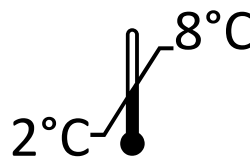
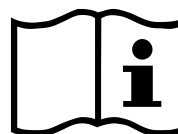


ACTICHROME® AT III

REF 838

*test chromogenny do pomiaru
aktywności antytrombiny III w osoczu ludzkim*



Obelis s.a
Boulevard Général Wahis 53, 1030 Brussels, BELGIA

PRZEZNACZENIE

Test ACTICHROME® AT III jest przeznaczony do ilościowego oznaczania aktywności antytrombiny III w osoczu ludzkim za pomocą testu chromogennego. Test jest przeznaczony do diagnostyki *in vitro*.

WYJAŚNIENIE TESTU

Antytrombina III to inhibitor osoczowych proteaz serynowych. Ważną funkcją antytrombiny III jest hamowanie aktywności trombiny. Normalnie poziom hamowania trombiny przez antytrombinę III jest niewielki (progresywne działanie antytrombiny). Jednak poziom hamowania może zostać zwiększony kilka tysięcy razy w obecności heparyny (aktywność kofaktorowa heparyny).

Toefsen i Blank zgłosili istnienie w ludzkim osoczu innego szybkiego, zależnego od heparyny inhibitora trombiny, kofaktora heparyny II. Białko to może zaburzać oznaczanie antytrombiny III, zwłaszcza przy dużych (2 jedn. USP/ml) stężeniach heparyny. W celu nadania swoistości antytrombinie III, obecny system testu stosuje niższe (1,0 jedn. USP/ml) końcowe stężenie heparyny, przy którym wzmacniana przez heparynę dezaktywacja trombiny przez kofaktor heparyny II jest pomijalna. Ponadto ludzki kofaktor heparyny II reaguje łatwiej z trombiną ludzką, niż z trombiną wołową (Friberger *et al.*). W związku z tym dalszą swoistość dla antytrombiny III w obecnym systemie testu zapewnia się przez wykorzystanie trombiny wołowej.

ZASADA METODY

W obecnej metodzie dwuetapowej (Odegard, *et al.*), trombinę dodaje się do rozcieńczonego osocza zawierającego antytrombinę III w obecności nadmiaru heparyny. Po początkowej inkubacji (etap 1) pozostałości trombiny oznacza się za pomocą swoistego dla trombiny substratu chromogenego (etap 2). Aktywność pozostałej trombiny jest odwrotnie proporcjonalna do stężenia antytrombiny III w osoczu.

ODCZYNNIKI

Test REF 838 zawiera ilość odczynników wystarczającą do wykonania 60 testów w metodyce ręczną.



R1 Trombina Wołowa: 6 fiolek (liofilizowane).

R2 SPECTROZYME® TH: 6 fiolek (liofilizowane).

R3 Bufor Testu: 6 fiolek, 5 ml, koncentrat 10X.

OSTRZEŻENIA I ŚRODKI OSTROŻNOŚCI

Ten produkt zawiera materiał pochodzenia zwierzęcego. Ponieważ żadna ze znanych metod badawczych nie może zapewnić całkowitej pewności, że produkty uzyskane z próbek zwierzęcych nie będą przenosić patogenów krwiopochodnych, z odczynnikiem tym należy postępować zgodnie z zaleceniami dla wszelkich próbek potencjalnie zakaźnych.

Trombina Wołowa	Ostrzeżenie		H315, H319; P264, P280, P302 + P352, P305 + P351 + P338, P337 + P313		
SPECTROZYME TH	Ostrzeżenie		<table border="1"><tr><td>ZAW.</td><td>Sól diocetowa H-D-cycloheksyloalanylo-alanylo-arginino-para-nitroanilidu</td></tr></table> H315, H319, H335, P261, P264, P280, P302 + P352, P305 + P351 + P338, P337 + P313	ZAW.	Sól diocetowa H-D-cycloheksyloalanylo-alanylo-arginino-para-nitroanilidu
ZAW.	Sól diocetowa H-D-cycloheksyloalanylo-alanylo-arginino-para-nitroanilidu				
Bufor Testu	–	–	Przestrzegać zasad dobrej praktyki laboratoryjnej.		



Zwroty Określające Zagrożenie:
H315 Działa drażniąco na skórę.
H319 Działa drażniąco na oczy.
H335 Może powodować podrażnienie dróg oddechowych.

