

N Latex CDT Kit

OPCS G03 C0543 (1484)

Intended Use

In vitro diagnostic for the quantitative determination of carbohydrate-deficient transferrin (CDT) in human serum by means of particle-enhanced immunonephelometry using the BN[®] II and BN ProSpec[®] System for the identification of chronic elevated alcohol consumption.

Summary and Explanation

The main component of serum transferrin is a glycoprotein with a molecular mass of about 80 kD that contains two polysaccharide side chains. Each side chain carries two terminal sialic acid residues. Human serum transferrin can, however, occur in different isoforms with different degrees of glycosylation¹.

The tetrasialoform with two carbohydrate side chains, each featuring two terminal sialic acid residues, dominates in about 90% of healthy subjects¹. Transferrin molecules with only one carbohydrate side chain (disialotransferrin) or even no carbohydrate chain (asialotransferrin) occur in increased numbers as a result of alcohol consumption². These and other structurally altered transferrin isoforms induced by alcohol consumption are referred to as CDT (carbohydrate-deficient transferrin)^{1,3}.

As a rule, the daily alcohol consumption of about 50 – 60 g ethanol over two weeks leads to increased CDT levels. Increased CDT values can be expected to normalize after abstinence from alcohol for about two to four weeks, depending on the height of the CDT level^{3,4}.

The determination of CDT provides a valuable contribution to the recognition of patients with chronically high alcohol consumption, the monitoring of changes in alcohol consumption and the monitoring of abstinence. Different studies have shown that CDT is one of the specific markers for increased alcohol consumption over a longer period of time^{5,6}.

Non-alcohol induced illnesses that may trigger an increase in CDT include chronic active hepatitis, primary biliary cirrhosis, liver failure and the extremely rare CDG (carbohydrate-deficient glycoprotein) syndrome^{1,4}.

The calculation of %CDT from CDT and transferrin concentrations enables the influences of transferrin levels, iron status and mild to moderate limitations of liver function on the CDT result to be largely minimized. An additional improvement in diagnostic accuracy can be achieved by the combination of CDT and γ GT (γ -glutamyltransferase)^{5,7}.

Principle of the Method

Competitive assay

The CDT in the sample competes with CDT-coated polystyrene particles for the bond to specific monoclonal antibodies against human CDT, which are likewise bound to polystyrene particles. In the presence of CDT in the sample, there is no or little aggregation of the polystyrene particles. In the absence of CDT in the sample, the polystyrene particles aggregate. The higher the CDT content in the assay, the lower the scattered light signal. The evaluation is performed by comparison with a standard of known concentration.

Reagents

Materials provided

N Latex CDT Kit, Code No. OPCS

N CDT Reagent 1, three vials containing 0.9 mL each

N CDT Reagent 2, three vials containing 0.9 mL each

N CDT Supplementary Reagent, three vials containing 2 mL each

N CDT Standard SL, three vials containing 1 mL each

N CDT Control SL/1, three vials containing 1 mL each

N CDT Control SL/2, three vials containing 1 mL each

Composition and Standardization

N CDT Reagent 1 consists of a suspension of polystyrene particles coated with carbohydrate-deficient transferrin (< 0.017 g/L).

N CDT Reagent 2 consists of a suspension of polystyrene particles coated with monoclonal anti-CDT antibodies (mouse) (< 0.009 g/L).

N CDT Supplementary Reagent consists of a phosphate buffered saline solution with polyethylene glycol sorbitan monolaurate (5 g/L) and EDTA (< 0.2 mol/L).

N CDT Standard SL (human) consists of a stabilized human serum matrix and carbohydrate-deficient transferrin. The concentration of CDT was calibrated with reference to purified CDT. The analytical value for the N CDT Standard SL is indicated in the enclosed table.

N CDT Control SL/1 and N CDT Control SL/2 (human) each consist of a stabilized human serum matrix and carbohydrate-deficient transferrin. The concentration of CDT was calibrated with reference to the N CDT Standard SL. The assigned value and confidence interval for N CDT Control SL/1 and N CDT Control SL/2 are given on the enclosed table. These also contain the transferrin concentration and a %CDT value for the N CDT Controls SL/1 and SL/2; the transferrin concentration for these was calibrated with reference to N Protein Standard SL and the %CDT value was calculated from the respective CDT and transferrin concentration.

Preservative

N CDT Reagent 1 and N CDT Reagent 2: Gentamicin 6.25 mg/L, Amphotericin 0.625 mg/L

N CDT Supplementary Reagent, N CDT Standard SL, N CDT Control SL/1 and N CDT Control SL/2: Sodium azide < 1 g/L.

Warnings and Precautions

- For *in vitro* diagnostic use.
- Products containing sodium azide must be handled with due caution:
 - Do not ingest or allow to contact with skin or mucous membranes. When disposing of in water, flush with large amounts of water. Sodium azide can form explosive azides when contacting heavy metals such as copper or lead.
- Each individual blood donation intended for use in the manufacture of N CDT Reagent 1 and N CDT Reagent 2 as well as N CDT Standard SL, N CDT Control SL/1 and SL/2, was tested for HBsAg, Anti-HCV, Anti-HIV1 and Anti-HIV2. Only donations with negative findings were used for manufacture. Nevertheless, since the absence of infectious agents cannot be proven, all materials obtained from human tissues or body fluids should always be handled with due care, observing the precautions recommended for biohazardous material⁸.

Preparation of Reagents

The reagents, standard and controls are ready to use and require no additional preparation. Shake carefully to mix before the first use.

Storage and Stability

Store the reagents protected from light!

