

ACIDO ARACHIDONICO 25 mM

Per uso diagnostico in Vitro

Per la valutazione dell'Aggregazione Piastrinica indotta da Acido Arachidonico su sangue intero e su PRP

I. DESTINAZIONE D'USO

L'acido arachidonico è un acido grasso presente nei granuli e nelle membrane delle piastrine umane. E liberato dai fosfolipidi e, in presenza dell'enzima cicloossigenasi 1 (COX1) incorpora ossigeno per formare la prostaglandina endoperossidica G2 (PGG2). La PGG2 e poi trasformata rapidamente in prostaglandina H2 (PGH2) che a sua volta è convertita in trombossano A2, un potente induttore dell'aggregazione piastrinica. L'aggiunta *in vitro* di acido arachidonico al plasma ricco di piastrine normale induce un aumento del consumo di ossigeno, la formazione di trombossano e l'aggregazione piastrinica. L'ingestione di aspirina o di composti contenenti aspirina inibisce il consumo di ossigeno mediato dalla COX1, precludendo così tutti gli eventi successivi che portano all'aggregazione piastrinica.

L'acido arachidonico è un importante agente aggregante che trova applicazione nella diagnosi dell'"Aspirin Like Disease", nella differenziazione di tale sindrome dallo "Storage Pool Disease" e nella valutazione degli effetti inibitori dell'aspirina (o di altri farmaci antinfiammatori più recenti) sull'aggregazione piastrinica.

Inoltre l'Acido Arachidonico è utile negli studi di aggregazione piastrinica di routine per valutare disfunzioni piastriniche o attivazione piastrinica.

II. PRINCIPIO DEL TEST

Il test dell'aggregazione piastrinica, misura la velocità e l'entità con cui le piastrine, disperse in un campione di plasma ricco di piastrine (PRP) o sangue intero anticoagulato, formano ammassi (aggregati) in seguito all'aggiunta al PRP o al sangue intero mantenuti sotto costante agitazione, di una sostanza che normalmente stimola l'aggregazione piastrinica (agonista).

Il fenomeno è strettamente correlato alla presenza di Ioni Calcio e di uno o più fattori plasmatici.

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.

Lo studio dell'aggregazione su Plasma Ricco di Piastrine si basa sulla rilevazione ottica della diminuzione di torbidità del campione in seguito alla formazione degli aggregati piastrinici, messa in relazione alla torbidità di un campione di Plasma Povero di riferimento.

Questi fenomeni vengono misurati attraverso un aggregometro piastrinico che traccia un grafico della velocità e dell'entità massima della reazione.

L'acido arachidonico fornito nel kit può essere impiegato sia per il test su sangue intero che su PRP.

III. REAGENTI E MATERIALI

3 flaconi contenenti 5 mg di acido arachidonico in forma liofila, con l'aggiunta di tampone e stabilizzanti.

IV. PREPARAZIONE DEL REAGENTE

Ricostituire un flacone con 0,7 mL di acqua distillata o deionizzata. Attendere 10 minuti e mescolare accuratamente prima dell'uso.

V. CONSERVAZIONE E STABILITÀ

Il prodotto liofilo è stabile alla temperatura di 2-8 °C fino alla data di scadenza stampata sulla confezione.

Dopo ricostituzione il prodotto è stabile per 8 ore a T ambiente (20-25°C), 2 settimane a 2-8 °C, 4 settimane a -20°C.

Dopo il congelamento il reagente può essere scongelato 2 volte mantenendo la stabilità. Si consiglia quindi di aliquotare dopo la ricostituzione.

VI. MATERIALE RICHIESTO MA NON FORNITO

- Provette e pipette.
- Trisodio citrato 3,8%.
- Acqua distillata o deionizzata
- Aggregometro

VII. RACCOLTA DEL CAMPIONE

Effettuare il prelievo da una vena antecubitale senza stasi con ago siliconato 18 o 20 G. Trasferire immediatamente il sangue in una provetta di plastica contenente l'anticoagulante (Trisodio Citrato 3,8%) nel rapporto di 1/9 (v/v). Il sangue può essere usato tal quale per l'aggregazione piastrinica entro 3 ore.

Per il PRP centrifugare il sangue a 150-200 x g per 10-15 minuti a T ambiente per ottenere il Plasma Ricco in Piastrine (PRP); il tempo e la velocità di centrifugazione possono variare da campione a campione; ispezionare il sovrantante per assicurarsi che sia privo di globuli rossi; se presenti ripetere la centrifugazione. Aspirare con cura il supernatante (PRP), trasferirlo in una provetta di plastica con il tappo e su di esso eseguire un normale conteggio piastrinico.

Ricentrifugare il rimanente sangue a 2000 x g per 20 minuti per ottenere il PPP.

Effettuare il test entro 3 ore dal prelievo.

VIII. PROCEDURA DEL TEST SU PRP

1. Preparare il PRP e il PPP come descritto nel paragrafo VII.
 2. Mettere in una provetta per aggregazione contenente una barretta magnetica il volume richiesto di PRP (Per gli strumenti Chrono-Log 500 µl (250 µl) di PRP) e incubare a 37 °C per 3 minuti.
 3. Mettere in una provetta per aggregazione senza barretta magnetica il volume richiesto di PPP (per gli strumenti Chrono-Log 500 µl (250 µl) di PPP).
 4. Porre le cuvette negli appositi spazi dell'aggregometro e seguire le istruzioni d'uso dello strumento per la taratura.
 5. Aggiungere il volume richiesto di AA diluito nella cuvetta avendo cura di pipettarlo sul fondo del campione. (Per gli strumenti Chrono-Log: 10 µl (5µl) alla cuvetta con PRP, per ottenere una concentrazione di 0,5mM e 20 µl (10 µl) per ottenere una concentrazione di 1 mM).
 6. Registrare l'aggregazione piastrinica per almeno 5 minuti.
- I volumi tra parentesi possono essere richiesti da alcuni aggregometri; per l'utilizzo del volume dimezzato sugli strumenti Chrono-Log avvalersi degli appositi spaziatori adesivi.

