SIEMENS

OWWRG17E0502 (220)

Berichrom® Antithrombin III (A)
Berichrom AT III

See shaded sections - updated information versus edition from July 2007

Intended Use
For the quantitative determination of the functional activity of antithrombin III (AT III) in plasma using automated analyzers for diagnosing reduced AT III synthesis or increased consumption and for monitoring substitution therapy.

Summary and Explanation
Antithrombin III is the plasmatic inhibitor of thrombin and activated factor X and forms an irreversible inactive complex with these enzymes. Inactivation of the activated coagulation factors is greatly accelerated by heparin. Berichrom® Antithrombin III (A) aids in the quick determination of physiologically active antithrombin III and allows the diagnosis of inherited and acquired antithrombin III deficiency, which represents an increased risk of thrombosis. Acquired antithrombin III deficiencies often occur as a result of consumption after major operations or disseminated intravascular coagulation (DIC) associated with sepsis, nephrosis, parenchymal liver damage (hepatitis, drug intoxication, alcoholism) and contraceptives containing estrogen[1]. The test enables the early detection of patients at increased risk of thrombosis.

Principle of the Method
The antithrombin III in the sample is converted by heparin into an immediate inhibitor and inactivates the thrombin present. The residual thrombin content is determined in a kinetic test measuring the increase in absorbance at 405 nm according to the following reaction:

$$AT\ III_{sample} + Thrombin_{excess} \xrightarrow{Heparin} [AT\ III\text{-}Thrombin] + Thrombin_{residual}$$

$$Tos\text{-}Gly\text{-}Pro\text{-}Arg\text{-}ANBA\text{-}IPA \xrightarrow{residual\ thrombin} Tos\text{-}Gly\text{-}Pro\text{-}Arg\text{-}OH + ANBA\text{-}IPA$$

The absorbance change is inversely correlated to the antithrombin III activity in the Sample.

Reagents
Note: Berichrom® Antithrombin III (A) can be used manually or on automated coagulation analyzers. Siemens Healthcare Diagnostics provides Reference Guides (Application Sheets) for several coagulation analyzers. The Reference Guides (Application Sheets) contain analyzer/assay-specific handling and performance information which may differ from that provided in these Instructions for Use. In such a case, the information contained in the Reference Guides (Application Sheets) supersedes the information in these Instructions for Use. In addition, please also consult the instruction manual of the instrument manufacturer.

Materials provided

Berichrom® Antithrombin III (A), REF *OWWR 15:*

6 x ⟶ 15 mL REAGENT THR, Thrombin Reagent
6 x ⟶ 3 mL SUBSTRATE, Substrate Reagent
1 x 100 mL REAGENT THR DILUENT, Buffer Solution

Berichrom® Antithrombin III (A), REF *OWWR 17:*

6 x ⟶ 5 mL REAGENT THR, Thrombin Reagent
3 x ⟶ 3 mL SUBSTRATE, Substrate Reagent
1 x 30 mL REAGENT THR DILUENT, Buffer Solution

Composition

Thrombin Reagent, bovine thrombin, lyophilized; heparin and aprotinin

Substrate Reagent, lyophilized; concentration in the working solution of Tosylglycyl-L-prolyl-L-arginyl-5-amino-2-nitrobenzoic acid-isopropylamide (Tos-Gly-Pro-Arg-ANBA-IPA) 4 mmol/L

Buffer Solution: Tris(hydroxymethyl)-aminomethane (100 mmol/L), NaCl (8.7 g/L), pH 8.2

Preservative: sodium azide (< 1 g/L)

Warnings and Precautions

1. For *in-vitro* diagnostic use only.
2. Contains sodium azide (< 1 g/L) as a preservative. Sodium azide can react with copper or lead pipes in drain lines to form explosive compounds. Dispose of properly in accordance with local regulations.

Preparation of the Reagents

REAGENT THR: Reconstitute with the amount of REAGENT THR DILUENT indicated on the label and incubate for 30 minutes at +15 to +25 °C before use.

To ensure the homogeneity of the reagent, after reconstitution and shortly before use, gently mix the dissolved reagent.

SUBSTRATE: Dissolve the contents of the vial with the amount of distilled or deionized water indicated on the label.

NOTE: Make sure that SUBSTRATE is fully dissolved.

Storage and Stability

The test kit may be used up to the expiry date indicated on the label if stored unopened at +2 to + 8 °C.

Stability after reconstitution:

Temperature	REAGENT THR	SUBSTRATE
+2 to +8 °C	2 weeks	6 weeks
-20 °C	3 months	6 months

Reconstituted REAGENT THR may be frozen and thawed in the original vial up to five times and the SUBSTRATE up to ten times. Do not exceed the stability period listed in the table.

REAGENT THR DILUENT is stable for 6 months after it is first opened if stored at +2 to +8 °C.

Information about on-board stability is specified in the Application Sheets for the different coagulation analyzers.

Materials required but not provided

Standard Human Plasma, REF ORKL
Control Plasma N, REF ORKE
Control Plasma P, REF OUPZ
Imidazole Buffer Solution, REF OQAA, *or*
Dade® Owren's Veronal Buffer, REF B4234 *or*
Dade® CA System Buffer, REF B4265 *or*
Isotonic saline solution
Distilled or deionized water

Specimens
To obtain the plasma, carefully mix 1 part sodium citrate solution (0.11 mol/L) with 9 parts venous blood, avoiding the formation of foam. An evacuated tube system or syringe may be used. Please refer to CLSI document H21-A5 for further details[2]. Centrifuge immediately at no less than 1,500 x g for at least 15 minutes.

Stability of the samples:

-20 °C	1 month
+2 to +8 °C	2 days
+15 to +25 °C	6 hours

Plasma stored at -20 °C is to be thawed within 10 minutes at +37 °C, after which the assay is to be performed within 2 hours. Do not freeze multiple times. Use the plasma undiluted.

