



BIOPHEN AT (LRT) Ref 221111

Chromogenní stanovení antitrombinu v plazmě metodou anti Xa

Pouze pro výzkumné účely "In Vitro"



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

Poslední revize: 20. 06. 2014

POUŽITÍ:

BIOPHEN AT (LRT) kit je chromogenní metoda pro kvantitativní stanovení aktivity heparin kofaktoru antitrombinu (AT) v lidské citrátové plazmě^{1,2,3} za použití metody anti Xa⁴, manuální nebo automatizované. Reagencie v kitu BIOPHEN AT (LRT) jsou v tekutém stavu, připraveny k použití (LRT = Liquid Reagent Test).

KLINICKÉ VYUŽITÍ:

K diagnostice vrozených nebo získaných deficiencí antitrombinu.

PRINCIP STANOVENÍ:

Antitrombin je hlavním fyziologickým koagulačním inhibitorem. Inhibuje obzvláště serinové proteázy, především trombin, Faktor Xa a Faktor IXa, reguluje koagulační kaskádu a chrání před trombózou^{5, 6}. Když vytvoří komplex s heparinem, stane se antitrombin potentním a rychle reagujícím inhibitorem serinových proteáz. BIOPHEN AT (LRT) stanovení je kinetická metoda založená na inhibici Faktoru Xa, který za konstantní koncentrace a v přebytku reaguje s antitrombinem za přítomnosti heparinu. Zbývající Faktor Xa je potom měřen za pomoci specifického chromogenního substrátu, který uvolňuje pNA. Množství uvolněného pNA je potom nepřímo úměrné koncentraci antitrombinu v testované plazmě. Vzhledem k tomu, že toto stanovení není citlivé na heparin, 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: Reagent 1: Hovězí Faktor Xa

Hovězí Faktor Xa, v tekuté formě.

4 lahvičky obsahující cca 11ml Faktoru Xa, při pH 7.85, obsahující heparin a azid sodný.

R2: Reagent 2: SXa-11

Chromogenní substrát, specifický na Faktor Xa (SXa-11), v tekuté formě.

4 lahvičky obsahující cca 4 ml SXa-11.

Pozn.:

- Hovězí Faktor Xa byl připraven z hovězí plazmy, která byla testována na nepřítomnost infekčních agens a odebrána zvířatům, které neměla BSE. Ničíméně žádný test nemůže úplně vyloučit přítomnost infekčních agens. Takže, jako s každým jiným produktem hovězího původu, musí se s reagencí zacházet s předepsanou opatrností a jako s potenciálně infekčním materiálem.
- Hovězí Faktor Xa (R1) obsahuje azid sodný, který může reagovat s olověnými nebo měděnými částmi odpadu za vzniku vysoce explozivních azidů kovů. Pokud vyléváte do výlevky, spláchněte velkým množstvím vody

REAGENCIE A MATERIÁL POTŘEBNÝ, ALE V KITU NEOBSAŽENÝ:

Reagencie:

- Destilovaná voda, pokud možno sterilní.
- Kyselina octová (20%) nebo kyselina citrónová (2%) (End point method).
- Fyziologický roztok (0.9% NaCl).
- Plasma Calibrator (BIOPHEN Plasma Calibrator Ref 222101).
- Normální nebo Abnormální Kontrolní Plazmy (BIOPHEN Normal Control Plasma Ref 223201, and BIOPHEN Abnormal Control Plasma Ref 223301).

Materiál:

- Spektrofotometr, fotometr nebo automatický přístroj na chromogenní stanovení, s nastavitelnou vlnovou délkou 405 nm.
- Stopy.
- Kalibrované pipety.

PODMÍNKY SKLADOVÁNÍ:

BIOPHEN AT (LRT) sada musí být skladována při 2-8°C, ve svém originálním balení. Za těchto podmínek je stabilní až do doby expirace, která je vytištěna na každé krabičce.

