

AGP TEST

Per uso diagnostico *in Vitro***Kit per la valutazione dell'Aggregazione Piastrinica indotta da ADP, Adrenalina, Collagene e Ristocetina**

I. DESTINAZIONE D'USO

L'ADP, l'Adrenalina, il Collagene e la Ristocetina sono utili negli studi di aggregazione piastrinica di routine ai fini della valutazione di disfunzioni piastriniche o di attivazione piastrinica.

II. PRINCIPIO DEL TEST

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.

III. REAGENTI E MATERIALI

Ogni kit contiene:

1. ADP 0,1mM liofilo (2 flaconi x 0,5 mL).
2. Adrenalina 5 mM liofila (5 flaconi x 0,5 mL).
3. Collagen 1 mg/mL (1 flacone x 0,5 mL). Sospensione contenente 1 mg/mL di fibrille di collagene di tendine equino di Tipo 1.
4. Ristocetin 25 mg (1 flacone x 0,5 mL). Ristocetina A solfato liofila; antibiotico isolato da *Nocardia lurida*, contenente oltre il 90% di Ristocetina A.
5. Diluent A (1 flacone x 50 mL): tampone di diluizione contenente TRIS, pH 7,3.
6. Diluent B (1flacone x 4,0 mL): soluzione per diluire il collagene.
7. Istruzioni per l'uso.

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 bidistillata.
- Aggregometro

IV. CONSERVAZIONE e PREPARAZIONE DEI REATTIVI

Conservare il kit a +2 - +8°C. Il kit è stabile fino alla data di scadenza stampata sulla confezione.

ADP – Ricostituire ciascun flacone con 0,5 mL di Diluent A. Una volta ricostituito il reattivo è stabile per 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 due 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 MB. 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 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 **33 curve/flacone**.

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

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

Codice Ramo CND W010302  

M3115001 DI-5 11/14

Pag. 1 di 3



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

Ricentrifugare il rimanente sangue citratato a 2000 x g 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 mm³. Mantenere il PRP a temperatura ambiente ed eseguire le determinazioni entro 4 h.

VI. PROCEDURA

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.

VII PROCEDURA SU PRP

1. Preparare il PRP e il PPP come descritto nel paragrafo V.
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 spazi dell'aggregometro e seguire le istruzioni d'uso dello strumento per la taratura.
5. Lasciare a temperatura ambiente gli agenti aggreganti 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; avvalersi degli appositi spaziatori adesivi.

VIII. PROCEDURA CON SANGUE INTERO

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 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	



IX 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 ranges di normalità e con questi comparare le curve di aggregazione ottenute sui soggetti ritenuti patologici.

NOTA: i valori normali che seguono si sono ottenuti da diversi laboratori e da pubblicazioni. Essi devono 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
Adrenalina	Concentrazione 5 µM	% aggregazione 69 – 88 %
	Concentrazione 10 µM	% aggregazione 71 – 88 %
	Conc. inferiori a 0,2 µM	aggregazione reversibile
Collagene in PRP	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 70-80%)
	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

X. 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, Ristocetina 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.

XI. NOTA

- **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 **lumi-aggregometro** (Esempio 700-2). Si rinvia alla Scheda Tecnica e alle Istruzioni riportate nell'User Manual dello strumento.

XII. BIBLIOGRAFIA













Vedere Scheda Tecnica M3115xxx BI-0 07/11

CONFEZIONE

ADP 0,1 mM
Adrenalina liofila
Collagen 1 mg/mL
Ristocetin 25 mg
Diluent A
Diluent B
Istruzioni per l'uso

COD. 3115001 (900 test)

2 x 0,5 mL
5 x 0,5 mL
1 x 0,5 mL
1 x 0,5 mL
1 x 50 mL
1 x 4,0 mL
1 pezzo

	Dispositivo medico-diagnostico in vitro		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

Codice Ramo CND W010302  

M3115001 DI-5 11/14

Pag. 3 di 3