Stability at +2 to +8 °C:

The expiry date is indicated on the label;

Stability once opened:

Two weeks for all reagents, standard and controls if stored at +2 to +8 °C securely capped immediately after each use. Do not freeze the reagents.

Stability on-board the BN[®] II and BN ProSpec[®] Systems:

A minimum of three days, at eight-hours per days or a comparable period of time.

Note: "On-board" stability may vary, depending on the BN[®] System used and laboratory conditions. For further details, refer to BN[®] II and/or BN ProSpec[®] System Instruction Manual.

"On-board" stability of the N CDT Controls SL/1 and SL/2 on the BN ProSpec[®] System are stated in the Instruction Manual of the system.

Material required, but not provided

BN[®] II or BN ProSpec[®] System

N Supplementary Reagent L, Code No. OQTD

N Diluent, Code No. OUMT

BN[®] II Evaporation Stoppers (optional), Code No. OVLE

Optional, for the transferrin determination:

N Antiserum to Human Transferrin, Code No. OSAX

N Protein Standard SL, Code No. OQIM

N/T Protein Control SL/L, M, H, Code Nos. OQIN, OQIO, OQIP (for the quality assurance of the transferrin determination)

N Reaction Buffer, Code No. OUMS

Additional materials and supplies as described in your BN[®] System Instruction Manual.

Specimens

Suitable samples are human serum as either as fresh as possible (stored for no more than seven days at +2 to +8 °C) or stored frozen. Samples can be stored at below -20 °C for up to three months if they are frozen within 24 hours after collection and if repeated freeze-thaw cycles are avoided. Serum samples must be fully coagulated and must not contain any particles or traces of fibrin after centrifuging. Lipemic samples or frozen samples that became turbid after thawing must be clarified by centrifuging (10 minutes at approximately 15,000 x g) prior testing.

Procedure

Notes

- Consult your BN[®] System Instruction Manual for details regarding operation of the instrument.
- Reagents and samples stored at +2 to +8 °C may be used immediately for testing on a BN[®] II or a BN ProSpec[®] System.
- In order to receive the %CDT value on the BN[®] II and the BN ProSpec[®] System for a sample in addition to the CDT concentration the transferrin concentration of the respective sample must be determined with the transferrin assay available on the BN[®] Systems.
- The transferrin content given for each of the N CDT Controls SL/1 and SL/2 aids in the calculation of the %CDT of individual control measurements. It is not suitable for the quality control of the transferrin assay on the BN[®] Systems.

Assay Protocol on the BN[®] Systems

The assay protocol for serum is given in the BN[®] System Instruction Manual and software of the instrument. All steps are performed automatically by the system.

Establishment of the Reference Curve

Reference curves are generated by multi-point calibration. Serial dilutions of N CDT Standard SL are automatically prepared by the instrument using N Diluent. The standard dilutions must be used within four hours. The analytical value is indicated in the enclosed table. For the BN ProSpec[®] System, a lot data CD (Code No. OVLP) can be used to enter the analytical value. The reference curve is valid for two weeks. It can be used beyond this period of time as long as controls with corresponding method-dependent target values, e. g. N CDT Control, Level SL/1 and Level SL/2 are reproduced within their respective confidence interval. If a different lot of reagent is used, a new reference curve must be generated. The exact measuring range depends on the protein concentration of each lot of N CDT Standard SL. Typical measuring ranges are provided in the respective BN[®] Systems Instruction Manual.

Assay of Specimens

Samples are automatically diluted 1:5 with N Diluent. They must be measured within four hours. The manual selection of another sample dilution than 1:5 is not permissible.

Internal Quality Control

Assay N/T CDT Controls SL/1 and SL/2 after each establishment of a reference curve, the first use of a reagent vial, as well as with each series of samples. The controls are to be assayed and evaluated as for patient samples. The assigned value and confidence interval can be found in the enclosed table. For the BN ProSpec[®] System, a lot data CD (Code No. OVLP) can be used to enter the assigned value. The stated assigned values are intended for use as an intra-laboratory control for the assessment of precision and analytical bias. If used for precision control, the user should establish the target concentration and confidence limits during a preliminary phase. If a control value is outside the confidence interval, the determination must be repeated. If the repeated determination confirms the deviation, a new reference curve should be established. Do not release patient results until the cause of deviation has been identified and corrected.

Results

Evaluation is performed automatically in mg/L or in a unit selected by the user on the BN[®] System.

In addition, the calculation of %CDT has been integrated into the software of the BN[®] Systems. In the case of simultaneous determination of CDT and transferrin from the same sample, %CDT can be received additionally.

Limitations of the Procedure

Turbidity and particles in the sample may interfere with the determination. Therefore, samples containing particles must be centrifuged prior to testing. Lipemic samples or samples that contain particles that cannot be clarified by centrifuging (10 minutes at approx. 15,000 x g) must be excluded from testing.

Patient samples may contain heterophile antibodies that could react in immunoassays to give a falsely elevated or depressed result. This assay has been designed to minimize interference from heterophilic antibodies. Nevertheless, complete elimination of this interference from all patient specimens cannot be guaranteed.

Dade Behring has validated use of these reagents on various analyzers to optimize product performance and meet product specifications. User defined modifications are not supported by Dade Behring as they may affect performance of the system and assay results. It is the responsibility of the user to validate modifications to these instructions or use of the reagents on analyzers other than those included in Dade Behring Application Sheets or these instructions for use.

Results of these tests should always be interpreted in conjunction with the patient's medical history, clinical presentation and other findings.

