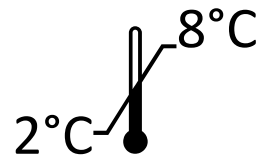
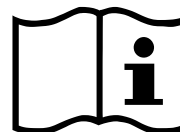


ACTICHROME® AT-III

REF 838

*ensaio cromogênico para medição de atividade
antitrombina III no plasma humano*



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

USO PRETENDIDO

ACTICHROME® AT III destina-se à determinação quantitativa da atividade antitrombina III no plasma humano através de um ensaio cromogênico. O ensaio destina-se ao diagnóstico *in vitro*.

EXPLICAÇÃO DO TESTE

O antitrombina III é um inibidor das proteases serinas do plasma. Uma função importante do antitrombina III é a inibição da atividade da trombina. Normalmente a taxa de inibição da trombina por antitrombina III é lenta (atividade antitrombínica progressiva). No entanto, a taxa de inibição pode ser aumentada em várias mil vezes na presença de heparina (atividade cofator de heparina).

Tolefsen e Blank relataram outro inibidor rápido de trombina dependente de heparina, Heparina Cofator II, em plasma humano. Esta proteína pode interferir nas determinações de antitrombina III, especialmente em concentrações elevadas (2 unidades USP/mL) de heparina. A fim de conferir especificidade ao antitrombina III, o presente sistema de ensaio utiliza uma concentração final menor (1,0 unidades USP/mL) de heparina, onde a inativação da trombina por cofator de heparina II é insignificante. Além disso, o cofator de heparina humana II reage mais facilmente com trombina humana do que com trombina bovina (Friberger, *et al.*). Assim, uma maior especificidade para o antitrombina III é conferida no presente sistema de ensaio através do uso de trombina bovina.

PRINCÍPIO DO MÉTODO

No presente método em dois estágios (Odegard, *et al.*), a trombina é adicionada a uma diluição plasmática contendo antitrombina III na presença de heparina em excesso. Após uma incubação inicial (fase 1), a trombina residual é determinada com um substrato cromogênico específico da trombina (fase 2). A atividade residual da trombina é inversamente proporcional à concentração de antitrombina III do plasma.

REAGENTES

A REF 838 contém reagentes suficientes para realizar 60 testes usando um método manual.



R1 Trombina Bovina: 6 frascos (liofilizado).

R2 SPECTROZYME® TH: 6 frascos (liofilizado).

R3 Tampão de Ensaio: 6 frascos, 5 ml, concentração de 10 vezes.

ADVERTÊNCIAS E PRECAUÇÕES

Este produto contém material de origem animal. Uma vez que nenhum método de teste conhecido pode fornecer uma garantia total de que os produtos derivados de amostras animais não transmitirão agentes patogênicos sanguíneos, esse reagente deverá ser manuseado conforme recomendado para quaisquer amostras potencialmente infecciosas.

Trombina Bovina	Aviso		H315, H319; P264, P280, P302 + P352, P305 + P351 + P338, P337 + P313		
SPECTROZYME TH	Aviso		<table border="1"><tr><td>CONT</td><td>H-D-ciclohexilalanil-alanil-arginina-para-nitroanilida sal diacetato</td></tr></table> H315, H319, H335, P261, P264, P280, P302 + P352, P305 + P351 + P338, P337 + P313	CONT	H-D-ciclohexilalanil-alanil-arginina-para-nitroanilida sal diacetato
CONT	H-D-ciclohexilalanil-alanil-arginina-para-nitroanilida sal diacetato				
Tampão de Ensaio	-	-	Observe as boas práticas de higiene laboratorial.		

Declarações de Perigo:

H315 Provoca irritação à pele.
H319 Provoca irritação ocular grave.
H335 Pode causar irritação respiratória.



Declarações de Precaução:

P261 Evite respirar pó.
P264 Lave as mãos cuidadosamente após o manuseio.
P280 Use luvas de proteção/roupas de proteção/proteção ocular/proteção facial.
P302 + P352 EM CASO DE CONTATO COM A PELE: Lave com água em abundância.
P305 + P351 + P338 EM CASO DE CONTATO COM OS OLHOS: Enxágue cuidadosamente com água durante vários minutos. No caso de uso de lentes de contato, remova-as, se for fácil. Continue enxaguando.
P337 + P313 Se a irritação ocular persistir: Consulte um médico.



PREPARAÇÃO E ARMAZENAMENTO DE REAGENTES

Os frascos de reagentes intactos são estáveis até a data de validade do rótulo quando armazenados de 2° a 8°C.



