

KOLLAGEN 100 - REAGENZ FÜR DIE AGGREGATION



Gebrauchsanleitung

Verwendungszweck

Kollagen - Reagenz (fibrilläres Kollagen aus Pferdesehnen) wird für die Untersuchung der Aggregation von Thrombozyten mit Hilfe der Lichttransmissionsaggregometrie im plättchenreichen Plasma (PRP)¹ (aus antikoaguliertem Vollblut) eingesetzt.²

Zusammenfassung

Verschiedene Rezeptoren der Thrombozyten sind in die Aggregation durch Kollagen involviert, insbesondere GP VI und GP Ia/IIa.³ Ein Mangel von Kollagenrezeptoren kann zu einer hämorrhagischen Diathese führen und die Sensitivität auf Medikamente wie Aspirin erhöhen. Die Aktivierung durch Kollagen induziert die Plättchenaggregation, typischerweise nach einer Lagphase.

Prinzip der Methode

Plättchenreiches Plasma (PRP) wird in einer Küvette mit dem Kollagen-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 Reagenz 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 72 300 (2 x 1ml)

Zusammensetzung: native Kollagenfibrillen aus Pferdesehnen, Stabilisatoren, 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, dann vorsichtig schwenken. Man erhält so eine Konzentration von 100 µg/ml Kollagen im Reagenz und 10 µg/ml Kollagen 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 **Antikoagulantien** eignen sich sowohl Natriumzitrat (0,11 M) wie auch BAPA (Xipla®) (Benzylsulfonyl-D-Arg-Pro-4-amidinobenzylamid), ein dualer synthetischer Inhibitor von FXa und FIIa⁴. BAPA (Xipla®) antikoaguliertes Blut zeigt gegenüber Zitrat eine deutlich verlängerte Probenstabilität.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)
- In BAPA (Xipla®): bis 24h

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.^{6,7} 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 durch Pipettieren von 250 µl PPP in eine Küvette einen Leerwert her
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. Kollagen-Reagenz durch Schwenken des Fläschchens vorsichtig aufmischen, dann 25 µl direkt dem PRP zusetzen (nicht an die Küvettenwand pipettieren!), Spitze danach immer werfen
6. Aggregometrieurve für den gewünschten Zeitraum (mindestens 6 min) aufzeichnen.

Ergebnisse

Die **Normalwerte** von PRP von gesunden Probanden mit Kollagen bei 10 µg im Test liegen üblicherweise bei >75% 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. Nach einer Lag-Phase setzt die Aggregation ein, meist in einer einzelnen, großen Aggregationswelle. Eine abnormale Aggregation mit Kollagen kann die Lag-Phase, die Aggregationsgeschwindigkeit und die maximale Aggregation beeinträchtigen. Abnormale Werte findet man nach Einnahme von Aspirin, Storage-Pool-Defekt, beim Mangel der Enzyme Cyclooxygenase oder Thromboxan-Synthetase; bei einer Thrombasthenie Glanzmann bleibt die Aggregation mit Kollagen meist ganz aus.^{8,9}

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 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 - 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 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
- ³ Clemetson KJ. Platelets and Primary Haemostasis. Thrombs Res 2012; 129: 220-224
- ⁴ 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
- ⁵ 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
- 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 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
- ⁹ Nieswandt B, Pleines I, Bender M. Platelet adhesion and activation mechanisms in arterial thrombosis and ischaemic stroke. J Thromb Haemost. 2011;9 Suppl 1:92-104
- ¹⁰ Bachmair EM, Ostertag LM, Zhang X, de Roos B. Dietary manipulation of platelet function. Pharmacol Ther. 2014; 144:97-113.

	= Bestellnummer		= Chargenbezeichnung		= Verwendbar bis
	= Gebrauchsanweisung beachten		= nicht steril		= nicht zur Wiederverwendung
	= Lagerung		= in vitro Diagnostika		