

RISTOCETIN 15 - REAGENZ FÜR DIE AGGREGATION



Gebrauchsanleitung

Verwendungszweck

Das Antibiotikum Ristocetin wird für die Untersuchung der Aggregation (richtiger: der Agglutination) von Thrombozyten mit Hilfe der Lichttransmissionsaggregometrie im plättchenreichen Plasma (PRP)¹ (aus antikoaguliertem Vollblut) eingesetzt.

Zusammenfassung

Die Agglutination von Thrombozyten durch Ristocetin wird durch Interaktion des Von-Willebrand-Faktors (VWF) mit dem Glykoprotein (Gplb) induziert. Bei Patienten mit kongenitalem oder erworbenem Von-Willebrand-Syndrom liegt ein quantitativer Mangel oder ein Funktionsdefekt des VWF vor und es kommt zu einer abnormalen Agglutination mit Ristocetin. Die Ristocetin-induzierte Plättchenaggregation (RIPA) wird zur Diagnose und weiteren Charakterisierung eines VWF-Syndroms und Störung des Gplb wie z.B. des Bernard-Soulier-Syndrom eingesetzt.^{2, 3, 4}

Prinzip der Methode

Plättchenreiches Plasma (PRP) wird in einer Küvette mit dem Ristocetin-Reagenz versetzt. Die Trübungsabnahme des Plasmas durch Agglutination 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 72 700 (2 x 1ml)

Zusammensetzung: Ristocetin, Stabilisatoren, lyophilisiert

Warnhinweis: Für 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 bidestilliertem Wasser (ohne Konservierungsmittel) rekonstituieren, 10 min stehen lassen und vorsichtig schwenken. Man erhält so eine Konzentration von 15 mg/ml Ristocetin im Reagenz und 1,5 mg/ml Ristocetin 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 bidestilliertem 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 **Antikoagulant** eignet sich Natriumzitrat (0,11 M). BAPA (Xipla®) (Benzylsulfonyl-d-Arg-Pro-4-amidinobenzylamid), ein dualer synthetischer Inhibitor von FXa und FIIa, ist NICHT geeignet.⁵ Die **Blutentnahme** muss äußerst sorgfältig durch vorsichtige Venenpunktion, wenn möglich ohne Stau, erfolgen. Blut und Antikoagulant 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)

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 verschließen. 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.^{6,7}

Zur Herstellung von plättchenarmem 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

(Beispiel) Bitte folgen Sie den Angaben im Gerätehandbuch.

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. Ristocetin-Reagenz durch Schwenken des Fläschchens vorsichtig aufmischen, dann 25 µl direkt dem PRP zusetzen (nicht an die Küvettenwand pipettieren!), Spitze danach immer verwerfen
6. Aggregometrieurve für den gewünschten Zeitraum (mindestens 6 min) aufzeichnen.

Ergebnisse

Die **Normalwerte** von PRP von gesunden Probanden mit 1 mg/ml Ristocetin im Test liegen üblicherweise bei >60 % Aggregation. Es können viele präanalytische Einflüsse (Punktion der Vene, Staubbedingungen, Kanüle, Antikoagulant, Typ des Röhrchens, Zentrifugationsbedingungen, Restzahl von Erythrozyten im PRP, Rührgeschwindigkeit u.a.m.) hier 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, Flowzytometrie) hinzugezogen werden. Siehe Gerätehandbuch sowie 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. Bei Patienten mit von Willebrand-Syndrom sind meist, aber nicht immer, folgende Ergebnisse zu erwarten:

VWF-Mangel Typ	Agglutination
Typ 1	Keine bzw. verminderte
Typ 2A	Keine bzw. verminderte
Typ 2B	Verstärkte
Typ 3	Keine bzw. sehr stark verminderte

Bei Patienten mit Bernard Soulier Syndrom bleibt die Agglutination aus oder ist stark pathologisch. Bei Storage Pool Defekten und Thrombasthenie Glanzmann ist meist die erste Phase der Agglutination betroffen. Defekte von Cyclooxygenase oder Thromboxan-Synthetase sowie Effekte von Azetylsalicylsäure werden nicht erfasst.

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.⁸ Bei der Lichttransmissionsaggregometrie können Lipämie, Bilirubin oder Hämoglobin je nach Gerät 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 - 9207122
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 U Budde et al. Standardisierte Diagnostik des von Willebrand- Syndroms. *Hämostaseologie* 24, 12 (2004)
- ³ M. Franchini, Advances in the diagnosis and management of von Willebrand disease. *Hematology.* 11, 219 (2006)
- ⁴ Franchini M. Acquired von Willebrand Syndrome: An Update. *American Journal of Hematology* 82:368–375 (2007).
- ⁵ 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
- ⁶ 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
- ⁷ 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.
- ⁸ Bachmair EM, Ostertag LM, Zhang X, de Roos B. Dietary manipulation of platelet function. *Pharmacol Ther.* 2014; 144:97-113.

