

 **CHRONO-LOG Corporation**  
2 WEST PARK ROAD  
HAVERTOWN, PA 19083-4691  
1-800-CHRONOLOG  
IN PA 610-853-1130  
FAX 610-853-3972  
chronolog@chronolog.com  
www.chronolog.com

 BioTop Medical

Modifié le 02/2015



## REACTIFS CHRONO-PAR<sup>®</sup> ET CHRONO-LUME<sup>®</sup> POUR TEST FONCTIONNEL ET ETUDE DE LA SECRETION PLAQUETTAIRE DANS UN PLASMA RICHE EN PLAQUETTE ET SANG TOTAL

*(Usage Diagnostic In Vitro – Mesure de l'agrégation  
plaquettaire et de la sécrétion d'ATP dans le sang total  
ou dans le plasma riche en plaquettes)*

### INTRODUCTION

Les réactifs CHRONO-PAR<sup>®</sup> et CHRONO-LUME<sup>®</sup> sont utilisés pour confirmer la fonction plaquettaire normale et pour diagnostiquer les dysfonctionnements plaquettaires.

**Les réactifs CHRONO-PAR et CHRONO-LUME suivants sont appropriés pour une utilisation sur sang total et plasma riche en plaquettes :**

**ADP (Réf.384)** – Pour le PRP à faibles concentrations, (<1 µM), le changement de forme est suivi d'une phase d'agrégation primaire puis de désagrégation. Avec des concentrations supérieures (1 à 5 µM), une réponse bi-phasique est souvent visible. La deuxième phase d'agrégation nécessite la synthèse du thromboxane A2 qui est affectée par les inhibiteurs de cyclooxygénase tels que l'aspirine. L'agrégation par l'ADP sur sang total nécessite des concentrations plus élevées d'ADP (typiquement 5 à 20 µM).

**Acide arachidonique (Réf. 390)** - Test direct pour la synthèse de la prostanoïde, car l'agrégation nécessite une conversion en thromboxane A2 par la cyclooxygénase, un processus qui est inhibé par l'aspirine. L'absence d'agrégation ou des réponses inférieures à la plage normale indiquent fréquemment une ingestion de médicament au cours des jours précédents.

**ATP Standard (Réf. 387)** - Quantification de libération d'ATP. 2 µmole d'adénosine 5' triphosphate lyophilisé. L'ajout de 5 µL à n'importe quel volume d'échantillon à tester donne un standard à la concentration de 2 nmole

**CHRONO-LUME (Réf. 395)** - Quantification de la libération d'ATP dans la détection de la prise d'aspirine et le diagnostic des troubles du stockage et de la sécrétion. La Luciférine-Luciférase se lie à l'ATP, générant de la lumière proportionnelle à la quantité d'ATP libérée par les plaquettes de l'échantillon à tester.

**REMARQUE :** La réaction avec le réactif CHRONO-LUME est dépendante du temps et de la température. Assurez-vous d'incuber chaque échantillon pendant deux minutes seulement avant de commencer le test.

**Collagène (Réf. 385)** – Une phase de latence suit l'addition d'un réactif à l'échantillon à tester, au cours de laquelle le collagène polymérise en fibrilles pour l'activation des plaquettes. Le collagène à faible concentration (1 à 2 µg / mL) est inhibé par les inhibiteurs de cyclooxygénase tels que l'aspirine. Normalement, les concentrations plus élevées (5 µg / mL) ne sont pas affectées.

**Epinéphrine (Réf. 393)** – Le changement de forme n'est pas observé avec cet agoniste. Des concentrations plus élevées (> 5 µM) produisent une courbe biphasique avec une deuxième phase d'agrégation dépendant de la synthèse de thromboxane A2. L'épinéphrine n'est pas recommandée en tant qu'agoniste standard pour le dépistage clinique sur sang total, car moins de 50% répondent à ce très faible agoniste. L'anticoagulant recommandé pour le dépistage sur sang total avec l'épinéphrine est le citrate trisodique à 1,5% avec 2 Unités d'héparine par mL de citrate.

**Ristocétine (Réf. 396)** – Détection de la maladie de Von Willebrand (un défaut quantitatif ou qualitatif du facteur plasmatique von Willebrand) et du syndrome de Bernard Soulier (manque de glycoprotéine GPIb de la membrane plaquettaire) et la thrombasthénie de Glanzmann avec un modèle d'agrégation-désagrégation. Les résultats avec la Ristocétine peuvent également être affectés par l'aspirine.

