

CE BIOPHEN® α_2 -Antiplasmin (LRT)



Art.Nr. 220502



Vertrieb und Support:
CoaChrom Diagnostica GmbH
www.coachrom.com | info@coachrom.com
Tel. +43-1-236 222 1 | Fax +43-1-236 222 111
Kostenfreie Nummern für Deutschland:
Tel. 0800-24 66 33-0 | Fax 0800-24 66 33-3

Chromogene Methode zur Bestimmung von α_2 -Antiplasmin im Plasma mit gebrauchsfertigem Flüssigreagenz

VERWENDUNGSZWECK:

BIOPHEN® α_2 -Antiplasmin (LRT) ist ein Test zur chromogenen Bestimmung von α_2 -Antiplasmin in humanem Citratplasma mit automatisierten oder manuellen Methoden. Alle Reagenzien liegen gebrauchsfertig in flüssiger Form vor (LRT = „Liquid Reagent Technology“).

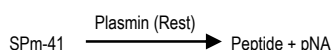
ZUSAMMENFASSUNG:

Plasmin ist als ein wesentliches Enzym der Fibrinolyse verantwortlich für die Degradierung verschiedener Proteine und wird durch die Serinprotease α_2 -Antiplasmin (oder Plasmin Inhibitor) inaktiviert. Die Bestimmung von α_2 -Antiplasmin dient der Diagnose eines angeborenen Mangels oder der Überwachung einer fibrinolytischen Therapie.

TESTPRINZIP:

α_2 -Antiplasmin inaktiviert das im Überschuss zugesetzte Plasmin (R1). Das restliche Plasmin spaltet das plasminspezifische, chromogene Substrat SPm-41, dabei wird der Farbstoff para-Nitroanilin (pNA) freigesetzt. Die Menge des freigesetzten pNA ist indirekt proportional zur α_2 -Antiplasmin-Aktivität im Plasma. Die Farbentwicklung wird bei 405 nm gemessen.

α_2 -Antiplasmin + Plasmin (Überschuss) \longrightarrow α_2 -Antiplasmin-Plasmin + Plasmin (Rest)



IM KIT ENTHALTENE REAGENZIEN:

R1: Reagenz 1: Humanes Plasmin

Hochgereinigtes humanes Plasmin, Flüssigreagenz.
3 Flaschen mit je 3 ml (gebrauchsfertig).

R2: Reagenz 2: Chromogenes Substrat (SPm-41)

Chromogenes Substrat, spezifisch für Plasmin, Flüssigreagenz.
3 Flaschen mit je 3 ml (gebrauchsfertig).

ANMERKUNGEN UND WARNHINWEISE:

- Jedes Produkt biologischen Ursprungs muss mit allen erforderlichen Vorsichtsmaßnahmen als potenziell infektiös behandelt werden.
- Falls das Substrat eine Gelbfärbung aufweist, ist dies ein Zeichen von Kontamination. Die betroffene Flasche ist zu verwerfen und eine neue Flasche muss verwendet werden.
- Nur Reagenzien aus Packungen mit identischer Chargennummer verwenden.
- Die Plasmin-Konzentration kann von Charge zu Charge variieren, wird jedoch für jede Charge exakt bestimmt.
- Die Reagenzien enthalten geringe Mengen Natriumazid (0,9 g/l) als Konservierungsmittel, welches mit Blei- bzw. Kupferarmaturen unter Bildung hochexplosiver Metallazide reagieren kann. Auf die sorgsame Entsorgung ist zu achten.
- Bei Entsorgung sind die lokalen Entsorgungsrichtlinien zu befolgen.
- Stabilitätsstudien für 3 Wochen bei 30°C haben gezeigt, dass die Packungen ohne Beeinträchtigung bei Raumtemperatur versendet werden können.
- Zur *in-vitro*-Diagnostik

VORBEREITUNG UND STABILITÄT DER REAGENZIEN:

R1: Reagenz 1: Plasmin (Transparente Flasche)

Gebrauchsfertiges Flüssigreagenz. Um eine homogene Reaktivität zu gewährleisten, vor Verwendung 30 Minuten bei Raumtemperatur (18-25°C) inkubieren und durchmischen. Stabilität des in der Originalflasche gelagerten, geöffneten Plasmins unter der Voraussetzung, dass dieses nicht kontaminiert wurde und keine Verdunstung erfolgte:

- 5 Wochen bei 2-8°C.
- 7 Tage bei Raumtemperatur (18-25°C).