Zwroty Wskazujące Środki Ostrożności:
P261 Unikać wdychania pyłu.
P264 Dokładnie umyć po użyciu.
P280 Stosować rękawice ochronne/odzież ochronną/ochronę oczu/ochronę twarzy.
P302 + P352 W PRZYPADKU KONTAKTU ZE SKÓRĄ: Umyć dużą ilością wody.
P305 + P351 + P338 W PRZYPADKU DOSTANIA SIĘ DO OCZU: Ostrożnie płukać wodą przez kilka minut. Wyjąć soczewki kontaktowe, jeżeli są i można je łatwo usunąć. Nadal płukać.
P337 + P313 W przypadku utrzymywania się działania drażniącego na oczy: Zasięgnąć porady/zgłosić się pod opiekę lekarza.


PRZYGOTOWANIE I PRZECHOWYWANIE ODCZYNNIKA

Nienaruszone fiołki odczynników są stabilne do daty ważności podanej na etykiecie, gdy są przechowywane w temperaturze 2°–8°C.

R1 Trombina Wołowa: Odtworzyć za pomocą 2 ml filtrowanej wody dejonizowanej. Odtworzona trombina wołowa jest stabilna przez:

	1 tydzień	1 miesiąc
	2°–8°C	–20°C

R2 SPECTROZYME TH: Odtworzyć za pomocą 2 ml wody oczyszczonej lub filtrowanej wody dejonizowanej. Odtworzony substrat jest stabilny przez:

	1 tydzień	1 miesiąc
	2–8°C	–20°C

R3 Bufor Testu: Rozcieńczyć Bufor Testu do 50 ml filtrowaną wodą dejonizowaną. Bufor testu w stężeniu roboczym jest stabilny:

	1 tydzień	1 miesiąc
	2–8°C	–20°C

POBIERANIE I PRZYGOTOWYWANIE PRÓBEK

Do testu można użyć osocza ubogopłytkowego pobranego na cytrynian. Patrz „Collection, Transport and Processing of Blood Specimens for Testing Plasma-Based Coagulation Assays and Molecular Hemostasis Assays; Approved Guidelines”, dokument CLSI H21-A5, Vol. 28, No. 5, Styczeń 2008. Osocze należy pobrać następująco:

1. Pobrać 9 objętości krwi w 1 objętości 3,2% (0,109 M) roztworu antykoagulantu cytrynianu trisodu.
2. Odwirować próbkę krwi przy 1500 x g przez 15 minut.

3. Osocze powinno być przechowywane w temperaturze 2°–8°C i oznaczone w ciągu 2 godzin. Alternatywnie, osocze może być przechowywane w temperaturze –20°C przez okres do 1 miesiąca.
4. Zamrożone osocze należy szybko rozmrozić w temperaturze 37°C. Rozmrożone osocze powinno być przechowywane w temperaturze 2°–8°C i oznaczone w ciągu 24 godzin.

PROCEDURA

Dostarczone Materiały — Patrz Odczynniki

Materiały Wymagane, Ale Niedostarczone

Woda dejonizowana lub destylowana typu 1

Specjalny Kalibrator Koagulacji, REF C.BMD.SCC030-01ML-A

Specjalna Kontrola Koagulacji Prawidłowa, REF C.BMD.SCCN180-01ML-A

Specjalna Kontrola Koagulacji Nieprawidłowa, REF C.BMD.SCCA180-01ML-A

Pipety jednorazowe o pojemności 0–200 µl, 200–1000 µl

Probówki plastikowe, zegar laboratoryjny, sucha lub mokra łaźnia o temperaturze 37°C

50% lodowy kwas octowy

Spektrofotometr obsługujący pomiar przy długości fali 405 nm, koagulometr

Kalibracja Testu

Do przygotowania wzorców antytrombiny III można użyć Specjalnego Kalibratora Koagulacji, REF C.BMD.SCC030-01ML-A, lub puli prawidłowego osocza ludzkiego (od co najmniej 10 prawidłowych dawców) zebranego w taki sam sposób jak osocza do oznaczania. Ponieważ doustne środki antykoncepcyjne oraz inne preparaty zawierające estrogen/progesteron mogą wpłynąć na poziom antytrombiny III, z puli należy wykluczyć osocze od osób przyjmujących takie preparaty.

Przygotować wzorce kalibracji antytrombiny III, kontroli oraz próbki osocza pacjenta w następujący sposób. Wzorce, kontrole i próbki należy oznaczyć natychmiast po przygotowaniu.