PŘÍPRAVA A STABILITA REAGENCIÍ:

R1 : Reagent 1: Hovězí Faktor Xa

Připraven k použití.

Před použitím nechte reagencii stabilizovat po dobu 30 minut při pokojové teplotě. Těsně před použitím jemně promíchejte.

Stabilita otevřené reagencie Faktoru Xa v původní lahvičce, za předpokladu zamezení jakékoli bakteriální kontaminace

- 3 měsíce při 2-8°C.
- 7 dní při pokojové teplotě
- Nemrazit!!

R2 : Reagent 2: Faktor Xa specifický Chromogenní substrát (SXa-11)

Připraven k použití.

Před použitím nechte reagencii inkubovat po dobu 30 minut při pokojové teplotě (18-25°C)

Těsně před použitím jemně promíchejte.

Stabilita otevřené reagencie chromogenního substrátu v původní lahvičce, za předpokladu zamezení jakékoli bakteriální kontaminace

- 3 měsíce při 2-8°C.
- 7 dní při pokojové teplotě.
- Nemrazit.

Upozornění:

- Pro zlepšení stability musí být reagencie uchovávány v původních lahvičkách a uzavřeny původními uzávěry
- S reagencí musí být zacházeno opatrně abychom se během použití vyhnuli jakékoli kontaminaci.
- Pokud substrát zežloutne, je to způsobeno kontaminací. Nesmí být již dále používán a je třeba použít novou lahvičku.
- Inkubace naředěných reagencí při pokojové teplotě po dobu 30 minut umožňuje stabilitu reagencí a získání homogenní reaktivity po celou dobu použití

Pozn.:

- Dle příslušné používané automatizované metody, mohou být použity jiné objemy než je doporučováno v manuální metodě. V každém případě, stanovený reakční poměr (respektive koncentrace reakčního roztoku) mezi faktorem Xa a substrátem musí být přísně dodržován.
- Používejte pouze reagencie z kitu o stejné šarži. Nemixujte reagencie mezi kity s jinými šaržemi. Reagencie R1 a R2 jsou optimalizovány pro každou jednotlivou šarži.

PŘÍPRAVA PLAZMY (ODBĚR VZORKU):

Krev (9 objemů) musí být odebrána do 0.109 M citrátu sodného (1 objem), s velkou pečlivostí do zkumavek ze silikonového skla nebo do plastových zkumavek. Odběr musí být atraumatický, aby se zabránilo aktivaci koagulace při odběru. Během 4 hodin musí být krev odstředěna při 3 000 g po dobu 20 min a 18°C nebo méně, a plazma přenesena do plastových zkumavek, za použití plastových pipet

- Skládování plazmy:
 - Do 8 hodin při pokojové teplotě (18-25°C).
 - Do 24 hodin při 2-8°C.
 - Do 1 měsíce zamrazená na -20°C nebo nižší (před použitím nechte roztát po dobu 15 min. ve vodní lázni při 37°C).

Viz. NCCLS dokument H21-A2 pro další instrukce týkající se odběru vzorků, manipulace a skladování.

POPIS:

BIOPHEN AT (LRT) kit je určen pro použití kinetické metody, automatizované metody, ale může být použit i pro manuální metody "End Point". Aplikační protokoly pro různé automatické přístroje jsou k dispozici na požádání. Stanovení se provádí při teplotě 37°C a vývoj barvy je měřen 405 nm.

KALIBRACE:

BIOPHEN AT (LRT) kit může být kalibrován s **BIOPHEN Plasma Calibrator (ref 222101)**, který má velmi dobře definovanou koncentraci antitrombinu „C“. Následující tabulka ukazuje přípravu ředění:

% AT	Plasma Calibrator (µl)	Fyziologický roztok (µl)
0	0	500
C/4	125	375
C/2	250	250
C	500	0



POSTUP STANOVENÍ:

Manuelní metoda:

Mikrodestička: Naředte testovaný vzorek, kontroly a kalibrační roztoky 1:20 s fyziologickým roztokem (0.15 M chlorid sodný)

