



## CEPHEN 2.5

# CK512K  
APTT-Reagenz  
6 x 25 Tests

Gebrauchsfertiges Flüssigreagenz

In-Vitro-Diagnostikum

### VERWENDUNGSZWECK:

Gebrauchsfertiges Flüssigreagenz zur Bestimmung der Aktivierten Partiiellen Thromboplastinzeit (APTT) in humanem Citratplasma. Der Gerinnungstest, kann manuell, semi-automatisiert oder vollautomatisiert durchgeführt werden. Das Reagenz zeigt niedrige Sensitivität für Lupus Antikoagulanz.

### TESTPRINZIP:

Messung der Recalcifizierungszeit von humanem Citratplasma mit standardisiertem APTT-Reagenz (Cephalin und Aktivator) zur Bestimmung der Aktivität der intrinsischen Gerinnungsfaktoren (II, V, VIII:C, IX, X, XI, XII). Das Reagenz zeigt beabsichtigterweise eine niedrigere Sensitivität für Lupus Antikoagulanz als andere Reagenzien. Alle anderen Eigenschaften entsprechen aber dem Lupussensitiven Reagenz CEPHEN LS (CK522K).

### PROBENMATERIAL:

Humanes Plasma, gewonnen aus, mit Trinatriumcitrat antikoaguliertem, Blut.

### REAGENZIEN:

6 Flaschen mit je 2,5 ml (Flüssigreagenz, gebrauchsfertig).

### ERFORDERLICHE MATERIALIEN, DIE NICHT IN DER TESTPACKUNG ENHALTEN SIND:

- Pipetten.
- Stoppuhr.
- Semi-automatisches oder automatisches Gerinnungsgerät, Fibrometer oder elektromagnetisches Wasserbad.
- Aqua dest.
- Qualitätskontrollplasmen, z.B. BIOPHEN Normal Control Plasma (#223201) bzw. Abnormal Control Plasma (#223301).
- 0,025M Calciumchlorid (z.B. #AR001A/K).

### VORBEREITUNG UND STABILITÄT DER REAGENZIEN:

Ungeöffnete Reagenzien sind bei 2–8 °C in der Originalverpackung bis zu dem auf dem Etikett aufgedruckten Verfalldatum stabil.

**Vorbereitung:** Jede Flasche enthält 2,5 ml gebrauchsfertiges APTT-Reagenz. Vor jedem Gebrauch das Reagenz 30 min. bei Raumtemperatur (18-25°C) unter gelegentlichem Schütteln stabilisieren. Vor jeder Verwendung durchmischen.

**Stabilität:** Nach Öffnen ist das Reagenz mindestens stabil für:

- o 7 Tage bei Raumtemperatur (18-25°C)
- o 3 Monate bei 2-8°C

Voraussetzung für die Gewährleistung der angegebenen Stabilität ist die Vermeidung jeglicher Kontamination oder Verdunstungsverluste.

#### Anmerkungen:

Natriumazid (<1g/l), das zur Konservierung zugesetzt wird, kann bei Kontakt mit Blei- bzw. Kupferarmaturen hochexplosive Metallazide bilden. Bei Entsorgung in den Ausguss, von der aus Umweltschutzgründen allerdings abgeraten wird, ist mit viel Wasser zu spülen.

Stabilitätsstudien bei 30°C über einen Zeitraum von 3 Wochen zeigen, dass das Reagenz ohne Beeinträchtigung bei Raumtemperatur verschickt werden kann.

Bei 2-8°C kann es zur Bildung eines weißen Niederschlags kommen, der sich durch Homogenisierung des Produktes bei Raumtemperatur wieder auflöst.

Das Produkt muss mit allen erforderlichen Vorsichtsmaßnahmen gehandhabt werden.

