



american diagnostica GmbH

IMUBIND® TAT ELISA

REF 833

IVD CE ∇ 96 2-8°C



american diagnostica GmbH
Kaplaneigasse 35, D-64319 Pfungstadt, Germany

PRODUCT INSERT ENGLISH

INTENDED USE

The IMUBIND® TAT ELISA is an enzyme-linked immunosorbent assay for the quantitative determination of thrombin-antithrombin III (TAT) complexes.

EXPLANATION OF THE TEST

The conversion of prothrombin to thrombin is a key event in thrombus (clot) formation. Thrombin is a serine protease that acts on a wide variety of substrates in the coagulation pathway. Antithrombin III, an alpha 2 glycoprotein with a molecular weight of 58,000 kDa, is the major inhibitor of thrombin. Inactivation of thrombin by antithrombin III occurs by the formation of a covalent bond resulting in an inactive complex. This thrombin-antithrombin III complex (TAT) can be quantified in peripheral blood as an indicator of thrombin activation. Elevated plasma levels of TAT have been associated with a wide variety of active thrombotic events including disseminated intravascular coagulation (DIC), sepsis, multiple trauma, pregnancy complications (pre-eclampsia), deep vein thrombosis (DVT), and malignancies. TAT levels have also been found to be elevated in many patients with disturbances in global coagulation when routine coagulation parameters are in the sub-normal or normal range.

PRINCIPLE OF THE METHOD

Diluted plasma samples are added to microwells coated with a monoclonal antibody against thrombin. During an incubation period, TAT complexes present in the sample will bind to the antibody coated to the wells. Following a washing step, a biotinylated monoclonal anti-antithrombin III antibody is added to the microwells and binds to the TAT complexes captured on the plate during a short incubation period. A streptavidin-horseradish peroxidase conjugate (SA-HRP) is added to the microwells to complete the formation of the antibody-enzyme detection complex. Following another washing step, the addition of a perborate-3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) substrate and its subsequent reaction with the HRP present generates a blue colored solution. The reaction is stopped by adding citrate stop solution, which turns the solution color yellow. Measuring the solution absorbance at 450 nm and extrapolating the value with those of a standard curve determines the level of TAT in the diluted plasma sample.

REAGENTS

MTP	Antibody Coated Microtiter plate, MTP-96 (12x8) well
WASH	Wash buffer, 50 ml, 1 vial (20x concentrate)
SBUF	Sample buffer, 15 ml, 1 vial (ready-to-use)
CBUF	Conjugate buffer, 50 ml, 1 vial (ready-to-use)
STD1	TAT Standard plasma 1, 3.8 ng/ml, 1 ml, 1 vial (lyophilized)
STD2	TAT Standard plasma 2, 1.9 ng/ml, 1 ml, 1 vial (lyophilized)
STD3	TAT Standard plasma 3, 0.38 ng/ml, 1 ml, 1 vial (lyophilized)
STD4	TAT Standard plasma 4, 0.06 ng/ml, 1 ml, 1 vial (lyophilized)
POS	Positive control plasma, conc. see label, 1 ml, 1 vial (lyophilized)
AB	Detection Antibody, biotinylated mAb, 120 µl, 1 vial (100x concentrate)
CON	Enzyme conjugate, SA-HRP, 120 µL (100x concentrate)
TMB	Substrate, 11 ml, 1 vial (ready-to-use)
STOP	Stop solution, 6 ml, 1 vial (ready-to-use)

PRECAUTIONS

Source material for some of the reagents in this kit is of human origin. This material has been found to be non-reactive for Hepatitis B Surface Antigen (HBsAg), Hepatitis C Virus (HCV) and Human Immunodeficiency Virus Type 1 and Type 2 (HIV-1, HIV-2) using FDA approved methods. As no known test method provides complete assurance that products derived from human blood will not transmit HBsAg, HCV, HIV-1, HIV-2 or other blood-borne pathogens, reagents should be handled as recommended for any potentially infectious human specimen. Discard all waste associated with test specimens and human source reagents in a biohazard waste container.