R2: Reagenz 2: Chromogenes Substrat (SPm-41) (Braune Flasche)

Gebrauchsfertiges Flüssigreagenz. Um eine homogene Reaktivität zu gewährleisten, vor Verwendung 30 Minuten bei Raumtemperatur (18-25°C) inkubieren und durchmischen. Stabilität des in der Originalflasche gelagerten, geöffneten Substrates unter der Voraussetzung, dass dieses nicht kontaminiert wurde und keine Verdunstung erfolgte:

- 5 Wochen bei 2-8°C.
- 7 Tage bei Raumtemperatur (18-25°C).

Um jegliche Kontamination während des Gebrauchs zu vermeiden, sind die Reagenzien sorgfältig zu handhaben. Zur Vermeidung von Verdunstung – welche die Reagenzstabilität im Analysenautomaten negativ beeinflussen kann – können Reduzierstücke für den Flaschenhals verwendet werden.

LAGERUNG:

Ungeöffnete BIOPHEN® α_2 -Antiplasmin (LRT) Reagenzien werden bei 2-8°C in der Originalverpackung gelagert. Sie sind dann bis zu dem auf der Verpackung aufgedruckten Verfallsdatum stabil.

ERFORDERLICHE MATERIALIEN, DIE NICHT IM KIT ENTHALTEN SIND:

Reagenzien:

- Aqua dest.
- 20% Essigsäure oder 2% Zitronensäure (Endpunkt-Methode).
- Imidazol-Puffer (Art.Nr. AR021) zur Probenverdünnung oder alternativ physiologische Kochsalzlösung (0,9% NaCl).
- Plasma Kalibrator (z.B. BIOPHEN® Plasma Kalibrator, Art.Nr. 222101).
- Normal- und Abnormal- Kontrollplasmen (z.B. BIOPHEN® Kontrollplasma „Normal“, Art.Nr. 223201, und BIOPHEN® Kontrollplasma „Abnormal“, Art.Nr. 223301).

Geräte:

- Spektrophotometer, Photometer oder Gerinnungsautomat für chromogene Tests mit einer Wellenlänge von 405 nm.
- Stoppuhr.
- Geeichte Pipetten.

PROBENGEWINNUNG:

Die Gewinnung und Lagerung der Proben hat gemäß aktueller lokaler Vorschriften zu erfolgen (Vorschriften für die Probengewinnung, -handhabung und -lagerung sind im NCCLS/CLSI Dokument veröffentlicht).

Proben

Humanes Plasma mit Tri-Natrium Citrat als Antikoagulant.

Blutabnahme

Blut (9 Volumenteile) wird vorsichtig in 0,109 M Citrat als Antikoagulant (1 Volumenteil) abgenommen. Die Blutabnahme erfolgt durch Venenpunktion, wobei jegliche Gerinnungsaktivierung vermieden werden muss.

Zentrifugation

Die Herstellung von plättchenarmem Plasma hat innerhalb von 2 Stunden nach Blutabnahme gemäß einem validierten, laborspezifischen Verfahren zu erfolgen, z.B. durch Zentrifugation bei Raumtemperatur (18-25°C) für 15 Minuten bei 2500g. Das Plasma wird anschließend in ein Kunststoffröhrchen überführt.

