetro contenente il Diluent A: tampone di diluizione contenente TRIS, pH 7,3 (1 x 50 mL) 1 vial di vetro contenente il Diluent B: soluzione per diluire il collagene (1 x 4 mL) Imballo secondario: scatola di cartone.

## Liofilo Adrenalina

Pericolo



H300; H318  
EUH031  
P305+P351+P338; P310; P264; P330  
(Sodio bisolfito; Epinefrina bitartrato)

## 4 – MATERIALI RICHIESTI MA NON FORNITI

Provette in vetro siliconato o in plastica, pipette. Acqua bidistillata. Centrifuga. Aggregometro.

## 5 – PRECAUZIONI E AVVERTENZE

- AGP TEST è un kit per l'uso diagnostico *in vitro*, per il solo uso professionale; deve essere utilizzato da personale di laboratorio qualificato e adeguatamente addestrato.





- Non utilizzare dopo la data di scadenza. La qualità dei reagenti non può essere garantita oltre la data di scadenza o se il kit è conservato in condizioni non appropriate.
- Seguire le normali precauzioni adottate per i reagenti di laboratorio. Smaltire i rifiuti in conformità alle normative vigenti a livello locale, regionale o nazionale.
- Tutte le operazioni riferite all'esecuzione del test devono essere condotte in accordo alle Buone Pratiche di Laboratorio.
- Tutti i campioni devono essere considerati potenzialmente pericolosi e manipolati nello stesso modo di agenti infettivi.
- Questo prodotto è classificato pericoloso in accordo alla Legislazione Europea vigente (consultare la scheda dati di sicurezza).
- Il Certificato di Analisi e la Scheda Dati di Sicurezza del prodotto sono disponibili sul sito web: [www.masciabrunelli.it](http://www.masciabrunelli.it).
- Le informazioni contenute in questo documento sono state definite al meglio delle nostre conoscenze e capacità e rappresentano una linea guida al corretto impiego del prodotto, ma senza impegno o responsabilità. L'utilizzatore finale deve in ogni caso, rispettare le leggi, i regolamenti e le procedure standard locali per l'esame dei campioni raccolti dai diversi distretti organici umani. Le nostre informazioni non esonerano l'utilizzatore finale dalla sua responsabilità di controllare l'idoneità dei nostri prodotti allo scopo previsto.

## 6 – CONDIZIONI DI CONSERVAZIONE E DATA DI SCADENZA

Conservare il kit a +2°C - +8°C. Il kit è stabile fino alla data di scadenza indicata nell'etichetta.

## 7 – 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 3,8% in una provetta di plastica o di vetro siliconato.

Se l'aggregazione piastrinica deve essere effettuata su PRP procedere come segue:

Centrifugare il sangue a  $100-170 \times g$  per 15 minuti, aspirare con cura il supernatante (PRP) e trasferirlo in una provetta di polipropilene e tappare. Su di esso eseguire un normale conteggio piastrinico. Ricentrifugare il rimanente sangue citratato a  $2000 \times g$  per 20 minuti e decantare il supernatante (PPP). Mantenere il PRP a temperatura ambiente ed eseguire le determinazioni entro 3 h.

## 8 – PREPARAZIONE DELLE SOLUZIONI DI LAVORO

**ADP** – Ricostituire ciascun flacone con 0,5 mL di **Diluent A**. una volta ricostituito il reattivo è stabile 8 ore a temperatura ambiente, 2 settimane a +2-+8°C e un mese a temperatura inferiore a -20°C. Per evitare ripetuti congelamenti e scongelamenti si consiglia di suddividere la soluzione in aliquote da 0,1 mL e congelare. Con lo schema di lavoro qui proposto il reattivo è sufficiente per **70 curve/flacone** (in genere si riescono a testare fino a 35 pazienti/flacone)

**Adrenalina** – Ricostituire ogni flaconcino con 0,5 mL di acqua bidistillata. Dopo ricostituzione e prelievo della quantità necessaria per i test, il flacone di adrenalina deve essere eliminato. Prima dell'uso diluire 2 aliquote da 0,1 mL di **Adrenalina** (precedentemente ricostituita con 0,5 mL di acqua bidistillata) con 4,9 mL e 0,9 mL di **Diluent A** per ottenere 2 soluzioni di lavoro a concentrazioni di Adrenalina rispettivamente 0,1 mM e 0,5 mM. Le soluzioni di lavoro sono stabili 60 minuti a TA. Per ogni flaconcino si possono eseguire circa **100 curve di aggregazione piastrinica**.

