



BIOPHEN AT (LRT) Ref 221111

Chromogener Test zur Bestimmung von Antithrombin im Plasma mit einer Anti-Xa Methode

In-Vitro-Diagnostikum



Vertrieb und Support:
CooChrom Diagnostica GmbH
www.coachrom.com | info@coachrom.com
Tel. +43-1-236 222 1 | Fax +43-1-236 222 11
Kostenfreie Nummern für Deutschland:
Tel. 0800-24 66 33-0 | Fax 0800-24 66 33-3

VERWENDUNGSZWECK:

BIOPHEN AT (LRT) ist ein chromogener Test zur quantitativen Bestimmung der Heparin-Kofaktoraktivität von Antithrombin (AT) in humanem Citratplasma^{1,2,3}, basierend auf einer anti-Faktor Xa-Methode⁴. Der Test kann manuell oder automatisiert durchgeführt werden. Die Reagenzien im BIOPHEN AT (LRT) Test liegen gebrauchsfertig als Flüssigreagenz vor (LRT = Liquid Reagent Test).

KLINISCHE BEDEUTUNG:

Bestimmung angeborener oder erworbener Antithrombinmängel.

TESTPRINZIP:

Antithrombin ist der wichtigste physiologische Inhibitor der Gerinnung und hemmt unterschiedliche Serinesterasen der Gerinnung, vor allem Thrombin, Faktor Xa und Faktor IXa. Antithrombin reguliert den Ablauf der Gerinnung und verhindert die Bildung von Thrombosen^{5,6}. Die Komplexbildung mit Heparin macht Antithrombin zu einem wirksamen und schnellen Inhibitor. BIOPHEN AT (LRT) Test ist eine kinetische Methode, die auf der Inhibierung von Faktor Xa durch Antithrombin in Anwesenheit von Heparin basiert. Faktor Xa ist in konstanter Konzentration und im Überschuss vorhanden. Nicht inhibierter, restlicher Faktor Xa spaltet das zugesetzte spezifische chromogene Substrat. Dabei wird der Farbstoff para-Nitroanilin (pNA) aus dem chromogenen Substrat freigesetzt. Die dabei entstehende Farbentwicklung ist umgekehrt proportional zur Antithrombin-konzentration im Testplasma. Aufgrund der Unempfindlichkeit des Testes gegen Heparin können auch Patienten unter Heparin-therapie getestet werden.

AT + Heparin → [AT•Hep.]

[AT•Hep.] + [FXa (Überschuss)] → [FXa•AT•Hep.] + [FXa (Rest)]
[FXa (Rest)] + SXa-11 → Peptid + pNA

REAGENZIEN:

R1: Reagenz 1: Boviner Faktor Xa

Boviner Faktor Xa, als Flüssigreagenz.

4 Flaschen mit je 11 ml Faktor Xa-Reagenz, pH 7,85, enthält Heparin und Natriumazid.

R2: Reagenz 2: SXa-11

Chromogenes Substrat, spezifisch für Faktor Xa (SXa-11), als Flüssigreagenz.

4 Flaschen mit je 4 ml SXa-11.

Anmerkung:

- Faktor Xa wird aus bovinem Plasma, das auf die Abwesenheit infektiöser Substanzen getestet und aus BSE-freien Tieren gewonnen wurde, hergestellt. Kein Test kann jedoch mit absoluter Sicherheit die Abwesenheit infektiöser Substanzen ausschließen. Wie alle Produkte bovinen Ursprungs, muss diese Faktor Xa-Präparation daher mit allen Vorsichtsmaßnahmen, die im Umgang mit potentiell infektiösem Material erforderlich sind, gehandhabt werden.
- Boviner Faktor Xa (R1) enthält Natriumazid, das mit Blei oder Kupferarmaturen unter Bildung hochexplosiver Metallazide reagieren kann. Bei Entsorgung der Lösung R1 in den Ausguss muss mit großen Mengen Wasser nachgespült werden.

ERFORDERLICHE MATERIALIEN, DIE NICHT IM KIT ENHALTEN SIND:

Reagenzien:

- Aqua. dest., bevorzugt steril.
- 20% Essigsäure oder 2% Zitronensäure (Endpunktmethode).
- Physiologische Kochsalzlösung (0,9% NaCl).
- Plasmakalibrator (BIOPHEN Plasma Calibrator Ref 222101).
- Kontrollplasma Normal oder Abnormal (BIOPHEN Normal Control Plasma Ref 223201 und BIOPHEN Abnormal Control Plasma Ref 223301).