Procedure
Pipetting scheme (example)

Citrated plasma	10 µL
REAGENT THR	600 µL
Mix and incubate for 3 minutes at +37 °C	
SUBSTRATE	100 µL
Determine ΔA_{405nm} /min	

Evaluation

Analysis takes place automatically in the coagulation analyzer.

Calculating the reference curve

A reference curve is generated by automatic determination of different dilutions of Standard Human Plasma. The reference curve must be re-generated if there is a change in the instrument or in the lot of Berichrom® Antithrombin III (A) used, or if there is any change in the experimental conditions.

Internal Quality Control

Normal range: Control Plasma N
Pathological range: Control Plasma P

Two levels of quality control material (normal and pathologic range) have to be measured at start of the test run, with each calibration, upon reagent vial changes and at least every eight hours on each day of testing. Each laboratory should determine its own quality control range, either by means of the target values and ranges provided by the manufacturer of the controls or by means of control values determined in the laboratory. If the measured control value lies outside of the pre-determined range, then the reagents, the reference curve and the coagulation analyzer should be checked. Do not report patient results until the problem has been identified, corrected and documented.

Limitations of the Procedure
Therapeutic doses of hirudin or other direct thrombin inhibitors will cause erroneously increased antithrombin III activity.

Some very rare genetic variants with reduced functional activity like antithrombin III Basel may yield results within the reference range.

Siemens has validated use of these reagents on various analyzers to optimize product performance and meet product specifications. User defined modifications are not supported by Siemens as they may affect performance of the system and assay results. It is the responsibility of the user to validate modifications to these instructions or use of the reagents on analyzers other than those included in Siemens Application Sheets or these Instructions for Use.

Results of this test should always be interpreted in conjunction with the patient's medical history, clinical presentation and other findings.

Reference Range

Plasma specimens obtained from ostensibly healthy donors (n = 309) were tested using the Berichrom® Antithrombin III (A) assay on the BCS®/BCS® XP System with the following results (2.5th to 97.5th percentile): 79.4 to 112 % of the norm (for adults). Other system specific results are given in the respective Reference Guides (Application Sheets).

Reference intervals vary from laboratory to laboratory depending on the population served and the technique, method, equipment and reagent lot used. Therefore, each laboratory must establish its own reference intervals or verify them whenever one or more of the aforementioned variables are changed.

Specific Performance Characteristics

Measuring range

The measuring range is from 0 to 140 % of the norm.

Specificity

Aprotinin in the Thrombin Reagent blocks the activity of any plasmin present in the sample[3].

Interference from heparin cofactor II can be disregarded since bovine thrombin is used in the test[4].

Sensitivity

The detection limit is approximately 3.7 % of the norm.

Precision

The precision of Berichrom® AT III (A) was calculated with Control Plasma N and Control Plasma P on a Sysmex® CA-1500 system over 5 days in 8-fold determination.

The coefficient of variation within run was 1.3 % and 2.7 % for Control Plasma N and Control Plasma P, respectively. From day to day, it was 4.6 % and 7.6 %, respectively.

Method comparison

In a comparison of Berichrom® AT III (A) with Berichrom® AT III (with manual dilution) using a Hitachi 717, 111 samples were determined in the range from 25 to 150 % of the norm. The coefficient of correlation was 0.99 (y-axis intercept: -3.7 % of the norm; slope: 0.98).

Bibliography

1. Hathaway WE. Clinical aspects of antithrombin III deficiency. Semin Hematol. 1991; 28: 19-23.
2. CLSI. Collection, Transport, and Processing of Blood Specimens for Testing Plasma-Based Coagulation Assays and Molecular Hemostasis Assays; Approved Guideline – Fifth Edition. CLSI document H21-A5 (ISBN 1-56238-657-3). CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 1908781898 USA, 2008.
3. Wendel HP, Heller W, Gallimore MJ. Aprotinin in therapeutic doses inhibits chromogenic peptide substrate assays for protein C. Thromb Res. 1994; 74: 543-8.
4. Friberger P, Egberg N, Holmer E, et al. Antithrombin assay - the use of human or bovine thrombin and the observation of a „second“ heparin cofactor. Thromb Res. 1982; 25: 433-6.

BCS, Berichrom and Dade are trademarks of Siemens Healthcare Diagnostics.

Sysmex is a registered trademark of SYSMEX CORPORATION.

Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH
Emil-von-Behring-Str. 76
35041 Marburg/Germany
www.siemens.com/diagnostics

USA Distributor: Siemens Healthcare Diagnostics Inc.
Newark, DE 19714 U.S.A.

Edition May 2010

Berichrom® Antithrombin III (A)
Berichrom AT III

Schattierte Abschnitte - Aktualisierte Informationen gegenüber der Ausgabe Juli 2007

Anwendungsbereich

Zur quantitativen Bestimmung der funktionellen Aktivität von Antithrombin III (AT III) in Plasma an Analysen-Automaten zur Diagnose von verminderter AT III-Synthese, erhöhtem Verbrauch und zur Überwachung einer Substitutionstherapie.

Diagnostische Bedeutung

Antithrombin III ist der plasmatische Inhibitor von Thrombin und aktiviertem Faktor X und bildet mit diesen Enzymen irreversibel einen inaktiven Komplex. Die Inaktivierung der aktivierten Gerinnungsfaktoren wird durch Heparin massiv beschleunigt. Berichrom® Antithrombin III (A) dient zur schnellen Bestimmung des physiologisch aktiven Antithrombins III und erlaubt die Diagnose von erblichem und erworbenem Antithrombin III-Mangel, der ein erhöhtes Thrombose-Risiko darstellt. Erworbene Antithrombin III-Mängel treten häufig infolge eines Verbrauchs nach großen Operationen oder infolge disseminierter intravaskulärer Gerinnung (DIC) bei Sepsis, Nephrosen, Leberparenchymschäden (Hepatitis, Drogenintoxikation, Alkoholismus) und östrogenhaltigen Kontrazeptiva[1] auf. Der Test ermöglicht ein frühzeitiges Erkennen von Patienten mit erhöhtem Thrombose-Risiko.

