Kollagen

REF AG005K

R1 3 x 0,5 mg; R2 3 x 12 mL

IVD

Kollagen für Thrombozytenaggregationsteste

HYPHEN BioMed

Vertrieb und Support:
CoaChrom Diagnostica GmbH
www.coachrom.com | info@coachrom.com
Tel. +43-1-236 222 1 | Fax +43-1-236 222 111
Kostenfreie Nummern für Deutschland:
Tel. 0800-24 66 33-0 | Fax 0800-24 66 33-3

VERWENDUNGSZWECK:

Für in-vitro-diagnostische Untersuchungen. Messung der Thrombozytenaggregation.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERLÄUTERUNGEN:

Untersuchung der konstitutionellen (z. B.: Glanzmann-Thrombasthenie, Bernard-Soulier-Syndrom, Grey-platelet-Syndrom usw.) oder erworbenen Thrombopathie (z. B.: myelodysplastisches Syndrom, myeloproliferatives Syndrom, multiples Myelom, Morbus Waldenström, Leber- oder Niereninsuffizienz usw.)
Überwachung der Therapie mit Thrombozytenfunktionshemmern wie z.B. Aspirin, NSAR, Thienopyridine, Abciximab oder andere GPIIbIIIa-Hemmer

TESTPRINZIP:

Aktiviert man thrombozytenreiches Plasma mit Kollagen, so bindet Kollagen an die GPIa/IIa- und GPVI- Rezeptoren auf der Thrombozytenoberfläche. Der GPVI-Rezeptor ist für die Thrombozytenaktivierung verantwortlich, die zur Freisetzung von ADP, Thromboxan A_2 und intrazellulärem Calcium führt[1, 2, 3]. Die Thrombozytenaggregation als Reaktion auf Kollagen zeigt typischerweise eine lag-Phase an, die durch die Kollagenkonzentration bestimmt wird. Es folgt ein Formwandel der Thrombozyten, der durch eine Abnahme der Transmission dargestellt wird. Anschließend folgt eine einfache Aggregationswelle. Kollagen gilt als starker Agonist.

REAGENZIEN:

R1 **Reagenz 1: Kollagen:** Kollagen, lyophilisiert, mit Stabilisatoren (Kollagen aus Pferdesehnen (hauptsächlich Typ I)).
3 Flaschen mit je 0,5 mg.
R2 **Reagenz 2: Verdünnungslösung für Kollagen**
3 Flaschen mit je 12 mL.

VORSICHTSMASSNAHMEN UND WARNHINWEISE:

- Alle Produkte biologischer Herkunft sind mit der erforderlichen Sorgfalt zu behandeln und gelten als potenziell infektiös.
- Bei der Entsorgung von Restmaterial sind die geltenden lokalen Richtlinien zu befolgen.
- Bei der Nutzung der Reagenzien ist eine Kontamination zu vermeiden. Die Verdunstung des Reagenzes ist zu verhindern.
- Um die Stabilität der Reagenzien zu erhalten, müssen die Flaschen nach jeder Verwendung mit dem jeweiligen Schraubverschluss verschlossen werden.
- Stabilitätsuntersuchungen bei 30°C über einen Zeitraum von 3 Wochen zeigten keine Veränderung der Reagenzeigenschaften. Die Reagenzien können ohne Beeinträchtigung bei Raumtemperatur versendet werden.
- Es wird empfohlen, die zu testenden Patientenproben und Kontrollen zeitnah nacheinander abzuarbeiten, um eine optimale Testleistung zu erzielen.
- Das Reagenz darf ausschließlich für in-vitro-diagnostische Untersuchungen verwendet werden.

HERSTELLUNG UND STABILITÄT DER REAGENZIEN:

Der Inhalt der Flasche ist lyophilisiert und die Flasche steht unter Vakuum. Beim Öffnen der Flasche muss der Gummistopfen vorsichtig entfernt werden, um einen Verlust des lyophilisierten Reagenzes zu vermeiden.

