

BIOPHEN™ AT anti-(h)Xa LRT

REF 221123 R1 R2 3 x 3 ml

REF 221127 R1 R2 4 x 7,5 ml

Chromogenní stanovení antitrombinu v plazmě s tekutými reagenty připravenými 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

Datum Revize: 01/2021

POUŽITÍ:

BIOPHEN™ AT anti-(h)-Xa LRT kit je chromogenní test pro in vitro kvantitativní stanovení aktivity heparin kofaktoru antitrombinu (AT) v lidské citrátové plazmě za použití metody anti Xa, manuální nebo automatizované.

Reagenty jsou v tekutém stavu, připraveny k použití (LRT = Liquid Reagent Test).

SHRNUTÍ:

Technické:

Antitrombin je hlavním fyziologickým koagulačním inhibítorem. Inhibuje obzvláště serinové estrázy, především trombin, Faktor Xa a Faktor IXa, reguluje koagulační kaskádu a chrání před trombózou. Když vytvoří komplex s heparinem, stane se antitrombin potentním a rychle reagujícím inhibítorem serinových proteáz¹.

Klinické:

Spontánní tromboembolické nemoci jsou pozorovány v přítomnosti vrozených deficitů AT, které se dělí na 4 skupiny^{2,3,4}.

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

Měření anti-Xa aktivity AT v lidské plazmě je potřeba pro diagnózu vrozených nebo získaných deficitů antitrombinu⁴.

PRINCIP STANOVENÍ:

BIOPHEN™ AT anti-(h)-Xa 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 (Sxa-11-65), který uvolňuje pNA. Množství uvolněného pNA je potom nepřímě 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 Lidský Faktor Xa v tekuté formě, pH okolo 7.85. Obsahuje heparin, BSA a malé množství azidu sodného (0,9 g/l).

R2 FXa substrát, chromogenní substrát, specifický na Faktor Xa (11-65), v tekuté formě se stabilizátory. Obsahuje Proclin.

REF 221123 ▶ **R1** **R2** 3 lahvičky po 3 ml.

REF 221127 ▶ **R1** **R2** 4 lahvičky po 7,5 ml.

VAROVÁNÍ A UPOZORNĚNÍ:

- Některé reagenty v soupravě obsahují materiál lidského a zvířecího původu. Lidská plazma použitá k přípravě produktu byla restována registrovanou metodou a sledována negativně na přítomnost protilátek HIV 1, HIV 2, HCV a povrchového antigenu Hepatitidy B. I přesto nelze stoprocentně zaručit nepřítomnost infekčních agens a proto musí být s produktem zacházeno jako s potenciálně infekčním se všemi vyplývajícími bezpečnostními opatřeními.
- V kontaktu s olověnými nebo měděnými trubkami vytváří Azid Sodný výbušné Azidy kovů.
- Odpad likvidujte dle platných místních regulací.
- Používejte pouze reagenty stejné šarže.
- Studie stability ukazují, že produkt může být převážně při pokojové teplotě bez degradace.
- Pouze pro in vitro diagnostiku v profesionální laboratoři.

PŘÍPRAVA REAGENCIE:

R1 **R2** Reagenty jsou připraveny k použití. Homogenizujte bez tvorby pěny a vložte do analyzátoru dle aplikačního protokolu.

Pro manuální metodu nechte reagenty stabilizovat 30 při pokojové teplotě (18 – 25°C), homogenizujte před použitím (dávajte pozor na viskozitu produktu).

SKLADOVÁNÍ A STABILITA:

Neotevřené reagenty skladujte při 2 – 8°C v originálním balení. Takto skladované mohou být použity až do data expirace uvedeného na obalu.

R1 **R2** Stabilita reagenty po otevření, pokud je předejito odpařování a kontaminaci, je:

- 5 týdnů při 2 – 8°C
- 7 dní při pokojové teplotě (18 – 25°C)
- Nemrazte.
- Stabilita v analyzátoru – viz aplikační protokol.

Žluté zbarvení znamená kontaminaci substrátu. Kontaminovaný substrát znehodnoťte a načnete novou lahvičku.

REAGENCIE A MATERIÁL POTŘEBNÝ, ALE V KITU NEOBSAŽENÝ:

Reagenty:

- Destilovaná voda.
- 20% kyselina octová nebo 2% kyselina citrónová (End point metoda).
- Diluent: Fyziologický roztok (0.9% NaCl) nebo Imidazolový pufr (AR021B/K/L/M/N). Pro všechna ředění použijte stejný diluent.
- Specifické kontroly a kalibrátory se známou hladinou:

Jméno produktu	Referenční číslo
BIOPHEN™ Plasma Calibrator	221 101
BIOPHEN™ Normal Control Plasma	223 201
BIOPHEN™ Abnormal Control Plasma	223 301

Odkažte se na aplikační protokol pro Váš analyzátor.

Materiál:

- Spektrofotometr, fotometr nebo automatický přístroj na chromogenní stanovení.
- Stopky; Kalibrované pipety, zkumavky z plastu nebo silikonového skla.

