

BIOPHEN® Antithrombin (LRT) Flüssigreagenz (anti-Human Xa) Art.Nr. 221127

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

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:

BIOPHEN® Antithrombin (LRT) Flüssigreagenz (anti-Human Xa) ist ein chromogener Test zur quantitativen *in vitro*-Bestimmung der Antithrombin (AT)-Aktivität in humanem Citratplasma, basierend auf einer anti-Faktor Xa-Methode. Der Test kann manuell oder automatisiert durchgeführt werden. Die Reagenzien liegen gebrauchsfertig als Flüssigreagenz vor (LRT = Liquid Reagent Technology).

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 (FXa) und Faktor IXa (FIXa). Antithrombin reguliert den Ablauf der Gerinnung und verhindert die Bildung von Thrombosen. 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 FXa durch Antithrombin in Anwesenheit von Heparin basiert. FXa ist in konstanter Konzentration und im Überschuss vorhanden. Nicht inhibierter, restlicher FXa spaltet das zugesetzte spezifische chromogene Substrat (Sxa). Dabei wird der Farbstoff para-Nitroanilin (pNA) aus dem chromogenen Substrat freigesetzt. Die dabei entstehende Farbentwicklung ist umgekehrt proportional zur Antithrombin-Konzentration in der Probe. Aufgrund der Unempfindlichkeit des Testes gegen Heparin können auch Patienten unter Heparintherapie getestet werden.

AT + Heparin → [AT•Hep.]

[AT•Hep.] + [FXa (Überschuss)] → [FXa•AT•Hep.] + [FXa (Rest)]

[FXa (Rest)] + Sxa → Peptid + pNA

REAGENZIEN:

R1: Reagenz 1: Humaner Faktor Xa

Humaner FXa, als Flüssigreagenz.

4 Flaschen mit je 7,5 ml FXa-Reagenz, pH 7,85, enthält Heparin, bovines Serumalbumin (BSA) und Natriumazid.

R2: Reagenz 2: FXa-spezifisches chromogenes Substrat (Sxa)

Chromogenes Substrat, spezifisch für FXa (11-65), als Flüssigreagenz.

4 Flaschen mit je 7,5 ml Sxa.

Anmerkung:

- FXa wird aus humanem Plasma hergestellt, das auf die Abwesenheit infektiöser Substanzen getestet wurde. Kein Test kann jedoch mit absoluter Sicherheit die Anwesenheit infektiöser Substanzen ausschließen. Wie alle Produkte humanen Ursprungs muss diese FXa-Präparation daher mit allen Vorsichtsmaßnahmen, die im Umgang mit potentiell infektiösem Material erforderlich sind, gehandhabt werden.
- Alle nötigen Vorsichtsmaßnahmen müssen ergriffen werden, um das Verschlucken von Reagenz zu vermeiden. Bei Kontakt mit der Haut ist die betroffene Stelle gründlich mit Wasser zu reinigen. Bei Kontakt mit einer offenen Wunde wenden Sie sich an einen Arzt und informieren Sie ihn über den Ursprung des Produktes
- Humaner FXa (R1) enthält Natriumazid, das mit Blei oder Kupferarmaturen unter Bildung hochexplosiver Metallazide reagieren kann. Bei Entsorgung der Lösung R1 in den Abguss muss mit großen Mengen Wasser nachgespült werden.
- Reagenzien aus unterschiedlichen Kitchargen nicht miteinander mischen.

ERFORDERLICHE MATERIALIEN, DIE NICHT IM KIT ENHALTEN SIND:

Reagenzien:

- aqua. dest., bevorzugt steril.
- 20% Essigsäure oder 2% Zitronensäure (Endpunktmethode).
- Physiologische Kochsalzlösung (0,15 M NaCl) oder Imidazol Puffer (Art.Nr. AR021)
- Kalibrationsplasma, titriert für Antithrombin-Aktivität (BIOPHEN® Kalibrationsplasma, Art.Nr. 222101).
- Kontrollplasma Normal oder Abnormal, titriert für Antithrombin-Aktivität (BIOPHEN® Normalkontroll Plasma, Art.Nr. 223201, und BIOPHEN® Abnormal Kontrollplasma, Art.Nr. 223301) oder vergleichbare Produkte.

