

DIN 58912-1



ICS 11.100.30

Ersatz für
DIN 58912-1:2015-09

**Hämostaseologie –
Bestimmung der Antithrombin-Aktivität –
Teil 1: Referenzmessverfahren mit einem synthetischen Peptidsubstrat;
Text Deutsch und Englisch**

Haemostaseology –
Determination of the antithrombin activity –
Part 1: Reference measurement procedure using a synthetic peptide substrate;
Text in German and English

Hémostase –
Dosage de l'activité de l'antithrombine –
Partie 1: Mode opératoire de mesure de référence à l'aide d'un substrat peptidique
synthétique;
Texte en allemand et anglais

Gesamtumfang 19 Seiten

DIN-Normenausschuss Medizin (NAMed)

Inhalt

	Seite
Vorwort	3
1 Anwendungsbereich	4
2 Normative Verweisungen	4
3 Begriffe	4
4 Bezeichnung	6
5 Entnahme und Aufbereitung des Blutes	6
6 Durchführung	6
6.1 Vorbereitung der Proben und Reagenzien	6
6.2 Methoden	6
6.2.1 Methode über Thrombin (Faktor IIa)	6
6.2.2 Methode über Faktor Xa	7
6.3 Reaktionsansatz	7
6.3.1 Manuelle Methode über Thrombin (Faktor IIa)	7
6.3.2 Manuelle Methode über Faktor Xa [11]	7
6.3.3 Automatisierte Methoden	8
6.4 Qualitätskontrolle	8
7 Ergebnismitteilung	8
Literaturhinweise	9

Vorwort

Dieses Dokument wurde vom Arbeitsausschuss NA 063-03-05 AA „Hämostaseologie“ im DIN-Normenausschuss Medizin (NAMed) erarbeitet.

Im Zweifelsfall gilt die deutsche Sprachfassung.

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Elemente dieses Dokuments Patentrechte berühren können. DIN ist nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren.

Aktuelle Informationen zu diesem Dokument können über die Internetseiten von DIN (www.din.de) durch eine Suche nach der Dokumentennummer aufgerufen werden.

Änderungen

Gegenüber DIN 58912-1:2015-09 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) die Bezeichnung in Abschnitt 4 wurde angepasst;
- b) in 6.2.2 wurde der Ursprung des eingesetzten Faktor Xa-Reagenz erweitert;
- c) die Norm wurde 2-sprachig veröffentlicht;
- d) die Norm wurde redaktionell überarbeitet.

Frühere Ausgaben

DIN 58912-1: 1994-06, 2000-03, 2015-09

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument ist anzuwenden für die funktionelle Bestimmung der Antithrombin-Aktivität (früher als Antithrombin III [AT III] bezeichnet) als Heparin-Kofaktoraktivität gegenüber Thrombin.

Zweck dieses Dokuments ist die Ermittlung vergleichbarer Ergebnisse des Antithrombin-Gehaltes einer Probe. Diese Bestimmung wird vor allem bei der Abklärung thrombophiler Diathesen, bei der Kontrolle einer Substitutionstherapie und der Gehaltsbestimmung in Antithrombin-Konzentraten angewendet.

2 Normative Verweisungen

Die folgenden Dokumente werden im Text in solcher Weise in Bezug genommen, dass einige Teile davon oder ihr gesamter Inhalt Anforderungen des vorliegenden Dokuments darstellen. Bei datierten Verweisungen gilt nur die in Bezug genommene Ausgabe. Bei undatierten Verweisungen gilt die letzte Ausgabe des in Bezug genommenen Dokuments (einschließlich aller Änderungen).

DIN 58905-1, *Hämostaseologie — Blutentnahme — Teil 1: Gewinnung von venösem Citratplasma für hämostaseologische Analysen*

DIN 58911-2, *Hämostaseologie — Kalibrierung von Meßverfahren — Teil 2: Photometrische Meßverfahren*

DIN 58939-1, *Hämostaseologie — Referenzplasma — Teil 1: Anforderungen, Herstellung*

DIN 58963-3, *Küvetten für photometrische Messungen — Einmal-Rechteckküvetten aus Kunststoffen — Maße, Anforderungen*

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die folgenden Begriffe.