Prinzip der Methode

Das Antithrombin III der Probe wird durch Heparin in einen Sofort-Inhibitor überführt und inaktiviert vorgelegtes Thrombin. Der Rest-Thrombin-Gehalt wird in einem kinetischen Test mit Extinktionszunahme bei 405 nm nach folgendem Reaktionsschema bestimmt:

$$AT\ III_{Probe} + Thrombin_{Überschuss} \xrightarrow{Heparin} [AT\ III\text{-}Thrombin] + Thrombin_{Rest}$$

$$Tos\text{-}Gly\text{-}Pro\text{-}Arg\text{-}ANBA\text{-}IPA \xrightarrow{Rest\text{-}Thrombin} Tos\text{-}Gly\text{-}Pro\text{-}Arg\text{-}OH + ANBA\text{-}IPA$$

Die Extinktionsänderung ist umgekehrt proportional zur Antithrombin III-Aktivität in der Probe.

Reagenzien

Hinweis: Berichrom® Antithrombin III (A) kann manuell oder an automatischen Gerinnungsmessgeräten verwendet werden. Siemens Healthcare Diagnostics stellt für verschiedene Gerinnungsmessgeräte Referenzhandbücher (Applikationsvorschriften) zur Verfügung. Diese enthalten geräte-/testspezifische Informationen zur Abarbeitung und zu Leistungsdaten, die von den Informationen in dieser Gebrauchsanweisung abweichen können. In diesem Fall ersetzen die Informationen in den Referenzhandbüchern (Applikationsvorschriften) die Informationen in dieser Gebrauchsanweisung. Bitte auch die Bedienungsanleitung des Geräteherstellers beachten!

Inhalt der Handelspackungen

Berichrom® Antithrombin III (A), REF *OWWR 15:*

6 x ⟶ 15 ml REAGENT THR, Thrombin-Reagenz
6 x ⟶ 3 ml SUBSTRATE, Substrat-Reagenz
1 x 100 ml REAGENT THR DILUENT, Pufferlösung

Berichrom® Antithrombin III (A), REF *OWWR 17:*

6 x ⟶ 5 ml REAGENT THR, Thrombin-Reagenz
3 x ⟶ 3 ml SUBSTRATE, Substrat-Reagenz
1 x 30 ml REAGENT THR DILUENT, Pufferlösung

Zusammensetzung

Thrombin Reagenz: Thrombin vom Rind, lyophilisiert; Heparin und Aprotinin

Substrat-Reagenz, lyophilisiert; Konzentration in der Gebrauchslösung: Tosylglycyl-L-prolyl-L-arginyl-5-amino-2-nitrobenzoesäure-isopropylamid (Tos-Gly-Pro-Arg- ANBA-IPA) 4 mmol/l

Pufferlösung: Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (100 mmol/l), NaCl (8,7 g/l), pH 8,2
Konservierungsmittel: Natriumazid (< 1 g/l)

Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen

1. Nur zur *in-vitro*-diagnostischen Anwendung.
2. Enthält Natriumazid (< 1 g/l) als Konservierungsmittel. Natriumazid kann mit kupfer- oder bleihaltigen Abflussrohren explosive Verbindungen eingehen. Entsorgen Sie bitte ordnungsgemäß entsprechend den örtlichen Richtlinien.

Vorbereitung der Reagenzien

REAGENT THR: Mit der auf dem Etikett angegebenen Menge REAGENT THR DILUENT lösen und vor Gebrauch 30 Minuten bei +15 bis +25 °C inkubieren.
Zur Gewährleistung der Homogenität des Reagenzes, nach der Rekonstitution und kurz vor Gebrauch das gelöste Reagenz leicht mischen.

SUBSTRATE: Inhalt der Flasche mit der auf dem Etikett angegebenen Menge destillierten oder entionisierten Wasser lösen.

ANMERKUNG: Stellen Sie sicher, dass SUBSTRATE ebenfalls vollständig gelöst ist.

Haltbarkeit und Lagerungsbedingungen

Der Testkit ist ungeöffnet bei +2 bis +8 °C zu lagern und bis zu dem auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum verwendbar.

Stabilität nach Rekonstitution:

Temperatur	REAGENT THR	SUBSTRATE
+2 bis +8 °C	2 Wochen	6 Wochen
-20 °C	3 Monate	6 Monate

Das rekonstituierte REAGENT THR kann in der Originalflasche bis zu fünfmal und SUBSTRATE bis zu zehnmal eingefroren und aufgetaut werden. Hierbei darf die in der Tabelle angegebene maximale Stabilitätsdauer nicht überschritten werden. REAGENT THR DILUENT ist nach dem erstmaligen Öffnen 6 Monate bei +2 bis +8 °C stabil.

Die Angaben zur Stabilität auf dem Gerät sind den Applikationsvorschriften für die einzelnen Gerinnungsmessgeräte aufgeführt.

Zusätzlich benötigte Materialien

Standard-Human-Plasma, REF ORKL
Kontroll-Plasma N, REF ORKE
Kontroll-Plasma P, REF OUPZ
Imidazol-Pufferlösung, REF OQAA, *oder*
Dade® Owren's Veronal-Puffer, REF. B4234 *oder*
Dade® CA-System Puffer, REF B4265 *oder*
Isotonische Kochsalzlösung
Destilliertes oder entionisiertes Wasser

Untersuchungsmaterial

Zur Plasmagewinnung 1 Teil Natriumcitrat-Lösung (0,11 mol/l) mit 9 Teilen Venenblut sorgfältig unter Vermeidung von Schaumbildung mischen. Ein geschlossenes Abnahmesystem oder eine Spritze kann verwendet werden. Bitte beachten Sie hierzu auch die Hinweise im CLSI-Dokument H21-A5[2]. Sofort mindestens 15 Minuten bei mindestens 1.500 x g zentrifugieren.

