Der Inhalt dieses Dokuments dient lediglich als Beispiel. Die aktuellste Version finden Sie in unserem geschützten Downloadbereich unter https://www.coachrom.com/insert. Bei Bedarf senden wir sie Ihnen aber auch gerne zu, bitte anfordern unter: info@coachrom.com

CE

LIAPHEN™ AT

REF 120002 R1 2x2 mL, R2 2x10 mL

Turbidimetrischer Latex-Immunoassay mit gebrauchsfertigen Flüssigreagenzien zur quantitativen Bestimmung von Antithombin im Plasma

HYPHEN BioMed

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 Latex-Immunoassay zur quantitativen *in-vitro*-Bestimmung von Antithombin-Antigen (AT:Ag) in humanem Citratplasma mit automatisierten oder manuellen Methoden. Die Reagenzien liegen in flüssiger Form vor und sind gebrauchsfertig.

ZUSAMMENFASSUNG:

Technisch:

Antithrombin (AT) ist der wichtigste physiologische Gerinnungsinhibitor. Es hemmt Serinproteasen, insbesondere Thrombin, Faktor Xa (FXa) und Faktor IXa (FIXa), im Komplex mit Heparin reguliert AT die Gerinnung und verhindert Thrombosen.[1]

Klinisch:

Bei Vorliegen eines angeborenen AT-Mangels sind spontane thromboembolische Erkrankungen zu beobachten. Angeborene AT-Mängel werden in vier Gruppen unterteilt.[2,3,4] Die AT-Konzentration ist bei Neugeborenen und unter bestimmten Umständen wie Schwangerschaft, Lebererkrankungen, DIC, etc. verringert.[4] Die funktionelle Bestimmung von AT in Kombination mit einem Immunoassay ermöglicht die Klassifizierung eines AT-Mangels.

TESTPRINZIP:

LIAPHEN™ AT ist ein turbidimetrischer Latex-Immunoassay, der auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion basiert. Wird die Probe mit dem Latexreagenz vermischt, bindet in der Probe vorhandenes AT an die im Latexreagenz enthaltenen polyklonalen Anti-Human AT-Antikörper und führt so zur Agglutination. Die Agglutination wird anhand der Veränderung der Lichtabsorption gemessen und ist proportional zum Gehalt an AT:Ag in der Probe.

REAGENZIEN:

R1 Latexreagenz, flüssig, enthält bovines Serumalbumin (BSA)

R2 Reaktionspuffer, Hepes NaCl Puffer, flüssig

REF 120002 → R1 2 Flaschen mit je 2 mL
R2 2 Flaschen mit je 10 mL

ANMERKUNGEN UND WARNHINWEISE:

- Für die Herstellung der Reagenzien wird Material tierischen Ursprungs verwendet. Produkte biologischen Ursprungs müssen mit allen erforderlichen Vorsichtsmaßnahmen und als potentiell infektiös gehandhabt werden.
- Bei Entsorgung sind die lokalen Richtlinien zu befolgen.
- Nur Reagenzien aus Packungen mit identischer Chargennummer verwenden.
- Stabilitätsstudien haben gezeigt, dass die Packungen ohne Beeinträchtigung bei Raumtemperatur versendet werden können.
- Zur *in-vitro*-Diagnostik in professionellem Laborgebrauch.

VORBEREITUNG DER REAGENZIEN:

R1 R2 Die Reagenzien liegen gebrauchsfertig vor. Vorsichtig durchmischen und dabei Schaumbildung vermeiden. Gemäß Applikationsanleitung auf den Gerinnungsautomaten laden.

Manuelle Methode: 30 Minuten bei Raumtemperatur (18-25°C) inkubieren. Den Inhalt vor jedem Gebrauch homogenisieren.

LAGERUNG UND STABILITÄT:

Die ungeöffneten Reagenzien müssen bei 2-8°C in der Originalverpackung gelagert werden. Sie sind dann bis zu dem auf dem Etikett aufgedruckten Verfalldatum stabil.