**Collagene** – Prima dell'uso mescolare per inversione il contenuto del flacone di collagene e diluirne 0,1 mL con 0,4 mL di **Diluent B**. Concentrazione della soluzione di lavoro: 200 µg/mL. La stabilità di tale soluzione è di poche ore in bagno di ghiaccio fondente.

**Ristocetina** – Ricostituire ogni flacone di ristocetina con 0,5 mL di **Diluent A**. Concentrazione della soluzione di lavoro: 50 mg/mL. Una volta ricostituito il reattivo è stabile per un mese a temperatura inferiore a -20°C. Per evitare ripetuto congelamenti e scongelamenti si consiglia di suddividere la soluzione in aliquote da 0,1 mL e congelare. Con lo schema di lavoro qui proposto il reattivo è sufficiente per **33 curve/flacone**.

## 9 – PROCEDIMENTO DEL TEST

Nello schema di lavoro qui presentato, i volumi degli agenti aggreganti sono calcolati per un volume di PRP di 0,5 mL (in accordo con il tipo di aggregometro ipotizzato) o un volume di sangue di 1 mL.

Trasferire 0,5 mL di PRP e 0,5 mL di PPP in due cuvette dell'aggregometro, precedentemente predisposte per il test secondo le indicazioni della Casa fornitrice, e tarare ciascun canale dello strumento al 90% e al 10% di trasmittanza rispettivamente con le cuvette del PPP e del PRP. La taratura va ripetuta per ogni plasma e per ogni cuvetta.

I procedimenti operativi qui proposti per i vari agenti aggreganti si basano sui risultati riportati in letteratura per i soggetti normali. E' quindi consigliabile che ogni laboratorio stabilisca un proprio range di normalità e segua uno schema di lavoro per l'esecuzione del test che tenga conto dell'intervallo dei valori ottenuti.

**NOTA:** gli strumenti attualmente in distribuzione permettono una **procedura semplice e rapida di autocalibrazione** (si vedano i manuali operativi dei singoli strumenti) precedentemente non effettuabile, la cui cadenza dipende dal carico e dalla ciclicità degli interventi (in media ogni 15 – 20 gg). Tale procedura permette una superiore standardizzazione del metodo utilizzato.

### PROCEDURA SU PRP

1. Preparare il PRP e il PPP come descritto nel paragrafo 7.
2. Mettere in una provetta per aggregazione contenente una barretta magnetica 500 µL (250 µL\*) di PRP e incubare a 37°C per 3 minuti.
3. Mettere in una provetta per aggregazione senza barretta magnetica 500 µL (250 µL\*) di PPP.
4. Porre le cuvette negli appositi pozzetti dell'aggregometro e seguire le istruzioni d'uso dello strumento per la taratura.
5. Lasciare a temperatura ambiente l'Adrenalina e agitare dolcemente.
6. Per ciascun aggregante aggiungere le quantità indicate in tabella alla cuvetta con PRP per ottenere le diverse curve di aggregazione.
7. Registrare l'aggregazione piastrinica per almeno 5 minuti.

Parametro	Concentrazione	Tipo di aggregazione	volume da aggiungere al PRP	Note
ADP	0.8 µM	bifasica	4.0 µL (2.0 µL) *	Esame di routine
	2 µM	monofasica irreversibile	10.0 µL (5.0 µL) *	
Adrenalina	1.0 µM	bifasica	5.0 µL (2.5 µL) * di Adrenalina 0.1 mM	Esame di routine
	10 µM	monofasica irreversibile	10.0 µL (5.0 µL) * di Adrenalina 0.5 mM	
Collagene	200 µg/mL		10.0 µL (5.0 µL) *	
Ristocetina	1.5 mg/mL		15.0 µL (7.5 µL) *	

Se non si ottiene aggregazione piastrinica o se la stessa è marcatamente ridotta (sindrome di von Willebrand e sindrome di Bernard-Soulier) ripetere il test, per avere una conferma della diagnosi, operando come segue:

- a 0,4 ml di PRP aggiungere 0,1 ml di plasma normale ottenuto facendo un pool di plasma raccolti da più soggetti normali;
- aggiungere 15 µl di Ristocetina ricostituita per ottenere una concentrazione pari a 1,5 mg/ml.