**Thrombine (Réf. 386)** – Quantification de la libération maximale d'ATP à 1U / mL, ne pas utiliser pour l'agrégation. La sécrétion en réponse à la thrombine est indépendante de la synthèse du thromboxane. L'absence ou la diminution de la sécrétion due à la thrombine peut être révélatrice d'une déficience du stockage ou d'un défaut de sécrétion.

**REMARQUE :** Les réactifs CHRONO-PAR sont expédiés à température ambiante. À l'arrivée, les stocker comme recommandé.

## MATERIEL NECEDSSAIRE MAIS NON FOURNIS

1. Agrégomètre
2. Cuvettes
3. Barreaux aimantés
4. Micropipettes réglables de 0,5 µL à 100 µL pour réactifs.
5. Pipettes de 100 µL à 1 mL pour échantillons sanguins.
6. Sérum physiologique stérile pour l'irrigation (0,85% ou 0,9% p / v) pour la préparation du réactif CHRONO-PAR® et pour la dilution de l'échantillon de sang entier

Évitez la solution saline de la banque de sang car elle peut être d'une osmolarité incorrecte. Les diluants des compteurs de cellules ne conviennent pas car ils contiennent de l'EDTA, ce qui inhibe l'agrégation plaquettaire. Les solutions salines de perfusion sont inappropriées car elles contiennent de l'alcool benzylique ou autres conservateurs qui inhibent la fonction plaquettaire.

7. L'eau distillée stérile en flacon convient à la préparation des réactifs CHRONO-PAR®.

L'eau doit être sans pyrogène (sans ATP) pour reconstituer des réactifs et ne pas contenir de conservateurs tels que l'alcool benzylique qui inhibe la fonction plaquettaire.

8. Glace pour maintenir des réactifs reconstitués à des températures appropriées.
9. Tubes coniques en plastique
10. KimWipes®
11. Sonde d'impédance [réutilisable]
12. Sonde d'impédance [Jetable], Voir le Manuel de l'Instrument pour les instructions sur les réactifs.

**REMARQUE :** Tous les réactifs CHRONO-PAR doivent être décongelés à température ambiante ou décongelés à la main et ne doivent pas être placés dans un bain-marie.

## INTERPRETATION DES RESULTATS

Les courbes d'agrégation et de sécrétion d'ATP luminescent à partir du sang et du PRP peuvent être interprétés comme suit :

- Comparaison directe à un contrôle normal exempt de drogue qui sert également de contrôle de qualité en temps réel.
- Comparaison à des valeurs normales publiées qui peuvent être vérifiées et reproduites par n'importe quel laboratoire.
- Le collagène ou l'acide arachidonique libère de l'ATP à des doses ou supérieures ou égales à 50% de celles obtenues par la thrombine. L'ADP et l'épinéphrine induisent moins de libération d'ATP.
- Lors d'une étude sur 106 patients présentant une déficience du stockage (SPD) ; 23% avaient des réponses normales d'agrégation optique (PRP) à l'ADP, à l'épinéphrine et au collagène ; 44% avaient des anomalies d'agrégation diverses. Les auteurs ont conclu que le SPD est commun, hétérogène et non nécessairement associé à des anomalies d'agrégation optique (PRP).<sup>7</sup>
- La mesure simultanée de l'agrégation et la libération d'ATP fournit des preuves sans équivoque de la sécrétion des granules denses (5). La valeur seuil à laquelle la déficience du stockage (SPD) doit être considérée a été rapportée comme étant inférieure à 0,5 nmole d'ATP en réponse à la thrombine 1U.<sup>4</sup>

## LIMITES

- Les tests devraient être effectués dans les 3 heures suivant la ponction veineuse.
- Beaucoup de médicaments inhibent la fonction plaquettaire. Si le but du test n'est pas de démontrer l'inhibition induite par un médicament, les patients devraient être sans médicament pendant deux semaines avant le test.
- Les tests sur sang total avec ADP nécessitent un nombre de plaquettes supérieur à 100 000 dans la cuvette test. L'addition de la solution Saline et du Chrono-Lume réduit le nombre de plaquettes.
- Des évaluations cliniques et de laboratoire supplémentaires peut être nécessaire pour confirmer le diagnostic.

