

### UTILISATION:

Agoniste plaquettaire pour méthode d'agrégométrie à transmission lumineuse (LTA) pour la détermination quantitative *in vitro* de l'agrégation plaquettaire, dans le plasma humain citraté, à l'aide d'une méthode automatisée ou semi-automatisée. Cette méthode est utilisée pour aider au diagnostic des troubles de la fonction plaquettaire chez les patients suspects de troubles de la fonction plaquettaire. Ce dispositif de diagnostic *in vitro* est destiné à une utilisation professionnelle en laboratoire.

### RESUME ET EXPLICATION:

#### Technique<sup>1-3</sup>

La fonction plaquettaire est évaluée par agrégométrie à transmission lumineuse (LTA).

LTA mesure la transmission lumineuse à travers un échantillon de plasma riche en plaquettes (PRP) en réponse à un panel d'agonistes plaquettaires. La transmission lumineuse à travers le PRP est mesurée par rapport à une cuvette de référence contenant du plasma pauvre en plaquettes (PPP). La transmission lumineuse est fixée à 100 % dans le PPP et à 0 % dans le PRP. Lorsqu'un agoniste plaquettaire est ajouté au PRP agité, les plaquettes commencent alors à s'agréger et la transmission lumineuse du PRP augmente.

#### Clinique<sup>3-9</sup>

Le réactif ristocétine est proposé pour les tests d'agrégation plaquettaire induite par la ristocétine (RIPA), pour aider à la détection de la maladie de von Willebrand notamment pour mettre en évidence une augmentation d'affinité du Facteur de von Willebrand (vWF) pour la GPIIb $\alpha$  dans le type 2B, et pour identifier un Syndrome de Bernard-Soulier.

### PRINCIPE:

Lorsque de la ristocétine est ajoutée au plasma riche en plaquettes (PRP) d'un sujet sain, elle permet l'interaction entre le facteur de von Willebrand (vWF) et la glycoprotéine GPIIb $\alpha$  de la membrane des plaquettes qui est le récepteur vWF sur les plaquettes. L'agrégation plaquettaire induite par la ristocétine (RIPA) est utilisée pour mesurer l'agrégation PRP du patient en présence de diverses concentrations de ristocétine. L'agrégation plaquettaire est observée pour une concentration de ristocétine (1,2 mg/mL) si les plaquettes et le vWF du plasma ont une fonction normale. On ne l'observe toutefois pas dans les conditions de carence quantitative et qualitative de vWF (à l'exception du type 2B de la maladie de Willebrand) ou en cas de fonction anormale la GPIIb $\alpha$ <sup>4-6</sup>.

### REACTIFS:

**R** Ristocétine à environ 7.5 mg, lyophilisé. Contient des stabilisants.

Le produit est classé non dangereux et n'est pas soumis à un étiquetage selon le règlement CE n° 1272/2008 [CLP].

### MISE EN GARDE ET AVERTISSEMENTS:

- L'élimination des déchets doit être effectuée conformément aux réglementations locales en vigueur.
- Tout incident grave survenu en rapport avec le dispositif médical doit être signalé au fabricant et l'autorité compétente de l'État membre dans lequel l'utilisateur et / ou le patient est établi.
- Le résumé des caractéristiques de sécurité et des performances (SSP) est disponible sur la base de données Européenne sur les dispositifs médicaux (voir le site public Eudamed : <https://ec.europa.eu/tools/eudamed> ou sur demande auprès d'HYPHEN BioMed).
- Il est recommandé de tester successivement et sans interruption les échantillons à tester et les contrôles, pour obtenir les performances optimales du test.

### PREPARATION DES REACTIFS:

Retirer délicatement le bouchon de lyophilisation des réactifs, pour s'affranchir de toute perte de produit à l'ouverture du flacon.

#### **R** Pour agrégomètre :

Reconstituer chaque flacon avec **exactement 0.5 mL d'eau distillée** (15 mg/mL).

Agiter vigoureusement jusqu'à dissolution complète. Laisser stabiliser le réactif pendant 30 min à température ambiante (18-25°C) en agitant de temps en temps.

Diluer la Ristocétine reconstituée comme suit (exemple pour 1 mL) :

Pour une concentration finale dans le test (mg/mL)	<b>1.2</b>	0.5
Préparer les solutions 10X suivantes :		
Préparation Ristocétine 10X (mg/mL)	<b>12</b>	5
Ristocétine 15 mg/mL (µL)	<b>800</b>	333
Solution saline (µL)	<b>200</b>	667

Pour tester à 2 mg/mL, reconstituer le flacon avec exactement 0,375 mL d'eau distillée (20 mg/mL). Agiter vigoureusement jusqu'à dissolution complète. Laisser

stabiliser le réactif pendant 30 min à température ambiante (18-25°C) en agitant de temps en temps et utiliser immédiatement.

