ADP 200 - REAGENZ FÜR DIE AGGREGATION

Probe & go Labordiagnostica GmbH

Gebrauchsanleitung

Verwendungszweck

ADP - Reagenz (ADP, Adenenosindiphosphat) wird für die Untersuchung der Aggregation von Thrombozyten mit Hilfe der Lichttransmissionsaggregometrie im plättchenreichen Plasma (PRP)[1] (aus antikoaguliertem Vollblut) eingesetzt.

Zusammenfassung

An der Aggregation von Thrombozyten durch ADP sind verschiedenen Rezeptoren beteiligt, insbesondere P2Y1 und P2Y12. Diese lösen über G-Proteine intrazelluläre Reaktionen aus, was zur Freisetzung von Inhaltsstoffen der verschiedenen Thrombozytengranula führt, darunter auch von Serotonin, Thromboxan A2 und ADP. Dadurch kommt es zur Aggregation der Thrombozyten. Störungen in der Funktion der ADP-Rezeptoren können verschiedene Ursachen haben. Häufig werden Sie durch Medikamente ausgelöst, die direkt gegen P2Y12 gerichtet sind. Eine übermäßige Hemmung durch Medikamente bzw. eine andere kongenitale oder erworbene Funktionsstörung von ADP-Rezeptoren kann zu Blutungen führen.

Prinzip der Methode

Lichttransmissionsaggregometrie**:** Plättchenreiches Plasma (PRP) wird in einer Küvette mit dem ADP-Reagenz versetzt. Die Trübungsabnahme des Plasmas durch Aggregation der Thrombozyten wird im Aggregometer unter konstantem Rühren gemessen. Es kommt zu einer Änderung der Lichttransmission. In die Auswertung kommen die Zeit vom Zusatz des Reagenzes bis zum Beginn des Shape-Change bzw. der Aggregation, die Aggregationsgeschwindigkeit (Slope) sowie die maximale Aggregation. Siehe das Handbuch des Gerätes für weitere Angaben.

Reagenz

REF 72 100 (2 x 1ml)

Zusammensetzung: ADP (Adenosindiphosphat), lyophilisiert

Warnhinweis: Gebrauch für *in vitro Diagnostik*.

Lagerung: Bei 2-8°C lagern und nur bis zum aufgedruckten Verfallsdatum verwenden.

Rekonstitution des Reagenz: Stopfen vorsichtig entfernen und mit 1 ml frischem bidestillierten Wasser (ohne Konservierungsmittel) rekonstituieren, 10 min stehen lassen und vorsichtig schwenken. Man erhält so eine Konzentration von 200 µM ADP im Reagenz und 20 µM ADP im Reaktionsansatz (bei 1 Vol. Reagenz + 9 Vol. Probe).

Aufbewahren nach Rekonstitution: Das angesetzte Reagenz ist verschlossen bei 2-8°C im Originalfläschchen zu lagern.

Haltbarkeit nach Rekonstitution: Bei Rekonstitution mit 1 ml frischem bidestillierten Wasser ist das Reagenz verschlossen im Originalfläschchen bei 2-8°C für 30 Tage stabil, bei 15-25°C für 24 Stunden. Nicht einfrieren.

Empfohlenes Material und Geräte

- Aggregometer, Aggregometerküvetten mit Rührstäbchen
- Bidestilliertes Wasser, kalibrierte Pipetten und saubere Pipettenspitzen
- Kunststoffeinmalpipetten, Kunststoffröhrchen
- Blutentnahmeröhrchen, Zentrifuge

Dieses Reagenz kann mit handelsüblichen Aggregometern für Lichttransmissionsaggregometrie eingesetzt werden. Der Betrieb sollte nach Angaben des Herstellers erfolgen. Insbesondere ist auf eine Standardisierung der Rührgeschwindigkeit zu achten.

Blutentnahme und Probenvorbereitung

Blut für die Durchführung der Aggregation sollte so schonend wie möglich in handelsübliche Entnahmeröhrchen aus Kunststoff oder Silikon-beschichtetem Glas gewonnen werden. Als **Antikoagulanzien** eignen sich sowohl Natriumzitrat (0,11 M) wie auch BAPA (Xipla®) (Benzylsulfonyl-d-Arg-Pro-4-amidinobenzylamid), ein dualer synthetischer Inhibitor von FXa und FIIa[2]. BAPA (Xipla®) antikoaguliertes Blut zeigt gegenüber Zitrat eine deutlich verlängerte Probenstabilität.[3]