Stabilität der Proben:

-20 °C 1 Monat
+2 bis +8 °C 2 Tage
+15 bis +25 °C 6 Stunden

Bei -20 °C gelagerte Plasmen innerhalb von 10 Minuten bei +37 °C auftauen und die Bestimmung dann innerhalb von 2 Stunden durchführen. Nicht mehrfach einfrieren. Das Plasma wird unverdünnt eingesetzt.

Testdurchführung

Pipettierschema (Beispiel)

Citratplasma REAGENT THR	10 µl 600 µl
Mischen und 3 Minuten bei +37 °C inkubieren	
SUBSTRATE	100 µl
ΔE_{405nm} /min bestimmen	

Auswertung

Die Auswertung erfolgt automatisch durch das Gerinnungsmessgerät.

Erstellung der Bezugskurve

Eine Bezugskurve wird durch automatische Bestimmung unterschiedlicher Verdünnungen von Standard-Human-Plasma erstellt.

Bei jedem Gerätewechsel und mit jeder neuen Charge Berichrom® Antithrombin III (A) sowie bei Änderung der experimentellen Bedingungen muss die Bezugskurve neu erstellt werden.

Interne Qualitätskontrolle

Normalbereich: Kontroll-Plasma N

Pathologischer Bereich: Kontroll-Plasma P

Bei jedem Wechsel der Reagenzfläschchen, zu Beginn eines Testlaufes, bei jeder Kalibration und mindestens alle 8 Stunden an jedem Testtag müssen zwei Kontrollen (eine im Normalbereich und eine im pathologischen Bereich) gemessen werden. Das Kontrollmaterial sollte wie die Probe behandelt werden. Jedes Labor sollte seinen Qualitätskontrollbereich entweder anhand der vom Hersteller der Kontrollen angegebenen Sollwerte und -bereiche oder anhand im Labor bestimmter Kontrollwerte festlegen. Liegt der gemessene Kontrollwert außerhalb des vorher festgelegten Bereichs, sollten Reagenzien, Bezugskurve und Gerinnungsmessgerät überprüft werden. Patientenbefunde dürfen erst dann weitergeleitet werden, sobald die Problematik identifiziert, korrigiert und dokumentiert wurde.

Einschränkungen der Testdurchführung

Therapeutische Dosen von Hirudin oder anderen direkten Thrombin-Inhibitoren führen zu einer fälschlich erhöhten Antithrombin III-Aktivität.

Einige sehr seltene genetische Varianten mit reduzierter funktioneller Aktivität wie Antithrombin III Basel können Resultate innerhalb des Referenzbereichs liefern.

Siemens hat den Einsatz dieser Reagenzien auf verschiedenen Analysengeräten auf optimale Produktleistung und Einhaltung der Produktspezifikationen überprüft. Vom Benutzer vorgenommene Änderungen werden von Siemens nicht unterstützt, da sie die Leistung des Systems und die Testergebnisse beeinflussen können. Es liegt in der Verantwortung des Benutzers, Änderungen an diesen Anleitungen oder die Verwendung dieser Reagenzien auf anderen als in den Applikationsvorschriften von Siemens oder diesen Gebrauchsanweisungen genannten Analysengeräten zu validieren.

Resultate dieses Tests sollten stets in Verbindung mit der Vorgeschichte des Patienten, dem klinischen Bild und anderen Untersuchungsergebnissen interpretiert werden.

Referenzbereich

Plasmen von augenscheinlich gesunden Blutspendern (n = 309) wurden mit Berichrom® Antithrombin III (A) und dem BCS®/BCS® XP System gestestet und es wurden folgende Ergebnisse erhalten (2,5 bis 97,5 Perzentile): 79,4 bis 112 % der Norm (für Erwachsene). Andere systemspezifische Ergebnisse sind in den jeweiligen Referenzhandbüchern (Applikationsvorschriften) angegeben.

Referenzintervalle variieren von Labor zu Labor in Abhängigkeit von der zu untersuchenden Population und den angewendeten Arbeitstechniken, Methoden, Geräten und Reagenzchargen. Daher sollte jedes Labor auf der Grundlage der jeweils angewendeten Arbeitstechniken, Methoden, Geräte und Reagenzchargen eigene Referenzbereiche ermitteln, bzw. die Referenzbereiche nach einem Wechsel der aufgeführten Parameter verifizieren.

Leistungsmerkmale des Tests

Messbereich

Der Messbereich reicht von 0 bis 140 % der Norm.

Spezifität

Aprotinin im Thrombin-Reagenz blockiert die Aktivität von Plasmin, falls es in der Probe vorkommt[3].

Störungen durch Heparin-Kofaktor II sind zu vernachlässigen, da im Test Rinder-Thrombin eingesetzt wird[4].

Empfindlichkeit

Die Nachweisgrenze liegt bei 3,7 % der Norm.

Präzision

Die Präzision von Berichrom® AT III (A) am Sysmex® CA-1500 System wurde mit Kontroll-Plasma N und Kontroll-Plasma P an 5 Tagen in 8-fach-Bestimmung ermittelt. Der Variationskoeffizient in der Serie lag bei 1,3 % und 2,7 % für Kontroll-Plasma N und Kontroll-Plasma P und von Tag zu Tag bei 4,6 % und 7,6 %.

Methodenvergleich

Bei einem Vergleich von Berichrom® AT III (A) mit Berichrom® AT III (mit manueller Verdünnung) am Hitachi 717 wurden 111 Proben im Bereich von 25 bis 150 % der Norm bestimmt. Der Korrelationskoeffizient betrug 0,99 (y-Achsenabschnitt : - 3,7 % der Norm; Steigung: 0,98).

Literatur

Siehe englische Gebrauchsanweisung.

BCS, Berichrom und Dade sind Warenzeichen von Siemens Healthcare Diagnostics.

