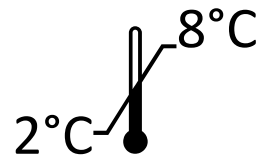
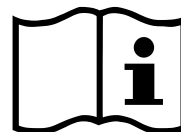


# ACTICHROME® AT-III

**REF 838**

*test cromogenico per la misurazione  
dell'attività dell'antitrombina III nel plasma umano*



Obelis s.a  
Boulevard Général Wahis 53, 1030 Bruxelles, BELGIO

## USO PREVISTO

ACTICHROME® AT III è destinato alla determinazione quantitativa dell'attività dell'antitrombina III nel plasma umano mediante test cromogenico. Il test è destinato all'uso diagnostico *in vitro*.

## SPIEGAZIONE DEL TEST

L'antitrombina III è un inibitore delle serinoproteasi plasmatiche. Una funzione importante dell'antitrombina III è l'inibizione dell'attività della trombina. Normalmente il tasso di inibizione della trombina da parte dell'antitrombina III è lento (attività antitrombinica progressiva). Tuttavia, il tasso di inibizione può essere aumentato di diverse migliaia di volte in presenza di eparina (attività del cofattore eparina).

Tolefsen e Blank hanno segnalato un altro inibitore rapido della trombina dipendente dall'eparina, il Cofattore eparinico II, nel plasma umano. Questa proteina può interferire con le determinazioni dell'antitrombina III soprattutto alle alte concentrazioni di eparina (2 unità USP/ml). Per conferire specificità all'antitrombina III, il presente sistema di test usa una concentrazione finale di eparina più bassa (1,0 unità USP/ml) in cui l'inattivazione della trombina da parte del cofattore eparinico II è trascurabile. Inoltre, il cofattore eparinico II umano reagisce più rapidamente con la trombina umana che con la trombina bovina (Friberger *et al.*). Quindi, al presente sistema di test è conferita un'ulteriore specificità per l'antitrombina III grazie all'uso della trombina bovina.

## PRINCIPIO DEL METODO

Nel presente metodo a due fasi (Odegard *et al.*), la trombina viene aggiunta a una diluizione di plasma contenente antitrombina III in presenza di eparina in eccesso. Dopo un'incubazione iniziale (fase 1), la trombina residua viene determinata con un substrato cromogenico specifico per la trombina (fase 2). L'attività residua della trombina è inversamente proporzionale alla concentrazione di antitrombina III nel plasma.

## REAGENTI

REF 838 contiene reagenti sufficienti per eseguire 60 test utilizzando un metodo manuale.



**R1 Trombina Bovina:** 6 fiale (liofilizzate).

**R2 SPECTROZYME® TH:** 6 fiale (liofilizzate).

**R3 Tampone di Test:** 6 fiale, 5 ml, concentrato 10X.

## AVVERTENZE E PRECAUZIONI

Questo prodotto contiene materiale di origine animale. Poiché nessun metodo di analisi conosciuto può fornire una garanzia completa che i prodotti derivati da campioni animali non trasmettano agenti patogeni trasmessi per via ematica, questo reagente deve essere maneggiato come raccomandato per qualsiasi campione potenzialmente infettivo.

Trombina Bovina	Avvertenza		H315, H319; P264, P280, P302 + P352, P305 + P351 + P338, P337 + P313		
SPECTROZYME TH	Avvertenza		<table border="1"><tr><td>CONT</td><td>Sale diacetato di H-D-cicloesilalanil-alanil-arginina-para-nitroanilide</td></tr></table>	CONT	Sale diacetato di H-D-cicloesilalanil-alanil-arginina-para-nitroanilide
			CONT	Sale diacetato di H-D-cicloesilalanil-alanil-arginina-para-nitroanilide	
H315, H319, H335, P261, P264, P280, P302 + P352, P305 + P351 + P338, P337 + P313					
Tampone di Test	-	-	Osservare le buone pratiche igieniche di laboratorio.		

**Dichiarazioni di Pericolo:**

H315 Provoca irritazione cutanea.  
H319 Provoca grave irritazione oculare.  
H335 Può causare irritazione respiratoria.



