

# LIAPHEN AT

Art.Nr. 120002

## Turbidimetrischer Latex-Immunoassay zur quantitativen Bestimmung von Antithrombin im Plasma



In-vitro-Diagnostikum



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

### VERWENDUNGSZWECK:

LIAPHEN AT ist ein turbidimetrischer Latex-Immunoassay zur quantitativen Bestimmung von Antithrombin (AT) in humanem Citratplasma und ist sowohl zur manuellen als auch zur automatisierten Durchführung geeignet.

### KLINISCHE BEDEUTUNG:

Diagnose eines angeborenen oder erworbenen quantitativen AT-Mangels.

### PROBENMATERIAL:

Humanes Citratplasma.

### TESTPRINZIP:

LIAPHEN AT ist ein turbidimetrischer Latex-Immunoassay zur quantitativen Bestimmung von AT in humanem Citratplasma. Wird die Testprobe mit dem Latexreagenz (R1) und dem Reaktionspuffer (R2) vermischt, bindet in der Probe vorhandenes AT an Latexgebundene Antikörper, dies führt in weiterer Folge zur Agglutination der Latexpartikel. Die Agglutination ist proportional zur AT-Konzentration der Probe und wird durch Lichtabsorption bei 620 nm (oder der spezifischen Messwellenlänge des verwendeten Gerinnungsautomaten) gemessen.



### IM KIT ENTHALTENE REAGENZIEN:

- **R1:** 2 Flaschen mit je 2 ml gebrauchsfertigem Latexreagenz, bestehend aus Latexmikropartikeln, beschichtet mit affinitätsgereinigten, polyklonalen Ziegen-anti-(h)-AT-Antikörpern.
- **R2:** 2 Flaschen mit je 10 ml gebrauchsfertigem Reaktionspuffer, bestehend aus Hepes-NaCl-Puffer mit 1% Rinderserumalbumin und 0,9% Natriumazid als Konservierungsmittel.

**Warnhinweis:** Rinderserumalbumin (RSA) wurde aus bovinem Plasma hergestellt, das aus BSE-freien Tieren gewonnen und auf die Abwesenheit infektiöser Substanzen getestet wurde. Kein Test kann jedoch die Anwesenheit infektiöser Stoffe vollständig ausschließen. Jedes Produkt biologischen Ursprungs muss deshalb mit allen erforderlichen Vorsichtsmaßnahmen als potenziell infektiös behandelt werden. Natriumazid (0,9 g/l) kann mit Blei oder Kupferarmaturen unter Bildung hochexplosiver Metallazide reagieren. Bei Entsorgung der Lösung in den Ausguss muss mit großen Wassermengen nachgespült werden.

### ERFORDERLICHE MATERIALIEN, DIE NICHT IM KIT ENTHALTEN SIND:

#### Reagenzien:

- Physiologische Kochsalzlösung (0,9% NaCl).
- Kalibrator für AT (z.B. BIOPHEN® Kalibrationsplasma, Art.Nr. 222101).
- Oder Referenzmaterial für AT:Ag (internationaler oder interner Standard).
- Normal- und Abnormal-Kontrollplasmen für AT (z.B. BIOPHEN® Kontrollplasma „Normal“, Art.Nr. 223201, und BIOPHEN® Kontrollplasma „Abnormal“, Art.Nr. 223301).

#### Geräte:

- Spektrophotometer mit einer Messwellenlänge von 620 nm oder Gerinnungsautomat zur Durchführung chromogener Tests.
- Stoppuhr.
- Kalibrierte Pipetten.
- Küvetten oder Mikrotiterplatten.

### RÜCKFÜHRBARKEIT DES STANDARDS:

Die Konzentration des internen Standards für AT:Ag wurde gegen den NIBSC-Standard SSC/ISTH, Lot Nr. 3, und den zweiten internationalen NIBSC-Plasma-AT-Standard (93/768) bestimmt.

### LAGERUNG:

Ungeöffnete Reagenzien müssen bei 2-8°C in der Originalverpackung gelagert werden und sind bis zum auf dem Etikett gedruckten Verfalldatum stabil.

