



COLLAGEN
REF AG005K
R1 3 x 0,5 mg
R2 3 x 12 ml



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: 11_2023

POUŽITÍ:

Destičkový agonista pro světelnou agregometrii (LTA) pro in vitro kvantitativní stanovení agregace destiček v lidské, citrátové plazmě automatickou nebo poloautomatickou metodou.

Tato metoda přispěje k diagnóze funkčních poruch destiček a měření účinnosti antideštičkových léčiv.

Pouze pro použití In Vitro v laboratoři vyškoleným personálem.

SOUHRN:

Technický:¹⁻³

Funkce destiček je měřena světelnou agregometrií (LTA). Metoda je založena na prostupnosti světla vzorkem plazmy bohaté na destičky (PRP). Prostupnost světla skrz PRP je porovnána s referenční kvyetou obsahující plazmu chudou na destičky (PPP). V PPP je prostupnost světla 100%, v PRP 0%.

Po přimíchání destičkového agonisty do PRP destičky agregují, a prostupnost světla vzorkem stoupá.

Klinický:³⁻⁸

Schopnost destiček reagovat na určité agonisty je základem rozlišení typů poruch funkce destiček – vrozených (Glanzmannova trombastenie, Syndrom šedých destiček, Bernard-Soulier syndrom) nebo získaných (myelodysplastické nebo myeloproliferativní, Waldeströmova choroba, mnohočetný myelom).

Těž je metoda určena ke kontrole efektu antiagregační terapie léky jako jsou Aspirin, thienopyridiny, NSAID, P₂Y₁₂ inhobitory receptorů a GPIIb/IIIa inhobitory.

PRINCIP:

Po přidání Collagenu se destičky ve zdravé plazmě aktivují GPIa/IIa a GPVI receptory. Při následující adhezi se vypustí destičková granula a vytvoří se thromboxan A₂ a destičky se aktivují. Protože je Collagenem indukovaná agregace destiček závislá na těchto druhotných mediátorech, je zde časová mezeza mezi přidáním Collagenu a samotnou viditelnou agregací. Collagen přítomný v cévním subendotelu hraje důležitou roli při hemostáze cévních poranění. Collagen funguje jako silný agonista destiček⁵⁻⁷.

REAGENCIE:

R1 Collagen reagentie: Přibližně 0,5 mg (collagen z koňských šlach – převážně typ I), lyofilizováno. Obsahuje stabilizátory.

R1 Diluent pro Collagen: Tekutina.

Produkt není klasifikován jako nebezpečný, a proto nepodléhá značení dle EC Regulace [CLP] 1272/2008.

UPOZORNĚNÍ:

- Produkt obsahuje materiál zvířecího původu. Zacházejte s ním jako s potencionálně infekčním.
- Likvidujte odpad dle lokálních předpisů.
- Používejte pouze reagentie stejné šarže.
- Jakékoliv závažné příhody se souvislostí na tuto reagentii ohlašte výrobci nebo jeho zástupci ve vašem regionu.
- Shrnutí pro bezpečnost a výkon (SSP) je dostupné v Evropské databázi zdravotnických prostředků (Eudamed), nebo na žádost od výrobce.
- Pro zajištění optimálního výsledku testování doporučujeme testovat vzorky a kontroly bez přerušování.

PŘÍPRAVA REAGENCIÍ:

Reagentie jsou lyofilizované a uzavřené pod vakuem. Zátku odstraňte opatrně, aby nedošlo ke ztrátě lyofilizátu.

Použití pro agregometr

R1 Rozpusťte každou lahvičku přesně 0,5 ml destilované vody (1 mg/ml). Míchejte, dokud nedojde k úplnému rozpuštění obsahu. Nechte stabilizovat 30 minut při pokojové teplotě (18-25°C) za občasného promíchání.

R2 Reagentie je připravena k použití. Nechte stabilizovat 30 minut při pokojové teplotě.

Naředte rozpuštěnou reagentii následovně (příklad pro 1ml):

Finální koncentrace v testu (µg/ml)	5	2
Připravte následující 10X roztok		
„10X“ Collagen příprava (µg/ml)	50	20
Collagen 1 mg/ml (µl)	50	20
Fyziologický roztok (µl)	950	980

Použití pro analyzátor

R1 Rozpusťte každou lahvičku přesně 0,625 ml destilované vody (800µg/ml). Promíchejte, dokud se úplně nerozpustí. Nechte stabilizovat 30 minut při pokojové teplotě (18-25°C) za občasného promíchání.

R2 Reagentie je připravena k použití. Homogenizujte, vyvarujte se tvorbě pěny a přímo vložte do analyzátoru dle aplikačního protokolu.

Naředte rozpuštěnou reagentii následovně (příklad pro 1ml):

Finální koncentrace v testu (µg/ml)	5	2
Připravte následující 8X roztok		
„8X“ Roztok Collagenu (µg/ml)	40	16
Collagen 800 µg/ml (µl)	50	20
Fyziologický roztok (µl)	950	980

Homogenizujte reagentie před použitím.

