


**BIOPHEN™ Antithrombin**

REF 221102 **R1** **R2** 2 x 2,5 ml; **R3** 2 x 5 ml

REF 221105 **R1** **R2** 4 x 5 ml; **R3** 4 x 10 ml

Chromogenni stanovení Antitrombinu v plazmě Anti-Xa metodou.

Datum Revize: 05\_2021

**POUŽITÍ:**

BIOPHEN™ Antithrombin soupravy jsou chromogenní testy pro in vitro kvantitativní stanovení aktivity heparin kofaktoru Antitrombinu (AT) v lidské citrátové plazmě Anti-Xa metodou, automatickou nebo manuální.

**SHRNUTÍ:**
**Technické:**

Antitrombin je hlavním fyziologickým koagulačním inhibítozem. Inhibuje obzvláště serinové proteázy, především Trombin, Faktor Xa a Faktor IXa, reguluje koagulační kaskádu a chrání před trombózou. Když vytvoří komplex s heparinem, stane se Antithrombin potentním a rychle reagujícím inhibítozem serinových proteáz<sup>1</sup>.

**Klinické:**

Vrozené nebo získané deficity AT korelují se zvýšeným rizikem trombozy. Spontánní trombo-embolická onemocnění jsou pozorována při vrozeném deficitu. Tyto vrozené deficity jsou klasifikovány do 4 skupin<sup>2,3,4</sup>:

- **Typ I:** Snížená koncentrace AT a snížená aktivita AT; to jsou nejčastější případy
- **Typ II RS (Reactive Site)** Normální koncentrace AT a snížená biologická aktivita; je přítomen protein s abnormalitou ve vazném místě pro serinové proteázy.
- **Typ II HBS (Heparin Binding Site):** Normální koncentrace AT, normální aktivita AT za nepřítomnosti heparinu, ale snížená za jeho přítomnosti.
- **Typ II (Pleiotropic):** Snížená koncentrace AT a snížená aktivita AT; nefunkční protein se sníženou hladinou.

**PRINCIP:**

BIOPHEN™ Antithrombin stanovení je kinetická metoda založená na inhibici Faktoru Xa, který se za konstantní koncentrace a v přebytku váže s Antitrombinem za přítomnosti heparinu. Zbývající Faktor Xa je potom měřen prostřednictvím jeho amidolytické aktivity na Faktor Xa specifický chromogenní substrát, který uvolňuje pNA. Množství uvolněného pNA je potom nepřímo úměrné koncentraci antitrombinu v testované plazmě<sup>5</sup>. Vzhledem k tomu, že toto stanovení není ovlivněno heparinem, mohou být tímto kitem měřeni i pacienti, kteří jsou na heparinové terapii.

Heparin + AT → [AT Hep.]

[AT Hep.] + [Přbytek FXa] → [FXa-AT-Hep.] + [Zbytek FXa]

[Zbytek FXa] + SXa-11 → Peptide + pNA

**REAGENCIE:**
**R1 Bovinní Faktor Xa:** Lyofilizováno, obsahuje BSA.

**R2 Faktor Xa specifický chromogenní substrát (SXa-11):** Lyofilizováno.

**R3 Tris-Heparin pufr:** pH 7,85, připraven k použití. Obsahuje malé množství Azidu sodného (0,9 g/l).

**BIOPHEN™ Antithrombin 2,5**

REF 221102

**R1** 2 lahvičky po 2,5 ml (obsahuje kolem 5µg FXa)

**R2** 2 lahvičky po 2,5 ml (obsahuje kolem 3,75 mg SXa-11)

**R3** 2 lahvičky po 5 ml

**BIOPHEN™ Antithrombin 5**

REF 221105

**R1** 4 lahvičky po 5 ml (obsahuje kolem 10µg FXa)

**R2** 4 lahvičky po 5 ml (obsahuje kolem 7,5 mg SXa-11)

**R3** 4 lahvičky po 10 ml

**UPOZORNĚNÍ A VAROVÁNÍ:**

- Některé reagenty v soupravě obsahují materiál zvířecího původu. Žádná metoda testování nemůže kompletně vyloučit přítomnost infekčních agens. Proto musí být tyto reagenty považovány za potenciálně infekční se všemi odpovídajícími bezpečnostními opatřeními.
- V kontaktu s olovenými nebo měděnými trubkami může Azid sodný vytvářet výbušné Azidy kovů.
- Odpad likvidujte podle místních příslušných regulací.
- Používejte pouze reagenty stejné šarže.
- Studie stability prokazují, že reagenty mohou být přepravovány za pokojové teploty bez poškození.
- Produkt je zamýšlen pro použití In Vitro v profesionální laboratoři.

