

DESCRIZIONE DEL PRODOTTO

L'ADP è una preparazione liofilizzata di adenosina-5'-difosfato. La concentrazione del reagente ricostituito è 2×10^{-4} M. (Vedi tabella 1.)

UTILIZZO

L'ADP è destinato ad essere utilizzato negli studi di aggregazione piastrinica di routine ai fini della valutazione di disfunzioni piastriniche o di attivazione piastrinica.

PRINCIPIO

Nei casi in cui l'ADP venga aggiunto a plasma ricco di piastrine, esso stimola le piastrine a modificare la propria forma e ad aggregarsi. L'aggregazione indotta dall'ADP esogeno è considerata aggregazione primaria ed è reversibile. Quindi le piastrine normali rispondono rilasciando ADP endogeno dai propri granuli. Il rilascio di ADP endogeno si manifesta in una seconda irreversibile onda di aggregazione che è irreversibile.^{8,10,11}

PRECAUZIONI D'USO

L'ADP è esclusivamente destinato all'USO DIAGNOSTICO IN VITRO E NON DEVE ESSERE INIETTATO NE' INGERITO.

MATERIALE FORNITO

ADP, 3 x 0.5 mL. Conservare a temperatura compresa tra 2°-8° C prima della ricostituzione.

MATERIALI RICHIESTI MA NON INCLUSI

1. Aggregometro.
2. Acqua purificata (distillata, deionizzata di grado reagente) e PH 5.3 – 7.2.
3. Pipette (capacità 0.5 mL, 0.45 mL, 0.05 mL).
4. Barrette magnetiche monouso.
5. Provette per l'aggregometro.

STRUMENTAZIONE

L'ADP fornisce le prestazioni descritte quando è utilizzato sulla maggior parte degli aggregometri con principio ottico.¹ Seguire le istruzioni della ditta produttrice dell'aggregometro in uso.

PRELIEVO DEI CAMPIONI E PREPARAZIONE DEL TEST

Per istruzioni dettagliate sulla raccolta del campione e preparazione dei campioni, fare riferimento alle attuali linee guida H21 A2 approvate dall'NCCLS.⁹

1. PREPARAZIONE DEL PAZIENTE:

I pazienti devono astenersi dall'assunzione di aspirina o di altri medicinali contenenti aspirina, nonché di preparati o integratori alimentari che hanno effetti sulla funzionalità piastrinica durante i 7 – 10 giorni che precedono la raccolta del campione. I pazienti devono essere a digiuno ed essersi astenuti dall'assunzione di cibi grassi e latticini durante le 12 ore precedenti la raccolta del campione.⁶

2. Il prelievo dei campioni di sangue deve essere eseguito con cura per evitare stasi, emolisi e contaminazione da fluidi tissutali o contatto col vetro. Mantenere i campioni a temperatura ambiente.⁸

Quanto di seguito specificato può causare inaccuratezza dei risultati dei test; campioni contaminati non devono essere utilizzati nei casi di: emolisi, contaminazione da RBC, lipemia, chilomicroni, ittero, trombocitopenia, coaguli nel campione e ipofibrinogenemia. Anche il riutilizzo di materiale monouso può determinare inaccuratezza dei risultati d'analisi.

Osservare le precauzioni standard previste per la raccolta dei campioni, la preparazione degli stessi e per i processi analitici.^{2,3} Per lo smaltimento di prodotti biologici, devono essere predisposti appositi contenitori, in conformità alle norme di laboratorio.

PROCEDIMENTO CON L'USO DELLA SIRINGA PER IL PRELIEVO (RACCOMANDATO)⁸

- a. Utilizzare un ago a farfalla per la venopuntura.
- b. Utilizzare una siringa in plastica per prelevare 9.0 mL di sangue. Evitare di prelevare sangue in eccesso.
- c. Rimuovere l'ago dalla siringa e immediatamente e delicatamente far scorrere il sangue dentro una provetta in plastica [polipropilene]⁴ contenente 1.0mL di Sodio Citrato anticoagulante alla concentrazione di 0.11 M. Il rapporto tra sangue e anti-coagulante deve essere 9 parti di sangue e una parte di anticoagulante.⁵
- d. Chiudere la provetta e delicatamente capovolgere 4-5 volte per mescolare il contenuto.
- e. Conservare a temperatura ambiente (15° - 28°C).