Lagerung der Plasmaproben bis zu:

- 4 Stunden bei Raumtemperatur (18-25°C).
- 1 Monat tiefgefroren bei -20°C oder
- 18 Monate bei -70°C

Gefrorene Plasmaproben sollten bei 37°C zügig aufgetaut, anschließend behutsam gemischt und dann sofort getestet werden. Jegliche Niederschläge sind durch gründliches Mischen sofort nach dem Auftauen und vor dem Testen zu resuspendieren.

TESTDURCHFÜHRUNG:

BIOPHEN® α_2 -Antiplasmin (LRT) kann sowohl als automatisierbare kinetische Methode wie auch als manuelle Endpunktmethode durchgeführt werden. Zertifizierte Anleitungen für verschiedene Gerinnungsautomaten sind auf Anfrage erhältlich! Der Test wird bei einer kontrollierten Temperatur von 37°C durchgeführt und die Farbentwicklung bei 405 nm gemessen.

Automatisierte Methoden:

Adaptionsanleitungen für verschiedene Gerinnungsautomaten sind auf Anfrage erhältlich. Die Besonderheiten der jeweiligen Anwendung und spezifische Warnhinweise für den jeweiligen Automaten sind zu beachten.

Testmethode:

Die zu testenden Proben, Kontrollen und Kalibratorverdünnungen werden 1:30 mit Imidazol-Puffer oder physiologischer Kochsalzlösung verdünnt. In Teströhrchen, die jeweils bei 37°C vorinkubiert sind, wird nach folgendem Schema zugegeben:

| | |
|--|--------|
| Kalibratoren/ Kontrollen/ Probe 1:30 verdünnt | 200 µl |
| R1: Plasmin, vorinkubiert bei 37°C | 200 µl |
| Mischen und für 4 Minuten bei 37°C inkubieren, dann zugeben: | |
| R2: Chromogenes Substrat, vorinkubieren bei 37°C | 200 µl |
| Mischen und für 4 Minuten bei 37°C inkubieren | |
| Stoppen der Reaktion durch die Zugabe von: | |
| Essigsäure (20%) | 400 µl |
| Mischen und die optischen Dichte bei 405 nm gegen den Probenleerwert messen. | |

Die gebildete Gelbfärbung ist für mindestens 1 Stunde stabil.

Der Probenleerwert wird durch Mischen der Reagenzien in der umgekehrten Testreihenfolge erhalten, d.h. Essigsäure (20%), chromogenes Substrat (R2), Plasmin (R1), verdünntes Plasma. Die Absorption des Probenleerwertes bei 405 nm ist von der Absorption des entsprechenden Probenwertes abzuziehen.

Falls die jeweilige Automatenmethode andere Reagenzvolumente als die oben beschriebenen erfordert, müssen die Verhältnisse der Reagenzkonzentrationen genau eingehalten werden, um den Erhalt der Leistungsmerkmale des Tests zu gewährleisten.

KALIBRATION:

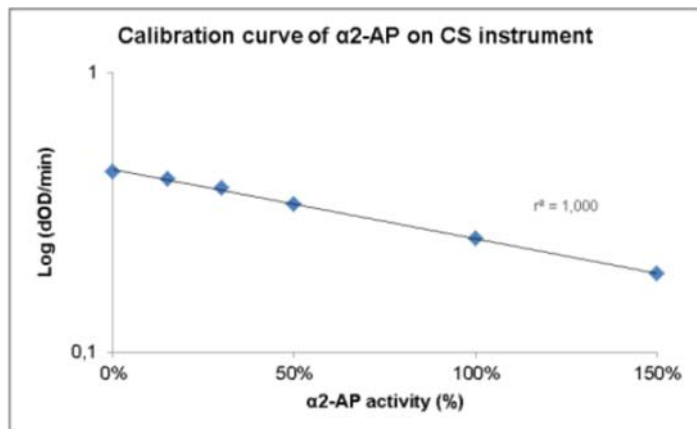
BIOPHEN® α_2 -Antiplasmin (LRT) kann mit kommerziell verfügbarem Kalibrationsplasma (z.B. BIOPHEN® Plasma Kalibrator, Art.Nr. 222101) oder gepooltem Normalplasma (zusammengeführt aus Citratplasma von mindestens 30 medikationsfreien, gesunden männlichen und weiblichen Spendern im Alter von 18 bis 55 Jahren und mit einer festgelegten α_2 -Antiplasmin Aktivität von 100 %) kalibriert werden.