## CONTROLE QUALITE

C'est une bonne pratique de laboratoire de tester un contrôle normal sans médicaments quand les réactifs sont reconstitués ou décongelés.

## GARANTIE

Les REACTIFS CHRONO-PAR® ET CHRONO-LUME® qui ne démontrent pas l'agrégation et la libération dans des contrôles normaux sans médicaments avant l'expiration et lorsqu'ils sont stockés et reconstitués comme indiqué sont remplacés sans frais. Cette garantie s'applique uniquement aux États-Unis.

REACTIFS CHRONO-PAR® ET CHRONO-LUME®				
REACTIF	PRESENTATION	PREPARATION	DUREE DE CONSERVATION ET STOCKAGE	VOLUMES RECOMMANDES
<b>ADP</b>  <i>Réf. 384</i>  <i>Stock Conc.:</i>  1 mM	2.5 mg d'une préparation lyophilisée de disphosphate d'adénosine	<p>Taper doucement le flacon pour faire descendre tout le contenu au fond.</p> <p>Reconstituer avec 5mL de solution saline physiologique.</p> <p>Laisser reposer pendant 10 minutes avec des renversements occasionnels.</p>	<p><u>Réactif lyophilisé</u> : jusqu'à la date de péremption, conserver congelé en dessous de 0°C.</p> <p><u>Réactif reconstitué</u> : 1 an ou jusqu'à date d'expiration, conserver congelé à -70°C dans un volume approprié à des séries quotidiennes.</p> <p><u>Stock de travail</u> : 8 heures à 2 - 8°C</p>	<p><u>Sang dilué/non dilué</u> : Ajouter 10µL de réactif dans 1 mL d'échantillon pour une concentration finale de 10µM. L'agrégation normale et la libération d'ATP sont observées sur sang total avec des concentrations finales de 5 à 20 µM.</p> <p><u>PRP</u> : Ajouter 5µL de réactif à 500µL d'échantillon pour une concentration finale de 10µM. L'agrégation normale et la libération d'ATP sont observées sur PRP avec des concentrations finales de 5 à 10 µM.</p>
<b>Acide Arachidonique</b> <i>Réf. 390</i>  <i>Stock Conc. :</i> 50 mM	Minimum de 10mg d'acide arachidonique avec une pureté supérieure à 99%. L'albume contient 100 mg d'albume bovine, fraction V en poudre, pure entre 96% et 99%.	<p>Taper doucement le flacon pour faire descendre tout le contenu d'albume au fond. Retirer le bouchon et reconstituer l'albume avec 1 mL de solution physiologique saline. Laisser reposer puis mélanger occasionnellement en agitant. Laisser reposer 15 à 30 minutes pour que l'albume soit totalement en solution (vérifier visuellement) et inverser doucement pour bien dissoudre l'albume. L'acide arachidonique dans le flacon est une goutte huileuse qui doit être secouée ou tapotée vers le bas du flacon. Taper le bout du tube avec un Cap Cracker™ fourni. Pipeter l'albume reconstituée dans la pointe et le corps du flacon en aliquotes de 100 µL à 700 µL.</p> <p>Mélanger dans de l'acide arachidonique à l'intérieur de la pointe ou du corps du flacon en faisant tourner le flacon lorsque l'albume est ajoutée. Répéter plusieurs fois dans chaque section du flacon puis mélanger vigoureusement la suspension à l'aide d'une pipette de transfert. Combiner la suspension de la pointe avec celle dans le corps du flacon et continuer à mélanger jusqu'à ce que la suspension atteigne la turbidité maximale. Vortexer pendant 2 minutes juste avant d'exécuter le test.</p>	<p><u>Réactif lyophilisé</u> : <b>Albumine</b> - Jusqu'à la date d'expiration, à 2 -8 °C.</p> <p><b>A / A Oily Drop</b> - Jusqu'à la date d'expiration, conservé congelé à au moins -20 °C.</p> <p><u>Réactif reconstitué</u> : 3 mois lorsqu'il est conservé à -70 °C à l'obscurité en aliquotes de 100µL ; 1 mois lorsqu'il est conservé à -20 °C à l'obscurité. Des aliquotes peuvent être décongelées à la main et vigoureusement remises en suspension pendant 2 minutes avec un vortex juste avant utilisation. <u>Stock de travail</u> : 8 heures</p> <p>à 2 - 8 °C à l'obscurité car l'albumine est sensible à la lumière.</p>	<p><u>Sang dilué/non dilué</u> : Ajouter 10µL de réactif dans 1 mL d'échantillon pour une concentration finale de 0,5 mM.</p> <p><u>PRP</u> : Ajouter 5µL de réactif dans 500µL d'échantillon pour une concentration finale de 0,5 mM.</p> <p>L'agrégation normale et la libération d'ATP sont observées avec des concentrations finales de 0,5 mM sur le sang total et de 0,5 à 1 mM pour le PRP.</p>
<b>ATP STANDARD</b> <i>Réf. 387</i>  <i>Stock : 2 µmole</i>	Adénosine 5' Triphosphate lyophilisée	<p>Taper doucement le tube pour faire descendre tout le contenu au fond de celui-ci.</p> <p>Retirer le bouchon, ajouter 5 mL de solution saline physiologique pour un standard de 2 µmole. Reboucher et inverser doucement le tube. Inverser à nouveau avant utilisation. Laisser reposer pendant 10 minutes avec une inversion occasionnelle.</p> <p>L'ATP lyophilisé peut apparaître sous la forme de particules à celle d'un film mince. Cet aspect est approprié pour une utilisation après reconstitution.</p>	<p><u>Réactif lyophilisé</u> : jusqu'à la date d'expiration, congelé en dessous de 0°C.</p> <p><u>Réactif reconstitué</u> : 2 semaines, stocké congelé en aliquotes à -20°C</p> <p><u>Stock de travail</u> : 24 heures, à 2-8°C</p>	<p><u>Sang dilué/non dilué</u> : Ajouter 5µL dans 1mL d'échantillon pour un standard de 2 nmoles.</p> <p><u>PRP</u> : Ajouter 5 µL dans 500µL d'échantillon pour une pour un standard de 2 nmoles.</p>