NOTA: Nel caso l'ematocrito del paziente sia < 30% ovvero > 55%, il rapporto tra il campione di sangue e l'anticoagulante deve essere ricalcolato di conseguenza.⁴

TECNICA DEL PRELIEVO CON PROVETTA SOTTOVUOTO

1. Utilizzare un ago a farfalla per la venopuntura.
2. Estrarre il sangue utilizzando provette (in plastica) contenenti l'anticoagulante Sodio Citrato alla concentrazione di 0.11 M.
3. Per mescolare, capovolgere delicatamente 4-5 volte.

NOTA: quando si utilizzano provette per il prelievo sottovuoto, controllare l'etichetta per accertarsi che la concentrazione del citrato anticoagulante sia 0.11 M. I tappi colorati delle provette infatti non variano al variare delle concentrazioni di citrato. Seguire le istruzioni della ditta produttrice per la raccolta del campione.

PREPARAZIONE DEL PLASMA RICCO DI PIASTRINE (PRP) E DEL PLASMA POVERO DI PIASTRINE (PPP)

1. Preparare il plasma ricco di piastrine centrifugando il sangue con l'anticoagulante a 150 g per 10 minuti a temperatura ambiente (15°-28° C).
2. Esaminare il plasma. Se sono presenti globuli rossi, ricentrifugare a 150 x g per ulteriori 5 minuti.
3. Utilizzare una pipetta in plastica, con cura rimuovere lo strato di plasma senza entrare in contatto con i globuli rossi e trasferire il contenuto in un contenitore etichettato (PRP). Chiudere il contenitore e lasciarlo riposare a temperatura ambiente.
4. Preparare il plasma povero di piastrine centrifugando il rimanente del campione di sangue a 2500 x g per 20 minuti. Esaminare il plasma povero di piastrine per eventuale emolisi e successivamente trasferire il contenuto in una provetta in plastica etichettata (PPP).
5. Il conteggio piastrinico dovrebbe risultare $250,000 \pm 50,000/\text{mm}^3$. La concentrazione può essere aggiustata usando il PPP preparato dallo stesso campione.

NOTA: Se si utilizza Acido Arachidonico come agonista, non si può ridurre la concentrazione usando il PPP.

RICOSTITUZIONE

NOTA: I reagenti devono essere portati a temperatura ambiente (15 - 28° C) prima della ricostituzione ed anche i reagenti conservati devono essere portati a temperatura ambiente prima dell'utilizzo.

Ricostituire un boccettino di ADP con 0.5 mL di acqua purificata.

CONSERVAZIONE DEL REAGENTE

L'ADP ricostituito è stabile per 30 giorni, quando è conservato a temperatura compresa tra 2°-8° C nel suo contenitore originale chiuso.

PROCEDIMENTO DI ANALISI

L'analisi deve essere completata entro 3 ore dal prelievo del campione.⁸

1. Inserire una barretta magnetica in ciascuna provetta.
2. Preparare il bianco dell'aggregometro dispensando con una pipetta 0.5 mL di plasma povero di piastrine in una provetta.
3. Dispensare con una pipetta, 0.45 mL di plasma ricco di piastrine in una seconda provetta. Incubare a 37° C per 3 minuti ed aggiungere una barretta magnetica.
4. Predisporre, ove richiesto, lo 0% e il 100% di riferimento secondo le istruzioni della ditta produttrice dell'aggregometro in uso.
5. Aggiungere direttamente 0.05 mL di ADP al plasma ricco di piastrine. Evitare di far scivolare il reagente lungo le pareti della provetta. La concentrazione finale di ADP nel plasma ricco di piastrine è 2×10^{-5} M. (Vedi tabella 1.)
6. Lasciare che la curva di aggregazione proceda per 5 minuti.