**PŘÍPRAVA REAGENCIÍ:**

Abyste zabránili ztrátě produktu, opatrně odstraňte víčko lahvičky.

Rozpusťte obsah každé lahvičky s přesně:

**REF 221102**
**R1** 2,5 ml **R3**
**R2** 2,5 ml destilované vody

**REF 221105**
**R1** 5 ml **R3**
**R2** 5 ml destilované vody

Dobře promíchejte, dokud se produkt úplně nerozpustí. Zamezte tvorbě pěny. Vložte do analyzátoru a postupujte dle doporučení v aplikačním listu.

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

**R3** je připravena k použití.

**SKLADOVÁNÍ A STABILITA:**

Neotevřené reagenty skladujte při 2-8°C v originálním balení. Pokud jsou takto skladovány, reagenty mohou být použity do data expirace uvedeného na obale.

**R1** **R2** Stabilita zavřené rozpuštěné reagenty, v případě že je zabráněno kontaminaci a odpařování je:

- 3 měsíce při 2-8°C.
- 7 dní při pokojové teplotě (18-25°C).
- Nemrazte.
- Stabilita v analyzátoru: viz specifická aplikace.

Žluté zbarvení je známkou kontaminace substrátu. Reagenty znehodnotte a načněte novou lahvičku.

**R3** Stabilita otevřené reagenty, pokud je zamezeno odpařování a kontaminaci a je skladována uzavřená při 2-8°C, je stabilní do data expirace uvedeného na obalu.

**REAGENCIE A MATERIÁL POTŘEBNÝ, ALE NEPŘÍTOMNÝ:**
**Reagenty:**

- Destilovaná voda.
- Kyselina octová (20%) nebo kyselina citronová (2%) (End point metoda).
- Fyziologický roztok (0,9% NaCl).
- AT-Tris pufr-Anti Xa pro variantní metodu.
- Specifické plazmatické kalibrátory a kontroly:

Název Produktu	Referenční číslo
BIOPHEN™ Plasma Calibrator	221101
BIOPHEN™ Normal Control Plasma	223201
BIOPHEN™ Abnormal Control Plasma	223301

Odkážte se na specifický aplikační protokol pro použití analyzátoru.

**Materiál:**

- Spektrofotometr nebo automatický analyzátor pro chromogenní testy.
- Stopky.
- Kalibrované pipety, zkumavky ze silikonového skla nebo plastu nebo mikrotitrační destičky.

**ODBĚR A PŘÍPRAVA VZORKU:**

Krev (9 dílů) by měla být odebrána přímou venepunkcí do citrátu sodného (1 díl; 0,109 M, 3,2%). Znehodnotte první zkumavku.

Vzorek musí být připraven a skladován dle příslušných regulí (pro USA doporučení CLSI H21-A5). Pro skladování plazmy viz reference<sup>6,7</sup>.

**PROCEDURA:**

Souprava může být použita pro kinetickou automatickou nebo manuální (End Point) metodu.

Test provádějte při 37°C a barvu měřte při 405 nm.