Due to matrix effects, inter-laboratory survey samples and control samples may yield results that differ from those obtained with other methods. It may therefore be necessary to assess these results in relation to method-specific target values.

Reference Interval

In a study of serum samples from healthy 561 adults from Central Europe in whom an elevated level of alcohol consumption had been excluded, the results determined with the N Latex CDT Reagent ranged from 28.1 - 76.0 mg/L CDT (1st to 99th percentile). The %CDT values in this population, with reference to the results obtained with the N Antiserum to Human Transferrin, ranged from 1.19 - 2.47 %CDT (1st to 99th percentile).

In addition, each laboratory should determine its own reference ranges since the results may vary depending on the population tested.

Specific Performance Characteristics

Sensitivity

The analytical sensitivity of the test is determined by the lower limit of the reference curve and is therefore dependent on the concentration of the analyte in the N CDT Standard SL. A typical detection limit for CDT is 20 mg/L.

Specificity

There are no known cross-reactions with the antibodies used.

Precision

The precision of N Latex CDT was calculated by measuring the controls and two serum pools with different CDT concentrations and calculating the coefficients of variation (CV).

Sample	Precision (n = 40)			
	Mean value	Within the series	From run to run	Total
	CV	CV	CV	CV
N CDT Control SL/1	61.6	4.2	1.6	4.2
N CDT Control SL/2	166.2	2.8	1.5	3.0
Serum Pool 1	49.4	4.9	7.6	8.9
Serum Pool 2	213.9	3.5	2.4	4.0

The coefficient of variation for %CDT of these samples was calculated based on the result obtained with the N Antiserum to Human Transferrin using the BN[®] System and ranged from 1.8% to 9.8%.

Method comparison

The %CDT values determined for serum samples from 200 test subjects were measured, on the one hand, with the aid of high-performance liquid chromatography (HPLC), on the other hand using a BN[®] System. If a cut-off of 2.5 %CDT is set for %CDT values obtained on the BN[®] System, the result is a specificity of 97 % and a sensitivity of 93 % in comparison to the %CDT values determined with HPLC.

Note

The values cited for specific performance characteristics represent typical results and are not to be regarded as specifications for the N Latex CDT Kit.

Bibliography

- Golka K, Wiese A. Carbohydrate-deficient transferrin (CDT) - a biomarker for long-term alcohol consumption. J Toxicol Environ Health B 2004;7:319-37.
- Peter J, Unverzagt C, Engel WD, et al. Identification of carbohydrate deficient transferrin forms by MALDI-TOF mass spectrometry and lectin ELISA. Biochim Biophys Acta 1998; 1380: 93-101.
- Helander A. Biological markers in alcoholism. J Neural Transm 2003; 66 (Suppl): 15-32.
- Allen JP. Use of biomarkers of heavy drinking in health care practice. Mil Med 2003; 168: 364-7.
- Anttila P, Järvi K, Latvala J, et al. A new modified γ -CDT method improves the detection of problem-drinking: studies in alcoholics with or without liver disease. Clin Chim Acta 2003; 338: 45-51.
- Schwan R, Albuissou E, Malet L, et al. The use of biological laboratory markers in the diagnosis of alcohol misuse: an evidence-based approach. Drug Alcohol Depend 2004; 74: 273-9.
- Chen J, Conigrave KM, Macaskill P, et al. Combining carbohydrate-deficient transferrin and gamma-glutamyltransferase to increase diagnostic accuracy for problem drinking. Alcohol Alcoholism 2003; 38: 574-82.
- U.S. Department of Health and Human Services CDC, Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, HHS Publication (CDC) 93-8395; 1999; Section II; 8-16.

* BN is a trademark of Dade Behring Marburg GmbH in the USA.

BN ProSpec is a registered trademark of Dade Behring Marburg GmbH in the USA, Germany and other countries.

Dade Behring Marburg GmbH
Emil-von-Behring-Str. 76
35041 Marburg/Germany
www.dadebehring.com



Edition April 2006

N Latex CDT Kit

Anwendungsbereich

In-vitro-Diagnostika zur quantitativen Bestimmung von Carbohydrate-deficient Transferrin (CDT) in humanem Serum mittels partikelverstärkter Immunnephelometrie mit dem BN[®] II und BN ProSpec[®] System zur Identifizierung von chronisch erhöhtem Alkoholkonsum.

Diagnostische Bedeutung

Die Hauptkomponente des Serum-Transferrins ist ein Glykoprotein mit einer Molekularmasse von ca. 80 kD, das zwei Polysaccharid-Seitenketten enthält. Jede Seitenkette trägt zwei endständige Sialinsäurereste. Humanes Serum-Transferrin kann jedoch in unterschiedlichen Isoformen mit verschiedenen Glykosylierungsgraden vorkommen¹.

Bei gesunden Probanden dominiert mit ca. 90 % die Tetrasialoform mit zwei Kohlenhydratseitenketten, die jeweils zwei endständige Sialinsäurereste aufweisen¹. Infolge erhöhten Alkoholkonsums treten vermehrt Transferrinmoleküle auf, die nur eine Kohlenhydratseitenkette aufweisen (Disialotransferrin), oder sogar keine Kohlenhydratseitenkette tragen (Asialotransferrin)². Diese und weitere durch Alkoholkonsum induzierten strukturell veränderten Transferrin-Isoformen werden als CDT (Carbohydrate-deficient Transferrin) bezeichnet^{1,3}.