**Dichiarazioni Precauzionali:**

P261 Evitare di respirare la polvere.  
P264 Lavare accuratamente dopo la manipolazione.  
P280 Indossare guanti protettivi/indumenti protettivi/protezioni oculari/protezioni per il viso.  
P302 + P352 IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE: Lavare con abbondante acqua.  
P305 + P351 + P338 IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: Sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare.  
P337 + P313 Se l'irritazione degli occhi persiste: Consultare un medico.



## PREPARAZIONE E CONSERVAZIONE DEI REAGENTI

Le fiale intatte dei reagenti sono stabili fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta se conservate a 2-8°C.



**R1 Trombina Bovina:** Ricostituire con 2 ml di acqua filtrata deionizzata. La trombina bovina ricostituita è stabile per:

	1 settimana	1 mese
	2-8°C	-20°C

**R2 SPECTROZYME TH:** Ricostituire con 2 ml di acqua depurata o acqua filtrata deionizzata. Il substrato ricostituito è stabile per:

	1 settimana	1 mese
	2-8°C	-20°C

**R3 Tampone di Test:** Diluire il Tampone di Test a 50 ml con acqua deionizzata filtrata. La forza lavoro del tampone di test è stabile per:

	1 settimana	1 mese
	2-8 °C	-20°C

## RACCOLTA E PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

Per questo test può essere utilizzato plasma povero di piastrine raccolto con citrato. Vedere "Collection, Transport and Processing of Blood Specimens for Testing Plasma-Based Coagulation Assays and Molecular Hemostasis Assays-Approved Guideline", CLSI Document H21-A5, Vol. 28, N. 5, Gennaio 2008. La raccolta del plasma deve essere eseguita come segue:

1. Raccogliere 9 parti di sangue in 1 parte di soluzione anticoagulante di citrato trisodico al 3,2% (0,109 M).
2. Centrifugare il campione di sangue a 1.500 x g per 15 minuti.

3. Il plasma deve essere conservato a 2-8°C e testato entro 2 ore. In alternativa, il plasma può essere conservato a -20°C per un massimo di 1 mese.
4. Il plasma congelato deve essere scongelato rapidamente a 37°C. Il plasma scongelato deve essere conservato a 2-8°C e testato entro 24 ore.

## **PROCEDURA**

### **Materiali Forniti - Vedere Reagenti**

### **Materiali Richiesti Ma Non Forniti**

Acqua deionizzata o distillata di tipo 1

Calibratore Speciale di Coagulazione, REF C.BMD.SCC030-01ML-A

Controllo Speciale di Coagulazione Normale, REF C.BMD.SCCN180-01ML-A

Controllo Speciale di Coagulazione Anormale, REF C.BMD.SCCA180-01ML-A

Pipette singole da 0-200 µl, 200-1000 µl

Provette di plastica, timer da laboratorio, bagno umido o asciutto a 37°C

Acido acetico glaciale al 50%

Spettrofotometro operante a 405 nm, analizzatore di coagulazione

### **Calibrazione del Test**

Per la preparazione degli standard di antitrombina III è possibile utilizzare il Calibratore Speciale di Coagulazione, REF C.BMD.SCC030-01ML-A, o un pool di plasma umano normale (almeno 10 donatori normali) raccolto nello stesso modo del plasma da testare. I contraccettivi orali e altri preparati a base di estrogeni/progesterone possono influenzare i livelli di antitrombina III, pertanto è necessario escludere dal pool il plasma degli utilizzatori di tali preparati.

Preparare gli standard di antitrombina III, i controlli e i campioni di plasma dei pazienti come segue. Testare gli standard, i controlli e i campioni subito dopo la preparazione.

<b>Standard*</b>	<b>Volume del Calibratore Speciale di Coagulazione</b>	<b>Volume del Tampone di Test</b>
100%	25 µl	1000 µl
50%	500 µl di standard al 100%	500 µl
0%	0 µl	1000 µl
<b>Campione Paziente/ Controllo</b>	<b>Volume del Campione Paziente/Controllo</b>	<b>Volume del Tampone di Test</b>
	25 µl	1000 µl

\*Il valore effettivo degli standard di antitrombina III dipende dal valore specifico del lotto del calibratore speciale di coagulazione.