Geräte:

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

LAGERUNG:

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.

Anmerkung: Stabilitätsstudien bei 30°C haben gezeigt, dass die Packungen ohne Beeinträchtigung der darin enthaltenen Reagenzien bei Raumtemperatur versendet werden können.

VORBEREITUNG UND STABILITÄT DER REAGENZIEN:

Die gebrauchsfertigen Flüssigreagenzien für 30 Minuten bei Raumtemperatur (18-25°C) inkubieren und vor Gebrauch durchmischen. Nach dem Öffnen sind die in den Originalflaschen gelagerten Reagenzien unter Vermeidung jeglicher Kontamination und Verdunstung für 7 Tage bei Raumtemperatur (18-25°C) und 5 Wochen bei 2-8°C stabil.

Vorsichtsmaßnahmen:

- Um die Stabilität zu gewährleisten, müssen die Reagenzien nach jedem Gebrauch mit der Original- Schraubkappe verschlossen werden (weiße Kappe für den humanen FXa, gelbe Kappe für das chromogene Substrat).
- Die Reagenzien sind sorgfältig zu handhaben, um jegliche Kontamination während des Gebrauchs zu vermeiden.
- Das Substrat (R2) ist leicht gelblich. Falls das Substrat eine starke Gelbfärbung aufweist, ist dies ein Zeichen von Kontamination. Die betroffene Flasche ist zu verwerfen und eine neue Flasche muss verwendet werden.
- Die 30-minütige Inkubation bei Raumtemperatur (18-25°C) ermöglicht eine Stabilisierung der Reagenzien und gewährleistet eine homogene Reaktivität.
- Um Verdunstung der Reagenzien zu vermeiden, können Reduzierstücke für den Flaschenhals verwendet werden.

Anmerkung:

- 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:

Gewinnung und Lagerung der Proben erfolgen gemäß den Vorgaben von GEHT und NCCLS/CLSI.

- Probenmaterial:** Citratplasma, in dem die Antithrombin-Aktivität bestimmt werden soll.
- Gewinnung:** Blut (9 Volumenteile) wird in Trinitrium-Citrat als Antikoagulant (1 Volumenteil) durch Venenpunktur abgenommen. Das erste Röhrchen muss aussortiert werden. Der Zeitraum zwischen Probengewinnung und Tests sollte zwischen einer und zwei Stunden liegen und vier Stunden nicht überschreiten.
- Zentrifugation:** Um ein plättchenarmes Plasma zu erhalten, ist eine validierte Labormethode zu nutzen wie eine Zentrifugation für mindestens 15 Minuten bei 2000 g bei Raumtemperatur (18 bis 25°C).
- Lagerung des Plasmas:**
 - 4 Stunden bei Raumtemperatur (18-25°C)
 - Bei -20°C oder tiefer kann das Plasma für bis zu 2 Monate gelagert und kurz vor Gebrauch für 15 Minuten bei 37°C aufgetaut werden.

TESTDURCHFÜHRUNG:

BIOPHEN® AT (LRT) kann sowohl als automatisierte, kinetische Methode, wie auch als manuelle Endpunktmethode durchgeführt werden. 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.

KALIBRATION:

Der Testkit BIOPHEN® AT (LRT) kann mit kommerziell verfügbarem Kalibrationsplasma mit einer genau definierten Antithrombin-Konzentration „C“ (z.B. BIOPHEN® Kalibrationsplasma, 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 Antithrombin-Aktivität von 100%) kalibriert werden. Der Testkit enthält eine standardmäßige Plasmaverdünnung von 1:50. Diese Verdünnung entspricht gemäß Definition einer Antithrombin-Aktivität von 100%. Der Messbereich erstreckt sich von 10 bis 150%. Die 150% Antithrombin-Aktivität entspricht dann einer 1:33,3-Verdünnung des Plasmapools in physiologischer Kochsalzlösung. Verdünnungen des Kalibrators werden wie folgt hergestellt (aus vorverdünntem Kalibrator oder gepooltem Plasma):

| % AT | | Plasmakalibrator (µl) | Kochsalzlösung (µl) |
|-------|------|---|---------------------|
| 0 | 0 | 0 | 500 |
| 12,5% | C:8 | 60 | 420 |
| 25% | C:4 | 125 | 375 |
| 50% | C:2 | 250 | 250 |
| 100% | C | 500 | 0 |
| 150% | 3C/2 | Erhalten mit Verdünnung 33,3x C:100 in Kochsalzlösung | |