Limited for research use only in the United States. For *in vitro* use only. Not for internal use in humans or animals. Do not use the kit components beyond the stated expiration date. Do not mix reagents from different kits. Avoid microbial contamination of the reagents. Do not smoke, eat or drink in areas in which specimens or kit reagents are handled. Do not pipette reagents by mouth. Wear laboratory coat and disposable gloves throughout the test procedure and wash hands thoroughly afterwards. Avoid splashing or aerosol formation.

REAGENT PREPARATION AND STORAGE

Unopened and lyophilized reagents are stable until the expiration date printed on the box when stored as instructed.

- MTP Antibody coated microwells:** Once removed from the foil pouch, the microwell strips must be used within 30 minutes. Unused strips may be stored at 2°-8°C for 4 weeks when sealed in the original pouch with the desiccant present, protected from any moisture.
- WASH Wash buffer:** Transfer the content to a 1 liter bottle and fill up the concentrate to 1 liter with filtered deionized/distilled water. Diluted Wash Buffer may be used for up to 4 weeks when stored at 2°-8°C.
- SBUF Sample buffer:** Supplied ready to use. Opened dilution buffer is stable for 3 month when stored at 2°-8°C.
- CBUF Conjugate buffer:** Supplied ready to use. Opened dilution buffer is stable for 3 month when stored at 2°-8°C.
- STD Standards:** Reconstitute the standard plasma with 1 ml purified, deionised or distilled water, swirl the contents gently and allow the vials to stand at room temperature for at least 15 minutes to ensure complete dissolution. The lyophilised plasma is stable until the date indicated on the vial label when stored at 2° - 8°C. Once reconstituted, the plasma will remain stable for 3 month when stored at -20 °C.
- POS Positive control plasma:** Reconstitute the control plasma with 1 ml purified, deionised or distilled water, swirl the content gently and allow the vial to stand at room temperature for at least 15 minutes to ensure complete dissolution. The lyophilised plasma is stable until the date indicated on the vial label when stored at 2° - 8°C. Once reconstituted, the plasma will remain stable for 3 month when stored at -20 °C.
- AB Detection antibody:** Supplied as a concentrate, dilute the Detection Antibody 1:100 with Conjugate Buffer just prior to use. For using all 96 microwells at one time, dilute 100 µL of Detection Antibody to 10 mL in Conjugate Buffer. If not all 96 microwells are used, dilute 10 µL of Detection Antibody to 1 mL in Conjugate Buffer for each 8-microwell strip that will be used. Working strength Detection Antibody is stable for 4 hours at 2°-8°C. Discard any unused working strength Detection Antibody. Opened antibody is stable for 3 month when stored in the dark at 2°-8°C.
- CON Enzyme conjugate:** Supplied as a concentrate, dilute the Enzyme Conjugate 1:100 with Conjugate Buffer just prior to use. For running all 96 microwells at one time, dilute 100 µL of Enzyme Conjugate to 10 mL in Conjugate Buffer. If not all 96 microwells are used, dilute 10 µL of Enzyme Conjugate to 1 mL in Conjugate Buffer for each 8-micro-well strip that will be used. Working strength Enzyme Conjugate is stable for 2 hours at 2°-8°C. Discard any unused working strength Enzyme Conjugate.
- TMB Substrate, TMB:** Supplied ready to use. Opened substrate is stable for 3 month when stored in the dark at 2° - 8°C.
- STOP Stop solution:** Supplied ready to use. Opened stop solution is stable for 3 month when stored at 2° - 8°C.

SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

EDTA or citrate collected platelet poor plasma may be used for this assay. See "Collection, Transport and Processing of Blood Specimens for Testing Plasma-based Coagulation Assays; Approved Guidelines-Fourth Edition", NCCLS Document H21-A4, Vol. 23, No. 35, December 2003.

Citrate Plasma collection should be performed as follows:

1. Collect 9 parts of blood into 1 part of 3.2% (0.109 M) trisodium citrate anticoagulant solution.
2. Centrifuge the blood sample at 5,000 x g for 15 minutes.
3. Plasma should be stored at 2°-8°C and assayed within 4 hours. Alternatively, plasma may be stored at -20°C for up to 6 months.
4. Frozen plasma should be thawed rapidly at 37°C. Thawed plasmas should be stored at 2°-8°C and assayed within 4 hours.