Kalibratoren, Kontrollen und Proben werden 1:30 mit Imidazol-Puffer oder physiologischer Kochsalzlösung vorverdünnt. Die Ausgangsaktivität des Kalibrators von „C%“ (z.B. 105%) entspricht dann dem Kalibrator C2. Die exakte Aktivität des Kalibrators C1 (ca. 150%) wird wie folgt errechnet: 30x C:150.

Die Kalibratorverdünnungen werden wie folgt hergestellt:

| Kalibrator | C1 | C2 | C3 | C4 | C5 | C6 |
|------------------------------------|------|--------|--------|--------|--------|-----|
| α_2 -Antiplasmin bei C=100% | 150 | 100 | 50 | 25 | 12,5 | 0 |
| Kalibrator (µl) | 1500 | 660 C1 | 500 C2 | 500 C3 | 500 C4 | 0 |
| Puffer (µl) | 0 | 330 | 500 | 500 | 500 | 500 |

Die nachfolgend gezeigte Kalibrationskurve auf einem CS Instrument dient lediglich als Beispiel. Zur Ergebnisberechnung von Proben darf ausschließlich die für die jeweilige Analysenserie gemessene Kalibrationskurve verwendet werden.



QUALITÄTSKONTROLLE:

Die Verwendung von Qualitätskontrollplasmen im normalen und pathologisch erniedrigten Bereich ermöglicht die Validierung der Kalibration bzw. der homogenen Reaktivität des Tests von Analyse zu Analyse. Zumindest bei Chargenwechsel, größeren Wartungsarbeiten am Analysenautomaten oder wenn die Kontrollen außerhalb des Vertrauensbereiches liegen, muss eine Neukalibration erfolgen. Jedes Labor sollte die

Richtigkeit der Zielwerte und Akzeptanzbereiche unter den eigenen Testbedingungen überprüfen.

ERGEBNISSE:

- Bei der Endpunktmethode wird auf lin-log Millimeterpapier die α_2 -Antiplasmin-Aktivität in Prozent (x-Koordinate) gegen die korrespondierende Absorption A_{405} (y-Koordinate) aufgetragen.
- Alternativ können Statistik-Software-Programme zur Ermittlung der Antiplasmin-Aktivität verwendet werden. Das Verhältnis zwischen α_2 -Antiplasmin und Extinktionen (A_{405}) ist indirekt proportional.
- Die Kalibrationskurve wird gezeichnet und r^2 kalkuliert. Ist $r^2 \geq 0,98$ und liegen die Messwerte der Kontrollen innerhalb der Akzeptanzgrenzen, ist die Kalibration gültig. Bei der manuellen Methode im Teströhrchen liegt die Absorption für den 0% Kalibrator bei etwa 2,0 ($\pm 0,3$). In der Mikrotiterplatten-Methode liegen die Absorptionen generell etwas niedriger. Bei den automatisierten Methoden sind die Absorptionen abhängig vom verwendeten Gerinnungsautomaten.
- Die α_2 -Antiplasmin-Aktivität der zu testenden Probe wird direkt von der Kalibrationskurve abgelesen. Die Ergebnisse werden in % α_2 -Antiplasmin angegeben.
- Der Messbereich bei der 1:30 Vorverdünnung liegt zwischen 10 und 150%. Bei abweichender Probenverdünnung müssen die Ergebnisse mit dem jeweiligen Verdünnungsfaktor multipliziert werden.
- Bei Verwendung von Gerinnungsautomaten wird die Aktivität in Bezug auf die Kalibrationskurve und Probenverdünnung direkt vom Automaten berechnet.