REACTIFS CHRONO-PAR® ET CHRONO-LUME® (suite)				
REACTIF	FOURNI COMME	PREPARATION	DUREE DE CONSERVATION ET STOCKAGE	VOLUMES RECOMMANDES
<b>CHRONO-LUME</b> Réf.: 395 Stock Conc.: 2 µM/L Luciférine/ Luciférase/ 1,25 mL	0,2 mg de Luciférine, 22 000 unités de d-luciférase, sulfate de magnésium, sérum albumine humaine, stabilisants et tampon.	Taper doucement le flacon pour faire descendre toute le contenu au fond. Retirer le bouchon et reconstituer avec 1,25 ml d'eau distillée stérile. Avant d'utiliser, laisser reposer pendant 20 minutes avec des inversions occasionnelles du flacon.	<u>Réactif lyophilisé</u> : jusqu'à la date d'expiration, stocké en dessous de 0°C.  <u>Réactif reconstitué</u> : 30 jours,  Stocker au congélateur à -20°C en aliquotes, ce qui convient pour les tests quotidiens.  Stock de travail : 8 heures entre 2°C et 8°C à l'obscurité.	Sang dilué/ non dilué : Ajouter 100 µL de réactif reconstitué dans 900µL de sang dilué ou non dilué pour mesurer la libération d' ATP.  <i>PRP : Ajouter 50µL de réactif reconstitué dans 450µL de plasma riche en plaquette pour mesurer la libération d'ATP.</i>
<b>Collagène</b> Réf.: 385 Stock Conc. : 50mM	Les fibrilles de collagène natif (type I) de tendons equins mis en suspension dans une solution de glucose isotonique de pH 2,7.	Peut être utilisé directement comme fourni. Inverser ou agiter le flacon avant son utilisation, car les fibrilles de collagène sont en suspension. Ne pas congeler. Si nécessaire, le collagène peut encore être dilué dans du glucose isotonique pH 2,7.  <b>REMARQUE</b> : en raison de son pH très bas, les micro-organismes ne poussent pas facilement. Si des techniques aseptiques sont utilisées (seringue stérile et aiguille pour déposer un jour d'utilisation dans un tube à micro-centrifugeuse conique), le réactif restant, entreposé entre 2°C et 8 °C est stable jusqu'à la date d'expiration. <b>Parafimer le flacon d'origine et les aliquotes.</b>	<u>Tel que fourni</u> : jusqu'à date d'expiration, stocké entre 2°C et 8°C.  <b>L'aliquote de réactif retirée du flacon et stockée dans un tube de micro-centrifugation conique est stable pendant une semaine à 2°C et 8°C lorsqu'il est para-filmé.</b>	Sang dilué/ non dilué : Ajouter 2 µL de réactif dans 1 mL d'échantillon pour une concentration finale de 2µg/mL. <i>PRP</i> : Ajouter 1µL de réactif dans 500µL d'échantillon pour une concentration finale de 2µg/mL L'agrégation normale et la libération d'ATP sont observées avec une concentration finale de 1 à 5 µg/mL.
<b>Epinéphrine Réf.:</b> 393 Stock Conc.: 10mM pour test sur sang total 1mM pour test sur PRP	Préparation lyophilisée de bitartrate d' 1-épinéphrine avec des stabilisants.	Taper doucement le flacon pour faire descendre toute le contenu au fond. Retirer le bouchon et reconstituer avec 5 mL d'eau distillée stérile pour l'analyse sur sang total. Diluer la solution stock au 1:10 avec une solution saline physiologique pour le test PRP. Laisser reposer pendant 10 minutes avec des inversions occasionnelles.	