



IVD

LIAPHEN™ AT

REF 120002 R1 2 x 2 ml, R2 2 x 10 ml

REF 120008 R1 2 x 1,5 ml, R2 2 x 5 ml

Turbidimetrický immuassay pro stanovení Antitrombinu (AT).

Tekuté reagentie připravené k použití.



www.hyphen-biomed.com

155, rue d'Eragny
95000 NEUVILLE SUR OISE
FRANCE
Tel. : +33 (0)1 34 40 65 10
Fax : +33 (0)1 34 48 72 36
info@hyphen-biomed.com

Revize: 12_2025, verze 3

POUŽITÍ:

LIAPHEN™ AT souprava je turbidimetrický immunoassay pro in vitro kvantitativní stanovení antigenu Antitrombinu (AT:Ag) v lidské citrátové plazmě při použití manuální nebo automatizované metody. Reagentie jsou tekuté, připravené k použití.

SHRNUTÍ:

Technické:

AT je jeden z hlavních fyziologických koagulačních inhibitorů. Blokuje aktivitu serinových estráz, specificky Thrombinu, Faktoru Xa (FXa) a IXa. AT reguluje rychlost koagulačního procesu a zabraňuje trombóze. V komplexu s heparinem se AT stává silným a rychle působícím inhibitorem koagulace¹.

Klinické:

Spontánní tromboembolické potíže jsou pozorovány u pacientů s vrozeným deficitem AT, který se řadí do 4 skupin^{2,3,4}.

Koncentrace AT je snížena u novorozenců, u různých stavů jako je těhotenství, poškození jater, DIC, atd⁴.

Funkční testy na AT spojené s immunoassay metodami umožní charakterizovat typ deficiencie.

PRINCIP TESTU:

LIAPHEN AT je immunoturbidimetrický test užívající latexové částice pro in vitro stanovení Antitrombinu (AT). Testovaný vzorek je smíchán s reakčním pufr (R2) a s latexovým reagentem (R1). Protilátky proti AT, navázané na latexových částicích reagují s AT ve vzorku a dojde k aglutinaci částic. Velikost aglutinace je přímo úměrná množství AT ve vzorku. Detekuje se absorpcí světla (A620 nm nebo specifické vlnové délky automatu).

REAGENCIE:

R1 Latex, tekutá reagentie. Obsahuje BSA.

R2 Reakční pufr, Hepes NaCl pufr, tekutá reagentie.

REF 120002

R1 2 lahvičky po 2 ml

R2 2 lahvičky po 10 ml

REF 120008

R1 2 lahvičky po 1,5 ml

R2 2 lahvičky po 5 ml

VAROVÁNÍ:

- Některé reagentie v soupravě obsahují materiál zvířecího původu. Manipulujte s reagentiemi dle všech příslušných bezpečnostních regulací, jako by se jednalo o materiál potencionálně infekční.
- Odpad likvidujte dle příslušných místních platných regulací.
- Studie stability prokazují, že reagentie mohou být transportovány při pokojové teplotě bez degradace.
- Reagentie jsou pouze pro in vitro diagnostické použití v laboratoři.

PŘÍPRAVA REAGENCIE:

R1 **R2** Reagentie jsou připraveny k použití. Homogenizujte před použitím opatrně, abyste zabránili tvorbě pěny a ihned vložte do analyzátoru, dle specifického aplikačního protokolu.

Pro manuální metodu nechte reagentie stabilizovat 30 minut při pokojové teplotě (18-25°C), homogenizujte před použitím.

SKLADOVACÍ PODMÍNKY A STABILITA:

Reagentie musí být skladovány při 2-8°C v jejich originálních obalech. Pak jsou stabilní do data expirace uvedeného na obalu.

R1 **R2** Stabilita otevřené reagentie, pokud je zamezeno kontaminaci nebo odpařování a pokud je reagentie skladována uzavřená, je:

- 6 měsíců při 2 – 8°C
- 7 dní při pokojové teplotě (18 – 25°C)
- Nemrazte.
- Stabilita v analyzátoru: Viz specifický aplikační protokol.

REAGENCIE A MATERIÁL POTŘEBNÝ, V KITU NEPŘÍTOMNÝ:

Reagentie:

- Destilovaná voda.
- Fyziologický roztok (0,9% NaCl).
- Specifické kalibrátory a kontroly se známou hladinou AT:Ag:

Název produktu	Referenční číslo
BIOPHEN™ Plasma Calibrator	222101
BIOPHEN™ Normal Control Plasma	223201
BIOPHEN™ Abnormal Control Plasma	223301

Viz specifický aplikační protokol pro použitý analyzátor.

Materiál:

- Spektrofotometr nebo automatický analyzátor pro immunoturbidimetrické měření.
- Stopky, kalibrované pipety, plastové zkumavky nebo kvety do spektrofotometru.

VZOREK:

Krev (9 dílů) musí být odebrána do 0,109 M tri-sodného citrátového antikoagulancia (1 díl; 0,109M, 3,2%), přímou venepunkcí. První odebraná zkumavka by měla být znehodnocena.

