



Ristocetin

REF AG004K

R 3 x 7,5 mg

Ristocetin pro agregační testy destiček



www.hyphen-biomed.com

155, rue d'Eragny
95000 NEUVILLE SUR OISE
FRANCE
Tel. : +33 (0)1 34 40 65 10
Fax : +33 (0)1 34 48 72 36
info@hyphen-biomed.com

Revize: 06/2021

POUŽITÍ:

Pro In Vitro diagnostické použití pro stanovení agregace trombocytů.

SOUHRN:

Ristocetinový reagent je navržen pro agregační testy destiček indukované Ristonetinem (RIPA). Tento test se používá ke stanovení von Willebrandovy choroby, specificky k zvýraznění zvýšené afinity von Willebrandova faktoru (vWF) pro GPIb typ 2B a identifikaci Bernard – Soulierovy choroby. Ristocetinová reagencie může být použita s lyofilizovanými destičkami (AG006A) pro test aktivity Ristocetinového kofaktoru (vWF:RCO).

PRINCIP TESTU:

Ristocetin indukuje aglutinaci destiček v plazmě bohaté na destičky (PRP) tím, že napomáhá interakci von Willebrandova faktoru (vWF) s receptorem na destičkách, glykoproteinem GPIb-V-IX. Takto podněcená aglutinace (RIPA) je použita pro měření pacientova PRP v přítomnosti různých koncentrací Ristocetinu. Ristocetin může být také použit s lyofilizovanými destičkami pro vWF:RCO test.

REAGENCIE:

R Ristocetin: Lyofilizováno, obsahuje Tris a stabilizační látky.

UPOZORNĚNÍ A VAROVÁNÍ:

- Všechny produkty biologického původu musí být považovány za potencionálně infekční.
- Odpad by měl být zlikvidován podle lokálních předpisů.
- S reagencí zacházejte opatrně, aby nedošlo ke kontaminaci během používání. Zabraňte též odpařování reagencie.
- Pro zajištění dobré stability zavírejte lahvičky jejich vlastními zátkami.
- Stabilitní studie prováděné po dobu 3 týdnů při teplotě 30°C prokázaly, že reagencie může být přepravována za pokojové teploty po krátkou dobu bez rizika poškození.
- Pro optimální výsledky testu doporučujeme, aby testy probíhaly jeden za druhým bez přerušování.
- Pro In vitro diagnostické použití.

H319: Způsobuje vážné podráždění očí.

H335: Může způsobit podráždění dýchacích cest.

H315: Způsobuje podráždění kůže.

PŘÍPRAVA A STABILITA REAGENCIE:

Reagencie jsou lyofilizovány pod vakuem. Abyste zabránili ztrátě produktu, otevřete lahvičky opatrně.

R Ristocetin

Pro použití s agregometrem:

Rozpusťte obsah lahvičky s přesně 0,5 ml destilované vody, dobře promíchejte, dokud se obsah zcela nerozpustí. Nechte reagencii stabilizovat 30 minut za pokojové teploty (18 – 25°C), občas promíchejte. Promíchejte před použitím.

Pro použití s analyzátozem:

Rozpusťte obsah lahvičky s přesně 0,625 ml destilované vody, dobře promíchejte, dokud se obsah zcela nerozpustí. Nechte reagencii stabilizovat 30 minut za pokojové teploty (18 – 25°C), občas promíchejte. Promíchejte před použitím.

Stabilita reagencie po rozpuštění v originální lahvičce, pokud je předejito kontaminaci nebo odpařování:

- 7 dní při 2 – 8°C
- 8 hodin za pokojové teploty (18 – 25°C)
- 2 měsíce při -20°C a méně*

*Rozmrazte pouze jednou co nejrychleji při 37°C, upravte dobu inkubace objemu reagencie. Stabilita rozmražené reagencie by měla být ověřena při laboratorních podmínkách.