<u>Réactif lyophilisé</u> : jusqu'à la date d'expiration, réfrigéré entre 2°C et 8°C <u>Réactif reconstitué</u> : 3 mois, stocker congeler à -70°C, dans l'obscurité et dans 100µL d'aliquotes  Stock de travail : 8 heures entre 2°C et 8°C dans un contenant protégé de la lumière.	Sang dilué/non dilué : ajouter 5µL de solution Stock dans 1 mL d'échantillon pour une concentration de 50 µM. L'agrégation et la libération d'ATP peuvent être observées sur sang total à une concentration de 50µM.  PRP : Ajouter 5µL de solution diluée au 1:10 dans 500 µL d'échantillon pour une concentration de 10µM. L'agrégation normale et la libération d'ATP sont observées avec 5µM à 10µM de PRP .  <b>REMARQUE</b> : Les sujets normaux présentent une variabilité considérable qui n'est pas corrélée avec l'âge, le sexe, le stress, le régime, le nombre de plaquettes ou l'hématocrite.
<b>Ristocétine</b> Réf.: 396 Stock Conc.: 125 mg/mL	Ristocétine stabilisée lyophilisée.	Taper doucement le flacon pour faire descendre toute le contenu au fond. Retirer le bouchon et reconstituer avec 0,5mL d'eau distillée stérile. Reboucher et laisser reposer pendant 10 à 15 minutes. Inspectez visuellement le fond du flacon pour confirmer que le réactif est complètement en suspension. Inverser doucement pour dissoudre tout réactif restant dans le bouchon et laisser reposer pendant 10 à 15 minutes jusqu'à ce que toutes les particules soient bien dissoutes. Peut avoir une suspension de couleur claire à brunâtre après reconstitution. Ne jamais agiter le réactif. Créer un tourbillon doux juste avant l'utilisation.	<u>Réactif lyophilisé</u> : jusqu'à date d'expiration, réfrigéré à 2-8°C <u>Réactif reconstitué</u> : 3 mois, stocké congelé à -20°C, en volumes adaptés à une journée de test. NE PAS STOCKER A -70°C.  Stock de travail : 8 heures entre 2°C et 8°C à l'obscurité.	Sang dilué/non dilué : Ajouter 8µL de réactif dans 1mL d'échantillon pour une concentration de 1 mg/mL. L'agrégation normale est observée avec des concentrations finales de 0,5 à1.  <i>PRP</i> : Ajouter 5µL de réactif à 500µL d'échantillon pour une concentration de 1,25 mg/mL. L'agrégation normale est observée avec une concentration finale de 0,9 à 1,25mg/mL  <b>REMARQUE</b> : Pour détecter le type 2B ou le type plaquettaire von Willebrand, tester avec une faible concentration de Ristocétine (0,25 mg/mL sur sang total et 0,5 mg/mL sur PRP).
<b>Thrombine</b> Réf.: 386 Stock Conc.: 10 Unités/mL	Thrombine lyophilisée de plasma humain.	Taper doucement le flacon pour faire descendre toute le contenu au fond. Retirer le bouchon et reconstituer avec 1 mL de solution saline physiologique. Laisser reposer pendant 10 minutes avec d'occasionnelles inversions.	<u>Réactif lyophilisé</u> : jusqu'à date d'expiration, stocker congelé en dessous de 0°C.  <u>Réactif reconstitué</u> : 3 mois, stocker congelé à -70°C dans des volumes adaptés pour une journée de test  Stock de travail : 24 heures entre 2°C et 8°C	Sang dilué/ non dilué : Ajouter 100µL de réactif dans 1mL d'échantillon pour une concentration de 1 Unité/mL.  <i>PRP</i> : ajouter 50µL de réactif dans 500µL d'échantillon pour une concentration de 1 Unité/mL.  <b>Sécrétion seulement : la libération maximale d'ATP est observée avec une concentration finale de 1 Unité/mL</b>