PROCEDURE

Materials Provided – See Reagents

Material Required But Not Provided

0.22 µm filtered deionized H₂O
50-300 µL eight channel multi-pipette
0-200 µL, 200-1000 µL single pipettes
microwell plate reader for reading absorbance at 450 nm
microwell plate washer (optional), microwell plate shaker (optional)

Preparing the TAT standards and control

1. Reconstitute the TAT standard and positive control plasmas as instructed under REAGENT PREPARATION.

Preparing the Sample Dilutions

2. Dilute each plasma sample 1:20 with sample buffer (e.g. 12 µl plasma + 228 µl sample buffer).

Running standard, control and samples in duplicate is recommended.

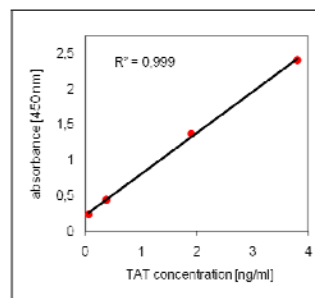
Assay Procedure

3. Open the foil pouch and remove the microwell strips/frame assembly. Remove the strips that will not be used, return them to the foil pouch and tightly reseal the pouch with the desiccant inside. Store the foil pouch at 2 - 8°C.
4. Pipette 100 µL of the standard, control or samples into separate microwells, cover with the acetate sheet and incubate for 1 hour at room temperature (18-25°C) on an orbital microwell plate shaker with agitation (at 250 rpm).
5. Empty the contents of the microwells and wash 4 times with Wash Buffer. Washing may be performed either using microwell plate washing equipment or manually (fill the wells with Wash Buffer with a pipette or squeeze bottle, wait three minutes, empty and remove droplets by tapping the plate 4-5 times face down against absorbing material).
6. Add 100 µL working strength Detection Antibody to each microwell, cover with the acetate sheet and incubate the wells at room temperature (18-25°C) for 1 hour on an orbital microwell plate shaker with agitation (at 250 rpm).
7. Wash the wells by repeating Step 5.
8. Add 100 µL of working strength Enzyme Conjugate to each microwell, cover with the acetate sheet and incubate for 1 hour at room temperature (18-25°C) on an orbital microwell plate shaker with agitation (at 250 rpm).
9. Wash the wells by repeating Step 5.
10. Add 100 µL of Substrate to each microwell immediately after the wash step, cover the wells with the acetate sheet and incubate for 5-10 minutes at room temperature (18°-25°C). A blue color will develop.
11. Stop the enzymatic reaction by adding 50 µL Stop solution to each microwell. Add the acid with the same speed and order as you added the substrate. Tap the sides of the microwell frame to ensure even distribution of the solution. The solution color will turn yellow. Read the absorbance on a microwell plate reader at a wavelength of 450 nm within 10 minutes.

RESULTS

Construct a standard curve by plotting the mean absorbance value for each standard versus its corresponding concentration. A standard curve should be generated each time the assay is performed. The following standard curve is for demonstration purposes only.

Representative Standard Curve



CALCULATIONS

Determine the amount of TAT in the diluted plasma sample by interpolating directly from the standard curve. As the plasma sample was diluted 1:20 during its preparation, multiply the results by 20 in order to obtain the concentration of TAT in the neat plasma sample. Since the TAT positive control plasma was pre-diluted 1:20, multiply the results by 20 too. The calculation is:

$$[\text{TAT}]_{\text{Plasma Sample}} = [\text{TAT}]_{\text{Diluted Test Sample}} \times 20$$

Samples which yield absorbances above the highest standard must be retested in other dilutions. Sample dilutions (e.g 1:40) must be prepared using a normal plasma with a TAT content of < 4 ng/ml. The TAT content of the normal plasma must be taken into account in the calculation of the TAT concentration of the sample.

QUALITY CONTROL

Patient samples should be tested along with the provided Positive control plasma. The measurement values for the samples can only be used if the value for the control is within the confidence interval.