IX. PROCEDURA SU SANGUE INTERO

Preparare il campione ed effettuare il test riferendosi alla procedura indicata dalle istruzioni del costruttore.

Per gli strumenti Chrono-Log:

1. Mettere in una cuvetta di plastica da 1 ml, 500 µl di 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 AA prestando attenzione a pipettarlo sul fondo, avvinando più volte (Attenzione a non formare bolle d'aria).
5. Registrare la curva di aggregazione.

Aggiungere: 20 µl di AA diluito a 1 ml di campione diluito per avere una concentrazione di 0,5 mM.
40 µl di AA diluito a 1 ml di campione diluito per avere una concentrazione di 1, mM.



X. CONTROLLO DI QUALITÀ

I risultati degli studi di aggregazione piastrinica devono essere interpretati per confronto con i risultati dei profili di aggregazione di un campione normale analizzato contemporaneamente. Il donatore normale non deve aver ingerito aspirina né composti contenenti aspirina nei 10 giorni precedenti.

XI. INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

E' necessario che ciascun laboratorio determini i valori di normalità per lo strumento in dotazione e per la procedura di lavoro impiegata ed in base a tali valori, fissi le concentrazioni più idonee di AA da usare nel test. Per la determinazione delle risposte "borderline" si dovrà eseguire il test con la concentrazione più bassa che induca l'aggregazione piastrinica nei soggetti normali.

Normalmente l'AA induce un rilascio di TxA2 per dare una singola onda forte di aggregazione piastrinica a concentrazioni comprese tra 0.5 e 1 mM (concentrazioni finali nel PRP o nel sangue intero).

NOTA: i valori normali che seguono si sono ottenuti da diversi laboratori e da pubblicazioni. Essi devono essere usati solo come linea guida.

Valori normali in Plasma ricco in Piastrine (PRP) $\pm 1 \sigma$			
Reagente	Conc.	Aggregazione (%)	ATP (nmole)
Acido Arachidonico	0,5 mM	74 – 99 ($\pm 2 \sigma$)	0,56 – 1,40

Valori normali in Sangue Intero (WB) $\pm 2 \sigma$			
Reagente	Conc.	Aggregazione (ohms)	ATP (nmole)
Acido Arachidonico	0,5 mM	5 – 17	0,6 – 1,40

La risposta all'acido arachidonico attesa nei difetti più comunemente riscontrati è elencata qui di seguito.

Condizione	Aggregazione da acido arachidonico
Trombastenia	Assente
Sindrome di Bernard Soulier	Normale
Difetto di secrezione (SPD) (δ)	Assente o solamente onda primaria
Deficienza di cicloossigenasi	Ridotta
Deficienza di trombassano sintetasi	Ridotta o assente
Ingestione di aspirina	Ridotta o assente
Sindrome di Ehlers-Danlos	Normale
Malattia di Von Willebrand	Normale

XII. 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.

XIII. PRECAUZIONI

- Per effettuare l'aggregazione su sangue intero indotta da Acido Arachidonico impiegare il reagente solo sotto forma di acido poiché il sale sodico dell'Acido Arachidonico lisa i globuli rossi con conseguente release di ATP che interferisce con la reazione.
- Eseguire il test su soggetti a digiuno che non abbiano fumato da almeno 8 ore e che non abbiano assunto farmaci a base di Acido Acetilsalicilico da una settimana, così come per altri farmaci che possano alterare l'aggregazione piastrinica.
- Pazienti trombocitopenici (meno di 75×10^9 pl/L) possono dare curve d'aggregazione su PRP poco attendibili. Quando si lavora su questi soggetti, particolare cura deve essere posta nel preparare il PPP che dovrà essere rigorosamente privo di piastrine.
- La presenza di globuli rossi nel PRP causa una riduzione della percentuale di aggregazione

XIV. BIBLIOGRAFIA













- Marcus A J: Platelet lipids. In Coleman R W, Hirsh J, Marder V J, Salzman E W: Hemostasis and thrombosis: Basic principles and clinical practice, pg 472. JB Lippencott Company, Philadelphia 1982.
- Moncada S, Vane J R: Arachidonic acid metabolites and the interactions between platelets and blood vessel walls. N Eng J Med 300:1142, 1979.
- Bye A, Lewis Y, O'Grady J: Effect of a single oral dose of aspirin on the platelet aggregation response to arachidonic acid. Br J Clin Pharmac 7:283, 1979.
- Dacie & Lewis, 'Practical Haematology', Lewis, S.M., Bain, B.J. and Bates, I. (Editors); 9° Edition, Elsevier Science Ltd., 2002, pages 380-381.
- Day, H.J. and Holmsen, H., 'Laboratory Tests of Platelet Function', Ann. Clin. Lab. Sci., 1972; 2 : 63.
- Dacie & Lewis, 'Practical Haematology', Lewis, S.M., Bain, B.J. and Bates, I. (Editors); 9° Edition, Elsevier Science Ltd., 2002, pages 383-385.
- Dacie & Lewis, 'Practical Haematology', Lewis, S.M., Bain, B.J. and Bates, I. (Editors); 9° Edition, Elsevier Science Ltd., 2002, pages 384-385.
-

CONFEZIONE:

Acido arachidonico
Istruzioni per l'uso

REF. 311501WB

3 flaconi X 5 mg
1 pezzo

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