Geräte:

- Spektrophotometer, Photometer oder Gerinnungsautomat zur Bestimmung chromogener Teste mit einer Wellenlänge von 405 nm.
- Stoppuhr.
- Kalibrierte Pipetten.

LAGERUNG:

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

REKONSTITUTION UND STABILITÄT DER REAGENZIEN:

R1: Reagenz 1: Boviner Faktor Xa

Gebrauchsfertig.

Den Inhalt der Flasche für 30 Minuten bei Raumtemperatur (18-25°C) inkubieren.

Vor Gebrauch vorsichtig mischen.

Stabilität des geöffneten Faktor Xa-Reagenz in der Originalflasche, unter Vermeidung jeglicher Kontamination:

- 3 Monate bei 2-8°C.
- 7 Tage bei Raumtemperatur.
- Nicht einfrieren.

R2: Reagenz 2: Faktor Xa spezifisches chromogenes Substrat (SXa-11)

Gebrauchsfertig.

Den Inhalt der Flasche für 30 Minuten bei Raumtemperatur (18-25°C) inkubieren.

Vor Gebrauch vorsichtig mischen.

Stabilität des geöffneten Substrats in der Originalflasche, unter Vermeidung jeglicher Kontamination:

- 3 Monate bei 2-8°C.
- 7 Tage bei Raumtemperatur.
- Nicht einfrieren.

Vorsichtsmaßnahmen:

- Um die Stabilität zu erhöhen, müssen die Reagenzien nach jedem Gebrauch mit der Original-Schraubkappe verschlossen werden.
- Die Reagenzien sind sorgfältig zu handhaben, um jegliche Kontamination während des Gebrauchs zu vermeiden.
- 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.
- Die Inkubation für 30 Minuten bei Raumtemperatur ermöglicht eine Stabilisierung der Reagenzien und gewährleistet eine homogene Reaktivität.

Anmerkung:

- Entsprechend der verwendeten Automatenmethode kann es zu Abweichungen der einzusetzenden Volumina kommen. In jedem Fall müssen jedoch die festgelegten reaktiven Verhältnisse (entsprechende Reagenzkonzentrationen im Testansatz) zwischen Faktor Xa und Substrat genau eingehalten werden.
- 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 in Bezug auf die Testcharge optimiert.

PROBENGEWINNUNG:

Blut (9 Volumenteile) wird mit großer Vorsicht in 0,109 M Citrat als Antikoagulan (1 Volumenteile) abgenommen. Die Blutabnahme erfolgt durch Venenpunktion, wobei jegliche Aktivierung vermieden werden muss.

- Innerhalb von 4 Stunden muss das Blut bei 3,000 x g für 20 Minuten bei 18°C oder niedriger zentrifugiert werden. Das Plasma wird anschließend mit einer Plastikpipette in ein Plastikröhrchen überführt.
- Lagerung der Plasmaproben:
 - Bis zu 8 Stunden bei Raumtemperatur (18-25°C).
 - Bis zu 24 Stunden bei 2-8°C.
 - Bis zu 1 Monat tiefgefroren bei -20°C oder niedriger (vor Gebrauch für 15 Minuten im Wasserbad bei 37°C auftauen).

Weitere Vorschriften für die Probengewinnung, -handhabung und -lagerung sind im NCCLS Dokument H21-A2 veröffentlicht.

TESTDURCHFÜHRUNG:

Der Testkit BIOPHEN AT (LRT) kann sowohl als automatisierte, kinetische Methode, wie auch als manuelle Endpunktmethode durchgeführt werden. Anleitungen für Gerinnungsautomaten sind auf Anfrage erhältlich. Der Test wird bei einer kontrollierten Temperatur von 37°C durchgeführt und die Farbentwicklung bei 405 nm gemessen.

KALIBRATION:

Der Testkit BIOPHEN AT (LRT) kann mit dem BIOPHEN Plasma Calibrator (Ref 222101) kalibriert werden. Dieser Kalibrator hat eine genau definierte Antithrombinkonzentration "C". Verdünnungen des Kalibrators werden wie folgt hergestellt:

% AT	Plasmakalibrator (µl)	Phys. Kochsalzlösung (µl)
0	0	500
C/4	125	375
C/2	250	250
C	500	0

TESTPROTOKOLL:

Manuelle Methode:

Mikrotiterplatte: Die zu testenden Proben, Kontrollen und Kalibrationslösungen werden 1:20 mit physiologischer Kochsalzlösung (0,15 M Natriumchlorid) verdünnt.