AGGREGAZIONE BIFASICA

Per evidenziare le due distinte onde di aggregazione, o aggregazione "bifasica" da ADP, il plasma ricco di piastrine deve essere testato con varie diluizioni di reagente.¹⁰

Preparare le concentrazioni diluite di ADP come segue:

1. Etichettare 2 provette per analisi: 4×10^{-5} M e 2×10^{-5} M, vedi Tabella 1.
2. Aggiungere 0.4mL di soluzione salina alla provetta etichettata 4×10^{-5} M, e aggiungere 0.2mL di soluzione salina alla provetta etichettata 2×10^{-5} M.
3. Per la concentrazione 4×10^{-5} M procedere come segue: aggiungere 0.1 mL della 2×10^{-4} M (dalla fiala ricostituita) alla provetta etichettata 4×10^{-5} M. Mescolare (diluizione 1 a 5).
4. Per la concentrazione 2×10^{-5} M procedere come segue: aggiungere 0.2 mL della 4×10^{-5} M (dalla provetta 4×10^{-5} M) alla provetta etichettata 2×10^{-5} M. Mescolare (diluizione 1 a 2).
5. Ulteriori diluizioni possono essere preparate utilizzando uno schema simile a quello descritto nei punti 1-4.

Tabella 1

	Concentrazione di Lavoro	Concentrazione Finale
Ricostituita	2×10^{-4} M	N/A
Normale	2×10^{-4} M	2×10^{-5} M
Bifasica	2×10^{-5} M fino a 4×10^{-5} M	2×10^{-5} M fino a 4×10^{-5} M

CONTROLLO DI QUALITA'

I laboratori devono attenersi alle regole generalmente condivise nei casi in cui non siano disponibili procedure specifiche.

Per la certezza della corretta funzionalità dello strumento e delle prestazioni del reagente, eseguire ogni giorno in cui si esegue il test l'analisi anche su un controllo. Il controllo deve essere preparato nello stesso modo in cui viene preparato il campione per il test. Ai fini degli studi qualitativi sull'aggregazione piastrinica il controllo deve essere effettuato su plasma fresco ricco di piastrine, prelevato da un donatore sano (identificato e qualificato) il quale deve essersi astenuto dall'ingerire aspirina e composti che contengano salicilati, durante i dieci giorni precedenti il test. Il donatore deve avere una storia clinica attestante una normale funzionalità piastrinica.

RISULTATI

I modelli tipici di aggregazione con ADP sono illustrati nelle figure 1-3.

L'ADP alla concentrazione finale di 2×10^{-5} M nel plasma normale ricco di piastrine induce una singola ed ampia onda di aggregazione. Alla concentrazione finale (nel test) da 2×10^{-5} M fino a 4×10^{-5} M, si potrebbero osservare due onde di aggregazione (Vedi Figura 2). La prima onda costituisce la risposta all'agente esogeno ADP (reagente). La seconda onda è invece dovuta al rilascio dell'ADP endogeno dal pool non-metabolico di nucleotidi (storage pool) contenuto dentro le piastrine.⁹

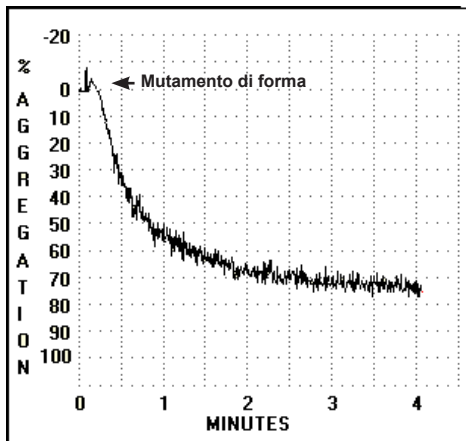


Fig. 1 Aggregazione Normale
(Concentrazione Finale $2 \times 10^{-5}M$). Vedi Tabella 1