Die **Blutentnahme** muss äußerst sorgfältig durch vorsichtige Venenpunktion, wenn möglich ohne Stau, erfolgen. Blut und Antikoagulanz müssen sofort nach Abnahme schonend durch vorsichtiges Schwenken gemischt werden. Die Aufbewahrung erfolgt bei 15-25°C. Ein Abkühlen des Blutes auf niedrigere Temperaturen als 15°C während Lagerung oder Transport ist unbedingt zu vermeiden, ebenso eine mechanische Belastung durch Schütteln, da es zu einer Schädigung der Thrombozyten kommen kann. Ein Transport des Blutes über Druckluftsysteme (Rohrpost) wird nicht empfohlen.

Probenstabilität:

- In Zitrat: maximal 4 h (von der Blutentnahme bis zum Abschluss aller Schritte)
- In BAPA (Xipla®): bis 24h[3]

Zur **Herstellung von plättchenreichem Plasma** (PRP) wird das Blut bei Raumtemperatur für 10 min bei 150 x g zentrifugiert. Ggf. muss noch einmal für 5 min zentrifugiert werden, wenn sich noch Erythrozyten im Überstand befinden. Zur besseren Vergleichbarkeit der Messwerte sollte immer mit derselben Zentrifuge gearbeitet werden. Das PRP wird schonend mit einer Kunststoffeinmalpipette oder einer Pipette mit Kunststoffspitze in ein sauberes Kunststoffröhrchen überführt und dieses luftdicht verschlossen. Das PRP sollte vor der Analyse ca. 30 min ruhen. Es empfiehlt sich, die Thrombozytenzahl zu bestimmen, da je nach Gerät eine gewisse Mindest- oder Höchstzahl von Thrombozyten für eine verlässliche Messung erforderlich ist. Eine Einstellung der Thrombozytenzahl durch Mischen von PRP mit Plasma derselben Probe wird heute allerdings außer bei extremen Thrombozytenzahlen eher kritisch gesehen.[4, 5]

Zur Herstellung von plättchenarmen Plasma (PPP) wird das restliche Blut (oder eine separate Probe desselben Patienten) nochmals für 20 min bei 1500 x g zentrifugiert und der Überstand schonend mit einer Kunststoffeinmalpipette oder einer Pipette mit Kunststoffspitze in ein anderes sauberes Röhrchen überführt.

Durchführung des Tests

Bitte folgen Sie den Angaben im Gerätehandbuch. Beispiel:

1. Stellen Sie einen Leerwert her durch Pipettieren von 250 µl PPP in eine Küvette
2. Pipettieren Sie 225 µl PRP in eine Küvette mit Rührstäbchen
3. Inkubation (5 min)
4. Wenn erforderlich: 0 und 100% Grundlinie gemäß Gerätehandbuch einstellen
5. ADP-Reagenz durch Schwenken des Fläschchens vorsichtig aufmischen, dann 25 µl direkt dem PRP zusetzen (nicht an die Küvettenwand pipettieren!), Spitze danach immer verwerfen
6. Aggregometriekurve für den gewünschten Zeitraum (mindestens 6 min) aufzeichnen.

Ergebnisse

Die **Normalwerte** von PRP von gesunden Probanden mit ADP bei 20 µM im Test liegen üblicherweise bei ca. 40-95% Aggregation. Viele präanalytische Einflüsse (Punktion der Vene, Staubedingungen, Kanüle, Antikoagulanz, Typ des Röhrchens, Zentrifugationsbedingungen, Restzahl von Erythrozyten im PRP, Rührgeschwindigkeit u.a.m.) können zu mehr oder weniger großen Abweichungen führen. Daher sollte jedes Labor seine eigenen Referenzwerte bestimmen.

Zur Interpretation der Ergebnisse bei **Patientenproben** sollten Tests mit anderen Aggregationsreagenzien und andere Laborparameter (z.B. Fibrinogen, von Willebrand-Faktor, Blutbild, Plättchenzahl) hinzugezogen werden. Siehe Gerätehandbuch und Fachliteratur für weitere Informationen. Unbedingt zu beachten ist, dass sich Ergebnisse nur dann vergleichen lassen, wenn standardisierte Reagenzien und diese in einer standardisierten Konzentration verwendet werden.