Zkumavka: Naředte testovaný vzorek, kontroly a kalibrační roztoky 1:10 s fyziologickým roztokem (0.15 M chlorid sodný)

Do jamky v mikrodestičce nebo do **plastové** zkumavky předeřháté **37°C**, přidejte:

Reagencie	Mikrodestička	Zkumavka
Naředěné kalibrátory, kontroly nebo testovanou plazmu	20 µL	30 µL
R1 : Faktor Xa předeřhátý na 37°C	100 µL	300 µL
Míchejte a inkubujte při 37°C, po dobu 90 sekund , potom přidejte:		
R2: SXa-11 Substrát předeřhátý na 37°C	35 µL	100 µL
Míchejte a inkubujte při 37°C, přesně po dobu 120 sekund!		
Zastavte reakci přidáním:		
Kyseliny citrónové (20g/L)	100 µL	500 µL
Zamíchejte a měřte při 405nm proti slepému vzorku.		

Získaná žlutá barva je stabilní po dobu 2 hodin.

Slepý vzorek se získá smícháním reagiencí v opačném pořadí než při testování např.: Kyselina citrónová (20 g/L), SXa-11 substrát, naředěná plazma., Faktor Xa.

Měření absorbance při 405 nm (A405). Odečtete potom slepý vzorek od testovaného vzorku

Automatizované metody:

Podrobné nastavení toho či kterého přístroje včetně přípravy reagiencí jsou k dispozici na vyžádání.

Poznámka:

- Pokud jsou požadovány větší nebo menší reakční objemy, musí být jejich poměry pro každou reagenii přísně dodržovány. To je z důvodu zabezpečení správného průběhu stanovení
- Udělejte slepý vzorek v přítomnosti vysoce lipemických, ikterických nebo hemolytických plazem – nebo pokud má plazma jinou barvu než je obvyklé.

KONTROLA KVALITY:

Použití kontrolních plazem umožňuje jak validaci kalibrační křivky tak i homogenní reaktivitu kitu BIOPHEN AT (LRT) mezi serii při použití stejné šarže kitu. Jsou k dispozici různé kontrolní plazmy:

BIOPHEN Normal Control Plasma: (ref 223201).

BIOPHEN Abnormal Control Plasma: (ref 223301).

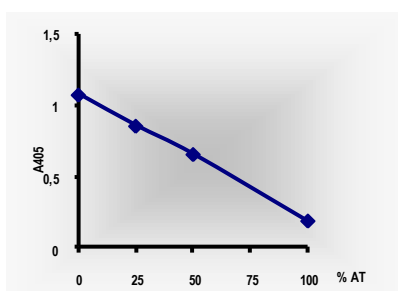
OMEZENÍ PROCEDURY:

- Při stanovení metodou anti Xa zde není žádný vliv Heparin Cofactor II, α -2-macroglobulinu nebo α -1-Antitrypsinu^{7,8,9}.
- Nebyly pozorovány žádné interference za použití manuální metody pro hemoglobin do 2,5 mg/ml a bilirubin do 0,1 mg/ml v plazmě. Některá analytika mohou interferovat při odečítání absorbance: v těchto případech je nutné při manuální metodě "end point" změřit slepý vzorek (zastavení reakce kyselinou)
- Abychom dosáhli optimálního průběhu stanovení, všechny procedurální instrukce musí být přísně dodržovány

VÝSLEDKY:

- Mezi absorbancí, měřenou při 405 nm (A405) a koncentrací AT v testované plazmě je nepřímá úměrnost. Test je lineární od 0 do 120% ($r^2 \geq 0,98$).
- Při metodě "End Point" použijte lineární grafický papír, vyneste na úsečku naměřenou absorbanci (A405) a odečtete korespondující koncentraci antitrombinu (%).
- Koncentrace antitrombinu v testovaném vzorku je získána přímo z kalibrační křivky. Výsledky jsou vyjádřeny v % normální plazmy.
- Při použití automatizovaných metod jsou koncentrace antitrombinu přímo kalkulovány analyzátozem z kalibrační křivky.
- Dynamické rozmezí je od 5 do 120 %.

