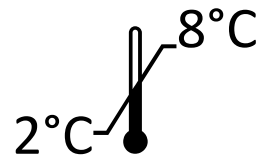


ACTICHROME® AT-III

REF 838

*prueba cromogénica para medir la actividad
de la antitrombina III en plasma humano*



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

USO PREVISTO

ACTICHROME® AT III está diseñado para la determinación cuantitativa de la actividad de la antitrombina III en plasma humano mediante una prueba cromogénica. La prueba está diseñada para uso diagnóstico *in vitro*.

EXPLICACIÓN DE LA PRUEBA

La antitrombina III es un inhibidor de la serina proteasa plasmática. Una función importante de la antitrombina III es la inhibición de la actividad de la trombina. Normalmente, la velocidad de inhibición de la trombina por la antitrombina III es lenta (actividad antitrombina progresiva). Sin embargo, la velocidad de inhibición puede aumentarse miles de veces en presencia de heparina (actividad de cofactor de heparina).

Tolefsen y Blank han informado acerca de otro inhibidor rápido de la trombina dependiente de la heparina en plasma humano, el Cofactor II de la heparina. Esta proteína puede interferir con las determinaciones de la antitrombina III, especialmente a concentraciones altas de heparina (2 USP unidades/ml). Para conferir especificidad a la antitrombina III, el presente sistema de prueba usa una concentración final de heparina más baja (1,0 USP unidades/ml) en donde la inactivación de la trombina potenciada por el cofactor II de la heparina es insignificante. Además, el cofactor II de la heparina humana reacciona más fácilmente con la trombina humana que con la trombina bovina (Friberger et al.). De este modo, la especificidad adicional para la antitrombina III se imparte en el presente sistema de prueba mediante el uso de trombina bovina.

PRINCIPIO DEL MÉTODO

En el presente método de dos etapas (Odegard, *et al.*), se agrega trombina a una dilución de plasma que contiene antitrombina III en presencia de un exceso de heparina. Después de una incubación inicial (etapa 1), la trombina residual se determina con un sustrato cromogénico específico de trombina (etapa 2). La actividad residual de la trombina es inversamente proporcional a la concentración de antitrombina III en el plasma.

REACTIVOS

REF 838 contiene reactivos suficientes para realizar 60 pruebas utilizando un método manual



R1 Trombina Bovina: 6 viales (liofilizados).

R2 SPECTROZYME® TH: 6 viales (liofilizados).

R3 Tampón de Prueba: 6 viales, 5 ml, 10X de concentrado.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

Este producto contiene material de origen animal. Como ningún método de prueba conocido puede proporcionar una garantía completa de que los productos derivados de muestras de animales no transmitirán patógenos transmitidos por la sangre, este reactivo debe manipularse como se recomienda para cualquier muestra potencialmente infecciosa.

Trombina Bovina	Advertencia		H315, H319; P264, P280, P302 + P352, P305 + P351 + P338, P337 + P313		
SPECTROZYME TH	Advertencia		<table border="1"><tr><td>CONT</td><td>Sal de diacetato de H-D-ciclohexilalanil-alanil-arginina-para-nitroanilida</td></tr></table> H315, H319, H335, P261, P264, P280, P302 + P352, P305 + P351 + P338, P337 + P313	CONT	Sal de diacetato de H-D-ciclohexilalanil-alanil-arginina-para-nitroanilida
CONT	Sal de diacetato de H-D-ciclohexilalanil-alanil-arginina-para-nitroanilida				
Tampón de Prueba	-	-	Observe las buenas prácticas de higiene en el laboratorio.		

Declaraciones de Peligro:

H315 Provoca irritación cutánea.
H319 Provoca irritación ocular grave.
H335 Puede provocar irritación respiratoria.