Teströhrchen: Die zu testenden Proben, Kontrollen und Kalibrationslösungen werden 1:10 mit physiologischer Kochsalzlösung (0,15 M Natriumchlorid) verdünnt.

In Mikrotiterplatten oder in Teströhrchen, die jeweils bei 37°C vorinkubiert sind, wird nach folgendem Schema zugegeben:

Reagenzien	Mikrotiterplatte	Teströhrchen
Vorverdünnte Kalibratoren, Kontrollen, Testplasmen	20 µL	30 µL
R1: Faktor Xa, vorinkubiert bei 37°C	100 µL	300 µL
Mischen und für 90 Sekunden bei 37°C inkubieren, dann zugeben:		
R2: Sx-A-11 Substrat, vorinkubiert bei 37°C	35 µL	100 µL
Mischen und für genau 120 Sekunden bei 37°C inkubieren		
Stoppen der Reaktion durch Zugabe von:		
Zitronensäure (20g/L)	100 µL	500 µL
Mischen und Messen der optischen Dichte bei 405 nm gegen den entsprechenden Probenleerwert.		

Die gebildete Gelbfärbung ist für 2 Stunden stabil.

Der Probenleerwert wird durch Mischen der Reagenzien in der umgekehrten Testreihenfolge erhalten, d.h. Zitronensäure (20g/L), Substrat Sx-A-11, verdünntes Plasma und Faktor Xa.

Die Absorption des Probenleerwertes bei 405 nm (A_{405}) ist von der Absorption des entsprechenden Probenwertes abzuziehen.

Automatisierte Methode:

Ausführliche Anleitungen für Gerinnungsautomaten sind auf Anfrage erhältlich.

Anmerkung:

- Falls die verwendete Methode andere Reaktionsvolumina als die oben beschriebenen erfordert, müssen die Verhältnisse der Reagenzienkonzentrationen eingehalten werden.
- Für hoch-lipämische, -ikterische oder -hämolytische Plasmen, sowie für Plasmen deren Färbung abweicht, müssen Probenleerwerte gemessen werden.

QUALITÄTSKONTROLLE:

Die Verwendung von Qualitätskontrollplasmen ermöglicht bei Einsatz der gleichen Reagenzcharge die Validierung der Kalibration bzw. der homogenen Reaktivität des BIOPHEN AT (LRT)-Testes von Analyse zu Analyse. Es sind verschiedene Qualitätskontrollen erhältlich:

BIOPHEN Normal Control Plasma: (Ref 223201).

BIOPHEN Abnormal Control Plasma: (Ref 223301).

EINSCHRÄNKUNGEN DES TESTS:

- Dieser Test basiert auf einer Anti-Xa Methode, daher ist eine Beeinflussung durch Heparin-Kofaktor II, α_2 -Makroglobulin oder α_1 -Antitrypsin ausgeschlossen^{7,8,9}.
- Eine signifikante Beeinflussung des Tests durch Hämoglobinkonzentrationen bis zu 2,5 mg/ml und Bilirubinkonzentrationen bis zu 0,1 mg/ml im Plasma wurde nicht beobachtet. Einige Analyten können die Absorption bei der manuellen Endpunktmethode beeinflussen, in diesem Fall ist es notwendig, individuelle Probenleerwerte zu messen.
- Um eine optimale Funktion des Testes zu gewährleisten, müssen die Vorschriften zur Testdurchführung genau eingehalten werden.

ERGEBNISSE:

Die Linearität zwischen pNA-Absorption, gemessen bei 405 nm und der korrespondierenden Antithrombin-Konzentration liegt zwischen 80 und 120% bezogen auf Normalplasma ($r^2 \geq 0,98$).

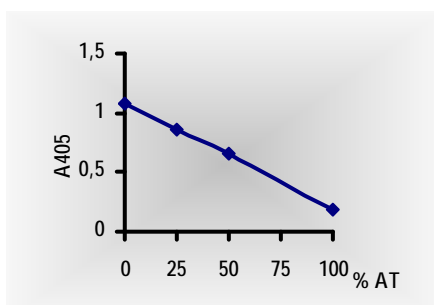
Bei der Endpunktmethode wird auf Millimeterpapier die Antithrombin-Konzentration in % (x-Koordinate) gegen die korrespondierende Absorption A_{405} (y-Koordinate) aufgetragen.