Um eine optimale Testleistung zu erzielen, ist die Kalibrationskurve direkt vor der Durchführung des Tests zu erstellen.

TESTPROTOKOLL:

Manuelle Methode:

Teströhrchen: Die zu testenden Proben und Kontrollen werden 1:50 mit physiologischer Kochsalzlösung (0,15 M Natriumchlorid) verdünnt.

In Teströhrchen, die jeweils bei 37°C präinkubiert sind, wird nach folgendem Schema zugegeben:

| Reagenzien | Teströhrchen |
|---|--------------|
| Vorverdünnte Kalibratoren, Kontrollen, Testplasmen | 200 µL |
| R1: FXa, vorinkubiert bei 37°C | 200 µL |
| Mischen und für genau 1 Minute bei 37°C inkubieren, dann zugeben: | |
| R2: Substrat, vorinkubiert bei 37°C | 200 µL |
| Mischen und für genau 1 Minute bei 37°C inkubieren | |
| Stoppen der Reaktion durch Zugabe von: | |
| Zitronensäure (20g/l) | 400 µL |
| Mischen und Messen der optischen Dichte bei 405 nm gegen den entsprechenden Probenleerwert. | |

Die gebildete Gelbfärbung ist für mindestens 1 Stunde stabil.

Der Probenleerwert wird durch Mischen der Reagenzien in der umgekehrten Testreihenfolge erhalten, d.h. Zitronensäure (20g/l), Substrat, verdünntes Plasma und FXa.

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

Automatisierte Methode:

Ausführliche Anleitungen inklusive Reagenzvorbereitungen für Gerinnungsautomaten sind auf Anfrage erhältlich.

Anmerkung:

Falls die jeweilige Automatenmethode andere Reagenzvolumenta als die oben beschriebenen erfordert, müssen die Verhältnisse der Reaktionsvolumenta 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 Verwendung der gleichen Reagenzcharge die Validierung der Kalibration bzw. der homogenen Reaktivität des BIOPHEN® AT (LRT) Tests von Analyse zu Analyse. Es sind verschiedene Qualitätskontrollen erhältlich: BIOPHEN® Kontrollplasma "Normal", Art.Nr. 223201 BIOPHEN® Kontrollplasma "Abnormal", Art.Nr. 223301

Anmerkung:

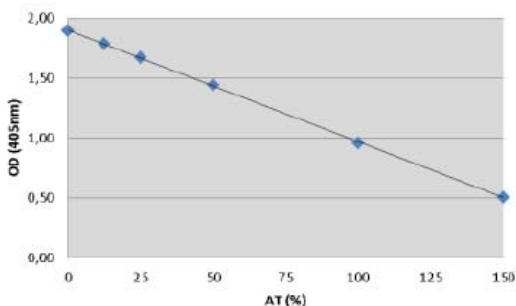
Eine neue Kalibrationskurve muss erstellt werden bei Wechsel der Testkitcharge, größeren Wartungsarbeiten am Messgerät und wenn die gemessenen Werte außerhalb des zu erwartenden Bereiches liegen. Jedes Labor kann, entsprechend der verwendeten Testvorschriften und Geräte, eigene Vertrauensbereiche festlegen. Bei jeder Testserie ist eine Qualitätskontrolle (mit unterschiedlichen Werten) zu inkludieren.