## RESULTATS ATTENDUES

REPONSE D'AGREGATION AVEC DES ANOMALIES SELECTES						
Réactif	Concentration finale	Effet Aspirine ****		Von Willebrand & Bernard Soulier	Pool de stockage/ défaut de sécrétion	Thrombo Asthénie de Glanzmann
ADP	5 µM à 20 µM	N, R *		N	N, R *	A
Acide Arachidonique	0,5 mM	A		N	N	A
Collagène	2 µg/mL à 5 µg/mL	2µg/mL	5 µg/mL	N	N	A
		R	N			
Epinéphrine	10 µM à 50 µM	R*		N	R *	A
Ristocétine	0,25 à 1 mg/mL [WB] 0,5 à 1,25 mg/mL	Défaut Qualitatif		** A, R, H *** >70 s de. retard (vW)	N	Défaut qualitatif

\* Deuxième phase inhibée

\*\* Le type 2B et le type plaquettes de Willebrand augmentent à une faible concentration de 0,25 mg/mL sur sang total et de 0,25 à 0,5 mg/mL sur PRP (10,11). En outre, lorsque du cryo-précipité est ajouté dans l'échantillon à tester du patient ayant le type plaquettaire [Pseudo] VWD, la réponse rehaussée à la faible concentration de Ristocétine se poursuit alors qu'un patient de type 2B ne montrera aucune réponse.

\*\*\* Pour distinguer von Willebrand et Bernard Soulier, ajouter un plasma normal ou un cryo-précipité dans l'échantillon du patient ; le patient vW répondra, le patient avec Bernard Soulier ne répondra pas.<sup>11</sup>

\*\*\*\* Réponse typique pour le donneur prenant 250mg d'aspirine (1,2).

SECRETION D'ATP AVEC DES ANOMALIES CONNUES					
Réactif	Concentration finale	Effect Aspirine**	Von Willebrand & Bernard Soulier	Pool stockage/ défaut sécrétion	Glanzmann's Thrombastheni
ADP	5 à 20 µM	A, R	N	A, R	A
Acide Arachidonique	0,5 mM	A	N	A, R	R
Collagène	2 à 5 µg/mL	R	N	A, R	R
Epinéphrine	10 à 50µM	A	N	A, R	A
Ristocétine	0,25 à 1 mg/mL [WB] 0,5 à 1,25 mg/mL	—	—	—	—
		—	—	—	—
Thrombine	[PRP] 1 Unité	N	N	A, R	R <sup>5</sup>

\* Des concentrations plus élevées que n'importe quel agoniste, y compris la thrombine jusqu'à 5 unités, induisent une sécrétion d'ATP avec un trouble de la sécrétion mais pas avec un défaut de stockage.<sup>5</sup>