PŘÍPRAVA A ODBĚR VZORKU:

Krev (9 dílů) musí být opatrně odebrána do 0,109 M (3,2%) citrátového antikoagulantia (1 díl), 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}.

PROVEDENÍ TESTU:

Souprava může být použita pro kinetickou, automatickou nebo manuální (endpoint) metodu. Měřte při 37°C a barvu odečítejte při 405nm.

Pro automatizovanou metodu jsou aplikační protokoly dostupné na vyžádání. Viz aplikační protokol pro použitý analyzátor.

Provedení:

1. Rekonstruuje kalibrátory a kontroly dle jejich specifických instrukcí. Kalibrátory by měly být rozpouštěny v diluentu uvedeném níže pro stanovení kalibrační křivky (C₀ definuje koncentraci AT):

Pokud je kalibrační křivka stanovena komerčně dostupnou kalibrační plazmou (např.: BIOPHEN™ Plasma Calibrator), ředění 1/50 odpovídá indikované koncentraci (C) AT a ředění 1/33,3 odpovídá 1,5krát této koncentraci. Pro kalibrátory s danou hladinou C₀ hladina o 150% (v podmínkách měření) je získána ředěním kalibrátoru v následujícím poměru:

$$33,3x(C)/100.$$

Kalibrační křivka může být také stanovena použitím poolované citrátové normální plazmy (alespoň 30 zdravých mužů a žen ve věku 18 až 55 bez léků nebo nemocí), které má dle definice hladinu AT 100%. Test obsahuje ředění plazmy 1/50, které dle definice představuje 100% aktivity. Dynamická kalibrační křivka má rozmezí od kolem 10 do 150% AT. Ředění 1/33,3 poolové plazmy představuje 150% AT aktivity.

Následující kalibrační rozmezí může být připraveno, viz níže:

AT (%)	0	C:8	C:4	C:2	C	3C:2
AT (%)	0	12,5	25	50	100	150
Objem kalibrátoru	0 µl	60 µl	125 µl	250 µl	500 µl	Získá se ředícím faktorem: 33,3 x C:100 v diluentu
Objem diluentu	500 µl	420 µl	375 µl	250 µl	0 µl	

Připravte kalibrační křivku těsně před měřením pro optimální výkon testu.

2. Ředte vzorky a kontroly v diluentu, viz níže:

Vzorky	Reference	Redění
Kontroly	223201 / 223301	1:50
Vzorky	-	1:50

Stanovte kalibrační křivku a proveďte kontrolu kvality. Pokud vzorky skladujete při pokojové teplotě (18-25°C) měřte se nejdříve. Přesné koncentrace kontrol a kalibrátorů pro každou šarži jsou vyznačeny na letáčích přiložených k jejich balení.

3. Pipetujte následující do plastových zkumavek inkubovaných při 37°C:

	Objem
Vzorek, kontrola nebo kalibrátor	200 µl
R1 Lidský Faktor Xa inkubovaný na 37°C	200 µl
Míchejte při 37°C po 1 minutu, pak přidejte:	
R2 Faktor Xa substrát inkubovaný při 37°C	200 µl
Míchejte při 37°C po přesně 1 minutu	
Reakci zastavte přidáním:	
Kyseliny citronové (2%)*	400 µl
Promíchejte a měřte na vlnové délce 405nm proti korespondujícímu blank vzorku.	



*Nebo kyselina octová (20%). Žluté zbarvení je stabilní 2 hodiny.

Blank vzorku se získá mícháním reagensů v opačném směru, tedy: Kyselina citronová (2%), R2, R1, ředěný vzorek.

Měříte vlnovou délku při 405 nm. Odečtete hodnotu blank vzorku od měřeného testu.

Vytvořte plazmatický blank, pokud je vzorek ikterický, lipemický, hemolyzovaný nebo je jeho barva mimo standard pro plazmu.

Pokud jsou zapotřebí jiné objemy, než je uvedeno výše, zajistěte, aby poměr objemů zůstal stejný. Laboratoř je zodpovědná za validaci jakýchkoliv změn a jejich dopadu na výsledky testu.

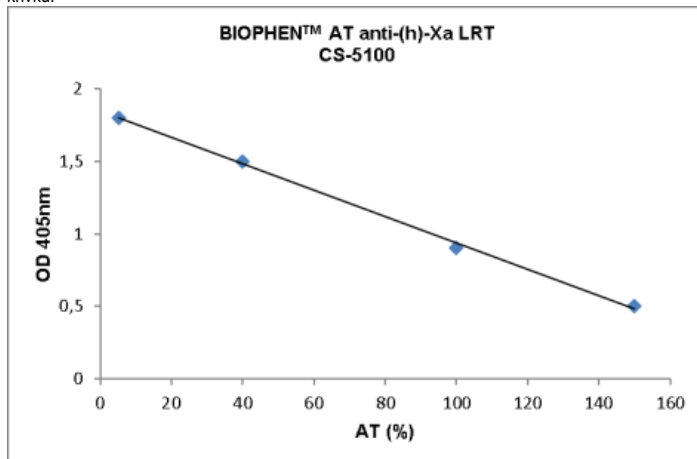
KALIBRACE:

BIOPHEN™ AT anti-(h)-Xa LRT může být kalibrován pro test AT aktivity. Kalibrátor zabírající toto kalibrační rozmezí je k dispozici od společnosti HYPHEN BioMed (viz REAGENCIE AMETERIÁL POTŘEBNÝ, ALE V KITU NEPŘÍTOMNÝ) a může být použit pro stanovení kalibrační křivky.