SKLADOVACÍ PODMÍNKY:

Reagencie musí být skladovány při 2-8°C v jejich originálních obalech. Pak jsou stabilní do data expirace uvedeného na obalu.

REAGENCIE A MATERIÁL POTŘEBNÝ, V KITU NEPŘÍTOMNÝ:

Reagencie:

- Destilovaná voda.
- Fyziologický roztok (0,9% NaCl).

Materiál:

- Světelný agregometr.
- Sysmex CS-série analyzátor a příslušný materiál.
- Kalibrované pipety.

ODBĚR VZORKU A PŘÍPRAVA PLAZMY

Příprava a skladování vzorku musí být provedeno ve shodě s lokálními předpisy (v USA CLSI H21-A5⁸ pro další informace). Pokud testujete trombocytopenii, pacient nesmí dostat žádnou medikaci, která upravuje funkci destiček (např.: Aspirin) alespoň 10 dní předem. Pacient by se měl vyvarovat tučným jídlům, kofeinu a mléčným výrobkům alespoň 12 hodin před odběrem⁴.

Vzorek:

Lidská citrátová plazma.

Odběr vzorku:

Krev (9 dílů) musí být odebrána do 0,109 M citrátového antikoagulantia (1 díl), přímou venepunkcí. První odebraná zkumavka by měla být znehodnocena. Zakryjte a opatrně obraťte 4 až 5-krát. Udržujte vzorek při pokojové teplotě (18-25°C). Nepoužívejte CTAD zkumavky pro odběr.

Centrifugace:

1. Příprava plazmy bohaté PRP a chudé na destičky (PPP):
2. připravte PRP centrifugací citrátové plné krve při 150g po dobu 10 minut za pokojové teploty (18-25°C)
3. prohlédněte vrstvu plazmy, zda neobsahuje erythrocyty. Pokud ano, centrifugujte znovu při 150g ještě 5 minut.
4. pro přenesení plazmy použijte plastové pipety a plazmu s destičkami nasávejte do pipety opatrně, aby nebyl porušen buffy coat nebo vrstva erythrocytů. Přeneste do zkumavky s označením PRP. Tuto zkumavku zadržte a nechte stát za pokojové teploty.
5. připravte PPP centrifugací dalšího vzorku krve při 2000 – 2500g po dobu 15 minut. Prohlédněte plazmu, zda není hemolytická. Potom přeneste do zkumavky označené PPP, zkumavku zadržte a nechte stát při pokojové teplotě.
6. Ohledně vhodného počtu destiček v PRP plazmě se řiďte doporučením ISTH⁵.

PROCEDURA:

Automatická metoda:

Aplikace pro Sysmex CS-série analyzátorů je k dispozici na vyžádání. Odkážete se na aplikační protokol pro každý analyzátor.

Agregometr: Ristocetin ředění:

Doporučujeme otestovat následující koncentrace před vypsáním anomálie⁵ Willebrand/GPIb:

Vstupní koncentrace v (mg/ml)	12	5
Ristocetin 15 mg/ml (µl)	120	60
Fyziologický roztok (µl)	30	120
Finální konc. v testu (mg/ml)	1,2	0,5



Protokol

Test musí být proveden do 3 hodin po odběru vzorku.

1. Vložte míchadlo do každé kyvety
2. Připravte blank napíjetováním 360 µl PPP (plazmy chudé na destičky) do kyvety. S touto kyvetou nastavíte 100% agregaci.
3. Pipetujte 360 µl PRP (plazmy bohaté na destičky) do další kyvety. Inkubujte při 37°C 2 minuty. Nastavte s touto kyvetou 0% agregace.
4. Přidejte 40 µl ristocetinu (5 až 12 mg/ml) přímo do PRP dlouhou, přesnou pipetou.
Reagencie nesmí stékat po stěně kyvety!
5. Nechte měřit agregaci 5 až 10 minut.

Každá laboratoř by měla vytvořit a validovat vlastní protokol, verifikovat výsledky v pracovních podmínkách (kombinace reagentie, přístroje, protokolu).