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

Platelet contamination in plasma samples may interfere with the assay results. Plasma samples must be free of platelets in order to have a valid result. Exercise great care in minimizing disruption of the platelet pellet while recovering the platelet poor plasma. Samples should not be frozen and thawed more than two times.

EXPECTED VALUES

Each laboratory should establish its own normal range using the local population.

In a study using the IMUBIND TAT ELISA the TAT concentration of EDTA plasma from normal adult donors (n=36) was determined to be < 1.2 ng/ml (Referenzbereich < 1.2 to 3.3 ng/ml (5th -95th percentile).

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Precision

The intra- and inter-assay coefficients of variations (CV) for this ELISA have been estimated to be 3.3 % and 12.9 % respectively.

Specificity

The assay is specific for human thrombin/antithrombin III complex.

BIBLIOGRAPHY

- Disseminated intravascular coagulation (DIC). Mammen EF. Clin Lab Sci. 2000 Fall;13(4):239-245.
- Useful laboratory tests for studying thrombogenesis in acute cardiac syndromes. Fareed J et al., Clin Chem. 1998 Aug;44(8 Pt 2):1845-1853.
- Contribution of the hemostasis laboratory in the diagnosis of deep venous thrombosis. Demarmels BF et al., Ther Umsch. 1996Apr;53(4):265-271.
- Derangements of coagulation and fibrinolysis in critically ill patients with sepsis and septic shock. Vervloet MG et al., Semin Thromb Hemost. 1998;24(1):33-44.

VERWENDUNGSZWECK

Der IMUBIND® TAT ELISA ist ein Enzyme-Linked Immunosorbent Test zur quantitativen Bestimmung von Thrombin Antithrombin III (TAT) Komplexen.

ERKLÄRUNG DES TESTVERFAHRENS

Die Umwandlung von Prothrombin zum aktiven Thrombin ist ein zentraler Schritt innerhalb der Gerinnungskaskade. Thrombin ist eine Serinprotease, welche zahlreiche Proteine innerhalb der Gerinnungskaskade zu spalten vermag. Antithrombin III, ein alpha 2 Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 58 kDa, ist der Hauptinhibitor von Thrombin. Die Inaktivierung von Thrombin durch Antithrombin III führt zur Bildung von kovalenten inaktiven Proteinase/Inhibitor-Komplexen. Diese Thrombin Antithrombin III (TAT) Komplexe können im peripheren Blut quantifiziert werden und stellen ein Maß für die Thrombin Aktivierung dar.

Erhöhte TAT-Konzentrationen wurden bei zahlreichen thrombotischen Ereignissen gemessen, hierzu zählen: Disseminierte intravasale Gerinnung (DIC), Sepsis, Polytraumen, Präeclampsia, Tiefe Beinvenenthrombose (DVT) und maligne Erkrankungen. Erhöhte TAT Werte wurden auch bei Patienten mit globalen Gerinnungsstörungen gefunden, bei denen die Routine-Gerinnungsparameter im sub-normalen bis normalen Bereich lagen.

TESTPRINZIP

Verdünte Plasmaproben werden in die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen gegeben, die mit einem monoklonalen Fängerantikörper gegen Thrombin beschichtet sind. Während der anschließenden Inkubation binden in der Probe vorliegende TAT-Komplexe an den Antikörper. Nach dem Waschen wird ein biotinylierter monoklonaler Detektionsantikörper der gegen Antithrombin III gerichtet ist zugegeben. Während einer kurzen Inkubationszeit bindet der Antikörper an das an die Platte gebundene TAT. Anschließend wird der biotinylierte Zweitantikörper durch ein Streptavidin – Meerrettichperoxidase (SA-HRP) Konjugat nachgewiesen. Nach einem weiteren Waschschrift wird das Substrat 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin Perborat (TMB) zugegeben. Dieses wird durch die HRP umgesetzt, was zu einer Blaufärbung führt. Durch Zugabe einer Citrat-Stoppplösung wird die Reaktion gestoppt und die Färbung schlägt von blau nach gelb um. Die TAT Werte werden durch Messung der optischen Dichte bei 450 nm anhand der mitgeführten Standardkurve ermittelt.