Sysmex ist eine eingetragene Marke der SYSMEX CORPORATION.

Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH
Emil-von-Behring-Str. 76
35041 Marburg/Germany
www.siemens.com/diagnostics

CE

Ausgabe Mai 2010

Berichrom® Antithrombine III (A)
Berichrom AT III

Paragraphes surlignés - informations mises à jour par rapport à l'édition de juillet 2007

Domaines d'utilisation

Dosage quantitatif de l'activité fonctionnelle de l'antithrombine III (AT III) dans le plasma sur des automates de coagulation, pour le diagnostic d'une synthèse diminuée ou d'une augmentation de la consommation d'AT III, ou encore pour la surveillance d'un traitement de substitution.

Intérêt diagnostique

L'antithrombine III est l'inhibiteur plasmatique de la thrombine et du facteur X activé, et forment avec ces enzymes un complexe inactif irréversible. L'inactivation des facteurs de la coagulation activés est fortement accélérée par l'héparine. Berichrom® Antithrombine III (A) permet le dosage rapide de l'antithrombine III physiologiquement active et permet de diagnostiquer les déficits en antithrombine III congénitaux et acquis, qui constituent un risque de thrombose augmenté. Les déficits en antithrombine III acquis apparaissent souvent suite à une consommation due à une intervention chirurgicale importante ou à une coagulation intravasculaire disséminée (CIVD) en cas de septicémie, de néphrose, de lésions du parenchyme hépatique (hépatite, intoxication par des drogues, alcoolisme) ou de prise de contraceptifs contenant des oestrogènes[1]. Le test permet un dépistage précoce des patients ayant un risque de thrombose élevé.

Principe de la méthode

L'antithrombine III présente dans l'échantillon est transformée par l'héparine en un inhibiteur immédiat et inactive la thrombine prédistribuée. Le taux de thrombine résiduel est déterminé selon un test cinétique par l'augmentation de la densité optique à 405 nm selon le schéma réactionnel suivant :

$$AT\,III_{\text{échantillon}} + \text{thrombine}_{\text{excès}} \xrightarrow{\text{héparine}} [\text{AT III-thrombine}] + \text{thrombine}_{\text{résiduelle}}$$

$$\text{Tos-Gly-Pro-Arg-ANBA-IPA} \xrightarrow{\text{thrombine résiduelle}} \text{Tos-Gly-Pro-Arg-OH} + \text{ANBA-IPA}$$

La modification de densité optique est inversement proportionnelle à l'activité de l'antithrombine III présente dans l'échantillon.

Réactifs

Remarque : Le test Berichrom® Antithrombine III (A) peut être utilisé manuellement ou sur un analyseur automatisé de coagulation. Siemens Healthcare Diagnostics propose des guides de référence (fiches d'application) pour plusieurs analyseurs de coagulation. Les Guides de référence (fiches d'application) contiennent des informations sur les performances et l'utilisation des différents analyseurs / dosages, qui peuvent différer de celles mentionnées dans la présente notice. Le cas échéant, les informations contenues dans les Guides de référence (fiches d'application) annulent et remplacent celles contenues dans la présente notice. En outre, consulter le guide d'utilisation édité par le fabricant de l'analyseur.

Contenu des conditionnements

Berichrom® Antithrombine III (A) REF *OWWR 15:*

6 x ⟶ 15 ml REAGENT THR, Réactif Thrombine

6 x ⟶ 3 ml SUBSTRATE, Réactif Substrat

1 x 100 ml REAGENT THR DILUENT Solution tampon

Berichrom® Antithrombine III (A) REF *OWWR 17*:

6 x ⟶ 5 ml REAGENT THR, Réactif Thrombine

3 x ⟶ 3 ml SUBSTRATE, Réactif Substrat

1 x 30 ml REAGENT THR DILUENT, Solution tampon

Composition

Réactif Thrombine, thrombine bovine lyophilisée ; héparine et aprotinine

Réactif Substrat, lyophilisé : concentration de la solution d'emploi : Tosylglycyl-L-prolyl-L-arginyl-5-amino-2-acide nitrobenzoïque-isopropylamide (Tos-Gly-Pro-Arg-ANBA-IPA) 4 mmol/l

Solution tampon : Tris(hydroxyméthyle)-aminométhane (100 mmol/l), NaCl (8,7 g/l), pH 8,2

Conservateur : azide de sodium (< 1 g/l)

Mises en garde et précautions d'emploi

1. Réservé à un usage de diagnostic *in vitro*.
2. Contient de l'azide de sodium (< 1 g/l) comme conservateur. L' azide de sodium peut réagir avec les tuyaux d'évacuation en cuivre ou en plomb et former des composés explosifs. L'évacuer conformément aux réglementations locales.

Préparation des réactifs

REAGENT THR : reconstituer le réactif avec le volume de REAGENT THR DILUENT indiqué sur l'étiquette et laisser incuber 30 min à +15/+25 °C avant emploi.

Afin de garantir l'homogénéité du réactif, agiter légèrement celui-ci après sa reconstitution et immédiatement avant son emploi.

SUBSTRATE : reconstituer le contenu du flacon avec le volume d'eau distillée ou désioni sée indiqué sur l'étiquette.

REMARQUE : s'assurer que le SUBSTRATE est également totalement reconstitué.

Stabilités et conditions de conservation

Le coffret peut être utilisé jusqu'à la date d'expiration mentionnée sur l'étiquette s'il est conservé dans son emballage fermé entre +2 et +8 °C.

Stabilité après reconstitution :

Température	REAGENT THR	SUBSTRATE
+2/+8 °C	2 semaines	6 semaines
-20 °C	3 mois	6 mois

Le REAGENT THR reconstitué peut être congelé jusqu'à cinq fois dans son flacon d'origine, et le SUBSTRATE jusqu'à dix fois, sans dépasser la durée maximale de stabilité indiquée dans le tableau ci-dessus.