R1 Trombina Bovina: Reconstituir com 2 ml de água filtrada desionizada. A trombina bovina é estável por:

	1 semana	1 mês
	2°C – 8°C	-20°C

R2 SPECTROZYME TH: Reconstituir com 2 ml de água purificada ou água filtrada desionizada. O substrato reconstituído é estável por:

	1 semana	1 mês
	2°C – 8°C	-20°C

R3 Tampão de Ensaio: Diluir o tampão de ensaio até 50 ml com água desionizada filtrada. O tampão de diluição de potência operacional é estável por:

	1 semana	1 mês
	2°C – 8°C	-20°C

COLETA E PREPARO DE AMOSTRAS

Para este ensaio pode ser usado plasma pobre em plaquetas recolhido de citratos. Consulte “Collection, Transport and Processing of Blood Specimens for Testing Plasma-based Coagulation Assays and Molecular Hemostasis Assays; Approved Guidelines-Fifth Edition”, CLSI Document H21-A5, Vol. 28, No. 5, Janeiro 2008. A coleta de plasma deve ser feita da seguinte forma:

1. Recolher 9 partes de sangue em 1 parte de 3,2% (0,109 M) de solução anticoagulante de citrato trissódico.
2. Centrifugar a amostra de sangue a 1.500 x g durante 15 minutos.

3. O plasma deve ser armazenado entre 2°C e 8°C e analisado em 2 horas. Alternativamente, o plasma pode ser armazenado a -20°C por 1 mês.
4. O plasma congelado deve ser descongelado rapidamente a 37°C. Os plasmas descongelados devem ser armazenados de 2° a 8°C e doseados em 24 horas.

PROCEDIMENTO

Materiais Fornecidos – Consultar Reagentes

Materiais Necessários, Mas Não Fornecidos

Água desionizada tipo 1 ou água destilada

Calibrador de Coagulação Especial, REF C.BMD.SCC030-01ML-A

Controle de Coagulação Especial Normal, REF C.BMD.SCCN180-01ML-A

Controle de Coagulação Especial Anormal, REF C.BMD.SCCA180-01ML-A

0-200 µL, 200-1000 µL pipetas simples

Tubos de ensaio em plástico, temporizador de laboratório, 37°C banho húmido ou seco

50% de ácido acético glacial

Espectrofotômetro operável a 405 nm, analisador de coagulação

Calibração de Ensaio

O Calibrador de Coagulação Especial, REF C.BMD.SCC030-01ML-A, ou um pool de plasma humano normal (pelo menos 10 doadores normais) que tenha sido coletado da mesma forma que os plasmas a serem testados, pode ser usado para a preparação dos padrões Antitrombina III. Uma vez que os contraceptivos orais e outras preparações de estrogénio/progesterona podem afetar os níveis de antitrombina III, o plasma dos utilizadores de tais preparações deve ser excluído da piscina.

Prepare padrões de calibração de Antitrobina III, controles e amostras de plasma do paciente da seguinte forma. Ensaie os padrões, os controles e as amostras imediatamente após a preparação.

Padrão*	Volume do Calibrador de Coagulação Especial	Volume do Tampão de Ensaio
100%	25 µL	1000 µL
50%	500 µL do Padrão 100%	500 µL
0%	0 µL	1000 µL
Amostra/Controle do Paciente	Volume da Amostra/Controle do Paciente	Volume do Tampão de Ensaio
	25 µL	1000 µL

*O valor real dos padrões de Antitrombina III dependerá do valor específico do calibrador de coagulação especial.

Procedimento de Ensaio

O ACTICHROME AT-III pode ser realizado manualmente ou por meio de analisadores de coagulação semiautomatizados ou automatizados.

A BioMedica Diagnostics oferece aplicações do instrumento para executar o ACTICHROME AT-III em vários analisadores de coagulação. Essas Aplicações de instrumentos podem conter dados de programação e desempenho específicos da plataforma que diferem dos dados fornecidos nestas Instruções de uso. Nesses casos, as informações contidas na Aplicação de instrumento substituem as informações desta Instrução de uso. Consulte o manual do instrumento do fabricante específico para obter as instruções de operação completas.

Procedimento de Ensaio - Método Manual

Método Endpoint

1. Adicione 200 µL de plasma padrão ou desconhecido a um tubo de plástico.
2. Incube a 37°C durante 2 a 4 minutos.
3. Adicione 200 µL de Trombina Bovina.

4. Misture e incube a 37°C durante 1 minuto.
5. Adicione 200 µL de SPECTROZYME TH.
6. Misture e incube a 37°C durante 1 minuto.
7. Adicione 200 µL de ácido acético glacial a 50%.
8. Mix.
9. Adicione 200 µL de água* (opcional).

Leia a absorvância a 405 nm em uma semimicrocuvette de 1 cm contra um branco preparado na seguinte ordem:

200 µL de ácido acético

200 µL de diluição padrão

200 µL Trombina Bovina

200 µL SPECTROZYME TH

200 µL de água* (opcional)

(*Alguns espectrofotômetros requerem um volume mínimo de 1 mL na cubeta)

Método Cinético

Um analisador cinético pode ser usado para medir a taxa inicial de hidrólise do substrato cromogênico. O procedimento a ser utilizado é o seguinte:

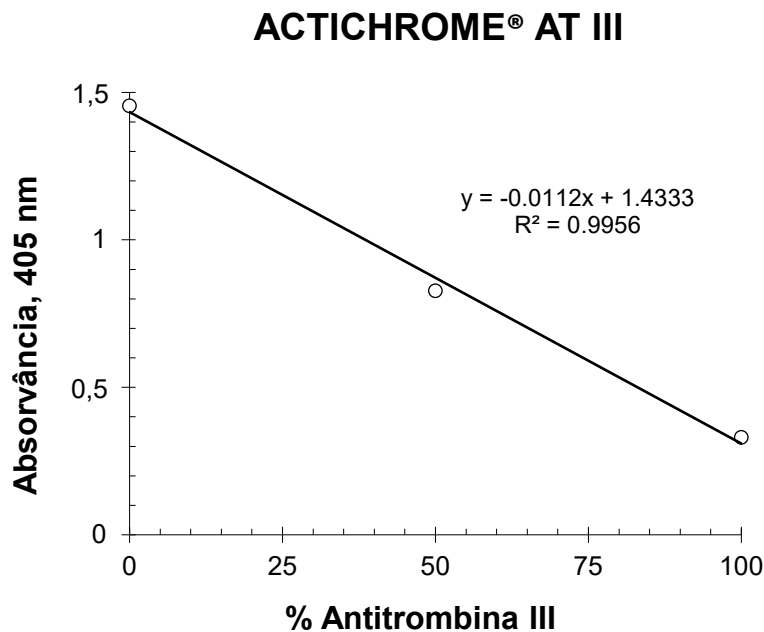
1. Adicione 5 µL de plasma padrão ou desconhecido a 200 µL de Tampão de Ensaio.
2. Incube a 37°C durante 2 a 4 minutos.
3. Adicione 200 µL de Trombina Bovina.
4. Misture e incube a 37°C durante 1 minuto.
5. Adicione 200 µL de SPECTROZYME TH.
6. Meça a taxa de variação da absorvância a 405 nm.

RESULTADOS

Curva Padrão Representativa

Uma curva padrão é construída ao traçar a absorção média de cada padrão de Antitrombina III em relação a sua atividade correspondente em porcentagem. Uma curva padrão deve ser gerada cada vez que o ensaio é realizado. Desenhe a linha de melhor ajuste entre os pontos, normalmente uma equação linear, para análise de dados.

A seguinte curva padrão destina-se apenas para fins demonstração.



CÁLCULO DE RESULTADOS

Interpolar a atividade antitrombina III da amostra do paciente diretamente a partir da curva padrão.

CONTROLE DE QUALIDADE

Os plasmas de controle devem ser incluídos na análise sempre que são usados reagentes reconstituídos recentemente. O Controle de Coagulação Especial Normal, REF C.BMD.SCCN180-01ML-A, e o Controle de Coagulação Especial Anormal, REF C.BMD.SCCA180-01ML-A, podem ser usados. Os níveis obtidos para estes plasmas de controle devem estar dentro dos limites especificados. Se os plasmas de controle não gerarem os níveis de Antitrombina III dentro do intervalo especificado, a análise

deverá ser repetida. Entre em contato com a BioMedica Diagnostics se o ensaio repetido dos controles não gerar os níveis de Antitrombina III dentro dos limites aceitáveis.

LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

Amostras de natureza icterica, lipêmica e hemolítica podem interferir com o ensaio. Se a amostra de plasma for muito icterica, deverá ser preparado um segundo branco contendo a diluição de plasma da amostra em vez da diluição padrão e a sua absorvância subtraída da absorvância obtida para o plasma da amostra.

VALORES ESPERADOS

O intervalo normal de AT III no plasma é de 75%-125%. Níveis de atividade de 30-60% podem ser observados em pacientes com deficiência hereditária de AT III. Várias condições clínicas associadas à deficiência de AT III adquirida incluem doença hepática, DIC, síndrome nefrótica, embolia pulmonar, acidente vascular cerebral e tromboflebite. Além disso, o uso de contraceptivos orais pode reduzir os níveis de AT III.

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

Precisão

Em estudos clínicos comparando o ACTICHROME AT III com vários outros kits cromogênicos antitrombina III disponíveis comercialmente, foi observada a seguinte correlação:

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

Precisão

As seguintes estimativas de precisão (coeficiente de variação) foram observadas usando o modo de ponto final semimicro parado. A precisão pode ser significativamente melhorada usando um modo cinético.

% AT III	Coeficiente de Variação	
	Intra-Assay (n=20)	Inter-Assay (n = 10)
100	4,4%	5,8%
50	3,4%	6,4%

Sensibilidade

ACTICHROME EM III é sensível a 10% de antitrombina III.

Especificidade

A especificidade do sistema de ensaio foi estabelecida em estudos que empregam plasma que foi seletivamente esgotado de antitrombina III seguido pela adição de antitrombina III purificada para atingir várias concentrações de antitrombina III.








RASTREABILIDADE DE CALIBRADORES E MATERIAL DE CONTROLE

Informações sobre rastreabilidade de calibradores e material de controle estão disponíveis mediante solicitação.

REFERÊNCIAS

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.

DEFINIÇÕES DOS SÍMBOLOS

	Consulte as Instruções de uso		Aviso
	Dispositivo médico para diagnóstico in vitro		Limitação de temperatura Armazenar de 2°C a 8°C
	Número do lote		Número de catálogo
	Data de expiração		Fabricado por
	Contém o suficiente para <n> testes		Contém...
	Marca CE		Representante Autorizado da União Europeia