## **Procedura di Test**

ACTICHROME AT III può essere eseguito manualmente o utilizzando analizzatori di coagulazione semiautomatici o automatici.

BioMedica Diagnostics offre applicazioni strumentali per eseguire ACTICHROME AT III su diversi analizzatori di coagulazione. Queste applicazioni strumentali possono contenere dati di programmazione ed esecuzione specifici della piattaforma che differiscono da quelli forniti nelle presenti Istruzioni per l'uso. In questi casi, le informazioni contenute nell'applicazione strumentale sostituiscono quelle contenute nelle presenti Istruzioni per l'uso. Per le istruzioni d'uso complete consultare il manuale dello strumento specifico del produttore.

## **Procedura di Test - Metodo Manuale**

### **Metodo Dell'Endpoint**

1. Aggiungere 200 µl di plasma standard o sconosciuto in una provetta di plastica.
2. Incubare a 37°C per 2-4 minuti.

3. Aggiungere 200 µl di Trombina Bovina.
4. Miscelare e incubare a 37°C per 1 minuto.
5. Aggiungere 200 µl di SPECTROZYME TH.
6. Miscelare e incubare a 37°C per 1 minuto.
7. Aggiungere 200 µl di acido acetico glaciale al 50%.
8. Miscelare.
9. Aggiungere 200 µl di acqua\* (opzionale).

Leggere l'assorbanza a 405 nm in una semi-microcuvetta da 1 cm contro un bianco preparato nel seguente ordine:

200 µl di acido acetico

200 µl di diluizione standard

200 µl di Trombina Bovina

200 µl di SPECTROZYME TH

200 µl di acqua\* (opzionale)

(\*Alcuni spettrofotometri richiedono un volume minimo di 1 ml nella cuvetta.)

### **Metodo Cinetico**

Un analizzatore cinetico consente di misurare il tasso iniziale di idrolisi del substrato cromogenico. La procedura da utilizzare è la seguente:

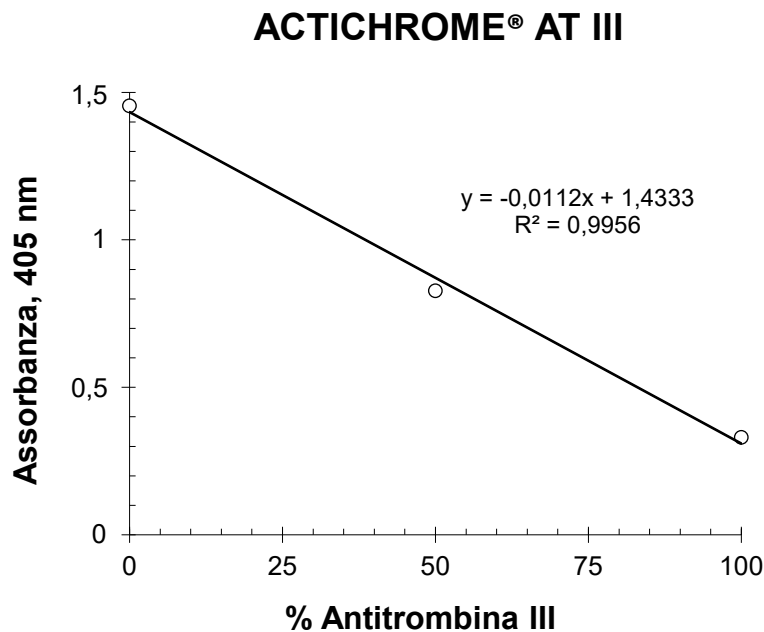
1. Aggiungere 5 µl di plasma standard o sconosciuto a 200 µl di tampone di diluizione.
2. Incubare a 37°C per 2-4 minuti.
3. Aggiungere 200 µl di Trombina Bovina.
4. Miscelare e incubare a 37°C per 1 minuto.
5. Aggiungere 200 µl di SPECTROZYME TH.
6. Misurare il tasso di variazione dell'assorbanza a 405 nm.