Declaraciones Cautelares:

P261 Evitar respirar el polvo.
P264 Lavarse exhaustivamente después de la manipulación.
P280 Usar guantes protectores, ropa protectora, protección ocular, protección facial.
P302 + P352 EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL:
Lavar con abundante agua.
P305 + P351 + P338 EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Enjuague cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quítese los lentes de contacto, si los hay y es fácil quitárselos. Continúe enjuagando.
P337 + P313 Si persiste la irritación ocular: Obtenga asesoramiento/atención médica.



PREPARACIÓN Y ALMACENAMIENTO DE REACTIVOS

Los viales intactos de reactivos son estables hasta la fecha de caducidad de la etiqueta cuando se almacenan A 2°C - 8°C.



R1 Trombina Bovina: Reconstituya con 2 ml de agua desionizada filtrada. La Trombina Bovina reconstituida es estable por:

	1 semana	1 mes
	2°C-8°C	-20°C

R2 SPECTROZYME TH: Reconstituya con 2 ml de agua purificada o agua desionizada filtrada. El substrato reconstituido es estable por:

	1 semana	1 mes
	2°C-8°C	-20°C

R3 Tampón de Prueba: Diluya el Tampón de prueba hasta 50 ml con agua desionizada filtrada. El tampón de prueba a la concentración de trabajo es estable durante:

	1 semana	1 mes
	2°C-8°C	-20°C

RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

Para esta prueba se puede utilizar plasma pobre en plaquetas recolectado con citrato. Consulte "Collection, Transport and Processing of Blood Specimens for Testing Plasma-based Coagulation Assays and Molecular Hemostasis Assays; Approved Guidelines" (Recolección, transporte y procesamiento de muestras de sangre para pruebas de coagulación basadas en plasma y pruebas de hemostasia molecular; Directrices aprobadas), documento CLSI H21-A5, Vol. 28, N° 5, Enero de 2008. La recolección de plasma se debe realizar de la siguiente manera:

1. Recoja 9 partes de sangre en 1 parte de solución anticoagulante de citrato trisódico al 3,2% (0,109 M).

2. Centrifugue la muestra de sangre a 1.500 x g durante 15 minutos.
3. El plasma debe almacenarse a 2°C - 8°C y probarse en un lapso de 2 horas. Opcionalmente, el plasma puede almacenarse a -20°C durante hasta 1 mes.
4. El plasma congelado debe descongelarse rápidamente a 37°C. Los plasmas descongelados deben almacenarse de 2°C - 8°C y probarse en 24 horas.

PROCEDIMIENTO

Materiales Suministrados – Ver Reactivos

Materiales Requeridos, Pero No Suministrados

Agua desionizada Tipo 1, o agua destilada

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

Control Especial de la Coagulación Normal, REF C.BMD.SCCN180-01ML-A

Control Especial de la Coagulación Anormal, REF C.BMD.SCCA180-01ML-A

Pipetas individuales de 0-200 µl, 200-1000 µl

Tubos de ensayo de plástico, temporizador de laboratorio, baño húmedo o seco a 37°C

50% de ácido acético glacial

Espectrofotómetro operable a 405 nm, analizador de coagulación

Calibración de la Prueba

Para la preparación de los estándares de Antitrombina III se puede usar REF C.BMD.SCC030-01ML-A o plasma humano normal conjunto (de al menos 10 donantes normales) que se haya recolectado de la misma manera que los plasmas a analizar. Como los anticonceptivos orales y otras preparaciones de estrógeno/progesterona pueden afectar los niveles de antitrombina III, el plasma de los usuarios de dichas preparaciones debe excluirse del grupo.

Prepare los estándares de calibración de la Antitrombina III, los controles y las muestras de plasma del paciente de la siguiente manera. Utilice los estándares de prueba, los controles y las muestras inmediatamente después de la preparación.

Estándar*	Volumen del Calibrador de Coagulación Especial	Volumen del Tampón de Prueba
100%	25 µl	1000 µl
50%	500 µl de estándar 100%	500 µl
0%	0 µl	1000 µl
Muestra del Paciente/Control	Volumen Muestra del Paciente/Control	Volumen del Tampón de Prueba
	25 µl	1000 µl

* El valor real de los Estándares de de Antitrombina III dependerá del valor específico del lote del Calibrador de Coagulación Especial.