Ein täglicher Alkoholkonsum von ca. 50 - 60 g Ethanol über zwei Wochen führt in der Regel zu erhöhten CDT-Spiegeln. Eine Normalisierung erhöhter CDT-Werte ist nach einer Alkoholabstinenz von ca. zwei bis vier Wochen, in Abhängigkeit von der Höhe des CDT-Spiegels, zu erwarten^{4,5}.

Die Bestimmung von CDT liefert einen wertvollen Beitrag zur Erkennung von Patienten mit chronisch erhöhtem Alkoholkonsum, zum Monitoring von Änderungen im Alkoholkonsum und zur Abstinenzkontrolle. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass CDT einen der spezifischsten Marker für einen über längere Zeit erhöhten Alkoholkonsum darstellt^{4,5,6}.

Unter den nicht-Alkohol-bedingten Erkrankungen, die eine CDT-Erhöhung auslösen können, sind chronisch aktive Hepatitiden, primäre Gallenstaunungszyrrosen, Leberschäden und das äußerst seltene CDG- (Carbohydrate-deficient Glycoprotein) Syndrom zu nennen^{1,4}.

Die Berechnung von % CDT aus der CDT-Konzentration und der Transferrin-Konzentration erlaubt eine weitgehende Minimierung der Einflüsse von Transferrin-Spiegel, Eisen-Status, und leichter bis mittelgradiger Leberfunktionseinschränkungen auf das CDT-Resultat. Eine weitere Verbesserung der diagnostischen Vorhersagekraft kann durch die Kombination von CDT und γ GT (γ -Glutamyltransferase) erzielt werden^{2,7}.

Prinzip der Methode

Kompetitiver Assay

Das CDT der Probe konkurriert mit CDT-beladenen Polystyrol-Partikeln um die Bindung an spezifische, monoklonale Antikörper gegen humanes CDT, die ebenfalls an Polystyrol-Partikel gebunden sind. Bei Anwesenheit von CDT in der Probe erfolgt keine bzw. eine abgeschwächte Aggregation der Polystyrol-Partikel. Bei Abwesenheit von CDT in der Probe aggregieren die Polystyrol-Partikel. Je höher der CDT-Gehalt im Ansatz, um so geringer ist das Streulichtsignal. Die Auswertung erfolgt im Vergleich mit einem Standard bekannter Konzentration.

Reagenzien

Inhalt der Handelspackung

N Latex CDT Kit, Bestell-Nr. OPCS

- N CDT Reagenz 1, drei Flaschen mit je 0,9 ml
- N CDT Reagenz 2, drei Flaschen mit je 0,9 ml
- N CDT Zusatzreagenz, drei Flaschen mit je 2 ml
- N CDT Standard SL, drei Flaschen mit je 1 ml
- N CDT Kontrolle SL/1, drei Flaschen mit je 1 ml
- N CDT Kontrolle SL/2, drei Flaschen mit je 1 ml

Zusammensetzung und Standardisierung

N CDT Reagenz 1 besteht aus einer Suspension von Polystyrol-Partikeln, die mit Carbohydrate-deficient Transferrin (< 0,017 g/l) beladen sind.

N CDT Reagenz 2 besteht aus einer Suspension von Polystyrol-Partikeln, die mit monoklonalen Anti-CDT Antikörpern (Maus) (< 0,009 g/l) beladen sind.

N CDT Zusatzreagenz besteht aus einer Phosphat-gepufferten Kochsalzlösung mit Polyethylenglycol-sorbitanmonolaurat (5 g/l) und EDTA (< 0,2 mol/l).

N CDT Standard SL (human) besteht aus einer stabilisierten Humanserum-Matrix und Carbohydrate-deficient Transferrin. Die Konzentration von CDT wurde unter Bezugnahme auf gereinigtes CDT kalibriert. Der Analysenwert des N CDT Standard SL ist auf der beiliegenden Tabelle angegeben.

N CDT Kontrolle SL/1 und N CDT Kontrolle SL/2 (human) bestehen jeweils aus einer stabilisierten Humanserum-Matrix und Carbohydrate-deficient Transferrin. Die Konzentration von CDT wurde unter Bezugnahme auf den N CDT Standard SL kalibriert. Sollwert und Vertrauensbereich der N CDT Kontrolle SL/1 und N CDT Kontrolle SL/2 werden auf der beiliegenden Tabelle angegeben. Diese enthält darüber hinaus die Transferrin-Konzentration sowie eine %CDT-Angabe für die N CDT Kontrollen SL/1 und SL/2, wobei die Transferrin-Konzentration unter Bezugnahme auf N Protein-Standard SL kalibriert wurde und die %CDT-Angabe aus der jeweiligen CDT- und Transferrin-Konzentration berechnet wurde.

Konservierungsmittel

N CDT Reagenz 1 und N CDT Reagenz 2: Gentamicin 6,25 mg/l, Amphotericin 0,625 mg/l

N CDT Zusatzreagenz, N CDT Standard SL, N CDT Kontrolle SL/1 und N CDT Kontrolle SL/2: Natriumazid < 1 g/l.

Warnung und Vorsichtsmaßnahmen

- Nur zur *in-vitro*-diagnostischen Anwendung.
- Beim Umgang mit Natriumazid-haltigen Reagenzien ist zu beachten:
Verschlucken und Berührung mit Haut oder Schleimhäuten vermeiden. Bei Entsorgung ins Abwasser mit viel Wasser nachspülen. Natriumazid kann mit Schwermetallen, wie Kupfer oder Blei, explosive Azide bilden.
- Jede individuelle Spende, die zur Herstellung von N CDT Reagenz 1, N CDT Reagenz 2 sowie N CDT Standard SL, N CDT Kontrolle SL/1 und SL/2 vorgesehen war, wurde auf HBsAg, auf Anti-HCV, auf Anti-HIV1 und auf Anti-HIV2 untersucht. Für die Herstellung wurden nur Spenden mit negativem Befund verwendet. Unabhängig davon sollten alle aus menschlichem Gewebe oder Körperflüssigkeiten gewonnenen Materialien wegen nie auszuschließender Gefährdung durch Krankheitserreger mit angemessener Sorgfalt unter Einhaltung der bei Biogefährdung empfohlenen Sicherheitsmaßnahmen gehandhabt werden⁸.

