



BIOPHEN™ AT (Anti-IIa)

Ref 221102

(R1, R2 : 2 x 2.5 ml, R3 : 2 x 25 ml)



Chromogenní metoda pro kvantitativní měření aktivity antitrombinu (AT) v lidské plazmě.

Poslední revize: 06-2017

POUŽITÍ:

BIOPHEN™ AT (Anti-IIa) kit je chromogenní test pro in vitro kvantitativní stanovení aktivity antitrombinu (AT) v lidské citrátové plazmě nebo jiném prostředí s přebytkem heparinu. Ke stanovení se používá Anti-IIa metoda, manuální nebo automatizovaná.

SHRNUTÍ:

Vrozený nedostatek AT vyvolává spontánní tromboembolická onemocnění. Vrozené nedostatky AT jsou rozděleny do 4 typů:

- **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 abnormální 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.

Tato metoda pomáhá při diagnostice typu nedostatku AT – vrozeného nebo získaného. AT se testuje v plazmě (anti-IIa aktivita) nebo v purifikovaném prostředí pokud je potřeba.

PRINCIP:

Antitrombin (AT) je hlavní fyziologický inhibitor koagulace serine estrátů, zvláště pak trombinu, Faktoru IXa a Faktoru Xa. AT reguluje koagulační cesty a zabráňuje trombóze. V komplexu s heparinem vytváří AT silný a rychlý inhibitor koagulace serine estrátů. Tento anti-IIa test měří heparin závislou aktivitu AT^{2,3,4,5}.

BIOPHEN™ AT (Anti-IIa) metoda je založená na měření inhibice konstantní hladiny a přebytku trombinu (IIa) testovanou AT v přítomnosti přebytkového heparinu a hydrolyzou trombin specifického chromogenního substrátu s trombinem v přebytku. Ze substrátu se vyloučí pNA a hladina pNA (měřená při 405nm) je pak úměrná zbytkového počtu trombinu. Je zde převrácený vztah k koncentraci AT přítomném v testovaném vzorku:

Heparin + AT ► [AT Hep.]

[AT Hep.] + [IIa (přbytek)] ► [IIa-AT-Hep.] + [zbytek FIIa]

[FIIa (zbytek)] + IIa-Subs. ► Peptid + pNA

REAGENCIE:

R1: Hovězí Trombin, lyofilizovaný se stabilizátory, obsahuje BSA.

2 lahvičky po 2,5 ml.

R2: Chromogenní substrát specifický na Trombin (SIIa-01), lyofilizovaný.

2 lahvičky po 2,5 ml.

R3: Specifický ředěný pufr s heparinem, pH 8,40, tekutý.

2 lahvičky po 25 ml.

Reagencie 3 obsahuje malé množství azidu sodného (0.9 g/l), viz část UPOZORNĚNÍ a VAROVÁNÍ.

UPOZORNĚNÍ a VAROVÁNÍ:

- S biologickými produkty musí být zacházeno jako s potenciálně infekčními.
- Reagencie obsahuje azid sodný, který může reagovat s olovnatými nebo měděnými částmi odpadu za vzniku vysoce explozivních azidů kovů.
- Nažloutlé zbarvení znamená kontaminaci reagencie. Lahvičku s takto zbarvenou reagencí nepoužívejte.
- Odpad likvidujte ve shodě s lokálními předpisy.
- Používejte pouze reagencie ze stejné šarže, nezaměňujte jednotlivé reagenty mezi různými šaržemi. Reagencie jsou vždy optimalizovány v rámci jedné šarže.
- S reagencí zacházejte tak, aby bylo zabráněno odpařování během používání. Minimalizuje možnost odpaření reagencie snížením plochy kontaktu reagencie se vzduchem. Vypařování snižuje stabilitu reagencie v přístroji.
- Pro dobrou stabilitu uzavírejte lahvičky s reagencí vždy jejich originálními zátkami.
- Studie stability provedené po dobu 3 týdnů při teplotě 30°C prokázaly, že reagencii je možné bez poškození přepravovat po krátkou dobu při pokojové teplotě.
- Reagencie byla připravena z hovězí plazmy, která byla testována registrovanou metodou a sledována negativní na přítomnost infekčních látek, hlavně pak činitele bovinní spongiformní encefalitidy (BSE).
- Pokud je vyšetřovaná plazma ikterická, lipemická, hemolytická nebo je zbarvená jinak než je obvykle, proměřte blank.
- Při použití kinetické metody, použijte ΔOD 405 nm místo OD 405nm.
- Koncentrace Trombinu jsou upraveny pro každou šarži pro optimální reaktivitu.
- Pouze pro stanovení In Vitro.