SKLADOVACÍ PODMÍNKY A STABILITA:

Reagentie musí být skladována při teplotě 2-8°C ve svém originálním obalu. Pak je stabilní do data expirace uvedeného na krabičce.

R1 Rozpuštěná reagentie po otevření je stabilní, viz níže (pokud je uchováván v originální lahvičce, uzavřen originální zátkou a je zabráněno kontaminaci a odpařování):

- 7 dní při 2-8°C
- 24 hodin při pokojové teplotě (18-25°C).
- Nemrazte.
- Stabilita v analyzátoru: Viz aplikační protokol pro daný analyzátor.

R2 Reagentie po otevření je stabilní, viz níže (pokud je uchováván v originální lahvičce, uzavřen originální zátkou a je zabráněno kontaminaci a odpařování):

- 7 dní při 2-8°C
- 24 hodin při pokojové teplotě (18-25°C).
- Nemrazte.
- Stabilita v analyzátoru: Viz aplikační protokol pro daný analyzátor.

REAGENCIE A MATERIÁL POTŘEBNÝ, ALE V KITU NEPŘÍTOMNÝ:

- Laboratorní materiál.
- SB Kvyety (064-1041-9) a SB Set Tool (063-4151-5) pro CS a CN série.
- Automatický analyzátor jako jsou CS a CN série.
- Světelný agregometr.

Aplikační protokoly pro ostatní analyzátoary mohou být validovány výrobcem přístroje dle nařízení 2017/746 (EU), pokud není modifikován zamýšlený účel reagentie.

PŘÍPRAVA PLAZMY (ODBĚR VZORKU):

Odběr, příprava a skladování vzorků (Plazma bohatá na destičky a plazma chudá na destičky), by měli být prováděny dle laboratorních a ostatních validních řádů^{3, 10}.

Krev (9 dílů) opatrně odeberte do citrátu trisodného (1 díl, 0,109M, 3,2%) přímou venepunkcí.

CLSI H58-A a studie^{3, 10}: Měření by mělo být provedeno na čerstvé krvi maximálně 4 hodiny po odběru.

PROVEDENÍ:

Destičkový agonista by měl být použit při 2 µg/ml. Pokud je agregace destiček abnormální, použijte vyšší koncentrace Collagenu (5 µg/ml)^{1, 3}.

HYPHEN BioMed má k dispozici aplikační protokoly pro definované skupiny analyzátorů. Tyto protokoly obsahují specifické postupy a informace o výkonu a doplňují informace uvedené v tomto příbalovém letáku.

Agregometr:

1. Do každé kyvety vložte míchadlo.
2. Stanovte 100% bod agregace s kyvetou obsahující 300 µl PPP.
3. Napipetujte 285 µl PRP do druhé kyvety.
Inkubujte 2 minuty při 37°C a stanovte 0% agregaci s PRP.
4. Přidejte 15 µl 10X Collagen roztoku přímo do kyvety s PRP dlouhou, tenkou pipetou mimo okraj kyvety.
5. Počkejte 10 minut, aby se vyvinul agregační profil vzorku.
Pokud jsou zapotřebí jiné reakční objemy, než jsou uvedeny výše, zachovejte striktně poměr reagií.

KONTROLA KVALITY:

Komerční kontroly nejsou dostupné.
Kontrolní vzorek, odebraný od zdravého pacienta bez žádné známé abnormality funkce destiček, musí být připraven stejným způsobem jako měřený vzorek.
Kontrolu kvality začleňte do každé série testů. 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.

VÝSLEDKY:

- Výsledky jsou vypočteny z agregační křivky a z % maxima agregace. Tyto parametry závisí na použitém přístroji a normální hodnoty by měly být stanoveny laboratoří.
 - Posouzení výsledků by mělo být provedeno v kontextu klinického stavu pacienta, počtu destiček, potenciálních dopadů branných léčiv a jiných, preanalytických vlivů.^{11, 12}
 - Abnormální křivky potvrďte opakováním testu.
- Variace mezi šaržemi reagentie, měřena na 3 šaržích, je %CV ≤ 10% (normální vzorek).

LIMITY:

- Pro získání optimálního průběhu testu je potřeba pečlivě dodržovat všechny pracovní instrukce, které byly výrobcem Hyphen-BioMed validovány.
- Reagentie neobvyklého vzhledu, obsahující koagulum nebo jevící známky kontaminace, by měla být vyřazena z použití.
- Vzorky neobvyklého vzhledu, nebo jevící známky aktivace, by neměly být testovány.
- Jakékoliv změny měření musí být validovány laboratoří, aby se zachoval výkon metody.
- Pokud je počet destiček menší než 150 x 10⁹/l nebo více než 600 x 10⁹/l, naměřené výsledky mohou být ovlivněny. Počet destiček u PRP vzorků nemusí být upraven na standardizovanou hodnotu autologní PPP³.

OČEKÁVANÉ HODNOTY:

Stanovený referenční interval interní studie, ze vzorků zdravých jedinců s 2 µg/ml Collagenu na agregometru (n=53), na CS sérii (n=51) a na CN sérii (n=83), byl naměřen mezi 55 a 99%, mezi 69 a 99% a mezi 50 a 95% respektive (Centrální 90%, 95 percentil)¹³.
Každá laboratoř by si měla stanovit vlastní referenční rozmezí^{3, 10, 14}.