REAGENZIEN

MTP	Antikörper-beschichtete Mikrotiterplate, 96 (12x8) Vertiefungen
WASH	Wash Puffer, 50 ml, 1 Fläschchen (20x Konzentrat)
SBUF	Proben Puffer, 15 ml, 1 Fläschchen (gebrauchsfertig)
CBUF	Konjugat Puffer, 50 ml, 1 Fläschchen (gebrauchsfertig)
STD1	TAT Standard Plasma 1, 3.8 ng/ml, 1 ml, 1 Fläschchen (lyophilisiert)
STD2	TAT Standard Pplasma 2, 1.9 ng/ml, 1 ml, 1 Fläschchen (lyophilisiert)
STD3	TAT Standard Plasma 3, 0.38 ng/ml, 1 ml, 1 Fläschchen (lyophilisiert)
STD4	TAT Standard Plasma 4, 0.06 ng/ml, 1 ml, 1 Fläschchen (lyophilisiert)
POS	Positiv Kontroll Plasma, Konz s. Etikett, 1 ml, 1 Fläschchen (lyoph.)
AB	Detektions Antikörper, biotinylierter mAk, 120 µl, 1 Fläschchen (100x Konzentrat)
CON	Enzyme conjugate, SA-HRP, 120 µL 1 Fläschchen (100x Konzentrat)
TMB	Substrat, 11 ml, 1 Fläschchen (gebrauchsfertig)
STOP	Stop Lösung, 6 ml, 1 Fläschchen (gebrauchsfertig)

WARNUNG

Ausgangsmaterialien für einige der im Kit enthaltenen Reagenzien sind humanen Ursprungs. Diese wurden auf Hepatitis B Oberflächenantigene (HBsAg), Hepatitis C Virus (HCV) und Humanes Immundefizienzvirus Typ 1 und 2 (HIV-1 und HIV-2) mit FDA zugelassenen Methode getestet und für nicht-reaktiv befunden. Da sich die Übertragung von HBsAg, HCV, HIV-1, HIV-2 und anderen im Blut zirkulierenden Infektionserregern durch Humanblutprodukte derzeit mit keiner bekannten Testmethode mit völliger Sicherheit ausschließen lässt, müssen diese Reagenzien wie potenziell infektiöse Humanproben gehandhabt werden.

In den USA darf dieses Produkt nur für Forschungszwecke verwendet werden. Nur für die *in vitro* Verwendung geeignet. Keine Verwendung in Mensch oder Tier. Keine Kitkomponenten nach dem Verfallsdatum verwenden. Keine Reagenzien aus verschiedenen Kits zusammen verwenden. Mikrobielle Kontamination der Kitkomponenten vermeiden. Bei der Arbeit nicht rauchen, essen und trinken. Nicht mit dem Mund pipettieren. Während des Testverfahrens Laborschutzbekleidung und Einweghandschute tragen; anschließend die Hände sorgfältig waschen. Spritzen oder Aerosolbildung vermeiden.

REKONSTITUTION DER REAGENZIEN UND LAGERUNG

Ungeöffnete und lyophilisierte Reagenzien sind - wenn sie wie angegeben gelagert werden - bis zu dem auf der Verpackung angegebenen Verfallsdatum stabil.