H315: Dráždí kůži.

H319: Způsobuje vážné podráždění očí.

H335: Může způsobit podráždění dýchacích cest.

PŘÍPRAVA A STABILITA REAGENCÍ:

Reagencie jsou lyofilizované pod vakuem v jejich originálních lahvičkách. Vyvarujte se ztráty lyofilizátu při otevření lahvičky s lyofilizovanou reagencí. Zátku odstraňujte opatrně.

R1 : Reagent 1: Hovězí Trombin

Naředte každou lahvičku s přesně 2,5 ml destilované vody, promíchejte, dokud se obsah zcela nerozpustí. Nechte stabilizovat po dobu 30 minut při pokojové teplotě (18-25°C) za občasných promíchání.

Těsně před použitím jemně promíchejte.

Stabilita naředěné reagencie, při zabránění kontaminaci nebo odpařování a uchování v původních lahvičkách:

- 15 dní při 2-8°C.
- 7 dní při pokojové teplotě (18 – 25 °C).
- 6 měsíců při -20°C a méně*.

R2: Reagent 2: Chromogenní substrát specifický pro Trombin

Rozpusťte každou lahvičku s přesně 2,5 ml destilované vody, opatrně míchejte, dokud se obsah zcela nerozpustí. Nechte reagencii inkubovat po dobu 30 minut při pokojové teplotě (18-25°C) za občasných promíchání.

Těsně před použitím jemně promíchejte.

Stabilita naředěné reagencie, pokud je zabráněno kontaminaci a odpařování a uchování v původních lahvičkách:

- 15 dní při 2-8°C.
- 7 dní při pokojové teplotě (18-25°C).
- 6 měsíců při -20°C a méně*.

*Rozmrazujte pouze jednou co nejrychleji při 37°C. Přizpůsobte dobu inkubace objemu rozmrazované reagencie. Stabilita reagencie by měla být otestována v laboratorních podmínkách.

R3 : Reagent 3: Specifický ředěný pufr s heparinem

Připraven k použití. Nechte reagencii stabilizovat po 30 minut za pokojové teploty před jejím použitím.

Stabilita naředěné reagencie, pokud je zabráněno kontaminaci a odpařování a uchování v původních lahvičkách:

- Alespoň 7 dní při 2-8°C.
- 7 dní při pokojové teplotě (18-25°C).
- Nemrazte.

SKLADOVÁNÍ:

Neotevřené reagencie by měly být skladovány při 2-8°C v jejich originálních baleních. Za těchto podmínek jsou stabilní do data uvedeného na obalu.

REAGENCIE A MATERIÁL POTŘEBNÝ, ALE V KITU NEOBSAŽENÝ:

Reagencie:

- Destilovaná voda.
- Kyselina octová (20%) nebo kyselina citrónová (2%) (End point method).
- Specifické kalibrátory nebo referenční materiál pro Antitrombin (mezinárodní, národní nebo normální citrátovou referenci k lidské poolové plazmě) a kontroly se známou hladinou, např.:

Produkt	Katalogové číslo
BIOPHEN™ Plasma Calibrator	222101
BIOPHEN™ Normal Control Plasma	223201
BIOPHEN™ Abnormal Control Plasma	223301

Materiál:

- Spektrofotometr nebo automatický přístroj pro chromogenní metody.
- Stopy, kalibrované pipety.

PŘÍPRAVA PLAZMY a ODBĚR VZORKU:

Vzorek by měl být připraven a skladován ve shodě s místními doporučeními (v USA CLSI H21-A5⁹).

Lidská plazma:

Lidská plazma s obsahem antikoagulantu (Citrát sodný).

Odběr:

Krev (9 objemů) musí být odebrána do citrátu sodného (1 objem) přímou venepunkcí. První odběrová zkumavka by měla být znehodnocena.

Centrifugace:

Během 2 hodin musí být krev odstředěna validovanou metodou pro získání plazmy chudé na destičky, např. 15 minut při 2500 g za pokojové teploty (18-25°C). Plazma může být přenesena do plastových zkumavek.