R1 R2 Stabilität des verschlossen gelagerten Reagenz nach dem Öffnen unter der Voraussetzung, dass dieses nicht kontaminiert wurde und keine Verdunstung erfolgte:

- 6 Monate bei 2-8°C
- 7 Tage bei Raumtemperatur (18-25°C)
- Nicht einfrieren
- On Board-Stabilität – siehe gerätespezifische Applikation

ERFORDERLICHE MATERIALIEN, DIE NICHT IM KIT ENTHALTEN SIND:

Reagenzien:

- Aqua dest.
- Physiologische Kochsalzlösung (0,9% NaCl)
- Spezifische Kalibratoren und Kontrollen mit bekannten AT:Ag-Werten, z.B.:

Artikelbezeichnung	Art.Nr.
BIOPHEN™ Kalibrationsplasma Gerinnung	222101
BIOPHEN™ Kontrollplasma Gerinnung „Normal“	223201
BIOPHEN™ Kontrollplasma Gerinnung „Abnormal“	223301

Die spezifische Applikationsanleitung des verwendeten Gerinnungsautomatens ist zu beachten.

Geräte:

- Spektrophotometer oder Gerinnungsautomat für turbidimetrische Immunoassays
- Stoppuhr, kalibrierte Pipetten, Plastikröhrchen für den Spektrophotometer.

PROBENGEWINNUNG:

Blut (9 Volumenteile) wird vorsichtig in 0,109 M Citrat als Antikoagulanz (1 Volumenteil) abgenommen. Die Blutabnahme erfolgt durch Venenpunktion. Das erste Röhrchen ist zu verwerfen.

Die Gewinnung und Lagerung der Proben hat gemäß aktuellen lokalen Vorschriften zu erfolgen (Vorschriften für die Probengewinnung, -handhabung und -lagerung sind im CLSI-Dokument H21-A5[5] veröffentlicht). In Bezug auf die Lagerung des Plasmas sind die Referenzen zu beachten.[5,6]

TESTDURCHFÜHRUNG:

LIAPHEN™ AT kann sowohl kinetisch auf einem Gerinnungsautomaten als auch mit der manuellen Methode durchgeführt werden. Der Test wird bei einer Temperatur von 37°C durchgeführt, die Agglutinationsentwicklung wird bei 620 nm gemessen (andere Wellenlängen können benutzt werden, vorzugsweise zwischen 450 und 700 nm).

Für die automatisierte Durchführung sind Applikationsanleitungen für die gängigsten Gerinnungsautomaten auf Anfrage erhältlich. Die gerätespezifische Applikation und die spezifischen Vorsichtsmaßnahmen des jeweiligen Gerinnungsautomatens sind zu beachten. Eine manuelle Verdünnung des Latexreagenzes ist bei automatisierter Durchführung nicht notwendig.

Testmethode:

1. Die Referenzpräparation oder die Kalibratoren und Kontrollen sind anhand der spezifischen Inserts oder gemäß interner Praxis zu rekonstituieren.

   Bei Verwendung eines kommerziell verfügbaren Kalibrators mit einer bekannten AT:Ag-Konzentration (C%) und einer Verdünnung von 1:15 erhält man das 150%-Niveau (unter Testbedingungen) durch Verdünnung des Kalibrators mit dem folgenden Verdünnungsfaktor (D): D = 10x(C)/100 bzw. D = C : 10.

   Die Kalibrationskurve kann auch unter Verwendung von gepooltem Normal-Citratplasma (mindestens 30 normale Spender beider Geschlechter, zwischen 18 und 55 Jahre alt, ohne bekannte Behandlung oder Erkrankungen), das per Definition einen AT:Ag Titer von 100% hat. Der Test sieht eine 1:15 Plasma-Verdünnung vor, die per Definition 100% AT:Ag entspricht. Die 1:10 Verdünnung in physiologischer Kochsalzlösung entspricht 150% AT:Ag.

   2 mL der 1:10-Verdünnung des gepoolten Normalplasmas oder eine 1:D (D=C:10)-Verdünnung des Kalibrators (d.h. C1) vorbereiten (diese entspricht 150% AT:Ag). Die weiteren Punkte der Kalibrationskurve werden durch Verdünnung mit physiologischer Kochsalzlösung wie folgt hergestellt:

Kalibrator	C1	C2	C3	C4	C5	C6
%AT:Ag	150	100	75	50	25	0
Menge Kalibrator	2000 µL	600 µL von C1	500 µL von C1	500 µL von C2	500 µL von C4	0 µL
Menge phys. Kochsalzlösung	0 µL	300 µL	500 µL	500 µL	500 µL	1000 µL

   Bei der manuellen Methode muss bei jedem Testlauf eine Kalibrationskurve erstellt werden.