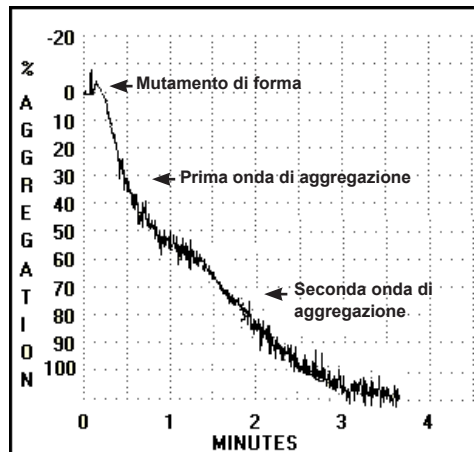


Fig. 2 Aggregazione Normale
(Concentrazione Finale $2 \times 10^{-6}M$) Vedi Tabella 1

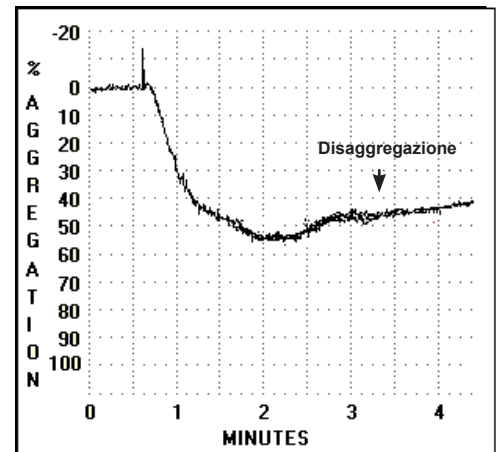


Fig. 3 Aggregazione Anormale
(Concentrazione Finale $2 \times 10^{-5}M$). Vedi Tabella 1

LEGENDA: Risultati dell'aggregazione piastrinica indotta da ADP su plasma ricco di piastrine normale e anormale.

Le frecce indicano l'aggiunta del reagente. Una disaggregazione dipendente dalla concentrazione può essere osservata in alcuni PRP normali. Tale fenomeno è osservabile nella Fig.3.

VALORI ATTESI

Le variazioni attese per ciascun reagente al variare delle concentrazioni utilizzate per indurre l'aggregazione devono essere stabilite da ciascun laboratorio, vedi Tabella 2.^{4,8,9,10}

Tabella 2

RISPOSTA TIPICA DI AGGREGAZIONE PIASTRINICA PER DONATORI NORMALI @ 250,000 PIASTRINE /mm³ [aggregazione totale a 5 minuti]

	ADP	Acido Arachidonico	Collagene [Tipo 1]	Epinefrina
Conc. Finale	$2 \times 10^{-5}M$	500 µg/mL	0.19 mg/mL	$1.0 \times 10^{-4}M$
Fase Lag [sec]	<10	≤20	<60	0
Slope Primaria	38-67	>20	35-67	7-34
Aggreg. Totale (%@5min)	63-89	65-90	61-99	54-101
Aggregazione Bifasica	Dipendente dalla concentrazione	NO	NO	Si
Altro	Si passano avere cambi di forma	Non tutti i donatori normali potrebbero essere conformi PLT~175k-300k	Non diluire	Non tutti i donatori normali potrebbero essere conformi

LIMITAZIONI

Per un'accurata interpretazione dell'analisi è necessario disporre di una dettagliata storia clinica del paziente. I pazienti devono essere intervistati in merito all'assunzione recente di medicinali, anche da banco, dato che alcuni di essi possono interferire con l'aggregazione piastrinica. Sostanze quali caffeina, tabacco, estratti d'erbe (o integratori alimentari), nonché alcol, potrebbero alterare i risultati.^{7,8}

PERFORMANCE

Gli studi effettuati hanno evidenziato che le prestazioni del prodotto hanno le caratteristiche descritte se viene utilizzato entro la data di scadenza e nel rispetto delle prescrizioni relative alle procedure e conservazione.

Linearità:

L'aggregazione piastrinica indotta dai comuni agonisti (ADP, Acido Arachidonico, Collagene ed Epinefrina) è un sistema di analisi non lineare per i seguenti parametri: Fase Lag, Slope Primario, Slope Secondario, 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.

ACCURATEZZA: Le limitazioni dell'aggregazione piastrinica rendono difficile fornire livelli di precisione o riproducibilità tipici. Tuttavia, c'è un consenso basato sull'esperienza per i seguenti parametri (vedi sotto). Ciascun laboratorio è tenuto a stabilire i propri limiti riguardo l'accettabilità del test.