Se si registra un aumento dell'aggregazione piastrinica si ha la conferma della diagnosi di sindrome di von Willebrand.





\* I volumi tra parentesi possono essere richiesti da alcuni aggregometri; se fosse necessario avvalersi degli appositi spaziatori adesivi.

#### PROCEDURA CON SANGUE INTERO

1. Mettere in una cuvetta di plastica da 1 mL, 500 µL di soluzione fisiologica e 500 µL di sangue intero con anticoagulante. Inserire una barretta magnetica e incubare a 37°C per 5 minuti.
2. Dopo aver collegato l'elettrodo all'apposita presa, metterlo in incubazione a 37°C per 5 minuti.
3. Al termine dell'incubazione inserirlo nella cuvetta contenente il sangue diluito. (Posizionare i filamenti verso il retro dell'aggregometro).
4. Mettere la cuvetta nel pozzetto di reazione e incubare altri 2 minuti tenendo lo sportello chiuso. Aprire lo sportello e pipettare la quantità stabilita di collagene prestando attenzione a pipettarlo sul fondo, avvinando più volte o 20 µL di Ristocetina ricostituita (Attenzione a non formare bolle d'aria).
5. Registrare la curva di aggregazione.

Parametro	Concentrazione finale	volume da aggiungere al sangue intero	Note
Collagene	2 µg/mL	10 µL	Si consiglia di utilizzare due concentrazioni differenti: 2 µg/mL e 4 µg/mL
	4 µg/mL	20 µL	
	5 µg/mL	25 µL	
Ristocetina	1 mg/mL	20 µL	

#### 10 – INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

##### Valori normali

Poiché i valori assoluti di normalità non sono per il momento disponibili per gli agenti aggreganti su sangue intero, si raccomanda a ciascun laboratorio di stabilire i propri range di normalità e con questi comparare le curve di aggregazione ottenute sui soggetti ritenuti patologici.

**NOTA: i seguenti intervalli normali sono stati ottenuti da vari laboratori e pubblicazioni. Dovrebbero essere usati solo come linea guida.**

ADP	Concentrazioni < a 0,3 µM	aggregazione reversibile	
	Conc. comprese tra 0,3 e 1,5 µM	aggregazione bifasica	
	Concentrazioni > a 1,5 µM	aggregazione monofasica irreversibile	
	Concentrazione 5 µM	% aggregazione 69 – 88 %	
	Concentrazione 10 µM	% aggregazione 71 – 88 %	
Adrenalina	Conc. inferiori a 0,2 µM	aggregazione reversibile	
	Conc. comprese tra 0,2 e 5,0 µM	aggregazione bifasica con un'onda secondaria indotta da agenti aggreganti endogeni	
	Conc > a 5,0 µM	aggregazione monofasica irreversibile (% di aggregazione è 78-88%) <sup>1</sup>	
Collagene in PRP	Concentrazione 2 µg/ml	% aggregazione 70 - 94%	
	in sangue intero	Concentrazione 2 µg/ml	aggregazione (ohm) 15 – 27
	Concentrazione 5 µg/ml	aggregazione (ohm) 15 – 31	
Ristocetina in PRP	Concentrazione 1,5 mg/ml	% aggregazione max 82 - 96%	
	in sangue intero	Concentrazione 1,0 mg/ml	aggregazione (ohm) >5 Ω. <70 sec Lag time

#### 11 – CARATTERISTICHE

Il prodotto presenta le caratteristiche descritte se esso viene utilizzato entro la data di scadenza e nel rispetto delle prescrizioni relative alle procedure ed alla conservazione.