Při lineární stupnici:

- Kalibrační rozmezí je kolem 5 do 150% (na CS-5100).

Níže uvedené kalibrační křivka je pouze příklad. Pro výpočet výsledku použijte vlastní kalibrační křivku.



KONTROLA KVALITY:

Použitím kontroly kvality validujete shodu metody a homogenitu mezi sériemi pro danou šarži reagensů.

Zahrňte kontrolu kvality do běžného provozu. Nová kalibrační křivka musí být stanovena pro každou novou sérii testů, pro každou novou šarži, po významné údržbě analyzátoru, nebo pokud naměřené hodnoty kontroly kvality jsou mimo přijatelné rozmezí pro danou metodu. Každá laboratoř se musí stanovit vlastní přijatelné rozmezí a verifikovat předpokládaný výkon na svém analytickém systému.

VÝSLEDKY:

- Pro manuální endpoint metodu stanovte kalibrační křivku v bilineárním grafu, s OD 405 nm na ose Y a koncentrace AT (v procentech) na ose X.
- Koncentrace AT (%) v měřeném vzorku je přímo odečtena z kalibrační křivky, pokud je použito standardní ředění.
- Pokud je použito jiné ředění, získané hodnoty musí být násobeny použitým dilučním faktorem.
- Výsledky musí být hodnoceny v souladu s klinickým a biologickým stavem pacienta.

LIMITY:

- Abyste zajistili optimální výkon testu a dostali potřebným specifikacím, technické instrukce validované společností HYPHEN BioMed musí být pozorně dodrženy.
- Jakákoliv reagenie neobvyklého vzhledu nebo jevící známky kontaminace musí být znehodnocena.
- Jakýkoliv vzorek jevící známky aktivace nebo jiné, podezřelé znaky, musí být znehodnocen.
- Test je Anit-Xa metoda, a proto není očekávaná interference Heparin Kofaktorem II, α 2-macroglobulin nebo α 1-Antitrypsin^{2,4,7}.
- Přímé inhibitory faktoru Xa (DOAC) mohou indikovat falešně zvýšenou aktivitu AT.

OČEKÁVANÉ HODNOTY:

Referenční rozmezí, získáno na zdravých dospělých jedincích (n=120) a testováno na Sysmex CS-5100 (central 90%, 95té procento), bylo naměřeno mezi 85 a 129%.

Každá laboratoř si musí stanovit vlastní normální rozmezí.

CHARAKTERISTIKA:

- Nejnižší detekční limit závisí na použitém analyzátoru (<5% na Sysmex CS-5100).
- Měřicí rozmezí závisí na použitém analyzátoru (kolem 5 do 200% AT na Sysmex CS-5100).
- BIOPHEN At Anti-(h)-Xa LRT test není citlivý na heparin do běžných koncentrací.
- Specifita: AT chudá plazma byla měřena \leq 15%.
- Studie výkonu byly provedeny interně na Sysmex CS-5100. Výkon byl hodnocen pomocí laboratorních kontrol během 20-denní doby, 2 série za den a 3 opakování v sériích pro kontrolní hladinu. Následující data byla získána:

Kontroly	Intra assay				Inter assay			
	n	Průměr	CV%	SD	n	Průměr	CV%	SD
Kontrola 1	40	34,7	1,8	0,6	120	34,6	3,1	1,1
Kontrola 2	39	89,7	1,2	1,1	120	87,7	2,3	2,0

- Dle principu měření není předpokládána interference anti-Ila antikoagulantů, jako jsou Dabigatran nebo Bivalirudin.
- Korelace referenční metody (INNOVANCE Antithrombin Siemens na CS-5100):
n = 120 y = 1,04x - 0,49 r = 0,945
- **Interference:**
Žádné interference na Sysmex Cs-5100 do následujících hodnot:

Intralipidy (mg/dl)	Hemoglobin (mg/dl)	Bilirubin (F/C) (mg/dl)	Heparin (UFH/LMWH) (UI/ml)
1000	1000	60	2

Odkážete se na specifický aplikační protokol pro použitý analyzátor.

REFERENCE:

1. Mann K.G. Biochemistry and Physiology of blood coagulation. Thrombosis and Haemostasis. 1999.
2. Patnaik MM 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 EM. 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.
7. Odegard O R et al. Heparin cofactor activity measured with an amidolytic method. Thromb res 6. 1975.

SYMBOLY:

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