#### **R** Pour automate :

Reconstituer chaque flacon avec **exactement 0.625 mL d'eau distillée** (12 mg/mL).

Agiter vigoureusement jusqu'à dissolution complète. Laisser stabiliser le réactif pendant 30 min à température ambiante (18-25°C) en agitant de temps en temps.

Diluer la Ristocétine reconstituée comme suit (exemple pour 1 mL) :

Pour une concentration finale dans le test (mg/mL)	<b>1.2</b>	0.5
Préparer les solutions 8X suivantes :		
Préparation Ristocétine 8X (mg/mL)	<b>9.6</b>	4
Ristocétine 12 mg/mL (µL)	<b>800</b>	333
Solution saline (µL)	<b>200</b>	667

Pour tester à 2 mg/mL, reconstituer le flacon avec exactement 0,470 mL d'eau distillée (16 mg/mL). Agiter vigoureusement jusqu'à dissolution complète. Laisser stabiliser le réactif pendant 30 min à température ambiante (18-25°C) en agitant de temps en temps et utiliser immédiatement.

Homogénéiser le réactif avant chaque utilisation.

### STOCKAGE ET STABILITE:

Les réactifs non ouverts doivent être conservés à 2-8°C dans leur emballage d'origine. Ils sont alors utilisables jusqu'à la date de péremption imprimée sur le coffret.

**R** La stabilité du réactif après reconstitution, sous réserve de toute contamination ou d'évaporation, conservé fermé est de :

- **7 jours** à 2-8°C.
- **24 heures** à température ambiante (18-25°C).
- **2 mois** congelé à -20°C ou moins\*
- **Stabilité à bord de l'automate : se référer au Guide d'Application spécifique.**

\*Décongeler une seule fois à température ambiante (18-25°C) et utiliser immédiatement.

### REACTIFS ET MATERIELS REQUIS MAIS NON FOURNIS:

- Matériel de laboratoire.
- Solution saline (0.9% NaCl).
- SB Cuvette (064-1041-9) et SB Set tool (063-4151-5) pour CS- et CN-series
- Instrument automatique tel que : CS-series, CN-series.
- Agrégomètre à transmission lumineuse.

Veillez noter que les applications sur d'autres instruments peuvent être validées par le fabricant de l'instrument conformément aux exigences du RÈGLEMENT (UE) 2017/746 sous sa responsabilité tant que la destination et les performances ne sont pas modifiées.

### PRELEVEMENTS ET PREPARATION DES ECHANTILLONS:

Le prélèvement, la préparation et le stockage d'échantillons frais (plasma riche en plaquettes (PRP) et plasma pauvre en plaquettes (PPP)) doivent être effectués selon les méthodes du laboratoire ou autres méthodes validées<sup>3,10</sup>.

Le sang (9 volumes) doit être soigneusement collecté sur l'anticoagulant citrate trisodique (1 volume) (0,109 M, 3,2 %) par ponction veineuse franche.

CLSI H58-A et études<sup>3,10</sup> : les études doivent être réalisées sur échantillon frais dans un délai maximum de 4 h après le prélèvement sanguin.

### PROCEDURE:

L'agoniste plaquettaire doit être utilisé à 1,2 mg/mL. Si l'agglutination plaquettaire est normale, une concentration plus faible de Ristocétine doit être testée (ex : 0.5-0.7 mg/mL). Si l'agglutination plaquettaire est anormale ou absente, le test doit être répété en utilisant 2 mg/mL de Ristocétine.<sup>1,3</sup>

HYPHEN BioMed fournit des Guides d'Application pour des familles d'instrument de coagulation définies. Les Guides d'Application contiennent des informations sur la manipulation et les performances spécifiques à l'instrument / test et complètent les informations de ces notices d'utilisation.

#### Protocole sur Agrégomètre :

1. Placer un agitateur dans chaque cuvette.
2. Etablir le 100% d'agrégation avec une cuvette contenant 360 µL de PPP.
3. Pipeter 360 µL de PRP dans une seconde cuvette.
4. Incuber à 37°C pendant 2 minutes. Etablir le 0% d'agrégation avec le PRP.
5. Ajouter 40 µL de solution Ristocétine 10X directement dans le PRP en utilisant un embout de pipette long et fin. Ne pas injecter contre les parois de la cuvette.

5. Laisser développer le profil d'agrégation pendant 5 à 10 minutes

Si un volume réactionnel différent de celui indiqué ci-dessus est requis pour la méthode utilisée, le rapport des volumes doit être strictement respecté afin de garantir les performances du dosage.

### CONTROLE QUALITE :

Les contrôles commerciaux ne sont pas disponibles. Le contrôle peut être un échantillon frais prélevé sur un donneur normal avec un historique de fonction plaquettaire normale. Inclure des échantillons contrôlés, de préférence, pour chaque série d'essai, et au moins pour chaque nouveau lot de réactif ou après la maintenance de l'automate.