Vzorky by měly být připraveny a skladovány dle relevantních řádů.

Pro skladování plazmy se odkažte na reference^{5,6}.

POSTUP MĚŘENÍ:

Souprava LIAPHEN AT je určena pro automatické nebo manuální metody. Měření provádějte při 37°C a turbiditu měřte při 620 nm (mohou být použity i jiné vlnové délky, nejlépe mezi 450 a 700 nm).

Pro automatickou metodu je aplikační protokol k dispozici na vyžádání.

Viz specifický aplikační protokol pro použitý analyzátor.

Manuální ředění latexu není zapotřebí pro automatické metody.

Postup:

1. Rozpusťte kontroly, kalibrátory nebo vzorky dle jejich specifických instrukcí nebo laboratorních postupů.

Pro kalibrátor se známou hladinou AT:Ag (C%) a pracovním ředěním 1:15 by měla být hladina 150% (v kontextu měření) získána ředěním kalibrátoru následujícím faktorem: $10x(C)/100$ tedy $D = C (v \%) : 10$.

Kalibrační křivka je stanovena z poolové normálové citrátové plazmy (alespoň 30 zdravých lidí, muži a ženy, věkem mezi 18 a 55 s žádnou známou léčbou nebo nemocí), která má dle definice AT:Ag 100%. Měření obsahuje 1:15 ředění plazmy, které představuje, dle definice, 100% hladinu AT:Ag. 1:10 ředění fyziologického roztoku představuje 150% AT:Ag.

Připravte 2 ml 1:10 normální citrátové poolové plazmy, nebo 1:D (D = C:10) ředění kalibrátoru (C1) odpovídající 150% AT:Ag. Stanovte kalibrační křivku sérií ředění ve fyziologickém roztoku, viz tabulka níže:

Standard	C1	C2	C3	C4	C5	C6
%AT:Ag	150	100	75	50	25	0
Objem standardu	2000 μl	600 μl C1	500 μl C1	500 μl C2	500 μl C4	0 μl
Fyziologický roztok	0 μl	300 μl	500 μl	500 μl	500 μl	1000 μl

Pro manuální metodu musí být kalibrační křivka stanovena pro každou sérii testů.

2. Naředit vzorky a kontroly ve fyziologickém roztoku, viz tabulka níže:

Vzorky	Referenční číslo	Ředění
BIOPHEN™ Normal Control Plasma	223201	1:15
BIOPHEN™ Abnormal Control Plasma	223301	1:15
Vzorky	-	1:15

Pro stanovení purifikovaného AT vzorky a kontroly musí být ředěny ve fyziologickém roztoku obsahujícím 1% BSA (konečná koncentrace je pak kolem 0,5 až 10 µg/ml).

Stanovte kalibrační křivku a proveďte kontrolu kvality. Pokud jsou ředěny vzorky skladovány při pokojové teplotě (18-25°C), musí být měřeny co nejdříve. Přesné koncentrace kalibrátorů a kontrol jsou uvedeny na letáčích přiložených k jejich balení.

3. Přidejte do zkumavky inkubované při 37°C:

Těsně před použitím připravte potřebné objemy R1 ředěné v R2 (viz níže)	
	Objem
Vzorky, kalibrátory nebo kontroly ředěné ve fyziologickém roztoku	100 µl
R1 Latex ředěný 1:5 v R2, předinkubovaný na 37°C a homogenizovaný před použitím	400 µl
Míchejte při 37°C přesně 15 minut, pak ihned:	
Míchejte a odečtěte absorbanci při 620 nm od fyziologického roztoku. Zachovávejte stejnou reakční dobu pro všechny vzorky.	

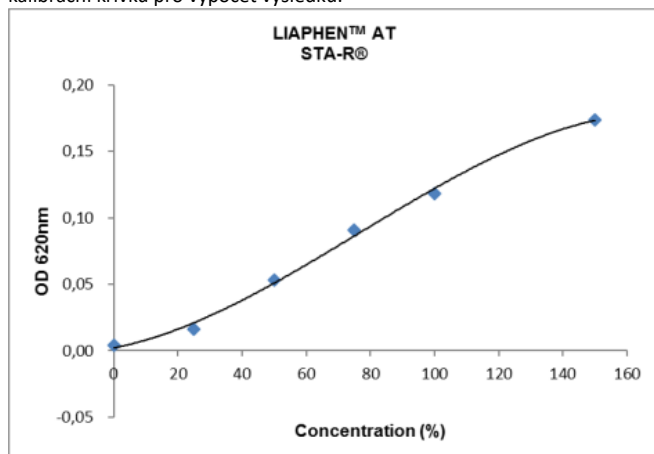
Vytvořte plasmatický blank, pokud je vzorek ikterický, lipemický, hemolyzovaný, nebo pokud je barva odlišná od standardních plazem.

Pokud jsou pro metodu potřeba jiné reakční objemy, než jsou uvedeny výše, musí být poměr reagensů a vzorku přísně dodržen. Každý uživatel je odpovědný za validaci provedených změn postupu a za jejich vliv na výsledek.