Après première ouverture, le REAGENT THR DILUENT reste stable pendant 6 mois à +2/+8 °C.

Les données de stabilité sur appareil sont indiquées dans les protocoles d'adaptation des différents appareils de coagulation.

Matériel et autres réactifs nécessaires

Plasma standard humain, REF ORKL
Plasma de contrôle N, REF ORKE
Plasma de contrôle P, REF OUPZ
Solution tampon imidazol, REF OQAA, *ou*
Dade® Tampon véronal d'Owren, REF B4234, *ou*
Dade® Tampon pour systèmes CA, REF B4265, *ou*
Sérum physiologique isotonique
Eau distillée ou déminéralisée

Échantillons a tester

Pour obtenir les plasmas, prélever 1 volume de solution de citrate de sodium (0,11 mol/l) avec 9 volumes de sang veineux, et mélanger avec précaution en évitant la formation de mousse. Utiliser un système de prélèvement clos ou une seringue, en respectant les recommandations du document CLSI H21-A5[2]. Centrifuger aussitôt pendant 15 min à au moins 1 500 x g.

Stabilité des échantillons :

-20 °C 1 mois
+2/+8 °C 2 jours
+15/+25 °C 6 heures

Si on utilise des plasmas congelés à -20 °C, les décongeler en 10 min maximum à +37 °C, et les tester ensuite dans les 2 heures qui suivent. Ne les congeler qu'une seule fois. Tester les plasmas non dilués.

Réalisation du test

Schéma de pipetage (exemple)

Plasma citraté REAGENT THR	10 µl 600 µl
Mélanger et laisser incuber 3 min. à +37 °C	
SUBSTRATE	100 µl
Mesurer $\Delta D.O._{405\ nm}$/min	

Exploitation des résultats

L'exploitation est effectuée automatiquement par l'appareil de coagulation.

Etablissement de la courbe d'étalonnage

Une courbe d'étalonnage est établie par dosage automatique des différentes dilutions du plasma standard humain. Une nouvelle courbe d'étalonnage doit être établie s'il se produit un changement au niveau de l'instrument ou à chaque nouveau lot de Berichrom® Antithrombine III (A) ou en cas de changement des conditions opératoires.

Contrôle de qualité interne

Domaine normal : Plasma de contrôle N
Domaine thérapeutique : Plasma de contrôle P

Deux contrôles (domaine normal et domaine pathologique) doivent être mesurés au début de chaque série de test, à chaque étalonnage, à chaque changement de flacon de réactif et au moins toutes les 8 heures au cours d'une journée de travail. Chaque laboratoire doit déterminer son propre domaine de contrôle de qualité, soit à partir des valeurs théoriques et des domaines de confiance indiqués par le fabricant des contrôles utilisés, soit à partir d'un domaine de confiance établi dans le laboratoire. Si la valeur d'un contrôle sort du domaine prédéfini, contrôler les réactifs, la courbe d'étalonnage et l'analyseur de coagulation. Les résultats de patients ne peuvent être rendus qu'après avoir identifié, corrigé et documenté le dysfonctionnement.

Limites du test

Les doses thérapeutiques d'hirudine ou des autres inhibiteurs directs de la thrombine entraînent une activité faussement diminuée de l'antithrombine III.

Chez certains variants génétiques très rares présentant une activité fonctionnelle réduite tels que l'antithrombine III Basel, les résultats peuvent être compris dans le domaine de référence.

Siemens a validé l'utilisation de ces réactifs sur plusieurs automates afin d'optimiser les performances du produit et répondre à ses spécifications. Les modifications apportées par l'utilisateur ne sont pas sous la responsabilité de Siemens dans la mesure où elles peuvent affecter les performances du système et les résultats des dosages. Il est de la responsabilité de l'utilisateur de valider toutes modifications apportées à ces instructions ou à l'utilisation des réactifs sur les analyseurs autres que ceux mentionnés dans les protocoles d'application Siemens ou dans la présente notice d'utilisation.

Les résultats de ce test doivent toujours être interprétés en rapport avec les antécédents médicaux du patient, les signes cliniques et autres constatations.

Domaine de référence

Des échantillons de plasma provenant de donneurs en apparente bonne santé (n = 309) ont été analysés à l'aide du Berichrom® Antithrombine III (A) sur le système BCS®/BCS® XP avec les résultats suivants (du 2,5ème au 97,5ème percentile) : 79,4 à 112 % de la normale (pour les adultes). D'autres résultats spécifiques à ce système sont mentionnés dans les Guides de référence correspondant (fiches d'application).

Le domaine de référence varie d'un laboratoire à l'autre en fonction de la population, de la technique, de la méthode, du matériel et du lot de réactif utilisés. En conséquence, chaque laboratoire doit déterminer ses propres domaines de référence ou les vérifier chaque fois que l'une ou plusieurs des variables mentionnées ci-dessus sont modifiées.

Caractéristiques du test

Domaine de mesure

Le domaine de mesure s'étend de 0 à 140 % de la normale.

Spécificité

L'aprotinine du Réactif Thrombine bloque l'activité de la plasmine si elle apparaît dans l'échantillon[3].

Les perturbations dues au cofacteur II de l'héparine sont négligeables dans la mesure où le test contient de la thrombine bovine[4].

Sensibilité

Le seuil de mise en évidence se situe à 3,7 % de la normale.

Précision

La précision du Berichrom® AT III (A) a été testée sur un système Sysmex® CA-1500 à l'aide de plasmas de contrôle N et de plasmas de contrôle P, dosés 8 fois sur 5 jours différents.

Le coefficient de variation à l'intérieur d'une série était de 1,3 % pour le plasma de contrôle N et de 2,7 % pour le plasma de contrôle P. Le coefficient de reproductibilité jour à jour a été trouvé respectivement à 4,6 % pour le contrôle N et à 7,6 % pour le contrôle P.