### RESULTATS :

- Les résultats sont évalués en examinant la courbe d'agrégation et l'agrégation maximale (%). Ces paramètres varient en fonction du type d'instrument et des valeurs normales spécifiques doivent être déterminées par chaque laboratoire.
- Les résultats doivent être interprétés sur la base de l'état clinique du patient, de la numération plaquettaire, des influences potentielles des médicaments, du mode de vie, de la nutrition et des conditions pré-analytiques.<sup>11,12</sup>
- Chez les individus sains, l'agrégation doit se produire au moins à 1,2 mg/mL, mais pas à 0,5 mg/mL. Dans le syndrome de Bernard Soulier et la maladie de Willebrand de type 3, l'agrégation est attendue très faible ou nulle à toutes les concentrations. Dans le pseudo-Willebrand et la maladie de Willebrand type 2B, les plaquettes sont hypersensibles à la ristocétine ce qui induit une agrégation même aux faibles concentrations (i.e. 0,5-0,7 mg/mL).<sup>3</sup>
- Les courbes anormales doivent être confirmées par un nouveau test.
- La variabilité inter-lots mesurée sur 3 lots est CV% ≤ 10% (échantillon normal).

### LIMITATIONS :

- Pour obtenir les performances optimales du test et répondre aux spécifications, suivre scrupuleusement les instructions techniques validées par HYPHEN BioMed.
- Tout réactif ne présentant pas d'aspect limpide ou présentant des signes de contamination doit être rejeté.
- Tout échantillon suspect ou présentant des signes d'activation doit être rejeté.
- Les modifications définies par l'utilisateur ne sont pas prises en charge par HYPHEN BioMed car elles peuvent affecter les performances du système et les résultats des tests. Il est de la responsabilité de l'utilisateur de valider les modifications apportées à ces instructions ou l'utilisation des réactifs sur d'autres analyseurs que ceux inclus dans les Guides d'Application HYPHEN BioMed ou ces instructions d'utilisation.
- Si le nombre de plaquettes est inférieur à  $150 \times 10^9/L$  ou supérieur à  $600 \times 10^9/L$ , les résultats du test peuvent être affectés. La numération plaquettaire des échantillons de PRP ne doit pas être ajustée à une valeur standardisée avec PPP autologue<sup>3</sup>.

### VALEURS ATTENDUES :

L'intervalle de référence établit, dans une étude interne, sur des sujets sains adultes avec 1.2 mg/mL de Ristocétine sur agrégomètre (n=61), sur CS-series (n=63) et sur CN-series (n=71), a été mesuré entre 63% et 105%, entre 71 et 92% et entre 51 et 93% respectivement (Central 90%, 95ème percentile)<sup>13</sup>. Cependant, chaque laboratoire doit établir ses propres paramètres d'agrégation normale.<sup>3,10,14</sup>

### PERFORMANCES :

Les études de performances ont été menées conformément aux recommandations CLSI. Les données de performance suivantes représentent des résultats typiques et ne doivent pas être considérées comme des spécifications pour la Ristocétine. Les analyses mathématiques sont réalisées en utilisant un logiciel de statistique validé construit conformément aux recommandations CLSI. Pour les tests automatisés, les performances sont documentées dans les Guides d'Application respectifs des analyseurs.

#### Sur agrégomètre : Performances analytiques Précision

Des études de précision ont été évaluées à l'aide d'échantillons anormaux et normaux, sur 1 série et 10 répétitions.

Echantillon	Répétabilité	
	% Agrégation max.	CV%
Normal	97%	4.7%
Anormal	37%	15.0%

#### Substances interférentes

Aucune interférence n'a été observée avec les molécules et jusqu'aux concentrations suivantes :

Bilirubine C	Bilirubine L	Intralipides	Hémoglobine
30 mg/dL	30 mg/dL	310 mg/dL	250 mg/dL

#### Performances cliniques

Agoniste	Agrément	
	Méthode de référence	Agrément (n = 121)
Ristocétine (1,2 mg/mL)	Réactif Helena	96%

Agoniste	n	Sensibilité/Spécificité		Aire sous la courbe (ROC)	
		VPP	VPN	RV+	RV-
Ristocétine	121	97%	95%	0.981	
Ristocétine	121	96%	96%	18,09	0,03

VPP : Valeur Prédicative d'un résultat Positif RV+ : Rapport de Vraisemblance +  
VPN : Valeur Prédicative d'un résultat Négatif RV- : Rapport de Vraisemblance -

#### Sur CS-series / CN-series :

#### Performances analytiques

#### Précision

Des études de précision ont été évaluées à l'aide d'échantillons anormaux et normaux, sur 1 série et 30 répétitions.