Skladování plazmy^{7, 8}:

- 4 hodiny při pokojové teplotě (18-25°C).
- 1 měsíc při -20°C.
- 18 měsíců při -70°C¹⁰

Zmrazená plazma by měla být rozmrazena rychle při 37°C, poté opatrně promíchána a okamžitě testována. Případný precipitát před testováním rozmíchejte.

POSTUP STANOVENÍ:

Souprava může být použita pro kinetické automatizované metody nebo pro manuální (end point) metody. Testujte při 37°C a zbarvení odečítejte při 405 nm.

Automatizované metody:

Aplikace pro různé analyzátoři jsou k dispozici na vyžádání. Viz specifická aplikace a doporučení pro každý analyzátor.

Manuální metoda:

1. Rekonstruuje kalibrátor a kontroly dle jejich specifických instrukcí.

Pokud používáte pro kalibraci komerční kalibrační plazmu (např.: BIOPHEN™ Plasma Calibrator) nebo národní nebo mezinárodní referenční materiál pro AT, rozpuštění 1:40 odpovídá oznamené koncentraci AT (%). 100% koncentrace (v podmínkách stanovení) je získána následujícím ředícím poměrem: 40 x C : 100.

Tato souprava se může také kalibrovat s normální citrátovou poolovanou lidskou plazmou (alespoň 30 zdravých lidí mezi 18 a 55 lety bez jakýchkoliv zdravotních potíží a medikací) s danou hodnotou 100% AT. Test zahrnuje standardní ředění 1:40 v R3 pufru, který představuje podle definice 100% AT.

Příprave 2 ml 1:40 ředění normální poolové plazmy nebo ředění (40 x C : 100) kalibrátoru se známou hladinou AT v R3 pufru. Toto souhlasí s 100% AT (C1). Kalibrační křivka pak může být sestavena přípravou následových ředění:

Kalibrátor	C1	C2	C3	C4	C5
AT (%)	100	50	25	12,5	0
Objem kalibrátoru	1000 µl C1	500 µl C1	500 µl C2	500 µl C3	0 µl
Objem pufru	0 µl	500 µl	500 µl	500 µl	500 µl

Abyste zajistili plný výkon testu, kalibrační křivka musí být připravena těsně před testem.

Kalibrační křivka může být také stanovena pomocí referenčního materiálu AT (mezinárodní nebo národní standardní příprava). Předředit materiál v příslušném pufru tak, abyste získali 1 IU/ml, pak je naředíte 1:40 v R3. Tak získáte 100% koncentraci AT (C1) a můžete sestavit kalibrační křivku podle postupu níže.

2. Ředíte vzorek a kontroly v R3 pufru, viz níže:

Vzorek	Katalogové číslo	Ředění
Kontroly	223201 / 223301	1:40
Vzorek	-	1:40

Pro At purifikované prostředí musí být testovaný vzorek předředit v příslušném pufru tak, aby předpokládaná koncentrace AT byla v rozmezí 0,2 – 1,0 IU/ml. Pro stanovení pak ředíte v poměru 1:40 s R3. Koncentrace AT je předpokládána v rozmezí 20-100% (měřená koncentrace musí být násobena před-dilučním faktorem).

Stanovte kalibrační křivku a testujte ji kontrolami kvality. Pokud materiál skladujete při pokojové teplotě, testujte ho do dvou hodin po ředění. Přesné koncentrace kalibrátorů a kontrol jsou uvedeny na přiložených letáčích šarže.

3. Vložte následující do jamek mikrotitrační destičky nebo plastové zkumavky při 37°C:

	Mikrodestička	Zkumavka
Kalibrátory, kontroly nebo testovaný vzorek - naředěné (1:40)	100 µL	400 µL
R1 : Trombin inkubovaný na 37°C	50 µL	200 µL
Míchejte a inkubujte přesně 1 min při 37°C, potom přidejte:		
R2 : Trombin Substrát inkubovaný na 37°C	50 µL	200 µL
Míchejte a inkubujte přesně 1 min při 37°C, přesně		
Zastavte reakci přidáním:		
Kyseliny citrónové (2%)*	100 µL	400 µL
Zamíchejte a měřte při 405nm proti slepému vzorku.		