Vorbereitung der Reagenzien

Die Reagenzien sowie Standard und Kontrollen sind gebrauchsfertig und können ohne weitere Vorbehandlung eingesetzt werden. Sie sind vor dem ersten Gebrauch behutsam aufzuschütteln.

haltbarkeit und Lagerungsbedingungen

Die Reagenzien sind lichtgeschützt zu lagern!

Lagerung bei +2 bis +8 °C:

das Verfallsdatum ist auf dem Etikett angegeben;

Stabilität nach Öffnen:

zwei Wochen für alle Reagenzien, Standard und Kontrollen, sofern unmittelbar nach Gebrauch wieder dicht verschlossen bei +2 bis +8 °C gelagert. Die Reagenzien dürfen nicht eingefroren werden.

Stabilität auf den BN[®] II und BN ProSpec[®] System:

minimal drei Tage mit jeweils acht Stunden, oder ein vergleichbarer Zeitraum.

Hinweis: Die „on-board“ Stabilität hängt von dem verwendeten BN[®] System sowie den Laborbedingungen ab. Weiterführende Angaben sind in den Bedienungsanleitungen des BN[®] II und des BN ProSpec[®] Systems enthalten.

Die „on-board“ Stabilität der N CDT Kontrolle SL/1 und SL/2 auf dem BN ProSpec[®] System sind in der Bedienungsanleitung des Systems angegeben.

Zusätzlich benötigte Materialien

BN[®] II oder BN ProSpec[®] System

N Zusatzreagenz L, Bestell-Nr. OQTD

N-Diluens, Bestell-Nr. OUMT

BN[®] II Evaporation Stoppers (wahlweise), Bestell-Nr. OVLE

Wahlweise, für die Transferrin-Bestimmung:

N Antiserum gegen Human-Transferrin, Bestell-Nr. OSAX

N Protein-Standard SL, Bestell-Nr. OQIM

N/T Protein-Kontrolle SL/L, M, H, Bestell-Nrn. OQIN, OQIO, OQIP (für die Qualitätssicherung der Transferrin-Bestimmung)

N-Reaktionspuffer, Bestell-Nr. OUMS

Verbrauchsmaterial und Ausrüstung wie in den Bedienungsanleitungen der BN[®] Systeme beschrieben.

Untersuchungsmaterial

Zur Messung sollen möglichst frische (maximal sieben Tage bei +2 bis +8 °C aufbewahrte) oder gefroren gelagerte humane Serumproben eingesetzt werden. Werden Proben innerhalb von 24 Stunden nach Entnahme tiefgefroren, so ist eine Lagerung unterhalb von -20 °C bis zu drei Monaten möglich, wenn wiederholtes Auftauen und Einfrieren vermieden wird. Serumproben müssen vollständig geronnen sein und dürfen nach Zentrifugation keine Partikel oder Spuren von Fibrin enthalten. Lipämische Proben oder eingefrorene Proben, die nach dem Auftauen trüb sind, müssen vor der Bestimmung durch Zentrifugation (10 Minuten bei ca. 15.000 x g) geklärt werden.

Testdurchführung

Hinweise

- Einzelheiten zur Bedienung der BN[®] Systeme sind der entsprechenden Bedienungsanleitung zu entnehmen.
- Am BN[®] II und BN ProSpec[®] System können bei +2 bis +8 °C gelagerte Reagenzien und Proben direkt zur Bestimmung eingesetzt werden.
- Damit am BN[®] II und BN ProSpec[®] System für eine Probe außer der CDT-Konzentration auch die Angabe in %CDT erfolgen kann, muss die Transferrin-Konzentration der entsprechenden Probe mit dem an den BN[®] Systemen zur Verfügung stehendem Transferrin Assay ermittelt werden.
- Der jeweils für die N CDT Kontrolle SL/1 und SL/2 angegebene Transferrin-Gehalt dient der Berechnung von %CDT einzelner Kontrollmessungen. Er ist nicht für die Qualitätskontrolle des Transferrin-Assays der BN[®] Systeme geeignet.

Assay-Protokoll an den BN[®] Systemen

Das Assay-Protokoll für Serum ist in der Bedienungsanleitung sowie der Software des jeweiligen Gerätes enthalten. Alle Schritte werden automatisch vom System durchgeführt.

Erstellung der Referenzkurve

Referenzkurven werden über Mehrpunktkalibrierung erzeugt. Für die Erstellung werden automatisch Verdünnungsreihen des N CDT Standards SL mit N-Diluens hergestellt. Die Standard-Verdünnungen müssen innerhalb von vier Stunden verwendet werden. Der Analysenwert ist der beiliegenden Tabelle zu entnehmen. Am BN ProSpec[®] System kann er per Chargenangaben-CD (Bestell-Nr. OVLP) eingelesen werden. Die Referenzkurve ist zwei Wochen gültig. Sie kann über diesen Zeitraum hinaus verwendet werden, solange Kontrollen mit verfahrensabhängigen Sollwerten, wie z. B. die N CDT Kontrolle SL/1 und N CDT Kontrolle SL/2, innerhalb ihres jeweiligen Vertrauensbereiches wiedergefunden werden. Bei Verwendung einer anderen Reagenzcharge muss eine neue Referenzkurve erstellt werden. Der exakte Messbereich hängt von der CDT-Konzentration jeder N CDT Standard SL Charge ab. Typische Messbereiche sind in der Bedienungsanleitung des jeweiligen BN[®] Systems angegeben.