Comparaison avec une autre méthode

Une étude comparative portant sur 111 échantillons couvrant un domaine de 25 à 150 % de la normale a été effectuée sur un Hitachi 717, en les testant avec Berichrom® AT III (A) et Berichrom® AT III (dilution manuelle). Le coefficient de corrélation a été trouvé à 0,99 (ordonnée à l'origine : -3,7 % de la norme ; pente : 0,98).

Littérature

Voir la notice d'utilisation en anglais.

BCS, Berichrom et Dade sont des marques commerciales de Siemens Healthcare Diagnostics.

Sysmex est une marque déposée de SYSMEX CORPORATION.

Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH
Emil-von-Behring-Str. 76
35041 Marburg/Germany
www.siemens.com/diagnostics

CE

Edition mai 2010

Berichrom® Antitrombina III (A)

Berichrom AT III

Vedere sezioni ombreggiate - informazioni aggiornate rispetto all'edizione attuale da luglio 2007

Uso Previsto

Determinazione quantitativa dell'attività funzionale dell'antitrombina III (AT III) nel plasma su analizzatori automatici per la diagnosi di ridotta sintesi di AT III, di aumentato consumo e per il controllo della terapia sostitutiva.

Riassunto e Spiegazione

L'Antitrombina III è l'inibitore plasmatico della trombina e del Fattore X attivato e forma con questi enzimi, in modo irreversibile, un complesso inattivo. L'inattivazione dei fattori della coagulazione attivati viene notevolmente accelerata per mezzo dell'eparina. Il Berichrom® AT III (A) viene utilizzato per la determinazione rapida dell'Antitrombina III fisiologicamente attiva e permette la diagnosi di stati di carenza ereditari o acquisiti di Antitrombina III, che rappresentano un fattore di rischio elevato di trombosi. Stati di carenza acquisiti di Antitrombina III si manifestano spesso in seguito ad un consumo dopo seri interventi chirurgici o in seguito a coagulazione intravasale disseminata (CID) conseguente a setticemia, nefrosi, danni epatici (epatite, intossicazioni da farmaci, alcoolismo) ed in seguito all'uso di contraccettivi orali contenenti estrogeni[1]. Il test permette il riconoscimento precoce dei pazienti con alto rischio di trombosi.

Principio del Metodo

In presenza di eparina, l'Antitrombina III contenuta nel campione in esame si trasforma in un rapido inibitore della trombina che è presente in eccesso nella miscela di reazione. La quantità di trombina residua viene quindi valutata utilizzando come indicatore un substrato cromogenico che può essere determinato per via fotometrica a 405 nm. La reazione decorre secondo il seguente schema :

$$\text{AT III}_{\text{campione}} + \text{trombina}_{\text{in eccesso}} \xrightarrow{\text{eparina}} \text{[AT III-trombina]} + \text{trombina}_{\text{residua}}$$

$$\text{Tos-Gly-Pro-Arg-ANBA-IPA} \xrightarrow{\text{trombina residua}} \text{Tos-Gly-Pro-Arg-OH + ANBA-IPA}$$

La variazione dell'assorbanza è inversamente proporzionale all'attività dell'antitrombina III nel campione.

Reagenti

Nota: Il test Berichrom® Antitrombina III (A) può essere utilizzato manualmente o su analizzatori per coagulazione automatici. Siemens Healthcare Diagnostics fornisce Guide di Riferimento (Protocolli Applicativi) per diversi analizzatori per coagulazione. Le Guide di riferimento (Protocolli Applicativi) contengono informazioni sulla manipolazione e sulle prestazioni specifiche per i diversi analizzatori/test che possono essere diverse da quelle fornite nelle presenti Istruzioni per l'uso. In tal caso, le informazioni contenute nelle Guide di riferimento (Protocolli Applicativi) sostituiscono le informazioni contenute nelle presenti Istruzioni per l'uso. Consultare anche il manuale di istruzioni del produttore dello strumento.

Materiali forniti

Berichrom® Antitrombina III (A) REF *OWWR 15:*

6 x ⟶ 15 mL REAGENT THR, Reagente trombina

6 x ⟶ 3 mL SUBSTRATE, Reagente substrato

1 x 100 mL REAGENT THR DILUENT, Soluzione tampone

Berichrom® Antitrombina III (A) REF *OWWR 17:*

6 x ⟶ 5 mL REAGENT THR, Reagente trombina

3 x ⟶ 3 mL SUBSTRATE, Reagente substrato

1 x 30 mL REAGENT THR DILUENT, Soluzione tampone

Composizione

Reagente trombina, trombina bovina, liofilizzata; eparina ed aprotinina

Reagente substrato, liofilizzato; concentrazione nella soluzione d'uso: tosilglicil-L-propil-L-arginil-5-amino-2-acido nitrobenzoico-isopropilamide (Tos-Gly-Pro-Arg-ANBA-IPA) 4 mmol/L.

Soluzione tampone: tampone Tris(idrossimetil)-amminometano (100 mmol/L), NaCl (8,7 g/L), pH 8,2

Conservante: sodio azide (< 1 g/L)

Avvertenze e Precauzioni

1. Solo per uso diagnostico *in vitro*.
2. Contiene sodio azide (< 1 g/L) come conservante. La sodio azide può reagire con le tubazioni in rame o piombo nelle linee di scarico formando composti esplosivi. Provvedere allo smaltimento in modo appropriato e secondo le normative locali.

Preparazione dei Reagenti

REAGENT THR: Ricostituire con la quantità di REAGENT THR DILUENT indicata in etichetta ed incubare per 30 min a +15/+25 °C prima dell'uso.
Per assicurare l'omogeneità del reagente: dopo ricostituzione e immediatamente prima dell'uso, mescolare cautamente il reagente ricostituito per far sì che tutti i componenti siano distribuiti uniformemente.

SUBSTRATE: Disciogliere il contenuto del flacone con la quantità di acqua distillata indicata sull'etichetta.