UKÁZKA KALIBRAČNÍ KŘIVKY:



Kalibrační křivka uvedená níže je pouze jako příklad. Pro měření je možno požit pouze takovou kalibrační křivku, která je získána sérií daného měření

VALIDACE KALIBRAČNÍ KŘIVKY:

Kalibrační křivka je přijatelná pouze tehdy, když koncentrace AT naměřené kontrolními plazmami jsou v daném rozmezí.

VÝKONNOST A CHARAKTERISTIKA:

- Detekce krajního limitu je kalkulována měřením vzorku deficitního pro antitrombin + 3 směrodatné odchylky (SD). Tento krajní limit je $\leq 10\%$.
- Příklad níže ukazuje měření Inter-Assay reprodukovatelnosti získané měřením vzorků s různou koncentrací antitrombinu za použití manuální end point metody.

	Intra-Assay CV%	N	Inter-Assay CV%	N
Sample 1 (90%AT)	0,99	10	2,72	10
Sample 2 (56%AT)	1,38	10	0,57	10

BIOPHEN AT(LRT) test jeví dobrou korelaci s BIOPHEN AT provedeným na STA-R

$$Y = 0.98 X + 1.64 \quad n=46 \quad r = 0.966$$

OČEKÁVANÉ HODNOTY:

Předpokládá se, že 100% koncentrace antitrombinu odpovídá normální hodnotě lidské citrátové plazmy, získané smícháním plazem zdravých dárců (mužů a žen ve věku 18 – 55 let, nepobírajících žádné léky).

Normální rozmezí AT je 80-120%.

Koncentrace antitrombinu $\leq 70\%$ indikuje přítomnost defecience, která musí být potvrzena dalším testem/ nebo testováním dalšího vzorku pacienta.

Koncentrace antitrombinu jsou sníženy během těhotenství a během používání antikoncepce

KLINICKÉ INFORMACE:

Spontánní trombotická onemocnění jsou pozorována při vrozeném deficitu. Tyto vrozené deficity jsou klasifikovány do 4 skupin:

- **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.

REFERENCE:

1. Tsiang M et al. Functional requirements for inhibition of Thrombin by Antithrombin III in the presence and absence of heparin. *The Journal of Biological Chemistry* vol. 272, N°18 12024-12029 (1997)
2. Odegard O R et al. Heparin cofactor activity measured with an amidolytic method. *Thromb res* 6, 287-294 (1975).
3. Mann K.G. Biochemistry and Physiology of blood coagulation. *Thrombosis and Haemostasis* vol 82 N° 2 165-174 (1999).
4. Demers C et al. An Antithrombin III assay based on factor Xa inhibition provides a more reliable test to identify congenital antithrombin III deficiency than an assay based on thrombin inhibition. *Thromb Haemostas* 69, 231-235 (1993).
5. Leslie B. et al. Investigation of the anticoagulant mechanism of a covalent antithrombin-heparin complex. *The Journal of Biological Chemistry* vol. 273 N° 52 34730-34736 (1999).
6. Mortensen J.Z. Inherited ATIII deficiency. Fast and slow inactivation of thrombin and Factor Xa *Thromb. Res.*, 33, 511-515 (1984).
7. Tran T H et al. Influence of heparin cofactor II (HCII) in the determination of Antithrombin III (AT). *Thromb Res* 40, 571-576 (1985).
8. Tollefsen D.M. Laboratory Diagnosis of Antithrombin and Heparin Cofactor II deficiency. *Seminars in Thromb haemost* 16, 162-168 (1990).
9. Andersson N-E et al. New chromogenic ATIII activity kit which is insensitive to heparin cofactor II and designed for use on automated instruments. *Thromb Haemost* 65, 912 (1991).