ADP
(ADENOSINA-5'-DIFOSFATO)

DESCRIZIONE DEL PRODOTTO
L'ADP è una preparazione liofilizzata di adenosina-5´-difosfato.). La concentrazione del reagente ricostituito è 200µL. (Vedi tabella 1.)

UTILIZZO
L'ADP è destinato ad essere utilizzato negli studi di aggregazione piastrinica di routine ai fini della valutazione di disfunzioni delle piastrine, di attivazione piastrinica e della terapia antiaggregante.

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 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
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.[6]

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 del 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.

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.

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]

PREPARAZIONE DEL PLASMA RICCO DI PIASTRINE (PRP) E DEL PLASMA POVERO DI PIASTRININE (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 ± 50,000/mm³. 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.

PROCEDURA
L'analisi deve essere completata entro 4 ore dalla raccolta del campione.[8]
1. Preparare un numero deguato di provettine per i test da eseguire e metterle nei pozzetti di incubazione.
   a.) Inerire una barretta magnetica in ciascuna provettina.
2. Preparare il bianco dell'aggregometro introducendo con una pipetta 0.250 mL di plasma povero di piastrine (PPP) in una provettina.
   a.) Non inserire la barretta magnetica nella provettina.
3. Introdurre con una pipetta 0.225 mL di plasma ricco di piastrine (PRP) nelle provettine preincubate per ciascun campione da testare.
4. Mettere la provettina col PRP nel pozzetto di incubazione.
   a.) Premere il pulsante del timer per far partire il tempo.
   b.) In cubare il campione a 37° C per il tempo pre-impostato.
5. Fare il 100% della linea di base introducendo nel pozzetto d'analisi il Bianco (PPP).
   a.) premere i pulsante del Bianco.
6. Mettere la provettina col PRP nel pozzetto d'analisi
   a.) premere il pulsante di Start
7. Aggiungere 0.025mL di reagente direttamente nel campione di PRP
   a.) premere il pulsante Inject
      I. Evitare di far scivolare il reagente lungo le pareti della provetta.
8. Lasciare che la curva di aggregazione proceda per il tempo programmato (6 minuti).

AGGREGAZIONE BIFASICA
Per ottenere 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:
Usare sempre soluzione fisiologica 0.85% o 0.90% per fare le diluzuoni.

Tabella 1

ADP	Fisiologica	Concentrazione di Lavoro	Concentrazione Finale
-------	------	200 µM	20 µM
125 µL	125 µL	100 µM	10 µM
62 µL	188 µL	50 µM	5 µM
50 µL	200 µL	40 µM	4 µM
38 µL	212 µL	30 µM	3 µM
25 µL	225 µL	20 µM**	2 µM
12 µL	238 µL	10 µM	1 µM
25 µL of *	225 µL	5 µM	0.5 µM
25 µL of **	225 µL	2 µM	0.2 µM