Procedimiento de Ensayo

ACTICHROME AT III puede realizarse manualmente, o utilizando analizadores de coagulación semiautomáticos o automatizados.

BioMedica Diagnostics ofrece aplicaciones instrumentales para realizar el ACTICHROME AT III en varios analizadores de coagulación. Estas aplicaciones de los instrumentos pueden contener datos de programación y rendimiento específicos de la plataforma que difieren de los que se proporcionan en estas instrucciones de uso. En estos casos, la información contenida en la aplicación del instrumento sustituye a la información de la presente instrucción de uso. Por favor, consulte el manual del instrumento del fabricante específico para obtener las instrucciones de funcionamiento completas.

Procedimiento de Prueba: Método Manual

Método de Punto Final

1. Añada 200 µl de plasma estándar o desconocido a un tubo de plástico.
2. Incube a 37°C durante 2-4 minutos.
3. Añada 200 µl de Trombina Bovina.
4. Mezcle e incube a 37°C durante 1 minuto.

5. Añada 200 µl de SPECTROZYME TH.
6. Mezcle e incube a 37°C durante 1 minuto.
7. Añada 200 µl de ácido acético glacial al 50%.
8. Mezcle.
9. Añada 200 µl de agua* (opcional).

Tome la lectura de la absorbancia a 405 nm en una cubeta semi-micro de 1 cm contra un blanco preparado en el siguiente orden:

200 µl de ácido acético

200 µl de dilución estándar

200 µl de Trombina Bovina

200 µl de SPECTROZYME TH

200 µl de agua* (opcional)

(*Algunos espectrofotómetros requieren un volumen mínimo de 1 ml en la cubeta.)

Método Cinético

Se puede usar un analizador cinético para medir la velocidad inicial de la hidrólisis del sustrato cromogénico. El procedimiento a utilizar es el siguiente:

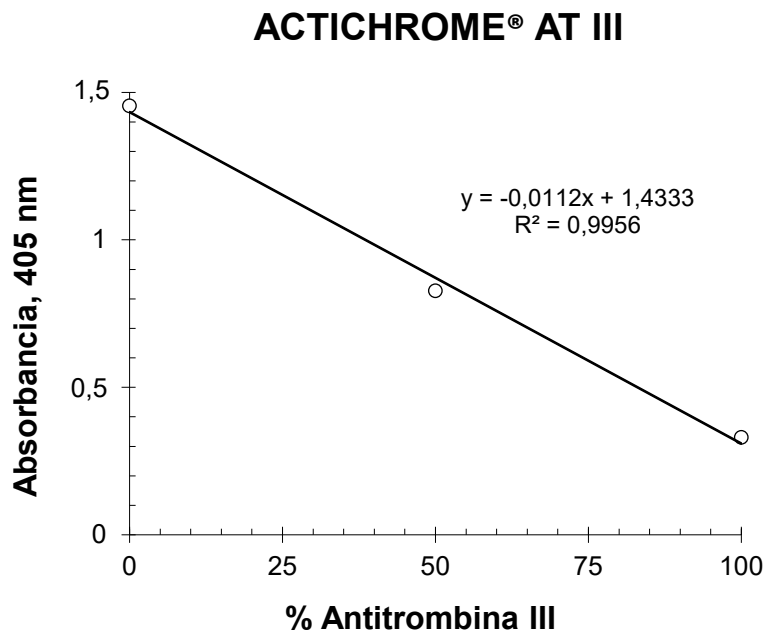
1. Añada 5 µl de plasma estándar o desconocido a 200 µl de Tampón de Prueba.
2. Incube a 37°C durante 2-4 minutos.
3. Añada 200 µl de Trombina Bovina.
4. Mezcle e incube a 37°C durante 1 minuto.
5. Añada 200 µl de SPECTROZYME TH.
6. Mida la tasa de cambio de la absorbancia a 405 nm.