DIN und DKE stellen terminologische Datenbanken für die Verwendung in der Normung unter den folgenden Adressen bereit:

— DIN-TERMinologieportal: verfügbar unter <https://www.din.de/go/din-term>

— DKE-IEV: verfügbar unter <http://www.dke.de/DKE-IEV>

3.1

Antithrombin-Aktivität

Heparin-Kofaktoraktivität des Antithrombins

Anmerkung 1 zum Begriff: Der Einfluss anderer physiologischer Thrombininhibitoren (Alpha-2-Makroglobulin, Heparin-Kofaktor II) wird durch entsprechende Reaktionsbedingungen minimiert.

3.2

Antithrombin-Kalibrierplasma

frisches, tiefgefrorenes oder lyophilisiertes gepooltes Plasma von mindestens zehn gesunden Spendern, das an einem Antithrombin-Referenzplasma kalibriert wird

Anmerkung 1 zum Begriff: Das Antithrombin-Kalibrierplasma dient zur Erstellung der Bezugskurve nach DIN 58911-2.

Anmerkung 2 zum Begriff: Verdünnungsstufen zur Mehrpunktkalibrierung sind zulässig, soweit diese den Kalibrierbeziehungen eines adäquat verdünnten Antithrombin-Referenzplasmas entsprechen.

3.3**Antithrombin-Normalaktivität**

Antithrombin-Gerinnungsaktivität in einem frischen gepoolten Normalplasma nach DIN 58911-2

Anmerkung 1 zum Begriff: Die Antithrombin-Normalaktivität beträgt definitionsgemäß 100 % oder 1 Internationale Einheit je Milliliter Plasma [4], [5].

3.4**Antithrombin-Referenzkonzentrat**

lyophilisiertes Antithrombin-Konzentrat, dessen Antithrombin-Aktivität an dem jeweils gültigen internationalen Konzentratstandard der WHO für Antithrombin kalibriert wird

Anmerkung 1 zum Begriff: Das Antithrombin-Referenzkonzentrat dient zur Kalibrierung und kann auch zur Erstellung einer Bezugskurve verwendet werden.

3.5**Antithrombin-Referenzplasma**

gepooltes Normalplasma, das bei -70 °C tiefgefroren bzw. lyophilisiert gelagert und am jeweils gültigen internationalen Standard der WHO für Antithrombin kalibriert wird

Anmerkung 1 zum Begriff: Zur Herstellung von Antithrombin-Referenzplasma kann z. B. gepooltes Normalplasma nach DIN 58939-1 verwendet werden.

Anmerkung 2 zum Begriff: Das Antithrombin-Referenzplasma dient zur Kalibrierung und kann auch zur Erstellung einer Bezugskurve verwendet werden.

3.6**chromogenes Peptidsubstrat**

synthetisches Oligopeptid, das am C-terminalen Ende eine chromophore Gruppe trägt, die durch Faktor Xa oder Thrombin (Faktor IIa) abgespalten wird

3.7**Faktor Xa (EC 3.4.21.6)**

proteolytisches Enzym, das durch partielle Proteolyse aus dem Proenzym Faktor X entsteht

Anmerkung 1 zum Begriff: EC 3.4.21.6 ist die Bezeichnung nach IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry).

Anmerkung 2 zum Begriff: Siehe auch Literaturhinweis [2].

3.8**Heparin**

Natrium- oder Calciumsalz eines sulfatierten Glucosaminoglycans, das in tierischem oder menschlichem Gewebe vorkommt

Anmerkung 1 zum Begriff: Die Substanz hat die charakteristische Eigenschaft, die Gerinnung von Frischblut zu verzögern [3].