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 es-

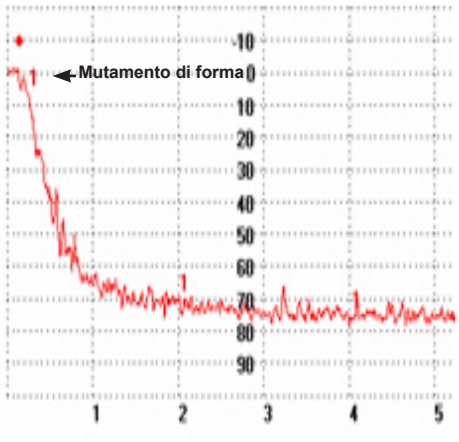

Fig. 1 Aggregazione Normale
(Concentrazione Finale 20µM). Vedi Tabella 1

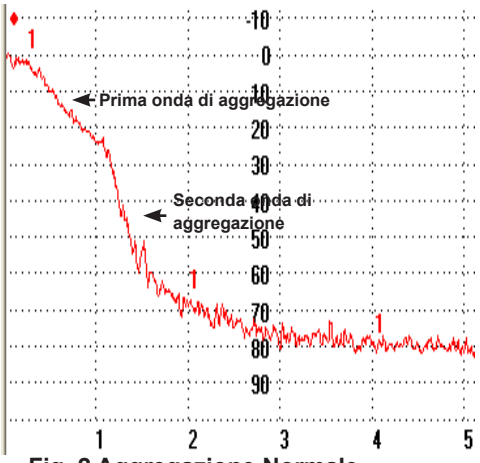

Fig. 2 Aggregazione Normale
(Concentrazione Finale 4 µM) Vedi Tabella 1

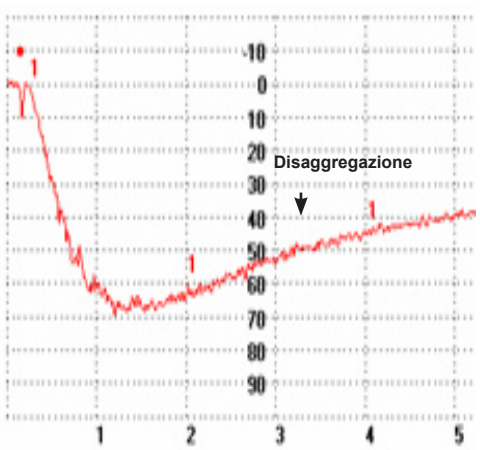

Fig.3 Aggregazione Anormale
(Concentrazione Finale 20 µM). Vedi Tabella 1

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.

sere 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.[12,13,14]

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

L'ADP alla concentrazione finale di 20 µM induce una singola ed ampia onda di aggregazione nel plasma normale ricco di piastrine. Alla concentrazione finale (nel test) da 2 µM a 10µM, 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]

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 µM	500 µg/mL	0.19 mg/mL	100 µM
Fase Lag [sec]	<10	≤20	<60	0
Slope Primaria	38-70	>20	35-67	7-45
Aggreg. Totale (%@5min)	62-101	65-90	63-109	54-101
Aggregazione Bifasica	Dipendente dalla concentrazione	NO	NO	Si
Altro	Si passono 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	migliore ± 7.5%
Riproducibilità Strumento – Strumento	migliore ± 15%
Variazione Lotto – Lotto	migliore ± 10.5%
Variazione Laboratorio- Laboratorio (analogo sistema di analisi)	migliore ± 12.5%

BIBLIOGRAFIA

1. Born, GVR and Cross, MJ. The Aggregation of Blood Platelets. J. Physiol [London] 168:178, 1963.
2. For Testing Plasma Based Settings, Siegel JD, Rhinehart E, Jackson M, Chiarello L, and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee, http://www.cdc.gov/nicdod/dhqp/pfd/isolation2007.pdf
3. CLSI. Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline - Third edition. CLSI Document M29-A3. Wayne, PA : Clinical Laboratory Standards Institute. 2005
4. McCabe-White, M and Jennings, LK. Platelet protocols: Research and Clinical laboratory Procedure. Academic Press. London. 1999, p 35.
5. Newhouse, P and Clark, C. The Variability of Platelet Aggregation. in Triplet, DA,ed. Platelet Function: Laboratory Evaluation and Clinical Application. ASCP. Chicago. 1978. p 69.
6. CLSI. Collection, Transport and Processing of Blood Specimens for Testing of Plasma Based Coagulation Assays and Molecular Hemostasis Assays; Approved Guideline - Fifth Edition; CLSI Document H21 A5. Wayne, PA:: Clinical and Laboratory Standards Institute. 2008
7. Weiss, HJ: Aspirin and platelets in drugs and hematologic reactions. Dimittov and Nodine (eds.). Grune and Stratton, New York, 1974.
8. Triplett, DA, Harms, CS, Newhouse, P, Clark, C: Platelet Function. Laboratory Evaluation and Clinical Application. ASCP, 1978.
9. Day, HJ, Holmsen, H: Laboratory tests of platelet function. Annal Clin Lab Sci, 2:63, 1972.
10. Owen, CA, Bowie, EJW, Thompson, JH: The diagnosis of bleeding disorder. Little, Brown and Co., 1975.
11. William, WJ, Beutler, E., Erslev, AJ, Rundles, RW: Hematology. McGraw-Hill, 1977.
12. CLSI. Platelet Function Testing by Aggregometry; Approved Guideline. CLSI Document H58-A. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute. 2008
13. JO Westgard, Basic QC Practices, 3rd ed. Madison, WI: Westgard QC, Inc., 2010
14. CLSI. Assessment of Laboratory Tests When Proficiency Testing Is Not Available; Approved Guideline - Second Edition. CLSI Document GP 29-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute. 2008

DISPONIBILITA' PRODOTTI
Per un elenco completo dei prodotti disponibili visitate il sito www.biodatacorp.com

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 COMMERCIABILITA' 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 SUDDETTA GARANZIA ESPRESSA

BIO/DATA CORPORATION
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

CE

EC REP EMERGO EUROPE, Prinsessegracht 20,2514 AP The Hague, The Netherlands

©Bio/Data Corporation 1981 - 2014
Printed in U.S.A.
Technical Bulletin No.106332 Rev. A