* nebo kyseliny octové (20%) Získaná žlutá barva je stabilní po dobu 2 hodin.

Slepý vzorek se získá smícháním reagentů v opačném pořadí než při testování: Kyselina citrónová (2%), R2, R1 ředěný vzorek. Měření absorbance při 405 nm. Odečtěte potom absorbanci slepého vzorku od absorbance testovaného vzorku.

Kinetická metoda:

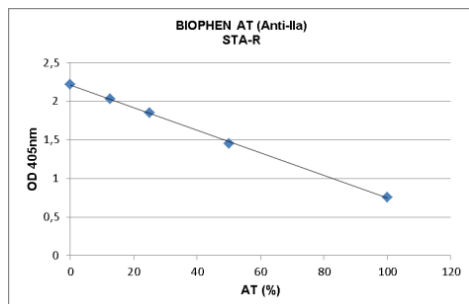
Test může být proveden kinetickou metodou měřením změny absorbance během kratšího času po přidání substrátu (ΔOD405). V tomto případě se nemusí odčítat blank nebo zastavovat reakce.

Pokud jsou reakční objemy jiné, než je uvedeno, musí být striktně zachován poměr objemů. Uživatel je zodpovědný za validaci jakýchkoliv změn a jejich vliv na výsledek.

KALIBRACE:

Kalibrační plazma pokrývající dynamické rozmezí testu je dostupná od HYPHEN BioMed (viz REAGENCIE A MATERIÁL POTŘEBNÝ, ALE V KÍTU NEOBSAŽENÝ) a může být použit pro stanovení kalibrační křivky.

- Kalibrační rozmezí je od 0 do 100% AT (tedy od 0 do 1 IU/ml). Kalibrační křivky uvedené níže, byla získána na přístroji STA-R[®] a je pouze příkladem. Kalibrace by měla být provedena pro každou sérii testů.



KONTROLA KVALITY:

Použití kontrolních plazem umožňuje jak validaci shodnosti metody, tak i kontrolu homogenity v sérii a mezi sériemi při použití stejné šarže reagentie.

Začněte kontrolu kvality do každé série testů, dle doporučení pro laboratorní práci, aby byly výsledky testu validní. Nová kalibrace by měla být provedena přednostně před každou sérií testů, nejméně však pro každou novou šarži reagentie, po významné opravě nebo údržbě používaného přístroje, nebo když jsou hodnoty kontrolních plazem mimo přijatelné meze.

Každá laboratoř si musí definovat vlastní přijatelné rozmezí a ověřit v komplexu celého analytického systému.

VÝSLEDKY:

- Při manuální metodě "End Point" používejte lineární grafický papír, vynesete na osu Y naměřenou absorbanci (A405) a na osu X korespondující koncentraci antitrombinu (%).
- Koncentrace Antitrombinu v testovaném vzorku je přímo odečtena z kalibrační křivky, pokud je použito doporučené ředění. Měřené koncentrace musí být násobeny dalšími ředícími faktory, pokud byly použity.
- Výsledek je vyjádřen v %.
- Výsledky by měly být interpretovány společně s klinickým stavem pacienta.

LIMITY:

- Pro zajištění optimálního průběhu testu by měly být pečlivě dodržovány instrukce validované výrobcem reagentie Hyphen-BioMed. Laboratoř je odpovědná za změny, které provede v těchto instrukcích.
- Každá reagentie neobvyklého vzhledu nebo vykazující známky kontaminace musí být z testování vyřazena.
- Každý vzorek jeví známky aktivace musí být vyřazen z testování.
- Každá plazma obsahující koagulum nebo jeví známky kontaminace musí být vyřazena z testování.
- Pro lepší přesnost testu ($\leq 20\%$) může být vzorek ředěn 1:20 a obrážený výsledek dělen 2. Pro vzorky měřené >120% se může použít ředění 1:80 a obrážený výsledek násoben 2. Pokud jsou použity standardní ředící poměry (1:40) koncentrace musí být opravena dalším faktorem ředění, tedy x2 pro 1:80 a x0,5 pro 1:20.
- Pro možné další vlivy se odkáže na specifickou aplikaci pro použitý analyzátor. Nebyl pozorován žádný závažný efekt při two-point kinetické metodě (STA-R[®]) pro koncentraci bilirubinu do 60mg/dl, hemoglobinu do 500 mg/dl a triglyceridů do 125mg/dl za použití přesycovacích testů.
- Inhibitory trombinu (Hirudin, Argatroban, Dabigatran...) přítomné ve vzorku mohou vést k přecenění koncentrace AT.
- Test může být proveden na purifikovaném prostředí za použití náležitého kalibrátoru.