Každá laboratoř je zodpovědná za validaci změn a jejich dopadů na výsledky.

KONTROLA KVALITY:

Použití kontrol kvality ve shodě se správnou laboratorní praxí umožní validovat kombinaci homogenitu provedení pro každou sérii testů a homogenost reaktivity mezi sériemi, pokud je užita stejná šarže reagentie.

Kontrolní vzorek by měl být připraven stejným způsobem, jako testovaný vzorek. Pro kvantitativní stanovení agregace destiček by měla kontrola být připravena jako PRP odebraná od normálního dárce který neužíval léky ovlivňující destičkové funkce nejméně 10 dní před odběrem a má normální funkci destiček ověřenou v minulosti.

Pro validaci testu začněte kontrolu kvality do každé série testů podle správné laboratorní praxe. Vždy při změně šarže reagentie by měla být provedena nová kontrola. Stejně tak po každé větší údržbě nebo opravě přístroje, nebo pokud je výsledek kontroly mimo očekávané meze – vždy je nutné zkontrolovat i ostatní parametry systému.

Každá laboratoř si musí stanovit vlastní přijatelné meze dle vlastního analytického systému.

VÝSLEDEK:

Pro posouzení a interpretaci výsledku je potřeba znát i anamnézu pacienta. Minimálně by měl být pacient dotázán ohledně užívání léků. Mnohá léčiva obsahují substance interferující s agregací destiček. Látky jako tabák, kofein, alkohol, vitamin C atd. mohou výsledek ovlivnit. Vždy by měly být výsledky posuzovány v kontextu s klinickým stavem pacienta.

LIMITY:

- Pro získání optimálního průběhu testu je potřeba pečlivě dodržovat všechny pracovní instrukce, které byly výrobcem Hyphen-BioMed validovány. Laboratoř odpovídá za validaci metody, pokud provede změny v tomto doporučeném postupu.
- Reagencie neobvyklého vzhledu nebo jevící známky kontaminace by měla být vyřazena z použití.
- Plazma vykazující známky kontaminace nebo koagula by měla být znehodnocena.
- Vzorky neobvyklého vzhledu, nebo jevící známky aktivace, by neměly být testovány.

OČEKÁVANÉ VÝSLEDKY:

Očekávané rozmezí pro každou reagentii v různých koncentracích, stejně tak provedení testu, by mělo být ověřeno a stanoveno pro každou laboratoř pro její specifické podmínky.

U normálních osob je agregace zaznamenána alespoň při použití koncentrace 1,2 mg/ml a není při použití 0,5-0,7 mg/ml⁶.

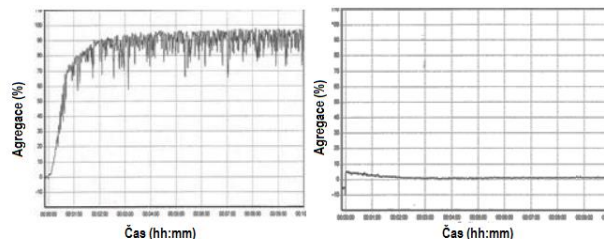
U Bernard Soulierova syndromu a u von Willebrandovy choroby typu III je agregace velmi nízká nebo žádná v každé koncentraci.

U pseudo-von Willebrandovy choroby a vWCh typu IIb jsou destičky hypersenzitivní k ristocetinu, což indukuje agregaci i při nízkých koncentracích (0,5 mg/ml).

CHARAKTERISTIKA:

Příklad normální a abnormální maximální agregace (%):

	Normální	Abnormální
Max agregace (%)	96	4



Obr.: Příklad normální (vlevo) a abnormální (vpravo) agregační křivky s Ristocetinem (1,2 mg/ml).

REFERENCE:

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.

SYMBOLY:

Použité symboly a znaky jsou v seznamu ISO 15223-1 standard, viz dokument definice symbolů.