Wzorzec*	Objętość Specjalnego Kalibratora Koagulacji	Objętość Buforu Testu
100%	25 µl	1000 µl
50%	500 µL 100% wzorca	500 µl
0%	0 µl	1000 µl
Próbka Pacjenta/ Kontrola	Objętość Próbkki Pacjenta/Kontroli	Objętość Buforu Testu
	25 µl	1000 µl

* Faktyczna wartość wzorców antytrombiny III będzie zależna od swoistej dla serii wartości specjalnego kalibratora koagulacji.

Procedura Testu

Test ACTICHROME AT III można wykonywać ręcznie lub za pomocą półautomatycznych lub automatycznych analizatorów koagulacji (koagulometrów).

Firma BioMedica Diagnostics oferuje aplikacje urządzenia testu ACTICHROME AT III dla kilku koagulometrów. Aplikacje urządzenia mogą obejmować instrukcje programowania specyficzne dla danej platformy oraz dane wydajności różne od zamieszczonych w instrukcji użycia. W takich przypadkach informacje zamieszczone w aplikacji urządzenia mają pierwszeństwo przed informacjami zamieszczonymi w instrukcji użycia. W celu uzyskania pełnych instrukcji postępowania należy zapoznać się z instrukcją obsługi producenta danego urządzenia.

Procedura Testu — Metoda Ręczna

Metoda Punktu Końcowego

1. Dodaj 200 µl wzorca lub badanej próbki osocza do plastikowej probówki.
2. Inkubuj przez 2–4 minuty w temp. 37°C.
3. Dodaj 200 µl Trombiny Wołowej.

4. Wymieszaj i inkubuj przez 1 minutę w temp. 37°C.
5. Dodaj 200 µl odczynnika SPECTROZYME TH.
6. Wymieszaj i inkubuj przez 1 minutę w temp. 37°C.
7. Dodaj 200 µl 50% lodowatego kwasu octowego.
8. Wymieszaj.
9. Dodaj 200 µl wody* (opcjonalnie).

Odczytaj absorbancję przy 405 nm w semi-mikrokuwecie o drodze optycznej 1 cm względem ślepej przygotowanej w następującej kolejności:

200 µl kwasu octowego

200 µl rozcieńczonego wzorca

200 µl Trombiny Wołowej

200 µl SPECTROZYME TH

200 µl wody* (opcjonalnie)

(* Niektóre spektrometry wymagają w kuwecie minimalnej objętości 1 ml).

Metoda Kinetyczna

Możliwe jest użycie analizatora kinetycznego do zmierzenia początkowej szybkości hydrolizy substratu chromogennego. Procedurę należy wykonać w następujący sposób:

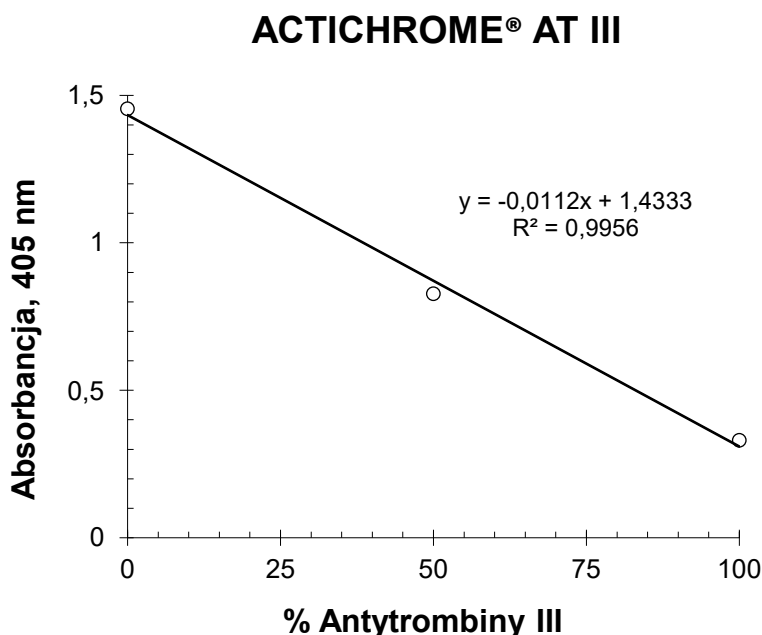
1. Dodaj 5 µl wzorca lub badanej próbki osocza do 200 µl buforu rozcieńczającego.
2. Inkubuj przez 2–4 minuty w temp. 37°C.
3. Dodaj 200 µl Trombiny Wołowej.
4. Wymieszaj i inkubuj przez 1 minutę w temp. 37°C.
5. Dodaj 200 µl odczynnika SPECTROZYME TH.
6. Zmierz szybkość zmiany absorbancji przy 405 nm.