### TESTDURCHFÜHRUNG:

#### Probengewinnung und -vorbereitung:

Blut (9 Volumenteile) wird bevorzugt in 0,109 M bzw. 0,129 M Trinatriumcitrat als Antikoagulanz (1 Volumenteil) in ein Sammelröhrchen aus Kunststoff bzw. silikonisiertem Glas abgenommen. Nach Zentrifugation für 20 min. bei 2.500 x g wird der Plasmaüberstand vorsichtig dekantiert bzw. abgenommen. Das Citratplasma muss bei Lagerung bei 20°C innerhalb von 4 Stunden (bzw. 2 Stunden bei heparinisierten Proben) für den Test eingesetzt werden. Spezielle Abnahmesysteme für Heparinbestimmungen, wie CTAD-Röhrchen (Citrat, Theophyllin, Adenosin und Dipyridanol) zur Verbesserung der Probenstabilität, können verwendet werden.

**Anmerkung:** Weitere Vorschriften für die Probengewinnung, -handhabung und -lagerung sind den entsprechenden GEHT-bzw. NCCLS-Richtlinien zu entnehmen. Plasmaproben, bei denen Auffälligkeiten festgestellt werden (Hämolyse etc.) sind zu verwerfen.

#### Probenplasma:

Für den Test muss **unverdünntes** Plasma verwendet werden.

**Anmerkung:** Die Gerinnungszeiten können in Abhängigkeit vom verwendeten Citrat-Antikoagulanz leichte Schwankungen zeigen.

#### Test:

##### Mechanische, manuelle Methode:

Prinzip: Ein mechanischer Gerinnungsanzeiger, z.B. eine Metallkugel, wird zur Bestimmung des Gerinnungszeitpunktes verwendet. Der Test wird bei 37°C durchgeführt. In ein Reaktionsröhrchen bzw. in die Küvette eines Gerinnungsgerätes werden pipettiert:

- 100 µl Citratplasma
- 100 µl Reagenz.

Mischen, genau 3 Minuten bei 37°C inkubieren und dann hinzupipettieren (Starten der Stoppuhr):

- 100 µl 0,025 M Calciumchlorid (auf 37°C vorgewärmt).

Exakte Aufzeichnung der Gerinnungszeit (z.B. Stopp der Metallkugel)

##### Automatisierte Methoden:

Adaptionen für Gerinnungsautomaten sind auf Anfrage erhältlich.

### ERGEBNISSE UND ÜBLICHE WERTE:

APTT-Werte normaler Plasmen, die mit KC10 oder STA-R gemessen werden, liegen in der Regel im folgenden Bereich:

**28 Sek. bis 37 Sek.**

Die APTT ist abnormal bei Gerinnungszeiten > **40 Sekunden**.

Die gemessene APTT des Patientenplasmas muss mit dem normalen Referenzbereich des jeweiligen Labors verglichen werden.

Die Gerinnungszeiten sind sowohl vom verwendeten Citrat-Antikoagulanz (0,109 bzw. 0,129 M) als auch von der Methode der Gerinnungszeitmessung (mechanisch bzw. optisch) abhängig. So sind die Gerinnungszeiten bei Verwendung von 0,109 M Citrat-Antikoagulanz bzw. einer optischen Bestimmungsmethode kürzer.

Jedes Labor sollte einen eigenen Normalbereich (Mittelwert ± 2 SD) festlegen, der in Abhängigkeit von der Reagenzcharge und des verwendeten Gerätes leichte Schwankungen zeigen kann.

### **QUALITÄTSKONTROLLE:**

Die Verwendung von Qualitätskontrollplasmen gewährleistet, bei Verwendung der gleichen Reagenzchargen, die Beständigkeit der Methode von Analysenserie zu Analysenserie.

Folgende Qualitätskontrollplasmen können für die Testvalidierung verwendet werden:

BIOPHEN Normal Control Plasma (#223201)

BIOPHEN Abnormal Control Plasma (#223301)

Die Gerinnungszeiten bei Wiederholungsmessungen mit der gleichen Reagenzcharge können, in Abhängigkeit vom verwendeten Gerinnungsgerät und der jeweiligen Sensitivität der Bestimmung des Gerinnungsendpunktes, leicht variieren. Jedes Labor sollte Werte für einen eigenen Normalbereich (inkl. Mittelwert und Standardabweichung) unter den gegebenen spezifischen Testbedingungen ermitteln und validieren.