ERGEBNISSE:

- Bei der Endpunktmethode wird auf linearem Millimeterpapier die Antithrombin-Aktivität in Prozent (x-Koordinate) gegen die korrespondierende Absorption A_{405} (y-Koordinate) aufgetragen.
- Die Kalibrationskurve wird gezeichnet und r^2 kalkuliert. Die Kalibration ist gültig, sofern $r^2 \geq 0,98$ ist und die Messwerte der Kontrollen innerhalb der Akzeptanzgrenzen liegen. Bei der manuellen Methode im Teströhrchen liegt die Absorption für den 0% Kalibrator bei etwa 1,7 ($\pm 0,3$). Bei den automatisierten Methoden sind die Absorptionen abhängig vom verwendeten Gerinnungsautomaten.
- Die Antithrombin-Aktivität der zu testenden Probe wird direkt von der Kalibrationskurve abgelesen. Die Ergebnisse werden in % Antithrombin angegeben.
- Bei Verwendung von Gerinnungsautomaten wird die Antithrombin-Konzentration in Bezug auf die Kalibrationskurve direkt vom Automaten berechnet.
- Der Messbereich bei der 1:50-Vorverdünnung liegt zwischen 10 und 150%, der Test ist linear bis zu 150% Antithrombin-Aktivität. Bei abweichender Probenverdünnung müssen die Ergebnisse mit dem jeweiligen Verdünnungsfaktor „D“ geteilt durch 50 (d.h. mit D:50) multipliziert werden.

BEISPIELKALIBRATION:

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



SPEZIFISCHE LEISTUNGSMERKMALE:

- Dynamischer Bereich: 10 bis 150% Antithrombin-Aktivität

- Die Nachweisgrenze wird durch die „scheinbare“ Antithrombin-Aktivität definiert. Diese entspricht der mittleren Gerinnungszeit eines Antithrombin-Mangelplasmas minus zwei Standardabweichungen (SD).
- Die Nachweisgrenze liegt bei $\leq 10\%$.
- Spezifität: Antithrombin-reduziertes Plasma wurde mit einem Ergebnis $<15\%$ gemessen.
- Beispielwerte, gemessen mit Proben mit unterschiedlichen Antithrombin-Konzentrationen unter Einsatz eines Sysmex® CS-2000i Analyzers:

| | Intra-Assay | | | |
|---------|-------------|------------|-----|-----|
| | N | Mittelwert | SD | VK% |
| Probe 1 | 10 | 95,9 | 1,0 | 1,0 |
| Probe 2 | 10 | 32,4 | 0,8 | 2,5 |

- Der Test BIOPHEN® AT(LRT) zeigt eine gute Korrelation mit dem Siemens INNOVANCE® Reagenz unter Einsatz eines Sysmex® CS-2000i Analyzers:

n=59 Messbereich 17 bis 150% AT Korrelation $r = 0,998$

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 nicht zu erwarten.
- Eine signifikante Beeinflussung des Tests durch Hämoglobin-Konzentrationen bis zu 500 mg/dl, Bilirubin-Konzentrationen bis zu 28 mg/dl, Triglyzerid-Konzentrationen bis 300 mg/dl und Heparin-Konzentrationen bis zu 4 IU/ml im Plasma wurde nicht beobachtet (Einsatz eines Sysmex® CS-2000i Analyzers). Einige Analyten können die Absorption bei der manuellen Endpunktmethode beeinflussen. In diesem Fall ist es notwendig, individuelle Probenleerwerte zu messen.
- Direkte FXa-Inhibitoren wie Rivaroxaban, Apixaban usw. können zu einer Überschätzung des gemessenen Antithrombins bei Patienten verleiten, die mit diesen Medikamenten behandelt werden.
- Um eine optimale Funktion des Testes zu gewährleisten, müssen die Vorschriften zur Testdurchführung genau eingehalten werden.

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.

Der erwartete Normalbereich zwischen 75 und 125% ist zu verifizieren und validieren unter den jeweiligen spezifischen Laborbedingungen (Instrument und Applikation, Charge, verwendeter Kalibrator usw.).

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

Während einer Schwangerschaft und der Einnahme oraler Kontrazeptiva ist die Antithrombin-Konzentration 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** (Pleitrop): Verringerte Antithrombin-Konzentration und -Aktivität, jedoch kein erniedrigter 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).
- 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.