WYNIKI

Reprezentatywna Krzywa Standardowa

Krzywą standardową tworzy się przez wykreślenie średniej absorbancji dla każdego wzorca antytrombiny III względem odpowiadającej mu aktywności w procentach. Krzywą standardową należy przygotować każdorazowo podczas wykonywania testu. Wykreśl linię najlepszego dopasowania pomiędzy punktami, zwykle opisywaną równaniem liniowym, do analizy danych.

Poniższa krzywa standardowa służy wyłącznie do celów demonstracyjnych.



OBLICZANIE WYNIKÓW

Interpolować aktywność antytrombiny III w próbce pacjenta bezpośrednio z krzywej standardowej.

KONTROLA JAKOŚCI

Osocza kontrolne powinny być włączone do badania zawsze wtedy, gdy używane są świeżo odtworzone odczynniki. Można użyć specjalnej kontroli koagulacji prawidłowej, REF C.BMD.SCCN180-01ML-A oraz specjalnej kontroli koagulacji nieprawidłowej, REF C.BMD.SCCA180-01ML-A. Poziomy uzyskane dla osoczy kontrolnych powinny mieścić się określonych zakresach. Jeśli wynik poziomu antytrombiny III dla osoczy kontrolnych nie mieści się w określonym zakresie, badanie należy powtórzyć. Jeśli powtórne

oznaczenie osoczy kontrolnych nie da wyniku poziomu antytrombiny III w określonym zakresie, należy skontaktować się z firmą BioMedica Diagnostics.

OGRANICZENIA PROCEDURY

Próbki żółtaczkowe, lipemiczne i zhemolizowane mogą zakłócać działanie testu. W przypadku osocza silnie żółtaczkowego należy przygotować drugą próbkę ślepą zawierającą rozcieńczenie osocza próbki zamiast standardowego rozcieńczenia i użyć tej próbki do odjęcia absorbancji od wyniku uzyskanego dla osocza próbki.

WARTOŚCI OCZEKIWANE

Zakres prawidłowy AT III w osoczu wynosi 75–125%. U pacjentów z dziedzicznym niedoborem AT III można zaobserwować poziomy aktywności rzędu 30–60%. Kilka stanów klinicznych powiązanych z nabytym niedoborem AT III obejmuje chorobę wątroby, DIC, zespół nerczycowy, zatorem tętnicy płucnej, udarem i zakrzepowym zapaleniem żył. Dodatkowo poziom AT III może zostać obniżony przez doustne środki antykoncepcyjne.

CHARAKTERYSTYKA SKUTECZNOŚCI

Dokładność

W badaniach klinicznych porównujących test ACTICHROME AT III z kilkoma innymi dostępnymi w handlu zestawami chromogenicznymi do oznaczania antytrombiny III zaobserwowano następującą korelację:

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

Precyzja

Przy użyciu testów wykonywanych w metodyce semi-mikro w trybie punktu końcowego zaobserwowano następujące oszacowania precyzji (współczynnika zmienności). Precyzja może ulec znaczącej poprawie w trybie kinetycznym.

% AT III	Współczynnik zmienności	
	W ramach testu (n=20)	Między testami (n=10)
100	4,4%	5,8%
50	3,4%	6,4%

Czułość

Test ACTICHROME AT III jest czuły do poziomu 10% antytrombiny III.

Swoistość

Swoistość systemu testu określono w badaniach z użyciem osocza, z którego wybiórczo usunięto antytrombinę III, a następnie dodano oczyszczonej antytrombiny III w celu uzyskania różnych stężeń antytrombiny III.













IDENTYFIKOWALNOŚĆ KALIBRATORÓW I MATERIAŁU KONTROLI

Informacje dotyczące identyfikowalności kalibratorów i materiału kontroli dostępne są na życzenie.

LITERATURA

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

DEFINICJE SYMBOLI

	Sprawdź w instrukcji użycia		Ostrzeżenie
	Wyrób medyczny do diagnostyki in vitro		Ograniczenia temperatury Przechowywać w temperaturze od 2°C do 8°C
	Numer serii		Numer katalogowy
	Data ważności		Producent
	Zawartość wystarczająca na <n> oznaczeń		Zawiera...
	Znak CE		Autoryzowany Przedstawiciel w Unii Europejskiej