##### Linearità, accuratezza, precisione.

L'aggregazione piastrinica indotta dai comuni reagenti aggreganti (ADP, Acido Arachidonico, Collagene ed Adrenalina) è un sistema di analisi non lineare per alcuni parametri: Fase di Latenza, Slope Primaria, Slope Secondaria, Risposta Bifasica e Disaggregazione. La non-linearità è causata da molteplici fattori, tra cui le reazioni biochimiche e la strumentazione utilizzata. L'aggregazione piastrinica misura livelli di risposta o di attività che non riflettono una misura quantitativa dei reagenti o della loro concentrazione. In aggregazione piastrinica, l'accuratezza è un parametro relativo e dipende dal sistema di analisi. Le limitazioni dell'aggregazione piastrinica rendono difficile fornire livelli di precisione o riproducibilità tipici.

#### 12 – NOTE

- E' sconsigliato usare l'adrenalina come agonista standard su campioni di sangue intero per effettuare analisi cliniche. Circa il 50% dei soggetti risponde in modo molto debole a questo agente aggregante.
- Per effettuare in simultanea il test ottico su PRP e il test di rilascio dell'ATP con la tecnica **bioluminescente** occorre operare su un **lumiaggregometro** (Esempio 700-2). Si rinvia alla Scheda Tecnica e alle Istruzioni riportate nell'User Manual dello strumento.

#### 13 – LIMITI DEL METODO

- In uno studio su centosei pazienti con Storage Pool Disease (SPD), il 23% ha avuto risposte di aggregazione ottiche normali (PRP) a ADP, epinefrina e collagene e il 44% ha avuto anomalie di aggregazione varie. Gli autori hanno concluso che l'SPD è comune, eterogeneo e non necessariamente associato a anomalie di aggregazione ottica (PRP).<sup>2</sup>
- I test dovrebbero essere eseguiti entro 3 ore dal prelievo.
- Molti farmaci inibiscono la funzione piastrinica.<sup>3,4,5</sup> A meno che lo scopo del test non sia quello di dimostrare l'inibizione indotta da farmaci, i pazienti devono essere liberi da farmaci per un periodo che vada da dieci (10) giorni a due (2) settimane prima del test.
- Ulteriori valutazioni cliniche e di laboratorio potrebbero essere necessarie per confermare la diagnosi.
- I globuli rossi nel PRP possono inibire la capacità dell'Aggregometro di rilevare i cambiamenti di intensità luminosa. Ciò potrebbe risultare in una sottostima del valore di percentuale di aggregazione piastrinica.<sup>5</sup>
- I lipidi nel PRP possono interferire con la lettura della trasmissione della luce e impedire la registrazione dell'aggregazione.
- La conta piastrinica inferiore a 50.000 plt/µL può causare problemi con l'impostazione della linea di base ottica, impedendo la registrazione dell'aggregazione.

#### 14 – BIBLIOGRAFIA

1. White M MC, Jennings LK: Platelet Protocols: Research and Clinical Laboratory Procedures. Academic Press, 1999

3. Kinlough – Rathbone RL: The effects of some other drugs on platelet function. Platelets, Drugs and Thrombosis. Edited by J. Hirsh, J.F. Cade, A.S. Gallus, et al. Basel, S. Karger, 1975, pp 124-131.





2. 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.

4. Packham MA, Mustard JF: Non-steroidal anti-inflammatory drugs, pyrimido-pyrimidine compounds and tricyclic compounds: effects on platelet function. Platelets, Drugs and Thrombosis. Edited by J. Hirsh, J.F. Cade, A.S. Gallus et al. Basel, S. Karger, 1975, pp 124-131.

5. CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute), Publication H58-A, Platelet Function Testing by Aggregometry; Approved Guideline; November 2008.

TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

	Dispositivo medico diagnostico in vitro		Limiti di temperatura		Codice del lotto (LXXX)		Fabbricante		Mantenere asciutto		Identificatore dispositivo
	Consultare le istruzioni per l'uso		Utilizzare entro (anno/mese)		Numero di catalogo		Non riutilizzare		Fragile, maneggiare con cura		Tenere lontano dal calore

CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

Versione	Descrizione delle modifiche	Data
Istruzioni per l'uso (IFU) - Revisione 6	Aggiornamento del contenuto, simbologia GHSvce del layout	2024-06

Nota: lievi modifiche tipografiche, grammaticali e di formattazione non sono incluse nella cronologia delle revisioni.