- MTP Antikörper beschichtete Mikrotiterstreifen: Mikrotiterstreifen müssen innerhalb von 30 min nach Entnahme aus dem Folienbeutel verwendet werden. Nicht verwendete Streifen können bei 2° - 8°C bis zu 4 Wochen gelagert werden, wenn diese in dem verschlossenen Folienbeutel zusammen mit dem Trocknungsmittel unter Ausschluss von jeglicher Feuchtigkeit gelagert werden.
- WASH Wash Puffer: den Inhalt in eine 1 Liter Flasche überführen und mit filtriertem deionisierten/destilliertem Wasser auf 1 Liter auffüllen. Der gebrauchsfertige Waschpuffer kann bei 2 – 8 °C bis zu 4 Wochen gelagert werden.
- SBUF Proben Puffer: Gebrauchsfertiger Puffer. Nach dem Öffnen kann der Puffer bei 2 – 8 °C bis zu 3 Monate gelagert werden.
- CBUF Konjugat Puffer: Gebrauchsfertiger Puffer. Nach dem Öffnen kann der Puffer bei 2 – 8 °C bis zu 3 Monate gelagert werden.
- STD Standards: die Standard Plasmen mit je 1 ml filtriertem deionisierten/destilliertem Wasser rekonstituieren. Den Inhalt leicht schwenken und mindestens 15 min bei Raumtemperatur stehen lassen um eine vollständige Auflösung zu erreichen. Die lyophilisierten Standards sind bei 2 – 8 °C bis zu dem auf dem Etikett angegebenen Datum haltbar. Nach Rekonstitution können die Standards bis zu 3 Monate bei -20°C gelagert werden.
- POS Positiv Kontroll Plasma: das Positiv Kontroll Plasma mit 1 ml filtriertem deionisierten/destilliertem Wasser rekonstituieren. Den Inhalt leicht schwenken und mindestens 15 min bei Raumtemperatur stehen lassen um eine vollständige Auflösung zu erreichen. Die lyophilisierte Kontrolle ist bei 2 – 8 °C bis zu dem auf dem Etikett angegebenen Datum haltbar. Nach Rekonstitution kann sie bis zu 3 Monate bei -20°C gelagert werden.
- AB Detektions Antikörper: liegt als Konzentrat vor. Der konzentrierte Detektions Antikörper wird kurz vor Gebrauch 1:100 mit Konjugat Puffer verdünnt. Bei Verwendung der ganzen Mikrotiter-Platte, 100 µL Detektions Antikörper in 10 mL Konjugat Puffer verdünnen. Wenn nicht alle 96 Microwells verwendet werden, dann werden pro 8 Vertiefungen (1 Riegel) 10 µL Detektions-Antikörper in 1 mL Konjugat Puffer verdünnt. Diese Gebrauchslösung ist bei 2-8°C für 4 Stunden stabil. Nicht verwendete verdünnte Gebrauchslösung verwerfen. Nach dem Öffnen kann das Detektions Antikörper Konzentrat bis zu 3 Monate im Dunkeln bei 2-8 °C gelagert werden.
- CON Enzyme Konjugat: liegt als Konzentrat vor. Das konzentrierte Enzym Konjugat wird kurz vor Gebrauch 1:100 mit Konjugat Puffer verdünnt. Bei Verwendung der ganzen Mikrotiter-Platte, 100 µL Enzym Konjugat in 10 mL Konjugat Puffer verdünnen. Wenn nicht alle 96 Microwells verwendet werden, dann werden pro 8 Vertiefungen (1 Riegel) 10 µL Enzym Konjugat in 1 mL Konjugat Puffer verdünnt. Diese Gebrauchslösung ist bei 2-8°C für 4 Stunden stabil. Nicht verwendetes gebrauchsfertiges Enzym Konjugat verwerfen.
- TMB Substrat, TMB: gebrauchsfertige Lösung. Kann nach dem Öffnen bis zu 3 Monate im Dunkeln bei 2-8 °C gelagert werden.
- STOP Stop Lösung: gebrauchsfertige Lösung. Kann nach dem Öffnen bis zu 3 Monate bei 2-8 °C gelagert werden.

PROBENABNAHME UND VORBEREITUNG

Thrombozyten-armes Zitrat-/ oder EDTA-Plasma sollte für den Test verwendet werden. Siehe "Collection, Transport and Processing of Blood Specimens for Testing Plasma-based Coagulation Tests; Approved Guidelines-Fourth Edition", NCCLS Document H21-A4, Vol. 23, No. 35, December 2003.