### **VERLÄNGERTE APTT UND KLINISCHE BEDEUTUNG:**

Eine verlängerte APTT kann durch folgende Situationen hervorgerufen werden:

- Anwesenheit von gerinnungshemmenden Therapien (Heparin, Hirudin, Argatroban®, Angiox®, Vitamin K-Antagonisten...).
- Faktormängeln: II, V, X (<5 bis 10%), VIIIc, IX, XI, XII (<20%), einschließlich hochmolekularem Kininogen (<5%).
- Abnormale Spiegel oder erworbene Mängel bei erhöhtem Verbrauch von Gerinnungsfaktoren, hepatischen Störungen...
- Anwesenheit von Inhibitoren wie Lupus Antikoagulanz oder Autoantikörper gegen Gerinnungsfaktoren. Es ist zu beachten, dass das vorliegende Reagenz weniger sensitiv für Lupus Antikoagulanz ist als die meisten anderen Routine-APTT-Reagenzien.

### **LEISTUNGSMERKMALE UND ÜBLICHE ERGEBNISSE:**

- Beispielhaft wurden die 'üblichen' APTT-Bereiche für humanes Citrat-Normalplasma ermittelt:

| Lot 070622B              | KC10      | STA-R     | ACL 7000<br>(Research Software)<br>(optical mode) |
|--------------------------|-----------|-----------|---|
| N                        | 30        | 50        | 30  |
| M (Mittelwert APTT, Sek) | 28,8      | 31,4      | 25,1  |
| SD (Sek)                 | 2,01      | 2,66      | 1,77  |
| M ± 2SD (Sek)            | 24,8-32,8 | 26,1-36,7 | 21,6-28,6   |
| Min-Max (Sek)            | 25,6-33,5 | 27,1-39,2 | 22,2-30,0   |

- Gute Sensitivität für niedrige Konzentrationen von Heparin im Plasma (ab 0,1 IE/ml unfraktioniertes Heparin (UFH) bzw. von 0,2 bis 0,4 IE/ml niedermolekulares Heparin (NMH). Die Verlängerung der Gerinnungszeit in Gegenwart von UFH bzw. NMH kann von Plasma zu Plasma leicht variieren). Die nachfolgend angegebenen APTT-Werte wurden mit humanem Citrat-Normalplasmapool, der mit UFH bzw. NMH versetzt wurde, bestimmt (Gerinnungsgerät: STA-R). Auch bei gleichbleibender Heparin-Konzentration ist die Verlängerung der APTT abhängig vom verwendeten Plasma:

| Lot     | IE/ml      | Plasmapool + UFH |      |       |       | Plasmapool + NMH |      |      |      |
|---------|------------|------------------|------|-------|-------|------------------|------|------|------|
|         |            | 0                | 0,20 | 0,350 | 0,50  | 0                | 0,20 | 0,50 | 1,00 |
| 90201   | APTT (Sek) | 31,1             | 59,3 | 97,9  | 177,0 | 31,7             | 38,4 | 45,5 | 60,8 |
| 080326B | APTT (Sek) | 30,1             | 52,7 | 85,6  | 154,9 | 30,5             | 37,0 | 43,1 | 58,1 |

CEPHEN hat eine sehr gute Sensitivität für unfraktioniertes Heparin (UFH) im Plasma. Verlängerungen der Gerinnungszeit sind ab 0,1 IE/ml Heparin signifikant.

Die Sensitivität für niedermolekulares Heparin (NMH) ist geringer.