Messung der Patientenproben

Proben werden automatisch 1:5 mit N-Diluens verdünnt. Sie müssen innerhalb von vier Stunden gemessen werden. Das manuelle Auswählen einer anderen Probenverdünnung als 1:5 ist nicht zulässig.

Interne Qualitätskontrolle

Die N CDT Kontrollen SL/1 und SL/2 sollten nach jeder Erstellung einer Referenzkurve, bei erstmaliger Verwendung einer Reagenzabfüllung, sowie bei jeder Serie von Proben eingesetzt werden. Die Kontrollen werden im Ansatz und bei der Auswertung wie Patientenproben behandelt. Sollwert und Vertrauensbereich der Kontrollen sind der beiliegenden Tabelle zu entnehmen. Am BN ProSpec® System kann er per Chargenangaben-CD (Bestell-Nr. OVLP) eingelesen werden. Die angegebenen Sollwerte dienen zur Qualitätskontrolle innerhalb eines Labors zur Bewertung der Präzision und analytischen Abweichung. Bei der Verwendung als Präzisionskontrolle sollten in einer Vorperiode Kontrollwert und Kontrollgrenzen vom Anwender ermittelt werden. Wenn das Ergebnis der Kontrollmessungen außerhalb des Vertrauensbereichs liegt, ist die Kontrollbestimmung zu wiederholen. Wird die Abweichung durch die Wiederholungsmessung bestätigt, sollte eine neue Referenzkurve aufgenommen werden.

Ergebnisse

Die Auswertung erfolgt automatisch in mg/l oder in einer vom Benutzer am BN* System auszuwählenden abgeleiteten Einheit.

Zusätzlich ist die Berechnung von %CDT in die Software der BN* Systeme integriert. Bei gleichzeitiger Bestimmung von CDT und Transferrin aus derselben Probe kann als Ergebnis auch %CDT erhalten werden.

Einschränkungen der Testdurchführung

Trübungen und Partikel in den Proben können die Bestimmung stören. Deshalb müssen Proben, die Partikel enthalten, vor der Bestimmung zentrifugiert werden. Lipämische oder partikelhaltige Proben, die durch Zentrifugation (10 Minuten bei ca. 15.000 x g) nicht zu klären sind, sind von der Bestimmung auszuschließen.

Patientenproben können heterophile Antikörper enthalten. Dieser Assay ist so ausgelegt, dass der Einfluss heterophiler Antikörper minimiert ist. Dennoch kann eine komplette Unterdrückung ihrer Effekte nicht garantiert werden.

Dade Behring hat den Einsatz dieser Reagenzien auf verschiedenen Analysengeräten auf optimale Produktleistung und Einhaltung der Produktspezifikationen überprüft. Vom Benutzer vorgenommene Änderungen werden von Dade Behring nicht unterstützt, da sie die Leistung des Systems und die Testergebnisse beeinflussen können. Es liegt in der Verantwortung des Benutzers Änderungen an diesen Anleitungen oder die Verwendung dieser Reagenzien auf anderen als in den Applikationsvorschriften von Dade Behring oder diesen Gebrauchsanweisungen genannten Analysengeräten zu validieren. Resultate dieses Tests sollten stets in Verbindung mit der Vorgeschichte des Patienten, dem klinischen Bild und anderen Untersuchungsergebnissen interpretiert werden.

Aufgrund von Matrixeffekten können für Kontroll- und Ringversuchsproben unterschiedliche Ergebnisse in Abhängigkeit von der verwendeten Bestimmungsmethode resultieren. Es kann daher notwendig sein, die Bewertung dieser Ergebnisse an methoden-spezifischen Zielwerten vorzunehmen.

Referenzbereich

Bei einer Untersuchung von Serumproben von 561 gesunden Erwachsenen aus Mitteleuropa, bei denen ein erhöhter Alkoholkonsum ausgeschlossen worden war, lagen die mit dem N Latex CDT Reagenz ermittelten Ergebnisse im Bereich von 28,1 - 76,0 mg/l CDT (1. bis 99. Perzentile). Die %CDT-Werte in dieser Population, bezogen auf die mit dem N Antiserum gegen Human Transferrin erhaltenen Resultate, lagen im Bereich von 1,19 - 2,47 %CDT (1. bis 99. Perzentile).

Darüber hinaus sollte jedes Labor seine eigenen Referenzbereiche ermitteln, da die Ergebnisse in Abhängigkeit von dem untersuchten Kollektiv variieren können.

Leistungsmerkmale der Bestimmung

Empfindlichkeit

Die analytische Empfindlichkeit der Bestimmung wird durch die untere Grenze der Referenzkurve festgelegt und ist damit abhängig von der Konzentration des Analyten im N CDT Standard SL. Eine typische Nachweisgrenze für CDT ist 20 mg/l.

Spezifität

Es sind keine Kreuzreaktionen des verwendeten Antikörpers bekannt.

Präzision

Die Präzision von N Latex CDT wurde ermittelt, in dem Kontrollen und zwei Serumpools mit unterschiedlicher CDT-Konzentration bestimmt und die Variationskoeffizienten (VK) berechnet wurden.