Die Vorbereitung der Blutproben sollte wie folgt durchgeführt werden:

1. 9 Teile Blut in 1 Teil 3.2% (0.109 M) Trinatrium-Zitrat Antikoagulans Lösung geben.
2. Blut Proben bei 10,000 x g für 15 Minuten zentrifugieren.
3. Das Plasma sollte bei 2°-8°C gelagert und innerhalb von 4 h bestimmt werden. Alternativ kann das Plasma bei -20°C bis zu 6 Monate gelagert werden.
4. Gefrorenes Plasma sollte zügig bei 37°C aufgetaut werden. Aufgetautes Plasma sollte bei 2°-8°C gelagert und innerhalb von 4 Stunden bestimmt werden.

TESTDURCHFÜHRUNG

Kitkomponenten – Siehe Reagenzien

Notwendige Materialien, die nicht mitgeliefert werden

- 0.22 µm gefiltertes deionisiertes H₂O
- Achtkanal Multipipette für den Volumenbereich 50-300 µL
- Einkanalpipetten für den Volumenbereich 0-200 µl und 200-1000 µL
- Spektralphotometer für Mikrotiterplatten mit einer Wellenlänge von 450 nm
- Orbital-Schüttler für Mikrotiterplatten
- Plattenwaschgerät (optional)

Vorbereitung der TAT Standards und Kontrolle

- Die TAT Standards und die Positiv Kontrolle, wie unter REKONSTITUTION DER REAGENZIEN angegeben, ansetzen.

Vorbereitung der Proben Verdünnungen

- Jede Plasmaprobe 1:20 mit Proben Puffer verdünnen (z. Bsp. 12 µl Plasma + 228 µl Proben Puffer).

Es wird empfohlen die Standards, Kontrolle und Proben als Duplikate zu bestimmen.

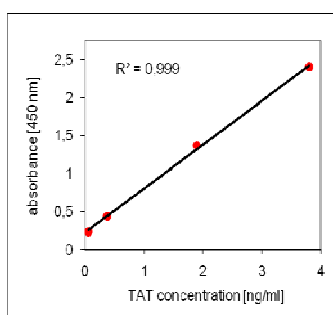
Testdurchführung

- Teststreifen und Halter aus der Folienverpackung entnehmen. Nicht verwendete Mikrotiterstreifen in die Folienverpackung zurückgeben. Den Folienbeutel mit dem innen liegenden Trocknungsmittel gut verschließen und bei 2° - 8°C lagern.
- Je 100 µL Standard, Kontrolle oder verdünnte Probe in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipettieren. Mit der Azetat-Abdeckfolie bedecken und 1 Stunde bei Raumtemperatur (18-25°C) auf dem Schüttler bei 250 upm inkubieren.
- Inhalt aus den Vertiefungen entfernen und 4mal mit Waschpuffer waschen. Dieser Waschschritt kann entweder mit einem Plattenwaschgerät oder manuell durchgeführt werden. Zur manuellen Waschung den Waschpuffer mit einer Spülflasche oder Pipette in die Vertiefungen geben und 3 Minuten warten. Waschpuffer verwerfen und Tropfen entfernen indem die Platte 4-5mal umgekehrt auf einem Papiertuch ausgeklopft wird.
- Je 100 µL verdünnten Detektions Antikörper in die Vertiefungen pipettieren, mit der Azetat-Abdeckfolie bedecken und 1 Stunde bei Raumtemperatur (18-25°C) auf dem Schüttler bei 250 upm inkubieren.
- Vertiefungen wie unter Schritt 5 angegeben waschen.
- Je 100 µL verdünntes Enzym-Konjugat in die Vertiefungen pipettieren, mit der Azetat-Abdeckfolie bedecken und 30 Minuten bei Raumtemperatur (18-25°C) auf dem Schüttler bei 250 rpm inkubieren.
- Vertiefungen wie unter Schritt 5 angegeben waschen.
- Je 100 µL Substrat unmittelbar nach dem letzten Waschschritt in die Vertiefungen pipettieren, mit der Azetat-Abdeckfolie bedecken und 5-10 Minuten bei Raumtemperatur (18-25°C) inkubieren (blaue Farbentwicklung).
- Zum Abstoppen der enzymatischen Reaktion je 50 µL Stop Lösung in die Vertiefungen geben. Platte an den Seiten antippen um eine gleichmäßige Verteilung zu bewirken. Die Lösung färbt sich gelb. Die Extinktion innerhalb von 10 Minuten mit dem Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 450 nm messen.