CHAKTERISTKA:

Studie výkonu byly provedeny dle CLSI směrníc.
Následující získaná data ukazují typické výsledky – nejsou určeny pro specifikaci Collagenu.
Matematická analýza byla provedena validovaným statistickým softwarem dle CLSI směrníc.
Pro automatické měření jsou výkonnostní data v daných aplikačních protokolech.

Agregometr

Přesnost

Studie přesnosti byly provedeny s normálními a abnormálními kontrolami, 1 série, 10 opakování.

Vzorek	Opakovatelnost	
	% Max agregace	CV%
Normální	85%	3,8%
Abnormální	31%	11,8%

Interference

Nebyly zjištěny interference molekul do následujících koncentrací:

Bilirubin C	Bilirubin F	Intralipidy	Hemoglobin
30 mg/dl	30 mg/dl	360 mg/dl	250 mg/dl

Klinický výkon

Distributor: Diagnostica s.r.o., Za Trať 686, Praha 9, Česká republika, tel.+420 266 315 909, Fax.+420 266 316 000, e-mail: info@diagnostica.cz, www.diagnostica.cz

Shoda					
Agonista		Referenční metoda		Shoda (n=110)	
Collagen (2µg/ml)		Helena reagent		96%	
Citlivost/Specifická					
Agonista	N	Citlivost	Specifická	Prostor po křivkou (ROC)	
Coolagen	110	93%	100%	0,995	
Agonista	N	PPV	NPV	LR+	LR-
Collagen	110	100%	93%	+∞	0,088

CS a CN série

Přesnost

Studie přesnosti byly provedeny na normálních a abnormálních vzorcích, 1 série, 30 opakování.

CS série	Opakovatelnost	
Vzorek	% Max agregace	CV%
Normální	90%	2,8%
Abnormální	8%	16,0%
CN série	Opakovatelnost	
Vzorek	% Max agregace	CV%
Normální	85%	3,1%
Abnormální	27%	7,5%

Interference

Interference jsou definovány použitým analytickým systémem a jsou vypsány v příslušném aplikačním protokolu.

Klinický výkon

Shoda					
Agonista		Referenční metoda		Shoda (n=107) (CS-série)	
Collagen		Helena reagent		95%	
Citlivost/Specifická					
Agonista	N	Citlivost	Specifická	Prostor po křivkou (ROC)	
Collagen	107	91%	100%	0,963	
Agonista	N	PPV	NPV	LR+	LR-
Collagen	107	100%	91%	+∞	0,070

PPV = Předpokládaná hodnota pozitivního výsledku

NPV = Předpokládaná hodnota negativního výsledku

LR+ = Poměr pravděpodobnosti +

LR- = Poměr pravděpodobnosti -

Klinický výkon byl definován při Collagenu 2 µg/ml pro antideštičková léčiva a normální vzorky, a potvrzen na vyšších koncentracích pro krvácivý syndrom, dvojitou antideštičkovou terapií a normální vzorky.

REFERENCE:

1. Le Blanc J. et al. Advances in Platelet Function Testing-Light Transmission Aggregometry and Beyond. J Clin Med. 2020.
2. Egashira M. et al. The Basic Evaluation of Light Transmission Platelet Aggregation Method on an Automated Coagulation Analyzer CN-6000. Sysmex Journal International. 2020.
3. 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.
4. Michelson AD. et al. How I use laboratory monitoring of antiplatelet therapy. Blood. 2017.
5. Yardumian DA. et al. Laboratory investigation of platelet function: a review of methodology. J Clin Pathol. 1986..
6. Zhou L. et al. Platelet aggregation testing in platelet-rich plasma: description of procedures with the aim to develop standards in the field. Am J Clin Pathol. 2005.
7. Angiolillo DJ. et al. Basic principles of platelet biology and clinical implications. Circ J. 2010.
8. Gresele P. Subcommittee on Platelet Physiology of the International Society on Thrombosis and Hemostasis. Diagnosis of inherited platelet function disorders: guidance from the SSC of the ISTH. J Thromb Haemost. 2015.
9. McCabe White M. et al. Platelet protocols: research and clinical laboratory procedures. Elsevier Science. 1999.
10. CLSI. Platelet Function Testing by Aggregometry; Approved Guideline. CLSI document H58-A (ISBN 1-56238-683-2). CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, PA 19087 USA 2012.
11. Kaeng W.L. et al. Effects of Lifestyle on Hemostasis, Fibrinolysis, and Platelet Reactivity. Arch Intern Med. 2003.

12. Olas B. and Brys M. Effects of coffee, energy drinks and their components on hemostasis: The hypothetical mechanisms of their action. *Food and Chemical Toxicology*. 2019.
13. CLSI Document EP28-A3c: "Defining, Establishing, and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory; Approved Guideline – Third Edition". 2010.
14. Munnix *et al.*, Harmonizing light transmission aggregometry in the Netherlands by implementation of the SSC-ISTH guideline, *Platelets*. 2021.