**Anmerkung:** Stabilitätsstudien für 3 Wochen bei 30°C zeigen, dass die Reagenzien ohne Beeinträchtigung bei Raumtemperatur (18-25°C) versendet werden können.

### VORBEREITUNG UND STABILITÄT DER REAGENZIEN:

- **R1:** Gebrauchsfertiges Latexreagenz:
  - Vor Verwendung für 30 Minuten bei Raumtemperatur (18-25°C) inkubieren.
  - Vor jedem Gebrauch durchmischen.

Stabilität von R1 nach dem Öffnen, bei Aufbewahrung in der verschlossenen Originalflasche und unter Vermeidung jeglicher Kontamination und Verdunstung:

- 7 Tage bei Raumtemperatur (18-25°C).
- 6 Monate bei 2-8°C.

- **R2:** Gebrauchsfertiger Reaktionspuffer:

- Vor Verwendung für 30 Minuten bei Raumtemperatur (18-25°C) inkubieren.
- Vor jedem Gebrauch durchmischen.

Stabilität von R2 nach dem Öffnen, bei Aufbewahrung in der verschlossenen Originalflasche und unter Vermeidung jeglicher Kontamination und Verdunstung:

- 7 Tage bei Raumtemperatur (18-25°C).
- 6 Monate bei 2-8°C.

#### Vorsichtsmaßnahmen:

- Um die Stabilität der Reagenzien zu gewährleisten müssen die Flaschen nach jedem Gebrauch mit ihrer Originalschraubkappe verschlossen werden.
- Die Reagenzien sind sorgfältig zu behandeln um jegliche Kontamination und Verdunstung während ihrer Verwendung zu vermeiden.
- Die bei Hyphen BioMed verfügbaren, gerätespezifischen (Gerinnungsautomaten) Angaben zum Testablauf sind zu beachten.
- Es dürfen ausschließlich Reagenzien aus Testpackungen mit übereinstimmender Chargennummer verwendet werden. Zur Testdurchführung dürfen keine Reagenzien aus Testpackungen mit unterschiedlicher Chargennummer verwendet werden. Die Kombination der Reagenzien R1 und R2 ist im Bezug auf die Testcharge optimiert.

### TESTDURCHFÜHRUNG:

LIAPHEN AT kann sowohl manuell als auch kinetisch auf einem Gerinnungsautomaten durchgeführt werden. Applikationen für die gängigsten Gerinnungsautomaten sind auf Anfrage erhältlich. Der manuelle Test muss bei einer kontrollierten Temperatur von 37°C durchgeführt werden. Die Agglutinationsentwicklung wird bei 620 nm gemessen.

#### Probengewinnung und -vorbereitung:

Blut (9 Volumenteile) wird in 0,109 M (oder 0,129 M) Trinatrium-Citrat als Antikoagulant (1 Volumenteil) abgenommen. Nach Zentrifugation für 20 Minuten bei 2.500 g wird der Plasmaüberstand abgenommen. Das Citratplasma sollte innerhalb folgender Zeitspannen getestet werden:

- 8 Stunden bei 2-25°C.
- Bei -20°C oder tiefer kann das Plasma für bis zu 6 Monaten gelagert und muss vor Gebrauch für 15 Minuten bei 37°C aufgetaut werden. Aufgetaute Proben müssen bei Raumtemperatur (18-25°C) innerhalb von 4 Stunden getestet werden.

**Anmerkung:** Weitere Empfehlungen für die Probengewinnung, -handhabung und -lagerung sind den GEHT- und NCCLS/CLSI-Dokumenten zu entnehmen. Ikerische, hämolytierte, lipämische Plasmen sind zu verwerfen.

#### Kalibration:

Zur Erstellung der Kalibrationskurve kann gepooltes Normalplasma (Citratplasma von mindestens 30 gesunden Spendern zwischen 18 und 55 Jahren, die nicht unter Medikation stehen) mit einem festgelegten AT-Gehalt von 100% verwendet werden. Der Testansatz wird mit 1:15 verdünnten (0,9% NaCl) Plasmen durchgeführt. Der Messbereich liegt zwischen 0 und 150% AT, wobei die 150%-Standard-Stammlösung durch eine 1:10-Vorverdünnung des 100%-AT-Poolplasmas erhalten wird.