**Průběh testu:**

1. Rekonstruuje kalibrátory a kontroly dle přiloženého návodu. Pro stanovení kalibrační křivky předte kalibrátory v fyziologickém roztoku viz níže, abyste stanovili kalibrační rozmezí („C“ definuje koncentraci AT):

Kalibrátor 221101	C	C:2	C:4	0
Kalibrační objem	500 µl	250 µl	125 µl	0 µl
Fyziologický roztok objem	0 µl	250 µl	375 µl	500 µl

2. Naředte vzorky ve fyziologickém roztoku, viz níže:

Vzorek	Referenční číslo	Ředění
Kontrola	223201	1:20
Kontrola	223301	1:20
Kalibrátor	222101	1:20
Vzorek	-	1:20

Stanovte kalibrační křivku a otestujte ji kontrolou kvality. Pokud naředěné vzorky skladujete při pokojové teplotě, testujte je rychle. Přesné koncentrace kalibrátorů a kontrol pro danou šarži jsou uvedeny na letáku přiloženém k jejich obalu.

3. Pipetujte na mikrotitrační destičku nebo do zkumavky, inkubované na 37°C:

	Mikrotitrační destička	Zkumavka
Ředěný vzorek, kontrola nebo kalibrátor	40 µl	80 µl
<b>R1</b> Faktor Xa inkubovaný na 37°C	100 µl	200 µl
Míchejte a inkubujte při 37°C, 1 minutu, pak přidejte:		
<b>R2</b> SXa-11 Substrát (inkubovaný 37°C)	100 µl	200 µl
Míchejte a inkubujte přesně:	1 minutu	1 minutu
Zastavte reakce přidáním		
Kyseliny citronové (2%)*	100 µl	200 µl
Promíchejte a měřte proti odpovídajícímu blank vzorku při vlnové délce 405nm.		

\*Nebo kyselinu octovou (20%). Žluté zbarvení je stabilní 2 hodiny. Blank vzorku je získán přidáním reagiencí v opačném pořadí, tedy kyselina citronová, R2, R1 a ředěný vzorek. Měřte při vlnové délce 405 nm. Odečtete naměřený blank od změřené absorbance testu.

Pokud je vzorek ikterický, lipemický, hemolyzovaný nebo zbarvený jinak než standardní plazmy, vytvořte plazmatický blank.

Pokud je zapotřebí použít jiný reakční objem, než je uveden výše, musí být poměr objemů přísně sledován, abyste zajistili optimální výkon testu. Uživatel je zodpovědný za validaci jakýchkoliv úprav a jejich dopadů na výsledky.

**Aplikační protokoly pro automatické metody na různé analyzátory jsou dostupné na vyžádání.**

#### Variace metody:

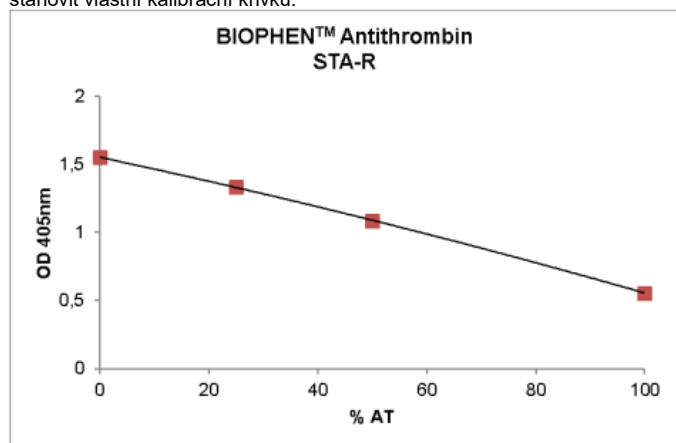
Pro identifikaci abnormality typu II, HBS (Heparin Binding Site), může být použita variace metody. Lahvička Bovinního FXa musí být rekonstituována s 2,5 ml Tris-pufu bez heparinu (AT- Tris puf- Anti Xa). Kalibrační křivka musí být stanovena s Plasma kalibrátorem a aktivita AT pacienta (HBS) je přímo odečtena z křivky. Specifický protokol je dostupný na vyžádání (D750-30/AT-prog/Anti Xa). Při HBS variantě má pacient normální aktivitu AT s touto metodou.

#### KALIBRACE:

BIOPHEN Antithrombin test může být kalibrován pro měření heparin kofaktorové aktivity AT. Kalibrátor pro dané rozmezí je dostupný od společnosti Hyphen BioMed (viz REAGENCIE A MATERIÁL POTŘEBNÝ, ALE NEPŘÍTOMNÝ) a může být použit pro stanovení kalibrační křivky.