Echantillon	Répétabilité	
	% Agrégation max.	CV%
Normal	84%	1.6%
Anormal	28%	14.2%

  

Echantillon	Répétabilité	
	% Agrégation max.	CV%
Normal	79%	4.5%
Anormal	45%	6.1%

#### Substances interférentes

Les interférences sont définies par le système d'analyses utilisé et sont documentées dans les Guides d'Application des instruments respectifs.

#### Performances cliniques

Agoniste	Agrément	
	Méthode de référence (agrégomètre)	Agrément (n = 119) (CS-series)
Ristocétine	Réactif Helena	96%

Agoniste	n	Sensibilité/Spécificité		Aire sous la courbe (ROC)	
		VPP	VPN	RV+	RV-
Ristocétine	119	100%	91%	0.950	
Ristocétine	119	93%	100%	10,80	0,00

VPP : Valeur Prédicative d'un résultat Positif RV+ : Rapport de Vraisemblance +  
VPN : Valeur Prédicative d'un résultat Négatif RV- : Rapport de Vraisemblance -

La performance clinique a été définie à 1,2 mg/mL de Ristocétine pour les échantillons anormaux (avec moins de GPIIb) et normaux.

### REFERENCES :

- Le Blanc J. et al. Advances in Platelet Function Testing-Light Transmission Aggregometry and Beyond. J Clin Med. 2020.
- Egashira M. et al. The Basic Evaluation of Light Transmission Platelet Aggregation Method on an Automated Coagulation Analyzer CN-6000. Sysmex Journal International. 2020.
- Cattaneo M. et al. Recommendations for the Standardization of Light Transmission Aggregometry: A Consensus of the Working Party from the Platelet Physiology Subcommittee of the SSC/ISTH. J Thromb Haemost. 2013.
- Yardumian DA. et al. Laboratory investigation of platelet function: a review of methodology. J Clin Pathol. 1986.
- 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.
- Angiolillo DJ. et al. Basic principles of platelet biology and clinical implications. Circ J. 2010.
- 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.
- Just S. Laboratory Testing for von Willebrand Disease: The Past, Present, and Future State of Play for von Willebrand Factor Assays that Measure Platelet Binding Activity, with or without Ristocetin. Semin Thromb Hemost. 2017.
- McCabe White M. et al. Platelet protocols: research and clinical laboratory procedures. Elsevier Science. 1999.
- 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.
- Kaeng W.L. et al. Effects of Lifestyle on Hemostasis, Fibrinolysis, and Platelet Reactivity. Arch Intern Med. 2003.
- 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.
- CLSI Document EP28-A3c: "Defining, Establishing, and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory; Approved Guideline - Third Edition". 2010.c
- Munnix et al. Harmonizing light transmission aggregometry in the Netherlands by implementation of the SSC-ISTH guideline, Platelets. 2021.

Les notices (autres langues) sont disponibles sur [www.hyphen-biomed.com](http://www.hyphen-biomed.com). Pour le support client et les Guides d'Application, veuillez contacter votre fournisseur ou distributeur local (voir [www.hyphen-biomed.com](http://www.hyphen-biomed.com)).

Changements par rapport à la précédente version.

Les symboles suivants peuvent apparaître dans l'étiquetage du produit :

<b>REF</b>	Référence catalogue	<b>LOT</b>	Désignation du lot	<b>IVD</b>	Dispositif médical de diagnostic <i>in-vitro</i>
<b>Rx</b>	Identification numérique < x > du réactif	<b>i</b>	Lire le mode d'emploi	<b>WHO STD</b>	Code du standard OMS
<b>CE</b>	Températures limites de conservation	<b>MA</b>	Fabricant	<b>YYYY-MM-DD</b>	Utilisable jusqu'à
<b>XXXX</b>	Marquage de conformité CE avec le numéro d'identification de l'organisme notifié	<b>→</b>	Volume de reconstitution	<b>CONTENTS</b>	Contenu
<b>Cx</b>	Identification numérique < x > du contrôle	<b>i-MA</b>	Consulter les instructions fournies dans le guide d'application de la méthode	<b>CONTAINS</b>	Contient
<b>EXP</b>	Date d'expiration	<b>Σ</b>	Suffisant pour < n > tests	<b>UNIT</b>	Unité de mesure
<b>TARGET VALUE</b>	Valeur cible	<b>☀</b>	Maintenir hors de portée de la lumière du soleil et de la chaleur	<b>CALx</b>	Identification numérique < x > du calibrateur
<b>UDI</b>	Identifiant unique du dispositif	<b>BIO</b>	Contient du matériel biologique d'origine animale	<b>🔥</b>	Contient du sang ou des dérivés de plasma humain
<b>UK CA</b>	Marquage de conformité UKCA	<b>🚫</b>	Risque biologique	<b>ACCEPTANCE RANGE</b>	Intervalle d'acceptation