## RISULTATI

### Curva Standard Rappresentativa

Una curva standard è costruita tracciando l'assorbanza media di ciascuno standard di antitrombina III rispetto alla sua corrispondente attività in percentuale. Ogni volta che si esegue il test è necessario generare una curva standard. Tracciare la linea del miglior adattamento tra i punti, tipicamente un'equazione lineare, per l'analisi dei dati.

La seguente curva standard è esclusivamente a scopo dimostrativo.



### CALCOLO DEI RISULTATI

Interpolare l'attività dell'antitrombina III del campione paziente direttamente dalla curva standard.

### CONTROLLO DI QUALITÀ

I plasmi di controllo devono essere inclusi nell'esecuzione ogniqualvolta vengono utilizzati reagenti appena ricostituiti. Possono essere utilizzati il Controllo Speciale di Coagulazione Normale, REF C.BMD.SCCN180-01ML-A, e il Controllo Speciale di Coagulazione Anormale, REF C.BMD.SCCA180-01ML-A. I livelli ottenuti per questi plasmi di controllo devono rientrare negli intervalli specificati. Se questi plasmi di controllo non riescono a produrre livelli di antitrombina III che rientrano nell'intervallo specificato, l'esecuzione deve essere ripetuta. Contattare BioMedica Diagnostics se

nemmeno il test ripetuto di questi plasma di controllo produce livelli di antitrombina III rientranti nei limiti accettabili.

## LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

I campioni itterici, lipemici ed emolizzati possono interferire con il test. Se il plasma campione è particolarmente itterico, occorre preparare un secondo bianco contenente la diluizione del plasma campione, invece della diluizione standard, e sottrarre la sua assorbanza dall'assorbanza ottenuta per il plasma campione.

## VALORI ATTESI

L'intervallo normale di AT III nel plasma è 75-125%. In pazienti con deficit ereditario di AT III possono essere osservati livelli di attività del 30-60%. Le diverse condizioni cliniche associate al deficit acquisito di AT III comprendono malattie epatiche, CID, sindrome nefrosica, embolia polmonare, ictus e tromboflebite. Anche l'uso di contraccettivi orali può ridurre i livelli di AT III.

## CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI

### Accuratezza

Negli studi clinici di confronto di ACTICHROME AT III con diversi altri kit cromogenici di antitrombina III disponibili in commercio è stata osservata la seguente correlazione:

$$\% \text{ AT III (altri test)} = 0,93\% \text{ AT III (ACTICHROME)} + 5,9 \quad (n=53, r=0,80)$$

### Precisione

Le seguenti stime di precisione (coefficiente di variazione) sono state osservate utilizzando la modalità semi-micro su endpoint arrestato. La precisione può essere notevolmente migliorata utilizzando una modalità cinetica.

% AT III	Coefficiente di Variazione	
	Intratest (n=20)	Intertest (n=10)
100	4,4%	5,8%
50	3,4%	6,4%

## Sensibilità

ACTICHROME AT III è sensibile al 10% di antitrombina III.

## Specificità

La specificità del sistema di test è stata stabilita in studi che impiegano plasma sottoposto a impoverimento selettivo di antitrombina III e aggiunta di antitrombina III purificata per ottenere varie concentrazioni di antitrombina III.




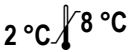








## TRACCIABILITÀ DEI CALIBRATORI E DEL MATERIALE DI CONTROLLO

Le informazioni sulla tracciabilità dei calibratori e del materiale di controllo sono disponibili su richiesta.

## RIFERIMENTI

1. Odegard, O. R., Lie, M. e Ablidgaard, U. *Thrombosis Research* 1975, **6**: 287-294.
2. Tolefsen, D. M. e Blank, M. K. *Journal of Clinical Investigations* 1981, **68**: 589-596.
3. Friberger, P., Egberg, N., Holmer, E., Hellgren, M. e Blomback, M. *Thrombosis Research* 1982, **25**: 433-436.

## DEFINIZIONI DEI SIMBOLI

	Consultare le istruzioni per l'uso		Avvertenza
	Dispositivo medicale diagnostico in vitro		Limite di temperatura: conservare a una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C
	Numero di lotto		Numero di Catalogo
	Data di scadenza		Produttore
	Contenuto sufficiente per <n> test		Contiene...
	Marchio CE		Rappresentante Autorizzato nell'Unione Europea