\*\* Réponse typique pour le donneur prenant 250mg d'aspirine.<sup>12</sup>

**Légende:** A – Absent H – Hyper N – Normal R – Réduit  
(Par rapport aux résultats habituels)

## REALISATION DES TESTS

Réf.	Description	Volume Unitaire	Conc. ST/PRP	Final Conc. ST/PRP	Volume par Test		Tests par Unité	
					ST*	PRP**	ST	PRP
386	Thrombine	1 mL	10 Unit/mL	1 Unit	100µL	50µL	10	20
385	Collagène	1 mL	1 mg/mL	2µg/mL	2µL	1µL	500	1000
390	Acide Arachidonique	0,7 mL	50 mM	0.5 mM	10µL	5µL	70	140
396	Ristocétine	0,5 mL	125 mg/mL	1.0 mg/mL/ 1.25 mg/mL	8µL	5µL	62	100
395	Chrono-lume	4x1,25 mL	N/A	N/A	100µL	50µL	50	100
384	ADP	5 mL	1 mM	10µM	10µL	5µL	500	1000
393	Epinéphrine	5 mL/50 mL	10 mM/1 mM	50µM/10µM	5µL	5µL	1000	10000
387	ATP Standard	5 mL	2 µmole	2 nmole	5µL	5µL	1000	1000

\* Dans un échantillon de 1 mL—généralement 450 µL de sang dilué avec 450 µL de solution saline physiologique plus 100 µL de réactif CHRONO-LUME ou 1 mL d'échantillon de sang sans CHRONO-LUME si testé avec la Ristocétine.

\*\* Dans un échantillon de 500 µL - généralement 450 µL de plasma riche en plaquettes plus 50 µL de réactif CHRONO-LUME ou 500 µL de plasma riche en plaquettes sans CHRONO-LUME si testé avec la Ristocétine. (Réduire les volumes de MOITIE avec des entretoises en caoutchouc Réf. 365 pour un échantillon de micro-volume de 250 µL).

**REMARQUE :** Les solutions stock multiples ne sont pas requises. Pour changer la concentration finale, régler le volume de la pipette.

**REMARQUE :** Pour de meilleurs résultats, les réactifs de travail reconstitués doivent être conservés sur de la glace. Le CHRONO-LUME®, l'EPINEPHRINE, l'ACIDE ARACHIDONIQUE et le RISTOCETINE reconstitués doivent être conservés dans la glace et à l'obscurité.

Étant donné que chaque test nécessite uniquement des micro-volumes de réactif, il est essentiel d'éviter l'introduction d'un excès de réactif. Par conséquent, retirer le réactif en excès essuyant l'extérieur de la pointe de la micropipette après avoir prélevé le réactif.

Il est important que la pointe de la micropipette soit immergée dans l'échantillon et que le réactif soit injecté avec force. **NE PAS** déposer le réactif au-dessus de l'échantillon dans la cuvette ou sur le bord de la cuvette car le réactif s'accroche alors sur le bord de la cuvette et ne se mélange pas à l'échantillon.

EC REP BioTop Medical

Poortgebouw Noord, Rijnsburgerweg 10  
2333 AA LEIDEN, The Netherlands

## PROCEDURES

Les procédures utilisant AGGRO / LINK® avec un logiciel compatible Windows et le format NCCLS GP2-A3 sont disponibles sur disque ou par Email (priced@chronolog.com) pour :

- Agrégation sur sang total
- Agrégation sur sang total avec libération d'ATP
- Agrégation optique sur PRP
- Agrégation optique avec libération d'ATP

**ÉCHANTILLONS DE PATIENTS ET CONTROLE** - collecter le contrôle normal sans médicaments et les échantillons de patients dans des tubes sous vide stériles avec surface non mouillable et 1/10 de volume de citrate de sodium tamponné à 3,2%. Prélever 20 à 30 mL de sang pour le test sur PRP optique ou 5 à 10 mL de sang pour le test sur sang total.

## GAMME HABITUELLE

**REMARQUE :** Les valeurs normales suivantes ont été obtenues auprès de divers laboratoires et publications. Elles doivent être utilisés uniquement comme un guide. Les valeurs habituelles devraient être établies pour l'agrégation et la libération d'ATP par chaque laboratoire.

### Gamme habituelle pour le plasma riche en plaquettes (Moyenne +/- 1 DS)

Réactif	Conc.	Agg. (%) <sup>2</sup>	ATP (nmole)
Thrombine	1 Unité	N/A	>0,5 <sup>3</sup>
Collagène	2 µg/mL	70 - 94	0,74 – 1,92 <sup>9</sup>
Acid. Arrach.	0,5 mM	74 – 99 <sup>9**</sup>	0,56 – 1,40 <sup>9</sup>
ADP	5 µM	69 - 88	0,41 – 0,63 <sup>2</sup>
	10 µM	71 - 88	0,5 – 1,06 <sup>9</sup>
Epinéphrine	5 µM	78 - 88	0,40 – 0,52 <sup>2</sup>
Ristocétine	1,25 mg/mL	87 - 102 <sup>9**</sup>	N/A