Empfohlen ist die Verwendung eines kommerziell verfügbaren Kalibrators (z.B. BIOPHEN® Kalibrationsplasma, Art.Nr. 222101). Der Testansatz wird auch hier mit 1:15 verdünnten (0,9% NaCl) Plasmen durchgeführt.

Bei Verwendung eines Plasmakalibrators mit bekannter AT-Konzentration (C) wird der 150%-AT-Standard durch entsprechend geringere Verdünnung (D) des Plasmakalibrators gemäß folgender Berechnung hergestellt:  $D = 10 \times C : 100$ . Beispiel: Bei einer AT-Konzentration (C) des Kalibrators von 93% wird für die Herstellung des 150%-Standards der Verdünnungsfaktor (D) wie folgt ermittelt:  $D = 10 \times 93 : 100 = 9,3$ .

Ausgehend von 2 ml der 150%-AT-Stammlösung (C1) werden die weiteren Kalibrationspunkte durch Verdünnung mit 0,9% NaCl wie folgt hergestellt:

Standard	C1	C2	C3	C4	C5	C6
% AT	150	100	75	50	25	0
Volumen der 150%-AT-Stammlösung	2000 µL	600 µL von C1	500 µL von C1	500 µL von C2	500 µL von C4	0 µL
Volumen 0,9% NaCl	0 µL	300 µL	500 µL	500 µL	500 µL	1000 µL

Um eine optimale Testleistung zu erzielen ist die Kalibrationskurve unmittelbar vor dem Testansatz herzustellen.

### Plasmaproben und Kontrollen:

Die Plasmaproben und Kontrollplasmen werden 1:15 (manuelle Methode) mit 0,9% NaCl vorverdünnt. Bei der Testung von hochreinem AT muss die Verdünnung mit einer Lösung bestehend aus 0,9% NaCl und 1% Rinderserumalbumin erfolgen (erwartete Endkonzentration: 0,5 bis 10 µg/ml AT). Die verdünnten Proben müssen innerhalb von zwei Stunden getestet werden.

### TESTPROTOKOLL:

#### Manuelle Methode:

Die benötigte Menge Latexreagenz (R1) unmittelbar vor Verwendung 1:5 mit Reaktionspuffer (R2) verdünnen.	
Kalibratoren oder verdünnte Testplasmen bzw. Kontrollen	100 µl
R1 (1:5 mit R2 verdünnt) bei 37°C vorinkubiert und durchmischt.	400 µl
Mischen und 15 Minuten bei 37°C inkubieren.	
Mischen und die Absorption bei 620 nm gegen 0,9% NaCl messen. Die Reaktionszeit muss bei allen Proben ident sein.	

#### Anmerkungen:

- Bei der manuellen Methode muss bei jedem Testlauf eine Kalibrationskurve erstellt werden.
- Bei stark lipämischen, ikterischen, hämolytischen oder sonst farblich auffälligen Plasmen ist ein Probenleerwert zu inkludieren.

### Automatisierte Methoden:

Anleitungen für Gerinnungsautomaten sind auf Anfrage erhältlich. Die beiden Reagenzien werden im Gerät platziert, das Latexreagenz wird automatisch verdünnt. Der Test wird kinetisch durchgeführt, wobei Probenleerwerte automatisch berücksichtigt werden. Je nach Automat können die Pipettierolumina und Verdünnungen abweichen, siehe dazu die gerätespezifischen Anwendungsvorschriften.

