



# Srovnání indukované agregace trombocytů stanovené automatickým koagulometrem CN-6000 a agregometrem APACT 4004

**Martina Pilnáčková**

IV. interní hematologická klinika – laboratoř, FN Hradec Králové



# Indukovaná agregace trombocytů

- Vyšetření se provádí u pacientů při podezření na krvácivý stav z poruchy destičkových funkcí
- Metodou na principu optické transmisní agregometrie (Light Transmission Aggregometry – LTA) podle Borna
- LTA vyvinutá r. 1962 Bornem je stále současný zlatý standard pro hodnocení funkce krevních destiček



# Indukovaná agregace trombocytů

## Princip

- Změna optické hustoty v plazmě bohaté na destičky (PRP) po stimulaci induktorem agregace
- Účinkem induktorů agregace dochází v PRP ke změně tvaru a poté k agregaci krevních destiček
- Podle agregační odpovědi na daný stimul lze nepřímo sledovat změny funkce krevní destičky
- Snížená agregační odpověď bývá u získaných nebo vrozených trombocytopatií



# Indukovaná agregace trombocytů

## Induktory agregace

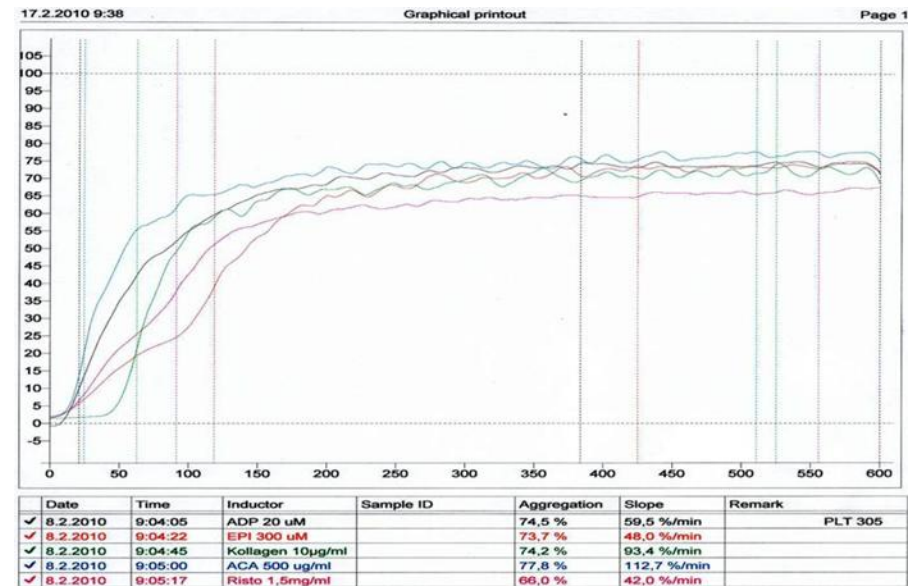
- ADP
- Epinefrin
- Kolagen
- Kys. arachidonová
- Ristocetin



# Indukovaná agregace trombocytů

## Vyhodnocení agregační odpovědi po přidání induktoru

- Grafický výstup: **agregační křivka**
- Sledovaný parametr: **maximální agregační amplituda (%)**
- Fyziologické meze (ma): **60 – 100 %**



# Cíl naší studie

- Porovnat výsledky indukované agregace trombocytů získané na automatickém koagulometru CN-6000 s hodnotami naměřenými na optickém agregometru APACT 4004
- Z výsledků zhodnotit, zda nižší koncentrace induktorů vyvolají u zdravých, neléčených jedinců adekvátní agregační odpověď



# Přístroje

## Automatický koagulometr CN-6000

(výrobce Sysmex)

- Plně automatizovaný koagulační analyzátor
- 26 měřicích pozic pro koagulační, chromogenní a imunologické testy, z toho **8 měřicích pozic pro agregační testy**
- Stojánek pro 3 sady PPP a PRP vzorků
- Automatizované ředění induktorů agregace (induktory „on board“)
- Automatizované dávkování vzorků a induktorů do měřicích kyvet
- SW z grafického výstupu (agregační křivky) automaticky vyhodnotí agregační odpověď (max. amplituda, lag fáze, AUC, slope ad.)



# Přístroje

## **Agregometr APACT 4004** (výrobce LABiTec)

- Poloautomatický optický agregometr
- 4 měřicí kanály
- Manuální dávkování vzorků a induktorů do měřicích kyvet
- SW z grafického výstupu (agregační křivky) automaticky vyhodnotí agregační odpověď (max. amplituda, slope)