(\*\* +/- 2 SD)

### Gamme habituelle en sang total (Moyenne +/- 2 DS)

Réactif	Conc.	Agg. (ohms) <sup>1</sup>	ATP (nmole) <sup>1</sup>
Thrombine	1 Unité	N/A	>0,5 <sup>4</sup>
Collagène	2 µg/mL	15 - 27	0,5 – 1,7
	5 µg/mL	15 - 31	0,9 – 1,7
Acid. Arrach.	0,5 mM	5 - 17	0,6 – 1,4
ADP	5 µM	1 - 17	0 – 0,7
	10 µM <sup>3</sup>	6 - 24	0,38 – 1,71 <sup>13</sup>
Ristocétine	1 mg/mL	> 5^; < 70 sec. temps de retard <sup>4</sup>	N/A

**CALCUL DE LA LIBÉRATION D'ATP – Le logiciel AGGRO / LINK** calcule la libération d'ATP. Si vous utiliser un graphique, la formule suivante est utilisée pour le calcul :

$$\frac{\text{Luminescence du test}}{\text{Gain du test}} \times \frac{\text{Gain du standard}}{\text{Luminescence du standard}} \times 2 \text{ nmoles}$$

la norme

## REFERENCES

- (1) Ingerman-Wojenski CM and Silver MJ: A Quick Method for Screening Platelet Dysfunctions Using the Whole Blood Lumi-Aggregometer. *Thromb Hemostas* 51-2 (154-156) 1984.
- (2) White MMC, Jennings LK: *Platelet Protocols: Research and Clinical Laboratory Procedures*. Academic Press, 1999.
- (3) Podczasy JJ, Lee J, Vucenik I: Evaluation of Whole-Blood Lumiaggregation. *Clin Appl. Thrombosis/Hemostasis*, 3(3):190-195, 1997.
- (4) Sweeney JD, Hoernig LA, Michnik A and Fitzpatrick JE: Whole Blood Aggregometry. Influence of Sample Collection and Delay in Study Performance on Test Results. *Am J Clin Pathol* 1989; 92:676-679.
- (5) Feinman RD, Detwiler TC and Ingerman-Wojenski C: The Lumi-Aggregometer as a Research and Clinical Tool. *The Plts.: Physiology and Pharmacology*. Copyright 1985 by Academic Press, Inc.
- (6) Sirridge, M: *Laboratory Evaluation of the Bleeding Patient. Clinics in Laboratory Medicine*, Vol. 4, No. 2, June 1984.
- (7) 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.
- (8) Sweeney JD, Hoernig LA and Fitzpatrick JE: Whole Blood Aggregation in von Willebrand Disease. *Am J Hematol* 32: 190-193 (1989).
- (9) UMDNJ, Spec. Hemostasis Lab, New Brunswick, NJ.
- (10) Sweeney JD, Hoernig LA, Behrens AN, Novak E, and Swank RT: Von Willebrand's Variant (type II Buffalo). *American Journal of Clinical Pathology* Vol. 93, No. 4, (522-525) 1990.
- (11) Miller JL: Platelet-Type von Willebrand's Disease. *Thrombosis and Hemostasis* Vol. 7, No. 4, 1985.
- (12) Taylor ML, Misso NLA, Stewart GA, Thompson PJ: The effects of varying doses of aspirin on human platelet activation induced by PAF, Collagen and arachidonic acid. *Br J Clin Pharmacol.*, (1992), 33, 25-31.
- (13) Ingham Medical Center, Lansing, MI.
- (14) Riess H, Braun G, Brehm G and Hiller E.: Critical Evaluation of Platelet Aggregation in Human Whole Blood. *Am J Clin Pathol*. Vol. 85, No. 1, (50-56) 1986.
- (15) Gengo FM, Rainka M, Robson M, Gengo MF, Forrest A, Hourihane M and Bates V: Prevalence of Platelet non-responsiveness to Aspirin in patients Treated for Secondary Stroke Prophylaxis and in patients with recurrent Ischemic Events. *Jrnl of Clin Pharmacology*. Vol 48 No 3, 335-343, 2008.