- Kalibrační rozmezí je kolem 5 až 120%.

Kalibrační křivka níže je uvedena pouze jako příklad. Uživatel si musí stanovit vlastní kalibrační křivku.



#### KONTROLA KVALITY:

Kontrola kvality umožňuje validaci shody metody a homogenity mezi testy pro danou šarži reagentie.

Zažádejte kontrolu kvality do provozu pro každou novou sérii testů, abyste validovali test. Nová kalibrační křivka by měla být stanovena nejméně pro každou novou sérii testů, pro novou šarži reagentií, nebo pokud jsou naměřené hodnoty mimo přijatelné rozmezí.

Každá laboratoř si musí stanovit vlastní přijatelné rozmezí a verifikovat předpokládané výsledky pro vlastní analyzátor.

#### VÝSLEDKY:

- Pro manuální end-point metodu stanovte kalibrační křivku bi-lineárně s OD 405 nm na ose Y a koncentrací AT v % na ose X. Pro kinetickou metodu použijte ΔOD 405 místo OD 405.
- Koncentrace Antitrombinu (%AT) v testovaném vzorku je přímo odečtena z kalibrační křivky, pokud jsou použity standardní ředící poměry.
- Pokud jsou použita jiná ředění, získané hodnoty se musí násobit dle použitého dilučního faktoru.
- Výsledky by měly být hodnoceny dle pacientova klinického a biologického stavu.

#### LIMITY:

- Abyste zajistili optimální výkon testu a dosáhli specifikací, technické instrukce validované výrobcem Hyphen BioMed by měly být pečlivě následovány.
- Jakákoliv reagentie neobvyklého vzhledu nebo vykazující známky kontaminace musí být znehodnocena.
- Jakýkoliv podezřelý vzorek vykazující známky aktivace musí být znehodnocen.
- Protože je měření Anti-Xa metoda, není zde žádná interference od Heparin Kofaktoru II, α2-macroglobulin or α1-Antitrypsin<sup>1</sup>.

#### PŘEDPOKLÁDANÉ HODNOTY:

Dle definice 100% koncentrace AT koresponduje s koncentrací v normální lidské citrátové plazmě, získané od zdravých, nemedikovaných mužů a žen od 18 do 55 let. Hladina AT v plazmě zdravého dospělého člověka je mezi 80 a 120%. Koncentrace AT ≤ 70% indikuje přítomnost nedostatku, která musí být potvrzena jiným testem nebo testováním jiného vzorku od daného pacienta.

Koncentrace AT se snižují během těhotenství a při užívání orální antikoncepce.

#### VÝKON:

- Meze detekce je ≤ 5%.
- Funkční rozmezí testu je 5 až 120%.
- Studie výkonu prováděná v laboratoři na 1 šarži reagentie na přístroji ACL 7000. Inter assay (12 testů na vzorek) a intra assay výkony byly posouzeny použitím různých koncentrací AT. Data níže byla získána:

Kontrola	Intra assay			
	n	Průměr	CV%	SD
1	10	107,7	0,7	0,8
2	10	69,4	0,7	0,5
3	10	51,0	0,9	0,5
Inter assay				
1	12	109,5	2,6	2,8
2	12	69,6	2,5	1,7
3	12	50,3	3,7	1,9

#### Interference:

Při kinetické metodě nejsou interference pro hemoglobin do 5 mg/ml, bilirubin do 0,1 mg/ml a pro hyperlipemickou plazmu.

Žádný známý medikament neinterferuje s testem.

Odkáže se na specifický aplikační protokol pro Váš 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. Odegard O.R. et al. Heparin cofactor activity measured with an amidolytic method. Thromb. 1975.
6. CLSI Document H21-A5: "Collection, transport, and processing of blood specimens for testing plasma -based coagulation assays and molecular hemostasis assays: approved guideline". 2008
7. 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 v seznamu ISO 15223-1 standard, viz dokument Definice Symbolů.

**R1** H373: Může způsobit poškození orgánů opakovaným nebo prodlouženým vystavením.