OČEKÁVANÉ HODNOTY:

Běžná hladina Antitrombinu v plazmě dospělé populace je v rozmezí kolem 80 – 120%. I tak si musí každá laboratoř stanovit vlastní běžné rozmezí.

Koncentrace AT $\leq 70\%$ indikuje nedostatek, který musí být potvrzen dalším testem vzorku nebo testem jiného vzorku od stejného pacienta. Koncentrace AT jsou sníženy během těhotenství, při braní orální antikoncepce, DIC nebo nemoci jater. Koncentrace je běžně menší u novorozenců.

CHARAKTERISTIKA:

- Detekční limit je vyhodnocen na kalibrační křivce z "zřemě" koncentrace AT, která odpovídá průměru A405 získaného ze vzorku bez AT (pouze pufr) minus 3 standardní odchylky (SD). Tento detekční limit je <math>< 0,10 \text{ IU/ml}</math>, tedy <math>< 10\% \text{ AT}</math>.
- Na STA-R[®] je měřitelné rozmezí kolem 20 do 120% AT.
- Specifita: Vzorek chudý na AT je měřen při <math>< 5\% \text{ AT}</math>. Nebyly pozorovány žádné interference heparinu (UFH, LWMH) v normálních léčebných koncentracích. Test může být proveden na vzorcích od pacientů s léčbou heparinem. Používá se boviní trombin, aby se interference Heparin Kofaktoru II mohl vyřadit jako zanedbatelný při normálních hladinách. Okamžité působení AT kvůli přítomnému heparinu, krátký čas reakce a postupná aktivita AT (tedy α_2 -makroglobulin) nemá účinek na test. Plasmin, pokud je přítomný, je blokován aprotininem přítomným v R1.
- Níže uvedená studie byla provedena výrobcem za použití 1 šarže reagentie pro N=10 na přístroji STA-R[®]. Výkon testu byl posouzen laboratorními kontrolami pro kontrolní hladinu. Byly zjištěny následující výsledky:

Kontroly	Intra assay				Inter assay			
	n	Průměr	CV%	SD	n	Průměr	CV%	SD
Normal Control	10	92	1,9	1,79	10	91	5,7	5,14
Abnormal Control	10	53	1,7	0,88	10	54	3,4	1,81

VARIACE METODY:

Pro účely identifikace abnormality typu II, HBS (Heparin binding site), variace metody může být užita. Provádí se za použití specifického "Tris pufru bez heparinu" [AR104A : AT-Tris-buffer (Anti-Ila)] místo R3 pufru. Musí se stanovit specifická kalibrační křivka s kalibrační plazmou a aktivita AT pacienta (HBS) je přímo čtena z kalibrační křivky. Protokol tuto metodu je dostupný na vyžádání (D.750.30/AT-prog/Anti-Ila). V přítomnosti HBS varianty má pacient aktivitu AT normální.

REFERENCES:

- Cooper P.C. *et al.* The phenotypic and genetic assessment of antithrombin deficiency. Int J Lab Hematol. 2011.
- Leslie B. *et al.* Investigation of the anticoagulant mechanism of a covalent antithrombin-heparin complex. The Journal of Biological Chemistry. 1999.
- 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.1997.
- Tollefsen D.M. Laboratory Diagnosis of Antithrombin and Heparin Cofactor II deficiency. Seminars in Thromb haemost. 1990.
- Mortensen J.Z. Inherited ATIII deficiency. Fast and slow inactivation of thrombin and Factor Xa Thromb. Res. 1984.
- CLSI Document H21-A5: "Collection, transport, and processing of blood specimens for testing plasma-based coagulation assays and molecular hemostasis assays; approved guideline". 2008.
- Woodhams B. *et al.* Stability of coagulation proteins in frozen plasma. Blood coagulation and Fibrinolysis. 2001.
- 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 jsou uvedeny v ISO 15223-1 standard, viz dokument definice symbolů.