2. Die Plasmaproben und Kontrollplasmen (s. oben unter „Erforderliche Materialien“) werden 1:15 mit physiologischer Kochsalzlösung vorverdünnt (manuelle Methode).

   Für gereinigte, nicht plasmatische Systeme, muss die Verdünnung in physiologischer Kochsalzlösung mit 1% BSA durchgeführt werden (finale Konzentration von ca. 0,5 bis 10 µg/mL). Die Kalibrationskurve ist zu erstellen und mittels Qualitätskontrollen zu überprüfen. Verdünnte Proben sollten, wenn sie bei Raumtemperatur (18-25°C) gelagert werden, rasch getestet werden. Die exakten chargenspezifischen Werte der Kalibratoren und Kontrollen sind einem der Packung beiliegenden Datenblatt zu entnehmen.

3. In ein bei 37°C präinkubiertes Kunststoffröhrchen folgendermaßen hinzufügen:

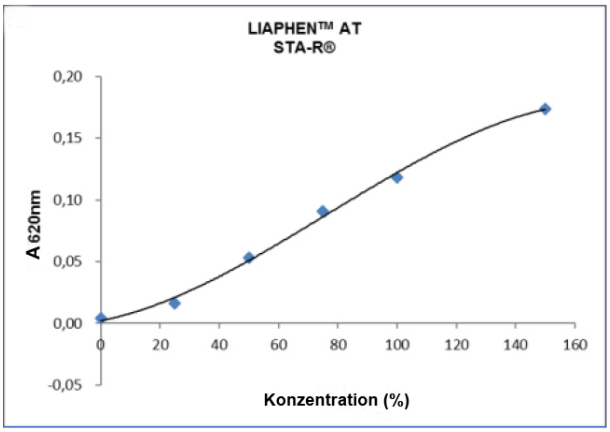
Unmittelbar vor der Verwendung die erforderliche Menge von R1, verdünnt in R2, vorbereiten (siehe unten)	
	Volumen
In phys. Kochsalzlösung verdünnte Proben, Kalibratoren oder Kontrollen	100 µL
R1 Latexreagenz 1:5 verdünnt in R2, präinkubiert bei 37°C und vor Gebrauch durchmischt	400 µL
Mischen und bei 37°C für exakt 15 Minuten inkubieren, anschließend umgehend:	
Mischen und Messen der Absorption bei 620 nm gegen die phys. Kochsalzlösung. Die Inkubationszeit muss für alle Proben gleich sein.	

Bei ikterischem, lipämischem oder hämolysiertem Plasma oder bei unüblicher Färbung ist eine Leerprobe mitzuführen.
Falls die angewandte Methode andere Reagenzvolumina als die oben beschriebenen erfordert, müssen die Verhältnisse der Reagenzkonzentrationen genau eingehalten werden, um den Erhalt der Leistungsmerkmale des Tests zu gewährleisten.
Es liegt in der Verantwortung des Anwenders, alle Veränderungen und sämtliche Auswirkungen auf die Testergebnisse zu überprüfen.

KALIBRATION:

LIAPHEN™ AT kann für die Messung von AT:Ag in humanem Plasma kalibriert werden. Entsprechende Kalibrationsplamen, die den Kalibrationsbereich abdecken, sind von HYPHEN BioMed erhältlich (siehe Abschnitt ERFORDERLICHE MATERIALIEN, DIE NICHT IM KIT ENTHALTEN SIND).
Der Kalibrationsbereich auf z.B. STA-R® beträgt 0 bis 150%.

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



QUALITÄTSKONTROLLE:

Die Verwendung von Qualitätskontrollplasmen ermöglicht bei Verwendung der gleichen Reagenzcharge die Validierung der Kalibrationskurve und der homogenen Reaktivität des Tests von Analyse zu Analyse.
Gemäß guter Laborpraxis ist bei jeder Testserie eine Qualitätskontrolle zu inkludieren, um die generierten Ergebnisse zu überprüfen. 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 manuellen Endpunktmethode wird auf Millimeterpapier (Lin-Lin-Skala nutzen) die AT:Ag-Konzentration (%) auf der Abszisse (x-Achse) gegen die jeweilige Absorption bei 620 nm auf der Ordinate (y-Achse) aufgetragen.
- Die AT:Ag-Konzentration in der Probe (%) leitet sich, wenn die Standardverdünnung verwendet wird, von der Kalibrationskurve ab.
- Falls andere Verdünnungen genutzt wurden, wird die gemessene Konzentration mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor multipliziert.
- Die Ergebnisse sind orientiert am klinischen und biologischen Zustand des Patienten zu interpretieren.