RESULTADOS

Curva Estándar Representativa

Una curva estándar se construye graficando el tiempo medio de coagulación para cada estándar de Antitrombina III versus su actividad correspondiente en porcentaje. Se debe generar una curva estándar cada vez que se realiza la prueba. Dibuje la línea de mejor ajuste entre los puntos, típicamente una ecuación lineal, para el análisis de datos.

La siguiente curva estándar es solo para fines de demostración.



CÁLCULO DE RESULTADOS

Interpole la actividad de Antitrombina III de la muestra de plasma directamente de la curva estándar.

CONTROL DE CALIDAD

El plasma de control debe incluirse en el proceso siempre que se usen reactivos recién reconstituidos. Se puede utilizar el Control Especial de la Coagulación Normal, REF C.BMD.SCCN180-01ML-A, y el Control Especial de la Coagulación Anormal, REF C.BMD.SCCA180-01ML-A. Los valores de los plasmas de control deben estar dentro de los rangos establecidos. Si el plasma de control falla en producir los niveles de Antitrombina III dentro del rango especificado, se debe repetir el proceso. Póngase en

contacto con BioMedica Diagnostics si los ensayos repetidos del plasma de control no producen niveles de antitrombina III dentro de límites aceptables.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Las muestras ictericas, lipemicas y hemolizadas pueden interferir con la prueba. Si el plasma de muestra es muy icterico, se debe preparar un segundo blanco que contenga la dilucion de plasma de muestra en lugar de la dilucion estandar y restar su absorbancia de la absorbancia obtenida para el plasma de muestra.

VALORES ESPERADOS

El rango normal de la AT III en plasma es del 75% al 125%. En pacientes con deficiencia hereditaria de AT III se pueden llegar a observar niveles de actividad del 30% al 60%. Entre las afecciones clinicas asociadas con la deficiencia adquirida de AT III estan la enfermedad hepatica, la coagulacion intravascular diseminada (DIC, por sus siglas en ingles), el sindrome nefrotico, la embolia pulmonar, el ataque cerebral y la tromboflebitis. Ademàs, el uso de anticonceptivos orales puede reducir los niveles de AT III.

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

Exactitud

En estudios clinicos que compararon ACTICHROME III con algunos kits de antitrombina III cromogenica comercialmente disponibles, se observó la siguiente correlacion:

$$\% \text{ de ATIII (otras pruebas)} = 0,93\% \text{ AT ATIII (ACTICHROME)} + 5,9 \text{ (n=53, r = 0,80)}$$

Precisión

Al utilizar el modo semi-micro de punto final detenido se observaron las siguientes estimaciones de precision (coeficiente de variacion). La precision se puede mejorar significativamente utilizando un modo cinetico.

% de AT III	Coeficiente de Variación	
	Intraprueba (n=20)	Interprueba (n=10)
100	4,4%	5,8%
50	3,4%	6,4%

Sensibilidad

ACTICHROME AT III es sensible al 10% de la antitrombina III.

Especificidad

La especificidad del sistema de prueba se ha establecido en estudios que emplean plasma en el que se ha empobrecido selectivamente la antitrombina III seguido de la adición de antitrombina III purificada para lograr diversas concentraciones de antitrombina III.




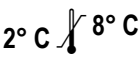








TRAZABILIDAD DE CALIBRADORES Y MATERIAL DE CONTROL

La información sobre la trazabilidad de los calibradores y el material de control está disponible bajo solicitud.

REFERENCIAS

1. Odegard, O. R., Lie, M. y 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. y Blomback, M. *Thrombosis Research* 1982, **25**: 433-436.

DEFINICIONES DE SÍMBOLOS

	Consulte las instrucciones de uso		Advertencia
	Dispositivo médico de diagnóstico in vitro		Limitación de temperatura Almacenar entre 2°C y 8°C
	Número de lote		Número de Catálogo
	Fecha de caducidad		Fabricante
	Contiene suficiente para <n> pruebas		Contiene...
	marca de CE		Representante Autorizado de la Unión Europea