# Srovnání systémů vyšetření indukované agregace trombocytů

|                                    | CN-6000                      | APACT 4004                   |
|------------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| <b>Princip</b>                     | LTA                          | LTA                          |
| <b>Antikoagulant</b>               | citrát sodný 3,2 %           | citrát sodný 3,2 %           |
| <b>Příprava plazmy</b>             | PRP, PPP                     | PRP, PPP                     |
| <b>Induktory agregace</b>          | výrobce: HYPHEN BioMed       | výrobce: Helena BioSciences  |
| <b>Množství vzorku v kyvetě</b>    | 140 µL                       | 225 µL                       |
| <b>Množství induktoru v kyvetě</b> | 20 µL                        | 25 µL                        |
| <b>Otáčky míchadla</b>             | 800 rpm                      | 1000 rpm                     |
| <b>Vlnová délka</b>                | 660 nm                       | 740 nm                       |
| <b>Teplota reakční směsi</b>       | 37 °C                        | 37 °C                        |
| <b>Čas měření</b>                  | 5 min.                       | 10 min.                      |
| <b>Grafický výstup</b>             | agregační křivka             | agregační křivka             |
| <b>Sledovaný parametr</b>          | max. agregační amplituda (%) | max. agregační amplituda (%) |

## Vybrané induktory agregace ve studii

- **ADP** (středně silný induktor) a **kys. arachidonová** (silný induktor)

### Finální koncentrace vybraných induktorů v testu

|            | CN-6000    | APACT 4004 |
|------------|------------|------------|
| <b>ADP</b> | 10 $\mu$ M | 20 $\mu$ M |
| <b>ArA</b> | 1 mM       | 1,6 mM     |



# Výsledky srovnávací studie

- Vyšetřeno: 50 zdravých, neléčených dárců (muži i ženy, věk nad 18 let)
- Paralelní měření na obou přístrojích bez časové prodlevy
- Vybrané induktory: ADP (středně silný induktor) a kys. arachidonová (silný induktor)
- Porovnávaný parametr: maximální agregační amplituda (%) po přidání induktoru



## Výsledky srovnávací studie

- Výsledky měření byly statisticky vyhodnoceny pomocí shody ve vybraných percentilech
- Stanoven byl 2,5. a 97,5. percentil a 5. a 95. percentil

## Výsledky percentilů porovnávaných testů

| INDUKTOR<br>AGREGACE | n  | MIN<br>(% ma) | MEDIAN<br>(% ma) | MAX<br>(% ma) | 2,5.<br>PERCENTI<br>L | 5.<br>PERCENTI<br>L | 95.<br>PERCENTI<br>L | 97,5.<br>PERCENTI<br>L |
|----------------------|----|---------------|------------------|---------------|-----------------------|---------------------|----------------------|------------------------|
| ADP 10 $\mu$ M (CN)  | 50 | 73,8          | <b>84,9</b>      | 93,0          | 75,1                  | 79,2                | 89,6                 | 90,2                   |
| ADP 20 $\mu$ M (AP)  |    | 63,8          | <b>86,5</b>      | 95,1          | 64,7                  | 65,7                | 93,6                 | 94,6                   |
| ArA 1 mM (CN)        | 50 | 77,9          | <b>84,3</b>      | 98,1          | 78,0                  | 78,5                | 95,0                 | 96,5                   |
| ArA 1,6 mM (AP)      |    | 83,8          | <b>88,6</b>      | 98,4          | 84,2                  | 84,5                | 93,6                 | 94,7                   |

# Závěry srovnávací studie

- Nižší finální koncentrace induktorů podle originální metodiky pro automatický koagulometr CN-6000 jsou dostatečné a vyvolají u zdravých, neléčených jedinců adekvátní agregační odpověď
- U obou systémů hodnoty percentilů porovnávaných testů po indukci ADP a ArA leží ve fyziologických mezích
- Pro ověření významů zjištěných rozdílů pro hodnoty v oblasti spodní hranice fyziologického rozmezí (2,5. a 5. percentil) by bylo vhodné vyšetřit na obou systémech také soubor vzorků s patologickými hodnotami indukované agregace



# Výhody automatického koagulometru CN-6000 vs. LTA poloautomat

- Plně automatizovaný multiparametrový analyzátor hemostázy včetně agregace trombocytů
- Automatizované ředění induktorů (induktory „on board“), dávkování vzorků a induktorů → minimalizace chyb a standardizace
- Menší objem vzorku a induktoru
- Stabilita naředěného induktoru na palubě (10 h.)
- Měření zbývajícího objemu reagensie
- Kratší čas měření → vyšší analytický výkon



# Výhody automatického koagulometru CN-6000 vs. LTA poloautomat

## Nové výzkumné parametry PAL (Platelet Aggregation Level)

- **APAL** (PAL indukovaný ADP)
- **CPAL** (PAL indukovaný kolagenem)
- Pomocné parametry a skórovací systém pro interpretaci výsledků a potvrzení účinnosti antiagregační léčby
- APAL – pro monitoraci léčby ADP antagonisty
- CPAL – pro monitoraci léčby ASA v duální terapii
- Nová metoda s využitím nízké a vysoké koncentrace induktoru (ADP 1  $\mu$ M a 10  $\mu$ M; COL 1  $\mu$ g/mL a 5  $\mu$ g/mL)
- Výpočet hodnoty PAL z plochy pod křivkou (AUC) z měření s použitím 2 konc. induktoru ADP (APAL) nebo COL (CPAL)
- Skórovací systém (od 0 do 10)
- Snížení hodnoty PAL → účinnost antiagregační léčby



**Děkuji za pozornost**