Die Sensitivität für Heparin fällt bei den verschiedenen am Markt befindlichen APTT Reagenzien unterschiedlich aus. Weiters kann es auch leichte Unterschiede zwischen den Chargen eines Herstellers geben. Die Heparin Sensitivität muss daher von jedem Labor unter den jeweiligen Arbeitsbedingungen und für die verwendete Charge des APTT Reagenz ermittelt werden. Auch eine gleichbleibende Heparin-Konzentration im Plasma kann, insbesondere bei Intensivpatienten, zu variablen Verlängerungen der APTT bzw. der Gerinnungszeit-Ratio Patient/ Normal Kontrolle führen.

- Gute Sensitivität für Hirudin von 0,1 bis 0,2 µg/ml in Plasma bei Verwendung eines KC10-Gerätes.
- Präzision: Die folgenden Ergebnisse wurden beispielhaft auf STA-R gemessen:

| Lot 070622B        | APTT (Sek) | N  | Intra-Assay VK | Inter-Assay VK |
|--------------------|------------|----|----------------|----------------|
| Normalplasmapool   | 33,0       | 10 | 0,38 %         | 2,22 %         |
| Plasma mit Heparin | 67,0       | 10 | 0,53 %         | 2,26 %         |

- Das CEPHEN APTT-Reagenz zeigt gute Übereinstimmung mit den APTT-Reagenzien STA-PTT®, gemessen auf STA-R und CK Prest®, gemessen auf KC10:

|   | CEPHEN 070622B<br>(STA-R) | STA-PTT® (STA-R) | CK Prest®<br>(KC10) |
|---|---------------------------|------------------|---------------------|
| Mittelwert APTT (Sek)<br>(N=30 Normale) | 33,2                      | 32,4             | 32,7                |
| Mittelwert ± 2 SD (Sek)                 | 28,1-38,3                 | 28,3-36,5        | 28,3-37,1           |

### **EINSCHRÄNKUNGEN:**

- Verschiedene Medikamente bzw. Therapien können APTT-Resultate beeinflussen. Weiterführende Untersuchungen sollten durchgeführt werden, um den Ursprung jedes unerwarteten bzw. abnormalen Resultats zu ermitteln.

- Wiederholungsmessungen der Gerinnungszeit einer Probe können, auch bei Verwendung der gleichen Reagenzcharge, in Abhängigkeit vom verwendeten Gerinnungsgerät bzw. der Methode der Gerinnungsbestimmung und den Geräteeinstellungen (Sensitivität der Bestimmung des Gerinnungsendpunktes) leicht variieren. Jedes Labor sollte Werte für einen eigenen Normalbereich (inkl. Mittelwert und Standardabweichung) unter den gegebenen spezifischen Testbedingungen ermitteln und validieren. Auf gleiche Weise können verschiedene Einflussgrößen (z.B. Heparine unterschiedlicher Herkunft) die Ergebnisse beeinflussen. Jedes Labor sollte daher eigene Vertrauensbereiche ermitteln.

- Die Inkubationszeit von 3 Minuten sollte durchgängig eingehalten werden. Falls die Inkubationszeit für eine Geräteapplikation geändert werden muss (z.B. 4 Minuten), so muss dies für alle durchgeführten Bestimmungen angewendet werden.

- Das Reagenz zeigt gute Sensitivität für Präkallikreinspiegel < 1%, jedoch keine Sensitivität für Konzentrationen > 5%.

- Messung auf KC10 ergab keine signifikanten Störeinflüsse bis zu 0,25 mg/ml Bilirubin bzw. bis zu 5 mg/ml Hämoglobin, welches den Plasmen jeweils zugesetzt wurde.

- Jegliche Plasmaproben, bei denen Auffälligkeiten festgestellt werden (z.B. lipämische und hämolytische Plasmen, partiell geronnene Plasmen ...) sind zu verwerfen.

### **REFERENZEN:**

- "Hémorragies et thromboses – Du diagnostic au traitement", M.M. Samama et coll., Abrégés, Masson, 2004.
- www.geht.org
- NCCLS- (CLSI-) Document H21-A4: 'Specimen collection, handling and processing'.