KALIBRACE:

Kalibrátor pokrývající rozmezí LIAPHEN™ AT měření je k dispozici od výrobce HYPHEN BioMed (viz REAGENCIE A MATERIÁL POTŘEBNÝ, V KTIU NEPŘÍTOMNÝ) a může být použit pro stanovení kalibrační křivky.

- Kalibrační rozmezí je přibližně od 0 do 150% (na STA-R®).
- Kalibrační křivka níže je uvedena pouze jako příklad. Stanovte vlastní kalibrační křivku pro výpočet výsledků.



KONTROLA KVALITY:

Použití kontrol slouží k validaci výsledků a homogenity měření v sérii nebo mezi sériemi pro danou šarži reagensů.

Začleňte kontroly kvality do každé série měření, podle pravidel laboratorní praxe.

Kalibrační křivka by měla být provedena pro každou sérii testů a pro novou šarži reagensie, po významné údržbě přístroje, nebo když jsou hodnoty kontrolního materiálu mimo přijatelné rozmezí.

Každá laboratoř by měla stanovit vlastní přijatelné rozmezí dle použitého přístroje a metody.

VÝSLEDKY:

- Pro manuální endpoint metodu stanovte kalibrační křivku bi-lineární s OD 620 nm podél osy Y a koncentrací AT:Ag, vyjádřenou v %, podél osy X (v nevhodnější interpolaci).
- Koncentrace AT (%) měřeného vzorku je přímo odečtena z kalibrační křivky, pokud byla použita standardní ředění.
- Pro ředění jiná než je uvedeno výše by měl být výsledek násoben použitým ředícím faktorem.

- Výsledky by měly být hodnoceny dle klinického a biologického stavu pacienta.

LIMITY:

- Pro zajištění optimálního průběhu testu a pro splnění specifikací by měly být dodrženy instrukce validované výrobcem HYPHEN BioMed.
- Reagencie s neobvyklým vzhledem nebo jevící známky kontaminace by měly být znehodnoceny.
- Vzorky podezřelého vzhledu nebo vzorky vykazující známky aktivace musí být znehodnoceny.
- Revmatoidní faktor může ovlivnit měření a vydávat falešně vyšší výsledky AT:Ag.
- Vliv Hook efektu na stanovení je uveden v aplikačním protokolu pro dany analyzátor (na přístroji STA-R® nebyl vyzorován dopad na stanovení pro koncentrace AT:Ag do 200%).

OČEKÁVANÉ HODNOTY:

Referenční rozmezí bylo měřeno u zdravých dospělých jedinců (n=100) na STA-R® (střed 90%, 95 percentil) mezi 86 a 124% AT:Ag. Každá laboratoř si musí stanovit vlastní normální rozmezí.

CHARAKTERISTIKA:

- Rozmezí měření závisí na použitém analytickém systému (od 11 do 150% AT:Ag na STA-R sérii).
- **Specificita:** AT deficitní plazma měří <5%.
- Studie výkonu byly provedeny vnitřně na Sysmex CS-5100 na laboratorních kontrolách po dobu 5 dní, 2 série denně a 3 opakování každé série pro hladinu kontroly. Byly získány následující hodnoty:

Kontroly	Intra assay			
	N	Průměr	CV%	SD
Vysoká	10	102	1,8	1,9
Normální	10	63	1,5	1,0
Nízká	10	23	3,0	0,7
	Inter assay			
	N	Průměr	CV%	SD
Vysoká	10	102	4,4	4,5
Normální	10	63	4,0	2,5
Nízká	10	23	7,4	1,7

- Korelace s referenční metodou (Berichom AT vs LIAPHEN™ AT na BSC-XP):
 $N = 62$ $y = 1,04x - 1,47$ $r = 0,987$
- **Interference:** Žádné interference na analyzátoru STA-R® pro následující molekuly do těchto hodnot:

Hepariny (UFH/LMWH)	2 IU/ml	Hemoglobin	500 mg/dl
Bilirubin	60 mg/dl	Intralipidy (ekvivalenty triglyceridů)	2000 mg/dl

Viz na specifický aplikační protokol pro daný analyzátor.

REFERENCE:

1. Mann K.G. Biochemistry and Physiology of blood coagulation. Thrombosis and Haemostasis. 1999.
2. Patnaik M.M. and Moll S. Inherited antithrombin deficiency: a review. Haemophilia. 2008.
3. Amiral J and Seghatchian J. Revisiting antithrombin in health and disease, congenital deficiencies and genetic variants, and laboratory studies on α and β forms. Transfus Apher Sci. 2018.
4. Khor B. and Van Cott E.M. Laboratory tests for antithrombin deficiency. American Journal of Hematology. 2010.
5. CLSI Document H21-A5: "Collection, transport, and processing of blood specimens for testing plasma -based coagulation assays and molecular hemostasis assays; approved guideline". 2008.
6. Mauge L. and Alhenc-Gelas M. Stabilité pré-analytique des paramètres de la coagulation: revue des données disponibles. Ann Biol Clin. 2014.

SYMBOLY:

Použité symboly a znaky jsou uvedeny v seznamu ISO 15223-1 standard, viz dokument definice symbolů.