EINSCHRÄNKUNGEN DES TESTES:

- Auf einem CS-5100 Analyser wurde keine Beeinflussung des Testes durch Bilirubinkonzentrationen <28 mg/dl, Hämoglobinkonzentrationen <500 mg/dl, Triglyzeridkonzentrationen <300 mg/dl und (gespiktes) Heparinkonzentrationen $<2,0$ IE/ml festgestellt. Bei der Endpunktbestimmung kann die Mitführung eines Probenleerwertes (z.B. bei lipämischen Plasmen) notwendig sein.
- Um eine optimale Funktion des Testes zu gewährleisten, müssen die Vorschriften zur Testdurchführung genau eingehalten werden.
- Eine sehr niedrige α_2 -Antiplasmin-Aktivität kann zu mangelnder Spezifität führen (z.B. gemessene 8-15% bei α_2 -Antiplasmin-Mangelplasma). In diesem Fall empfiehlt sich ein alternatives Testprotokoll mit verkürzter Inkubationszeit (30 Sekunden bei CS), um so den Einfluss anderer Inhibitoren zu minimieren.

ERWARTETE WERTE:

100% α_2 -Antiplasmin entspricht der Aktivität in normalem, humanem Plasma, zusammengeführt aus Citratplasma von mindestens 30 medikationsfreien, gesunden männlichen und weiblichen Spendern im Alter von 18 bis 55 Jahren. Gewöhnlich liegt die α_2 -Antiplasmin-Aktivität bei Erwachsenen geschlechts- und altersunabhängig zwischen 75 und 135%. Jedes Labor sollte eigene Normalbereiche festlegen.

LEISTUNGSMERKMALE:

- Dynamischer Bereich: 10 bis 150% α_2 -Antiplasmin-Aktivität.
- Die Nachweisgrenze wird durch die „scheinbare“ α_2 -Antiplasmin-Aktivität definiert. Diese entspricht der mittleren Gerinnungszeit eines α_2 -Antiplasmin-Mangelplasmas plus zwei Standardabweichungen.
- Die Nachweisgrenze liegt bei $\leq 10\%$.
- Spezifität: α_2 -Antiplasmin reduziertes Plasma wurde mit einem Ergebnis $<25\%$ gemessen.
- Beispiel für die Reproduzierbarkeit auf CS Automaten:

| Probe | Intra Assay CV% | | | | Inter Assay CV% | | | |
|-------------------------|------------------|-----|--------------------|-----|------------------|-----|--------------------|-----|
| | Kontrolle Normal | | Kontrolle Abnormal | | Kontrolle Normal | | Kontrolle Abnormal | |
| α_2 -Antiplasmin | N | 10 | N | 10 | N | 10 | N | 10 |
| | CV% | 0,8 | CV% | 1,2 | CV% | 1,3 | CV% | 2,4 |

REFERENZEN:

- SL Carpenter, P Mathieu: α_2 -Antiplasmin and its deficiency: Fibrinolysis out of balance; Haemophilia (2008); 14,1250-1254
- J Kettle and A Mayne: A bleeding disorder due to deficiency of α_2 -Antiplasmin; J Clin Pathol (1982); 38; 428-429
- I Jeffrey et al: α_2 -Antiplasmin supplementation inhibits Tissue Plasminogen Activator-induced Fibrinogenolysis and bleeding with little effect on thrombosis; J clin Invest (1993); 91; 1343-1350
- N Aoki et al: the α_2 -Antiplasmin inhibitor levels in liver disease; Clin Chem Acta (1978); 84; 99-105
- Woodhams B, Girardot O, Blanco M-J, Colesse G, Gourmelin Y. Stability of coagulation proteins in frozen plasma. Blood coagulation and Fibrinolysis. 2001. Vol 12, No 4. 229-236
- CLSI Document H21-A5: „Collection, transport and processing of blood specimens for testing plasma-based coagulation assays and molecular hemostasis assays; approved guideline“ Fifth Edition, 28, 5, 2008.

SYMBOLE:

Verwendete Symbole und Zeichen sind gelistet in der ISO-Norm 15223-1.