ERGEBNISSE

Die Standardkurve wird erstellt, indem man die Mittelwerte der gemessenen Extinktionswerte für die einzelnen TAT Standards gegen die entsprechende TAT Konzentration aufträgt. Bei jeder Testdurchführung ist eine Standardkurve zu erstellen. Nachstehend ein Beispiel für eine Standardkurve (nur zu Demonstrationszwecken)

Repräsentative Standardkurve



BERECHNUNGEN

Die TAT-Konzentration der verdünnten Plasmaprobe wird direkt aus der Standardkurve interpoliert. Da die Plasmaproben 1:20 verdünnt eingesetzt wurden, müssen die gemessenen Werte mit 20 multipliziert werden um die TAT Konzentration in der ursprünglichen Probe zu bestimmen. Da das TAT Kontroll Plasma bereits 1:20 vorverdünnt wurde, muß der abgelesene Wert ebenfalls mit 20 multipliziert werden. Die Berechnung erfolgt wie folgt:

$$[TAT]_{\text{Plasmaprobe}} = [TAT]_{\text{verdünnte Plasmaprobe}} \times 20$$

Proben deren OD-Werte oberhalb des höchsten Standards liegen müssen nach Verdünnung erneut getestet werden. Die Proben-Verdünnung (z. Bsp. 1:40) müssen mit einem Normalplasma, dessen TAT-Gehalt < 4 ng/ml beträgt, erfolgen. Der TAT-Gehalt des Normalplasmas muss bei der Berechnung der TAT-Konzentration der Probe berücksichtigt werden.

QUALITÄTSKONTROLLE

Aus Qualitätssicherungsgründen sollten Patientenproben immer zusammen mit dem mitgelieferten Positiv Kontroll Plasma getestet werden. Die Messwerte der Patientenproben können nur verwendet werden, wenn der Kontrollwert im Vertrauensbereich liegt.

GRENZEN DES VERFAHRENS

Nicht ordnungsgemäß vorbereitete Proben können mit Thrombozyten kontaminiert sein, welche das Testergebnis verfälschen können. Die Plasmaproben müssen Thrombozyten-frei sein um verlässliche Ergebnisse zu erzielen. Besondere Vorsicht ist bei der Überführung des Plasmas nach der Zentrifugation geboten, hierbei darf das Thrombozyten-Sediment nicht aufgewirbelt werden. Die Plasmaproben dürfen höchstens zweimal eingefroren und wieder aufgetaut werden.

ERWARTETE WERTE

Jedes Laboratorium sollte seinen eigenen Normalbereich bestimmen. In einer Studie betrug die TAT Konzentration in EDTA-Plasma von Normal Spendern (n=36) 1,2 ng/ml (Referenzbereich < 1,2 bis 3,3 ng/ml (5. - 95. Perzentile).

LEISTUNGSMERKMAL

Präzision

Der Intra-Assay Variationskoeffizient wurde mit 3,3% bestimmt. Der Inter-Assay Variationskoeffizient wurde mit 12,9% bestimmt.

Spezifität

Der Test ist spezifisch für humane Thrombin/Antithrombin III Komplexe.

LITERATURHINWEISE

- Disseminated intravascular coagulation (DIC). Mammen EF. Clin Lab Sci. 2000 Fall;13(4):239-245.
- Useful laboratory tests for studying thrombogenesis in acute cardiac syndromes. Fareed J, Hoppensteadt DA, Leya F, Iqbal O, Wolf H, Bick R. Clin Chem. 1998 Aug;44(8 Pt 2):1845-1853.
- Contribution of the hemostasis laboratory in the diagnosis of deep venous thrombosis. Demarmels BF et al., Ther Umsch. 1996Apr;53(4):265-271.
- Derangements of coagulation and fibrinolysis in critically ill patients with sepsis and septic shock. Vervloet MG, Thijs LG, Hack CE. Semin Thromb Hemost. 1998;24(1):33-44