EINSCHRÄNKUNGEN DES TESTES:

- Um eine optimale Leistung zu gewährleisten und die Spezifikationen zu erfüllen, sollten die technischen Anweisungen von HYPHEN BioMed sorgsam beachtet werden.
- Jegliches Reagenz mit unüblicher Erscheinung oder Anzeichen von Kontamination muss verworfen werden. Jegliche verdächtige Proben oder jene mit Anzeichen für Aktivierung müssen verworfen werden.
- Die Anwesenheit von Rheumafaktor kann zu einer fälschlich erhöhten AT:Ag-Konzentrationen führen.
- Hinsichtlich einer möglichen Beeinflussung durch den Hook-Effekt ist die spezifische Applikationsanleitung für den verwendeten Gerinnungsautomaten zu beachten (es wurde auf STA-R® kein signifikanter Hook-Effekt bei AT:Ag-Konzentrationen bis zu 200% festgestellt).

ERWARTETE WERTE:

Der Referenzbereich wurde bei gesunden Erwachsenen (n=100) auf STA-R® gemessen (Zentral 90%, 95. Perzentil) und liegt zwischen 86% und 124% AT:Ag. Jedoch muss jedes Labor seinen eigenen Normbereich festlegen.

LEISTUNGSMERKMALE:

- Der Messbereich hängt vom verwendeten Analysesystem ab (zwischen 11% und 150% AT:Ag auf der STA-R®-Serie).
- Spezifität: Keine Reaktivität mit AT-Mangelplasma
- Leistungsstudien wurden intern unter Einsatz einer Reagenzcharge auf der STA-R®-Serie durchgeführt. Sie wurden mittels Qualitätskontrollen des Labors über 10 Läufe und mit 2 Wiederholungen pro Lauf für jedes Kontrollniveau ausgewertet. Die folgenden Daten wurden erhalten:

Kontrolle	Intra-Lauf				Inter-Lauf			
	n	Mittelwert	VK%	SD	n	Mittelwert	VK%	SD
Hoch	10	102	1,9	1,9	10	102	4,4	4,5
Mittel	10	63	1,5	1,0	10	63	4,0	2,5
Niedrig	10	23	3,0	0,7	10	23	7,4	1,7

- Korrelation mit Referenzmethode (Berichrom® AT vs. LIAPHEN™ auf BCS®-XP): n = 62 y = 1,04 x - 1,47 r = 0,987
- Interferenzen: Auf dem STA-R® Analyzer wurde keine Beeinflussung des Testes durch Heparin (UFH/LMWH)-Konzentrationen ≤ 2 IE/mL Hämoglobin-Konzentrationen ≤ 500 mg/dL, Bilirubin-Konzentrationen ≤ 60 mg/dL und Intralipid (Triglyzerid-Äquivalent)-Konzentrationen ≤ 2.000 mg/dL festgestellt. Es ist zusätzlich die spezifische Applikationsanleitung des verwendeten Gerinnungsautomatens zu beachten.

LITERATUR:

1. Mann K.G. Biochemistry and Physiology of blood coagulation. Thrombosis and Haemostasis. 1999.
2. Patnaik M.M. and Moll S. Inherited antithrombin deficiency: a review. Haemophilia. 2008.
3. Amiral J and Seghatchian J. Revisiting antithrombin in health and disease, congenital deficiencies and genetic variants, and laboratory studies on α and β forms. Transfus Apher Sci. 2018.
4. Khor B. and Van Cott E.M. Laboratory tests for antithrombin deficiency. American Journal of Hematology. 2010.
5. CLSI Document H21-A5: "Collection, transport, and processing of blood specimens for testing plasma -based coagulation assays and molecular hemostasis assays; approved guideline". 2008
6. Mauge L. and Alhenc-Gelas M. Stabilité pré-analytique des paramètres de la coagulation: revue des données disponibles. Ann Biol Clin. 2014.

SYMBOLE:

Verwendete Symbole und Zeichen sind in der ISO-Norm 15223-1 gelistet. Das der Packung beiliegende Symbolerklärungs-Blatt ist zu beachten.