### QUALITÄTSKONTROLLE:

Die Verwendung von Qualitätskontrollplasmen ermöglicht, bei Gebrauch der gleichen Reagenzchargen, die Validierung der Kalibrationskurve und einer homogenen Reaktivität von Analyse zu Analyse. Die Kalibrationskurve ist gültig, wenn die Konzentrationen der gemessenen Kontrollen innerhalb des Vertrauensbereichs liegen. Es sind verschiedene Qualitätskontrollplasmen für AT verfügbar: BIOPHEN® Kontrollplasma „Normal“ (Art.Nr. 223201) und BIOPHEN® Kontrollplasma „Abnormal“ (Art.Nr. 223301). Jedes Labor sollte unter den jeweiligen Arbeitsbedingungen für jede neue Reagenzcharge die Zielwerte und Vertrauensbereiche verifizieren und falls notwendig anpassen.

#### Anmerkungen:

- Für jede Testserie kann eine neue Kalibrationskurve erstellt werden, jedenfalls ist diese für neue Reagenzchargen, nach Wartungsarbeiten am Analysengerät oder wenn die gemessenen Werte der Kontrollen nicht im Vertrauensbereich für die jeweilige Methode liegen (nach Kontrolle aller Parameter des Messsystems) zu erstellen.
- Jedes Labor kann seine eigenen Zielwerte und Vertrauensbereiche in Abhängigkeit der verwendeten Reagenzien, Chargen, Geräte und Protokolle definieren und validieren.

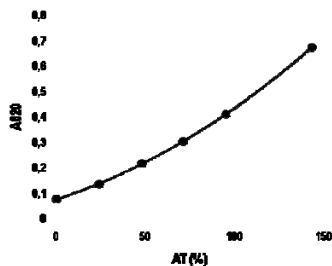
### BERECHNUNG DER ERGEBNISSE:

Auf Millimeterpapier wird die AT-Konzentration (%) auf der Abszisse (x-Achse) gegen die jeweilige Absorption ( $A_{620}$ ) auf der Ordinate (y-Achse) aufgetragen. Bei Verwendung einer Auswertesoftware sollte der Kurventyp verwendet werden, der am besten zu den Ergebnissen passt (Polynom 3. Ordnung, Akima, ...). Die Kalibration ist gültig, wenn die Linearität  $\geq 0,98$  ist und die Kontrollen im angegebenen Vertrauensbereich liegen.

Die AT-Konzentration der 1:15 (manuelle Methode) verdünnten Probe in Prozent wird direkt von der Standardkurve abgelesen. Bei Verwendung anderer Verdünnungsfaktoren müssen diese bei der Berechnung berücksichtigt werden.

### BEISPIEL FÜR EINE KALIBRATION:

Die nachfolgend gezeigte Kalibrationskurve, erstellt mit der manuellen Methode, dient lediglich als Beispiel. Zur Ergebnisberechnung von Proben dürfen ausschließlich die für die jeweilige Analysenserie gemessenen Kalibrationskurven verwendet werden.



### TESTCHARAKTERISTIKA:

- **Messbereich:** 0 bis 150% AT (manuelle Methode).
- **Nachweisgrenze:** 11,4%, definiert als die niedrigste Konzentration mit einem VK < 20%, Bias < 20% bei N = 15, gemessen über 4 Tage bei 4 Wiederholungen pro Tag.
- **Spezifität:** Keine Reaktivität mit AT-Mangelplasma (< 5% AT)
- **Präzision:** 3 Plasmen mit hoher, mittlerer und niedriger AT-Konzentration wurden über einen Zeitraum von 8 Tagen in insgesamt 10 Ansätzen gemessen:

	AT-Konzentration (%)	Wiederholbarkeit innerhalb der Analyse (%)	Gesamtpräzision (%)
Level 1	102,0	1,9	4,4
Level 2	63,3	1,5	4,0
Level 3	22,7	3,0	7,4

### Methodenvergleich:

Der Vergleich mit BIOPHEN® AT (chromogener AT-Test, Art.Nr. 221105, Hyphen Bio-Med) auf dem Gerinnungsautomaten STA-R ergab:

$$N = 59 \quad Y = 0,95X + 1,73 \quad R = 0,985$$

Der Vergleich mit Berichrom® AT (chromogener AT-Test, Siemens) auf dem Gerinnungsautomaten BCS XP ergab:

$$N = 62 \quad Y = 1,04X - 1,47 \quad R = 0,987$$

**Hook-Effekt bei hohen Dosen:** Bei Konzentrationen von bis zu 200% AT wurde kein Hook-Effekt festgestellt.

### Testeinschränkungen:

- Keine Beeinflussung des Tests durch unfraktioniertes oder niedermolekulares Heparin  $\leq 2$  IE/ml, Bilirubin  $\leq 0,2$  g/l, Hämoglobin  $\leq 2$  g/l, Intralipid®  $\leq 0,75\%$  (entsprechend 20 g/l Triglyzeride).
- Die Anwesenheit von Rheumafaktor kann zu fälschlich erhöhten AT-Konzentrationen führen.