R1 **Reagenz 1: Reagenz Kollagen**
Für Aggregometer:
Jede Flasche mit **genau 0,5 mL destilliertem Wasser** rekonstituieren und bis zum vollständigen Lösen des Lyophilisates mischen. Das Reagenz 30 min. bei Raumtemperatur (18-25°C) äquilibrieren, dabei von Zeit zu Zeit schwenken.
Das Reagenz vor jeder Verwendung homogenisieren.

Für Automaten:
Jede Flasche mit **genau 0,625 mL destilliertem Wasser** rekonstituieren und bis zum vollständigen Lösen des Lyophilisates mischen. Das Reagenz 30 min. bei Raumtemperatur (18-25°C) äquilibrieren und dabei von Zeit zu Zeit schwenken.
Das Reagenz vor jeder Verwendung homogenisieren.

Stabilität der gelösten Reagenzien in der Originalflasche (unter Vermeidung von Kontamination und Verdunstung):
- **4 Wochen** bei 2-8°C.
- **24 Stunden** bei Raumtemperatur (18-25°C).
- **Nicht einfrieren.**

R2 **Reagenz 2: Verdünnungslösung für Kollagen**
Gebrauchsfertig. Vor der Benutzung 30 Min. bei Raumtemperatur (18-25°C) temperieren lassen.
Vor jedem Gebrauch gut homogenisieren.
Stabilität der Reagenzien in der geöffneten Originalflasche (unter Vermeidung von Kontamination und Verdunstung):
- **4 Wochen** bei 2-8°C.
- **24 Stunden** bei Raumtemperatur (18-25°C).
- **Nicht einfrieren.**

LAGERUNG:

Ungeöffnete Reagenzien müssen bei 2-8°C in der Originalverpackung gelagert werden. Sie können dann bis zu dem auf dem Testkit aufgedruckten Verfalldatum verwendet werden.

ERFORDERLICHE, ABER NICHT MITGELIEFERTE REAGENZIEN UND AUSRÜSTUNGEN:

Reagenzien:
- Destilliertes Wasser.

Materialien:
- Lichttransmissionsaggregometer.
- Gerinnungsanalyser der Sysmex CS-Serie und zugehöriges Verbrauchsmaterial.
- kalibrierte Pipetten.

ENTNAHMEN UND VORBEREITUNG DER PATIENTENPROBEN :

Die Gewinnung und Lagerung der Proben sind entsprechend den geltenden lokalen Empfehlungen durchzuführen (für die USA sind nähere Informationen über die Probenahme, die Verarbeitung und Lagerung den Empfehlungen des CLSI zu entnehmen).
Im Falle der Untersuchung einer Thrombopathie dürfen die Patienten 10 Tage vorher keine Medikamente eingenommen haben, die die Thrombozytenfunktionen beeinträchtigen (z. B.: Aspirin). Die Patienten sollen mindestens 12 Stunden vor der Probenahme[4] keine fetten Nahrungsmittel, Kaffee und Milchprodukte zu sich nehmen.

- Proben:

antikoaguliertes Vollblut (Natriumcitrat).

- Probennahme:

Vorsichtig 1 Teil Natriumcitrat-Lösung (0,109M) mit 9 Teilen venösem Blut unter Vermeidung von Schaumbildung mischen. Es darf kein Röhrchen mit CTAD Zusatz verwendet werden. Das erste Röhrchen ist zu verwerfen. Das verschlossene Röhrchen ist nach der Abnahme 4 bis 5 Mal vorsichtig zu schwenken, um eine optimale Durchmischung zu erreichen. **Die Proben sind bei Raumtemperatur aufzubewahren** (18°C bis 25°C).