	Präzision (n = 40)			
	Mittelwert	In der Serie	Von Lauf zu Lauf	Gesamt
	VK	VK	VK	VK
Probe	(mg/l)	(%)	(%)	(%)
N CDT Kontrolle SL/1	61,6	4,2	1,6	4,2
N CDT Kontrolle SL/2	166,2	2,8	1,5	3,0
Serumpool 1	49,4	4,9	7,6	8,9
Serumpool 2	213,9	3,5	2,4	4,0

Die Variationskoeffizienten für %CDT dieser Proben wurden basierend auf den mit dem N Antiserum gegen Human Transferrin an einem BN* System ermittelten Resultat berechnet und betragen zwischen 1,8 % und 9,8 %.

Methodenvergleich

Die für Serumproben von 200 Probanden ermittelten %CDT-Werte wurden zum einen mit Hilfe der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) bestimmt, zum anderen an einem BN* System. Wird für die am BN* System erhobenen %CDT-Werte eine Entscheidungsgrenze (Cut-off) von 2,5 %CDT zu Grunde gelegt, ergibt sich im Vergleich zu den mit der HPLC ermittelten %CDT-Werten eine Spezifität von 97 % sowie eine Sensitivität von 93 %.

Anmerkung

Die angegebenen Werte für die Leistungsmerkmale der Bestimmung stellen typische Ergebnisse dar und sind nicht als Spezifikation für N Latex CDT anzusehen.

Literatur:

siehe englische Packungsbeilage

* BN ist eine Marke der Dade Behring Marburg GmbH in den USA.

BN ProSpec ist eine eingetragene Marke der Dade Behring Marburg GmbH in den USA, Deutschland und anderen Ländern.

Dade Behring Marburg GmbH
Emil-von-Behring-Str. 76
35041 Marburg/Germany
www.dadebehring.com



Ausgabe April 2006

N Latex CDT Kit

Domaine d'utilisation

Réactifs *in vitro* pour la détermination quantitative de la transferrine déficiente en hydrates de carbone (Carbohydrate Deficient Transferrin - CDT) dans le sérum humain, par immunonéphéométrie sensibilisée avec des particules à l'aide des systèmes BN* II et BN ProSpec®, pour le dépistage de la consommation excessive et chronique d'alcool.

Intérêt diagnostique

Le composant principal de la transferrine sérique est une glycoprotéine d'un poids moléculaire d'env. 80 kD, qui contient deux chaînes latérales de polysaccharides. Chaque chaîne latérale porte deux résidus terminaux d'acide sialique. La transferrine sérique humaine peut toutefois se présenter sous différentes isoformes en fonction des taux de glycosylation¹.

Chez les sujets sains, la forme prépondérante est à 90 % la tétrasialoforme avec deux chaînes latérales d'hydrate de carbone, qui présentent chacune deux résidus terminaux d'acide sialique¹. La consommation d'alcool entraîne la multiplication des molécules de transferrine ne présentant qu'une seule chaîne latérale d'hydrate de carbone (disialotransferrine), ou même aucune (asialotransferrine)². Ces isoformes de transferrine ainsi que d'autres isoformes structurellement modifiées, induites par la consommation d'alcool, sont désignées sous le nom de CDT (Carbohydrate deficient Transferrine)^{1,3}.

OPCS G03 C0543 (1484) CS 3

Une consommation quotidienne d'env. 50 à 60 g d'éthanol pendant deux semaines conduit généralement à une augmentation des taux de CDT. La normalisation des taux augmentés de CDT s'observe après une abstinence alcoolique d'env. deux à quatre semaines, selon le niveau du taux de CDT^{3,4}.

Le dosage de la CDT est une aide utile au dépistage des patients consommant de l'alcool de façon excessive et chronique, au suivi des modifications de consommation d'alcool et au contrôle de l'abstinence. Différentes études ont montré que la CDT représente un marqueur spécifique d'une consommation excessive d'alcool sur une période assez longue^{4,5,6}.

Parmi les maladies non liées à l'alcool qui peuvent déclencher une augmentation de la CDT, on peut citer les hépatites chroniques actives, les cirrhoses biliaires primitives, les insuffisances hépatiques et le syndrome CDG (Carbohydrate Deficient Glycoprotein), extrêmement rare^{1,4}.

Le calcul du % de la CDT par rapport à la concentration de transferrine totale permet de minimiser largement l'influence du taux de transferrine, du statut ferrique et des dysfonctionnements hépatiques légers à modérés sur le résultat de CDT. On obtient une meilleure prédiction diagnostique en combinant les résultats de CDT et de γ GT (γ -glutamyltransférase)^{5,7}.

Principe de la méthode

Test compétitif

La CDT présente dans l'échantillon entre en compétition avec des particules de polystyrène pour se fixer aux anticorps monoclonaux anti-CDT humaine spécifiques, également fixés sur des particules de polystyrène. En présence de CDT dans l'échantillon, il n'y a pas, ou qu'une faible, aggrégation des particules. En l'absence de CDT dans l'échantillon, il y a aggrégation des particules de polystyrène. Plus le taux de CDT de l'échantillon est élevé, plus le signal lumineux est faible. L'exploitation se fait par comparaison avec un standard de concentration connue.