Anmerkung 2 zum Begriff: Die Heparinaktivität wird in Internationalen Einheiten je Milliliter (I.E./ml) angegeben und ist durch den jeweils gültigen internationalen Standard der WHO definiert.

3.9**Thrombin (EC 3.4.21.5)**

proteolytisches Enzym, das durch partielle Proteolyse aus dem Proenzym Prothrombin entsteht

Anmerkung 1 zum Begriff: Die Aktivität von Thrombin wird im Allgemeinen in Internationalen Einheiten je Milliliter (I.E./ml) angegeben [1].

Anmerkung 2 zum Begriff: EC 3.4.21.5 ist die Bezeichnung nach IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry).

4 Bezeichnung

Bezeichnung der Bestimmung von Antithrombin (AT) mit einem chromogenen Peptidsubstrat (chrom) nach diesem Dokument:

Bestimmung DIN 58912-1-AT-chrom

5 Entnahme und Aufbereitung des Blutes

Die Entnahme und Aufbereitung des Blutes erfolgen nach DIN 58905-1.

Die Plasmaprobe darf bis zu 8 h nach der Blutentnahme bei einer Temperatur im Bereich von 18 °C bis 22 °C aufbewahrt werden. Sofern die Bestimmung innerhalb dieser Zeitspanne nicht möglich ist, darf die Plasma-
probe nach DIN 58905-1 eingefroren werden.

6 Durchführung

6.1 Vorbereitung der Proben und Reagenzien

Die Plasmaprobe ist mit physiologischer Kochsalzlösung vorzuverdünnen, wobei das Verdünnungsverhältnis im Bereich zwischen 1+19 und 1+99 liegen sollte. Die vorverdünnte Probe darf vor der Bestimmung nicht länger als 1 h bei Raumtemperatur aufbewahrt werden. Antithrombin-Konzentrate sind in einer Verdünnungslösung, die 0,1 % Humanalbumin enthält, auf ungefähr 1 I.E./ml vorzuverdünnen.

Die Reaktionsbedingungen dürfen modifiziert werden, sofern vergleichbare Ergebnisse erhalten werden.

6.2 Methoden

6.2.1 Methode über Thrombin (Faktor IIa)

Als Thrombin wird Rinderthrombin wegen der geringeren Affinität zu Heparin-Kofaktor II verwendet. Die Konzentration wird so gewählt, dass etwa 60 % der Aktivität des Rinderthrombins durch den Antithrombin Gehalt einer Probe mit etwa 1 I.E./ml gebunden wird.

Heparin wird in der Inhibitionsphase in einer Konzentration von mindestens 1,0 I.E./ml vorgelegt, so dass innerhalb der vorgegebenen Reaktionszeit die Thrombinhemmung durch Antithrombin abgeschlossen ist.

Als Reaktionspuffer wird ein TRIS-HCl-Puffer mit einem pH-Wert von 7,5 bis 9,0 verwendet. Als Stabilisator für Thrombin sollte Albumin zugesetzt werden, so dass sich im Puffer eine Konzentration von 0,1 % bis 1 % ergibt, um Adsorptionen zu verhindern. Zur Vermeidung von unspezifischen Reaktionen sind geeignete Protease-Inhibitoren, wie z. B. Aprotinin, zuzusetzen.

Für die Nachweisreaktion wird ein synthetisches, chromogenes Substrat mit einer chromophoren Gruppe am C-terminalen Ende eingesetzt. Unter den gewählten Reaktionsbedingungen sollte die Extinktionszunahme je Minute im Leerwert bei einer Wellenlänge von 405 nm mindestens 0,2 betragen. Dabei sollte die Konzentration mindestens $2 \times K_m^{-1}$ betragen bzw. die Extinktionszunahme mit der Zeit über mindestens 90 s linear verlaufen. Die Bestimmung wird bei $(37,0 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$ durchgeführt.

1 K_m : Michaelis-Menten-Konstante [6], [7], [8], [9], [10]