Sehr niedrige Konzentrationen von ADP (< 0,5 bis 2,5 µM) bewirken nur eine primäre oder reversible Aggregation und die Plättchenaggregate sind wenig stabil und können disaggregieren. Bei höheren ADP-Konzentrationen kommt es zu einer irreversiblen zweiten Aggregationswelle, die zur Bildung von Thromboxan A2 und Freisetzung des Inhalts der alpha-Granula führt. Die wichtigste Ursache für pathologische Werte bei der Aggregation mit ADP ist die Einnahme von Medikamenten, die den Rezeptor P2Y12 aus der Familie der inhibitorischen Gi-Protein-gekoppelten Purinrezeptoren der Thrombozyten hemmen (z.B. Clopidogrel, Prasugrel, Ticagrelor, Cangrelor, Ticlopidin).[6] Bei einigen Patienten kann die Hemmwirkung durch solche Medikamente, insbesondere bei Clopidogrel, vermindert sein.[7, 8, 9] Bei der Thrombasthenie Glanzmann bleibt die Aggregation mit ADP aus, während beim Bernard Soulier- oder beim von Willebrand- Syndrom normale Werte erhalten werden. Bei Storage-Pool-Defekt oder Mangel der Enzyme Thromboxansynthetase oder Cyclooxygenase oder Einnahme von Acetylsalicylsäure ist meist nur die erste Welle betroffen.

Einschränkungen

Ergebnisse sind zu einem gewissen Grad je nach Gerät mehr oder weniger von der Thrombozytenzahl abhängig. Oft werden bei Thrombozytenzahlen von < 75/nl niedrigere Ergebnisse gefunden. Es ist zu beachten, dass viele diätetische oder medikamentöse Faktoren die Plättchenfunktion beeinflussen können.[10] Bei der Lichttransmissionsaggregometrie können je nach Gerät Lipämie, Bilirubin oder Hämoglobin die Ergebnisse beeinflussen.

Qualitätskontrolle

Zur Sicherstellung der Qualität wird empfohlen, mit jeder Serie von Patientenproben frisches Blut von einem bekannten gesunden Spender ohne Einnahme von Medikamenten wie eine Patientenprobe aufzubereiten und zu untersuchen.

Probe & go Labordiagnostica GmbH
Lagesche Str. 15e | 32657 Lemgo
T +49 (0) 5261 - 920 7120
F +49 (0) 5261 - 920 7122
info@probe-go.de, www.probe-go.de

Referenzen

[1] Cattaneo M, et al. Recommendations for the Standardization of Light Transmission Aggregometry: A Consensus of the Working Party from the Platelet Physiology Subcommittee of SSC/ISTH. J Thromb Haemost. 2013;11:1183–1189
[2] Haubelt H, Vogt A, Hellstern P. Preservation of platelet aggregation and dense granule secretion during extended storage of blood samples in the presence of a synthetic dual inhibitor of factor Xa and thrombin. Platelets. 2008;19:496-501
[3] Hellstern P, et al. Preservation of in vitro function of platelets stored in the presence of a synthetic dual inhibitor of factor Xa and thrombin. J Thromb Haemost. 2007;5:2119-26
[4] Linnemann B, et al. Standardization of light transmittance aggregometry for monitoring antiplatelet therapy: an adjustment for platelet count is not necessary. J Thromb Haemost. 2008;6:677-83
[5] Cattaneo M, et al. Platelet aggregation studies: autologous platelet-poor plasma inhibits platelet aggregation when added to platelet-rich plasma to normalize platelet count. 2007;92: 694-7.
[6] Murugappa S, Kunapuli SP: The role of ADP receptors in platelet function. In: Front. Biosci.. 11, Nr. 1, 2006, S. 1977–1986
[7] Geisler T, Schaeffeler E, Gawaz M, Schwab M. Genetic variation of platelet function and pharmacology: an update of current knowledge. Thromb Haemost. 2013;110:876-87
[8] D'Ascenzo F, et al. The prognostic impact of high on-treatment platelet reactivity with aspirin or ADP receptor antagonists: systematic review and meta-analysis.Biomed Res Int. 2014;2014:61029
[9] Trenk D, Kristensen SD, Hochholzer W, Neumann FJ. High on-treatment platelet reactivity and P2Y12 antagonists in clinical trials. Thromb Haemost. 2013;109:834-45
[10] Bachmair EM, Ostertag LM, Zhang X, de Roos B. Dietary manipulation of platelet function. Pharmacol Ther. 2014; 144:97-113.

REF = Bestellnummer
LOT = Chargenbezeichnung
= Verwendbar bis
= Gebrauchsanweisung beachten
NON STERILE = nicht steril
= nicht zur Wiederverwendung
5°C 25°C = Lagerung
IVD = in vitro Diagnostika