PRECISIONE E RIPRODUCIBILITA'

Riproducibilità Test – Test	entro ± 7.5%
Riproducibilità Strumento – Strumento	entro ± 15%
Variazione Lotto – Lotto	entro ± 10.5%
Variazione Laboratorio- Laboratorio (analogo sistema di analisi)	entro ± 12.5%

BIBLIOGRAFIA

- Born, GVR and Cross, MJ. The Aggregation of Blood Platelets. J. Physiol [London] 168:178, 1963.
- Centers for Disease Control and Prevention. Guidelines for Isolation Precautions in Hospitals. Centers for Disease Control and Prevention. 1996; Vol 17; 1:53 - 80.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. NCCLS: Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections: Approved Guideline. NCCLS document M29. Wayne, PA
- McCabe-White, M and Jennings, LK. Platelet protocols: Research and Clinical laboratory Procedure. Academic Press. London, 1999, p 35.
- Newhouse, P and Clark, C. The Variability of Platelet Aggregation., in Triplett, DA,ed. Platelet Function: Laboratory Evaluation and Clinical Application. ASCP. Chicago. 1978. p 69.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. NCCLS Collection, Transport and Processing of Blood Specimens Approved Guideline- Second Edition. NCCLS Document H 18- A2. Wayne, PA
- Weiss, HJ: Aspirin and platelets in drugs and hematologic reactions. Dimittov and Nodine (eds.). Grune and Stratton, New York, 1974.
- Triplett, DA, Harms, CS, Newhouse, P, Clark, C: Platelet Function. Laboratory Evaluation and Clinical Application. ASCP, 1978.
- Day, HJ, Holmsen, H: Laboratory tests of platelet function. Annal Clin Lab Sci, 2:63, 1972.
- Owen, CA, Bowie, EJW, Thompson, JH: The diagnosis of bleeding disorder. Little, Brown and Co., 1975.
- William, WJ, Beutler, E., Erslev, AJ, Rundles, RW: Hematology. McGraw-Hill, 1977.

DISPONIBILITA' PRODOTTI

PRODOTTO	CONTENUTO	CATALOGO
ADP	3 x 0.5mL	101312
Arachidonic Acid	3 x 0.5mL	101297
BETA/Pak® (ADP, Collagen, Ristocetin)	1 x 0.5mL each	101580
Collagen	3 x 0.5mL	101562
Epinephrine	3 x 0.5mL	101311
Lyophilized Platelets	3 x 4 mL	101595
Lyophilized Platelets	1 x 10 mL	101258
PAR/Pak® II (ADP, Collagen, Epinephrine)	2 x 0.5mL each	101310
Ristocetin		
AggRecetin® 1.5mg/mL	15mg	100968
AggRecetin 1.0-1.5mg/mL	15mg	100970
AggRecetin Bulk	100mg	101241
vW Factor Assay®	10 Determinations	101246
vW Factor Assay	20 Determinations	103025
vW Abnormal Control Plasma	3 x 0.5mL	101270
vW Normal Reference Plasma	3 x 0.5mL	101269
vW Normal Control Plasma	3 x 0.5mL	106426

QUESTO PRODOTTO E' GARANTITO PER L'UTILIZZO DESCRITTO NELLE ETICHETTE E NELLE PUBBLICAZIONI DI BIO/DATA CORPORATION E BIO/DATA CORPORATION NON RICONOSCE ALCUNA GARANZIA IMPLICITA DI COMMERCIALITA' O IDONEITA' PER ALTRI SCOPI NE' IN ALCUN CASO BIO/DATA E' DA RITENERSI RESPONSABILE PER QUALSIVOGLIA DANNO CHE POSSA DERIVARE AL DI FUORI DELLA SUDETTA GARANZIA ESPRESSA



155 Gibraltar Road, Horsham, PA 19044 U.S.A.
(800) 257-3282 U.S.A. (215) 441-4000 Worldwide
(215) 443-8820 Fax Worldwide
E-mail: customer.service@biodatacorp.com
Internet: www.biodatacorp.com