### ÜBLICHE WERTE UND PATHOLOGISCHE ABWEICHUNGEN:

Die Konzentration von 100% AT entspricht der Konzentration in normalem humanem Citratplasma, gepoolt aus mehreren Plasmen von gesunden Männern und Frauen im Alter zwischen 18 und 55 Jahren, die nicht unter Medikation stehen. Der Normalbereich bei gesunden Erwachsenen liegt zwischen 80 und 120% AT.

Die AT-Konzentration liegt im Serum 20 bis 30% unter jener von Plasma. Die mit LIAPHEN AT im Serum gemessenen Konzentrationen liegen höher als die mit funktionellen Tests gemessenen Werte (Verbrauch während des Clottings), wohingegen die plasmatischen Werte ident sind.

Eine AT-Konzentration von  $\leq 70\%$  weist auf einen AT-Mangel hin und muss mit einem weiteren Test oder durch Testung einer neuen Plasmaprobe bestätigt werden. Die AT-Konzentration ist während der Schwangerschaft und der Einnahme oraler Kontrazeptiva verringert. Spontane thrombotische Ereignisse werden in Anwesenheit angeborener AT-Mängel beobachtet. Diese angeborenen Mängel werden in 4 Gruppen unterteilt:

- **Typ I:** Verringerte AT-Konzentration bei gleichzeitig verringerter Aktivität (häufigster Fall).
- **Typ II RS (Reaktive Stelle):** Normale AT-Konzentration bei verringerter Aktivität. Ursache dafür ist eine Protein-Mutation im aktiven Zentrum.
- **Typ II HBS (Heparin-bindende Stelle):** Normale AT-Konzentration bei normaler Aktivität in Abwesenheit von Heparin, jedoch reduzierter Affinität gegenüber Heparin.
- **Typ II (Pleiotrop):** Verringerte AT-Konzentration bei gleichzeitig verringerter Aktivität und reduzierter Heparinaffinität.

Die funktionelle Bestimmung von AT in Kombination mit einem Immunoassay erlaubt die Klassifizierung des AT-Mangels.

### ERGÄNZENDE INFORMATIONEN:

AT ist ein in der Leber synthetisiertes, einkettiges Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von etwa 58,2 kDa. Die Konzentration im Normalplasma beträgt etwa 125 µg/ml. AT ist ein progressiver Inhibitor von Thrombin (Faktor IIa) und anderer Serinproteasen wie die Faktoren Xa, IXa, XIa und XIIa, Plasmin und Kallikrein. Heparin beschleunigt sehr stark die Inhibition der Faktoren IIa und Xa. Die Plasma-AT-Konzentration ist, so wie z.B. auch die von Protein C und Protein S, wichtig für die Erhaltung der Hämostase.

### WEITERFÜHRENDE LITERATUR:

1. Tsiang M et al., Functional requirements for inhibition of Thrombin by Antithrombin III in the presence and absence of heparin. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol 272, No 18, 12024-12029 (1997).
2. Mann K.G., Biochemistry and Physiology of blood coagulation. *Thrombosis and Haemostasis*, Vol 82, No 2, 165-174 (1999).
3. Mortensen J.Z. Inherited ATIII deficiency. Fast and slow inactivation of thrombin and Factor Xa. *Thromb. Res.*, 33, 511-515 (1984).
4. Tollefsen D.M. Laboratory Diagnosis of Antithrombin and Heparin Cofactor II deficiency. *Seminars in Thromb. haemost.* 16, 162-168 (1990).