Die Antithrombin-Konzentration der zu testenden Probe wird direkt von der Kalibrationskurve abgelesen. Die Ergebnisse werden in % angegeben.

- Bei Verwendung von Gerinnungsautomaten wird die Antithrombin Konzentration in Bezug auf die Kalibrationskurve direkt vom Automaten berechnet.
- Der Messbereich liegt bei 10 bis 120%.

BEISPIELKALIBRATION:

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



VALIDIERUNG DER KALIBRATIONSKURVE:

Die Kalibration ist gültig, wenn die damit gemessenen Konzentrationen der Qualitätskontrollen innerhalb deren Vertrauensbereiches liegen.

SPEZIFISCHE LEISTUNGSMERKMALE:

- Die Nachweisgrenze der Methode liegt bei $\leq 10\%$.
- Beispielwerte für die Reproduzierbarkeit der Methode, gemessen mit Proben mit unterschiedlichen Antithrombin-Konzentrationen (manuelle Endpunktmethode):

	Intra-Assay VK%	N	Inter-Assay VK%	N
Probe 1 (90% AT)	0,99	10	2,73	10
Probe 2 (56% AT)	1,38	10	0,57	10

- Der Test BIOPHEN AT (LRT) zeigt eine gute Korrelation mit dem Test BIOPHEN AT (STA-R):
 $Y = 0,98 X + 1,64$ $n=46$ $r = 0,966$

ERWARTETE WERTE:

Die Konzentration von 100% Antithrombin entspricht der Konzentration in normalem, humanem Citratplasma, gepoolt aus mehreren Plasmen von gesunden Männern und Frauen im Alter zwischen 18 und 55 Jahren, welche nicht unter Medikation stehen.

Normalbereich: 80 bis 120% ATIII

Eine Antithrombin Konzentration $\leq 70\%$ weist auf einen Mangel hin und muss mit einem weiteren Test oder durch Testung einer neuen Plasmaprobe bestätigt werden.

Die Antithrombin-Konzentration ist während einer Schwangerschaft und der Einnahme oraler Kontrazeptiva verringert.

KLINISCHE INFORMATIONEN:

Spontane thrombotische Ereignisse werden in Anwesenheit angeborener Antithrombinmängel beobachtet. Diese angeborenen Mängel werden in 4 Gruppen unterteilt:

- Typ I:** Verringerte Antithrombin-Konzentration bei gleichzeitig verringerter Aktivität (häufigster Fall).
- Typ II RS** (Reaktive Stelle): Normale Antithrombin-Konzentration bei verringerter Aktivität. Ursache dafür ist eine Protein-Abnormalität im aktiven Zentrum.
- Typ II HBS** (Heparin-bindende Stelle): Normale Antithrombin-Konzentration bei normaler Aktivität während Heparin-Abwesenheit, jedoch verringert bei Heparin-Anwesenheit.
- Typ II** (Pleiotrop): Verringerte Antithrombin-Konzentration und -Aktivität, jedoch kein erniedrigtes Level des funktionellen Proteins.

REFERENZEN:

- 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, N°18 12024-12029 (1997)
- Odegard O R et al. Heparin cofactor activity measured with an amidolytic method. *Thromb res* 6, 287-294 (1975).
- Mann K.G. Biochemistry and Physiology of blood coagulation. *Thrombosis and Haemostasis* vol 82 N° 2 165-174 (1999).
- Demers C et al. An Antithrombin III assay based on factor Xa inhibition provides a more reliable test to identify congenital antithrombin III deficiency than an assay based on thrombin inhibition. *Thromb Haemostas* 69, 231-235 (1993).
- Leslie B. et al. Investigation of the anticoagulant mechanism of a covalent antithrombin-heparin complex. *The Journal of Biological Chemistry* vol. 273 N° 52 34730-34736 (1999).
- Mortensen J.Z. Inherited ATIII deficiency. Fast and slow inactivation of thrombin and Factor Xa. *Thromb. Res.*, 33, 511-515 (1984).
- Tran T H et al. Influence of heparin cofactor II (HCII) in the determination of Antithrombin III (AT). *Thromb Res* 40, 571-576 (1985).
- Tollefsen D.M. Laboratory Diagnosis of Antithrombin and Heparin Cofactor II deficiency. Seminars in *Thromb haemost* 16, 162-168 (1990).
- Andersson N-E et al. New chromogenic ATIII activity kit which is insensitive to heparin cofactor II and designed for use on automated instruments. *Thromb Haemost* 65, 912 (1991).