Réactifs

Conditionnement

N Latex CDT Kit, code OPCS

N CDT Réactif 1, trois flacons de 0,9 ml

N CDT Réactif 2, trois flacons de 0,9 ml

N CDT Réactif complémentaire, trois flacons de 2 ml

N CDT Standard SL, trois flacons de 1 ml

N CDT Contrôle SL/1, trois flacons de 1 ml

N CDT Contrôle SL/2, trois flacons de 1 ml

Composition et standardisation

N CDT Réactif 1 est composé d'une suspension de particules de polystyrène recouvertes de transferrine déficiente en hydrates de carbone (< 0,017 g/l).

N CDT Réactif 2 est composé d'une suspension de particules de polystyrène recouvertes d'anticorps monoclonaux (souris) anti-CDT (< 0,009 g/l).

N CDT Réactif complémentaire est composé de solution saline tampon phosphate additionnée de polyéthylène glycol sorbitan monolaurate (5 g/l) et d'EDTA (< 0,2 mol/l).

N CDT Standard SL (humain) est composé d'une matrice de sérum humain stabilisée et de transferrine déficiente en hydrates de carbone. La concentration de CDT est étalonnée par rapport à la N CDT purifiée. La valeur théorique du N CDT Standard SL est indiquée dans le tableau ci-joint.

N CDT Contrôle SL/1 et N CDT Contrôle SL/2 (humains) sont composés d'une matrice de sérum humain stabilisée et de transferrine déficiente en hydrates de carbone. La concentration de CDT est étalonnée par rapport au N CDT Standard SL. La valeur théorique et l'intervalle de confiance de chacun des contrôles sont indiqués dans le tableau ci-joint. Celui-ci indique également pour chaque contrôle la concentration en transferrine, ainsi que le % de CDT ; la concentration en transferrine est étalonnée par rapport au N Standard Protéines SL, et le % de CDT est calculé à partir des concentrations de transferrine et de CDT.

Conservateurs

N CDT Réactif 1 et N CDT Réactif 2 : 6,25 mg/l de gentamicine, 0,625 mg/l d'amphotéricine

N CDT Réactif complémentaire, N CDT Standard SL, N CDT Contrôle SL/1 et N CDT Contrôle SL/2 : azide de sodium < 1 g/l

Mises en garde et précautions d'emploi

1. Réservez à un usage de diagnostic *in vitro*.

2. Les réactifs contenant de l'azide de sodium doivent être manipulés avec précaution :

Ne pas avaler et éviter tout contact avec la peau et les muqueuses. En cas d'évacuation dans l'évier, rincer avec beaucoup d'eau. L'azide de sodium peut devenir explosif au contact de métaux lourds comme le cuivre ou le plomb.

3. Tout don de sang individuel prévu pour la préparation du N CDT Réactif 1, du N CDT Réactif 2, du N CDT Standard SL, du N CDT Contrôle SL/1 ou du N CDT Contrôle SL/2 a été testé vis-à-vis de l'anticorps AgHBs, de l'anticorps anti-VHC, de l'anticorps anti-VIH1 et de l'anticorps anti-VIH2. Seuls les dons trouvés négatifs ont été utilisés. Néanmoins, toutes les préparations obtenues à partir de tissu ou de liquide humain doivent être manipulées avec les précautions nécessaires en cas de risque biologique, dans la mesure où l'on ne peut exclure totalement un risque d'infection⁸.

Préparation des réactifs

Les Réactifs ainsi que le Standard et les Contrôles sont prêts à l'emploi et peuvent être utilisés sans aucun traitement préalable. Les mélanger en les agitant avec précaution avant la première utilisation.

Stabilités et conditions de conservation

Les réactifs doivent être conservés à l'abri de la lumière !

Conservation à +2/+8 °C :

la date de péremption est indiquée sur l'étiquette;

Stabilité après ouverture :

deux semaines pour les Réactifs, Standard et Contrôles, à condition de bien refermer les flacons et de les replacer à +2/+8 °C immédiatement après emploi. Ne pas congeler les réactifs.

Stabilité sur les systèmes BN* II et BN ProSpec® :

au moins trois jours de huit heures chacun, ou période équivalente.

Remarque : la stabilité « on-board » dépend du système BN* utilisé ainsi que des conditions d'analyse du laboratoire. Pour plus de détails, se reporter aux manuels d'utilisation des systèmes BN* II et BN ProSpec®.

La stabilité « on-board » des N CDT Contrôles SL/1 et SL/2 sur le système BN ProSpec® est indiquée dans le manuel d'utilisation du système.

Matériel et autres réactifs nécessaires

Système BN* II ou BN ProSpec®

N Réactif complémentaire L, code OQTD

N-Diluant, code OUMT

BN* II Bouchons anti-évaporation (utilisation optionnelle), code OVLE

Au choix, pour le dosage de la transferrine :

N Antisérums anti-Transferrine humaine, code OSAX

N Standard Protéines SL, code OQIM

N/T Contrôles Protéines SL/L, M, H, codes OQIN, OQIO, OQIP (pour l'assurance qualité du dosage de la transferrine)

N Tampon de réaction, code OUMS

Consommable et équipement selon les instructions des manuels d'utilisation des systèmes BN*.

Echantillons à tester

Utiliser des échantillons sériques humains, de préférence frais (conservés sept jours maximum à +2/+8 °C), sinon congelés. S'ils sont congelés dans les 24 heures qui suivent leur prélèvement et conservés à < -20 °C, ils peuvent être utilisés pendant trois mois ; ne les congeler qu'une seule fois. Les échantillons sériques doivent être totalement coagulés et ne plus contenir ni particules ni traces de fibrine après centrifugation. Les échantillons lipémiques ou devenus troubles après décongélation doivent être clarifiés par centrifugation (10 min à env. 15 000 x g) avant leur emploi dans le test.