- Zentrifugation:

Herstellung des plättchenreichen Plasmas (PRP) und des plättchenarmen Plasmas (PPP):
1) **PRP:** Zentrifugation der Citrat-Vollblut-Probe bei 150 x g für 10 Minuten bei Raumtemperatur (18°C-25°C).
2) Das Plasma auf rote Blutkörperchen überprüfen, ggf. nochmals bei 150 x g weitere 5 Minuten zentrifugieren.
3) Für die Herstellung des PRP den Überstand mit einer Kunststoffpipette entnehmen. Dabei darf das Zellsediment nicht berührt oder angesaugt werden. Den Überstand in ein mit PRP gekennzeichnetes Röhrchen überführen, **das Röhrchen verschließen und bei Raumtemperatur lagern.**
4) **PPP:** Zentrifugation des verbliebenen Zellsedimentes der PRP Herstellung bei 2000 – 2500 x g für 15 Minuten. Die Probe ist auf Hämolyse zu überprüfen. Den Überstand in ein Kunststoffröhrchen mit der Aufschrift PPP überführen. **Das Röhrchen verschließen und bei Raumtemperatur lagern.**
5) Die Empfehlungen der ISTH[5] bezüglich der Anzahl der Thrombozyten im PRP sind anzuwenden.

VORGEHENSWEISE:

Automatisierte Methode:
Die Applikation für die Gerinnungsanalyser der Sysmex CS-Serie ist auf Anfrage verfügbar. **Bitte beachten Sie die systemspezifischen Anwendungs- und Warnhinweise des jeweiligen Analysers.**

Aggregometer: Verdünnung des Kollagens:
Um die Thrombozytenaggregation nach Aktivierung mit Kollagen richtig beurteilen zu können, müssen verschiedene Kollagen -Konzentrationen mit 2 und 10 µg/mL Endkonzentration im Testansatz eingesetzt werden.
Für die Untersuchung von Thrombopathien kann mit 2 µg/mL Endkonzentration gearbeitet werden.
Bereiten Sie das zur Verdünnung des Kollagens erforderliche Volumen nach folgendem Schema in Glasröhrchen oder Kunststoffröhrchen vor:

Kollagen-Konzentration (µg/mL)	200	40
Kollagen (µL) (Konz.)	100 (1mg/mL)	100 (200µg/mL)
Verdünnungslösung für Kollagen (µL)	400	400
Endkonz. in dem Test (µg/mL)	**10**	**2**

Die Kollagenverdünnungen sind 1 Woche bei 18-25°C und 2 Wochen bei 2-8°C in einem fest verschlossenen Röhrchen stabil.

Protokoll:
Die Aggregation muss innerhalb von 3 Stunden nach der Probennahme durchgeführt werden.

1. Jede Küvette muss mit einem Rührer bestückt werden.
2. Für den 100 % Abgleich der Aggregation wird eine mit **300 µL PPP** gefüllte Küvette genutzt.
3. **285 µL** thrombozytenreiches Plasma (PRP) in eine zweite Küvette pipettieren. **2 Minuten bei 37°C** inkubieren. Mit dieser Küvette den 0% Abgleich der Aggregation durchführen und die Aufzeichnung der Aggregation starten.
4. Mit einer langgezogenen, feinen Pipettenspitze **15 µL Kollagen (40 oder 200 µg/mL)** direkt in das thrombozytenreiche Plasma geben. **Nicht gegen die Küvettenwände pipettieren**.
5. Die Aggregationskurve 5 bis 10 Minuten aufzeichnen.

Jedes Labor kann sein eigenes Testprotokoll erstellen und validieren. Die erzielten Ergebnisse müssen unter den laborspezifischen Vorgaben überprüft werden. (Reagenzien/Instrumente/Testprotokoll).
Der Anwender ist für die Validierung von Änderungen und deren Auswirkungen auf die Ergebnisse selbst verantwortlich.

HYPHEN BioMed
95000 Neuville sur Oise - FRANCE

QUALITÄTSKONTROLLE:

Qualitätskontrollen sichern die Ergebnisse der Testdurchführung und dokumentieren die Einhaltung der Inter-Assay-Varianz der jeweiligen Reagenzcharge.
Das Kontrollmaterial muss wie die Proben vorbereitet werden.
Für qualitative Untersuchungen der Thrombozytenaggregation kann die Kontrolle nur aus frisch abgenommenem Citratvollblut eines gesunden (spezifizierten und qualifizierten) Spenders genutzt werden.
Der Spender darf 10 Tage keine Medikamente (z.B. ASS) eingenommen haben, die die Thrombozytenfunktion beeinflussen. Weiterhin muss der Spender eine normale Thrombozytenfunktions-Anamnese haben.
Qualitätskontrollen sind in jeder Serie zu messen, entsprechend der Vorgaben des Qualitätsmanagements und der „good laboratory practice".
Es ist für jede Testreihe oder mindestens für jede neue Reagenzcharge eine Kontrolle zu messen. Nach jeder Wartung oder Reparatur des Automaten ist ebenfalls eine Kontrolle zu messen. Bei Kontrollmessungen außerhalb des Akzeptanzbereiches müssen die Kontrollen wiederholt werden und ggf. entsprechende Maßnahmen eingeleitet werden.
Jedes Labor muss seine eigenen Akzeptanzbereiche festlegen und die erwartete Leistungsfähigkeit in seinem analytischen System überprüfen.

ERGEBNISSE:

Die Befunde der Aggregationsprofile können nur im Zusammenhang mit der Anamnese und Epikrise des Patienten beurteilt werden. Besonders wichtig ist die aktuelle Anamnese, da zahlreiche Medikamente einen Einfluss auf die Thrombozytenaggregation haben. Substanzen wie Koffein, Tabak, Alkohol, Vitamin C usw. können ebenfalls die Aggregationsergebnisse beeinflussen. Die Ergebnisse müssen im Hinblick auf den klinischen Kontext des Patienten analysiert werden.

EINSCHRÄNKUNGEN:

- Um eine optimale Testleistung zu erzielen und die Spezifikationen zu erfüllen, sind die von HYPHEN BioMed validierten technischen Anweisungen einzuhalten. Das Labor ist verantwortlich für die Validierung aller Änderungen an dieser Gebrauchsanleitung.
- Alle Reagenzien, die optisch auffällig sind oder Zeichen einer Kontamination aufweisen, sind zu verwerfen.
- Alle Proben, die Gerinnsel oder Zeichen von Kontaminationen enthalten, sind zu verwerfen.
- Proben nach problematischer Blutentnahme oder Proben, die Aktivierungsanzeichen aufweisen, sind zu verwerfen.

ERWARTETE WERTE:

Für jedes Reagenz und die verschiedenen Konzentrationen muss die Leistungsfähigkeit von jedem Labor unter den aktuellen Arbeitsbedingungen überprüft werden.

LEISTUNGSMERKMALE:

Beispiel für maximale normale und anormale Aggregation (%)

	Normal	Anormal
Maximale Aggregation (%)	93	29

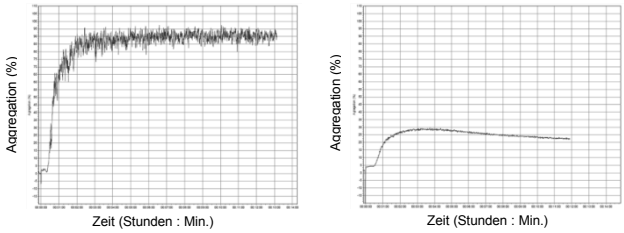

Abbildung: Beispiel für normale (links) und anormale (rechts) Aggregationskurven mit Kollagen (2 µg/mL)

LITERATUR:

1. Yardumian et al., « Laboratory investigation of platelet function: a review of methodology ». J Clin Pathol, 39 :701-712, 1986.
2. Zhou et al., « Platelet aggregation testing in platelet-rich plasma ». AM J Clin Pathol, 123 :172-183, 2005.
3. Angiolillo et al., « Basic principles of platelet biology and clinical implications ». Circ J, 74 :597-607, 2010.
4. McCabe-White and Jennings, « Platelet protocols: research and clinical laboratory procedure ». Academic press London, p 35, 1999.
5. Recommendations for the Standardization of Light Transmission Aggregometry : A consensus of the Working Party from the Platelet Physiology Subcommittee of SSC/ISTH. 2013.

SYMBOLE:

Die Symbole und Zeichen sind in der ISO-Norm 15223-1 aufgeführt, bitte beziehen Sie sich auf das Dokument Definition der Symbole.

Aktualisierung gegenüber der vorherigen Version

HYPHEN BioMed
95000 Neuville sur Oise - FRANCE