AVVERTENZA: assicurarsi che anche il SUBSTRATE sia completamente ricostituito.

Conservazione e Stabilità

Se conservato ben chiuso a +2/+8 °C, il kit può essere utilizzato fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta.

Stabilità dopo ricostituzione :

Temperatura	REAGENT THR	SUBSTRATE
+2/+8 °C	2 settimane	6 settimane
-20 °C	3 mesi	6 mesi

Il REAGENT THR ricostituito può essere congelato e scongelato nel flacone originale fino a cinque volte ed il SUBSTRATE fino a dieci volte. Non superare i periodi di stabilità indicati nella tabella.

Il REAGENT THR DILUENT è stabile per 6 mesi dopo la prima apertura se conservato da +2 a +8 °C.

Informazioni circa la stabilità on-board sono specificate nei Protocolli Applicativi per i diversi analizzatori per coagulazione.

Materiale necessario ma non fornito

Plasma umano standard, REF ORKL

Plasma di controllo N, REF ORKE

Plasma di controllo P, REF OUPZ

Soluzione tampone imidazolo, REF OQAA *oppure*

Dade® Tampone Veronal di Owren, REF B4234 *oppure*

Dade® Tampone per Sistema CA, REF B4265 *oppure*

Soluzione salina isotonica

Acqua distillata o deionizzata

Campioni

Per ottenere il plasma, mescolare 1 parte di soluzione di citrato di sodio (0,11 mol/L) con 9 parti di sangue venoso, evitando la formazione di schiuma. Si può utilizzare un sistema sottovuoto oppure una siringa. Fare riferimento al documento CLSI H21-A5 per ulteriori dettagli[2]. Centrifugare immediatamente a non meno di 1.500 x g per almeno 15 minuti.

Stabilità dei campioni :

a -20 °C 1 mese

a +2/+8 °C 2 giorni

a +15/+25 °C 6 ore

Scongelare, entro 10 min. a +37 °C, i campioni di plasma conservati a -20 °C ed eseguire la determinazione entro 2 ore. Evitare ripetuti congelamenti. Il plasma deve essere impiegato indiluito.

Procedura

Schema di pipettaggio (esempio)

Plasma citratato REAGENT THR	10 µL 600 µL
Miscelare e incubare 3 min a +37 °C	
SUBSTRATE	100 µL
Determinare ΔE_{405nm}/min	

Valutazione

La valutazione avviene automaticamente tramite analizzatore per coagulazione.

Realizzazione della curva di calibrazione

Le diluizioni del plasma umano standard sono preparate automaticamente dall'analizzatore per ottenere una curva di riferimento. Qualora si cambi lo strumento o il lotto di Berichrom® Antitrombina III (A) utilizzato o nel caso si verifichi qualsiasi modifica delle condizioni sperimentali, tale curva di riferimento dovrà essere eseguita nuovamente.

Controllo di Qualità Interno

Intervallo normale: Plasma di controllo N

Intervallo terapeutico: Plasma di controllo P

È necessario misurare due controlli di qualità con concentrazioni diverse (intervallo normale e patologico) all'inizio del test, dopo ogni calibrazione, al cambio del flacone di reagente, e almeno ogni 8 ore di lavoro. Ogni laboratorio dovrebbe determinare il proprio intervallo di controllo qualità, o sulla base dei valori ed intervalli indicati dal produttore del controllo oppure sulla base di valori dei controlli determinati nel laboratorio. Se il valore di controllo misurato non rientra nell'intervallo determinato in precedenza, è necessario controllare i reagenti, la curva di riferimento e l'analizzatore di coagulazione. Non refertare risultati di pazienti finché il problema non sia stato identificato, corretto e documentato.

Limiti della Procedura

Dosi terapeutiche di irudina o di altri inibitori diretti della trombina causeranno la generazione di valori errati per eccesso di attività della antitrombina III.

Alcune varianti genetiche molto rare, con ridotta attività funzionale, come l'antitrombina III Basel, possono dare risultati all'interno dell' intervallo di riferimento.

Siemens ha validato l'uso di questi reagenti su vari analizzatori per ottimizzare le prestazioni e rispettare le specifiche dei prodotti. Le modifiche definite dall'utente non sono supportate da Siemens poiché possono influire sulle prestazioni del sistema e sui risultati del test. Pertanto è responsabilità dell'utente validare tutte le modifiche apportate a queste istruzioni, l'uso dei reagenti su analizzatori diversi da quelli inclusi nei fogli di istruzioni o nelle istruzioni d'uso fornite da Siemens.

I risultati di questo test devono essere sempre interpretati unitamente all'anamnesi del paziente, al quadro clinico e ad altri reperti.

Valori Normali

Campioni di plasma ottenuti da donatori apparentemente sani (n = 309) sono stati analizzati mediante il test Berichrom® Antitrombina III (A) sul Sistema BCS®/BCS® XP con i seguenti risultati (tra il 2,5° e il 97,5° percentile): tra il 79,4 e il 112 % della norma (per adulti). Altri risultati specifici di sistema sono forniti nelle rispettive Guide di riferimento (Protocolli Applicativi).

I valori di riferimento variano da un laboratorio all'altro, in funzione della popolazione, della tecnica e, dell'apparecchiatura utilizzati. Ogni laboratorio dovrebbe, quindi, stabilire i propri intervalli di riferimento o verificarli nel caso in cui una o più delle variabili precedentemente menzionate siano cambiate.

Caratteristiche del test

Intervallo di misura

L'intervallo di misura è compreso tra 0 a 140 % della norma.

Specificità

La aprotinina nel Reagente Trombina blocca l'attività della plasmina presente nel campione[3].

L'interferenza dovuta al cofattore eparinico II è trascurabile, poiché nel test viene utilizzata trombina bovina[4].

Sensibilità

Il limite di identificazione è del 3,7 % della norma.

Precisione

La precisione di Berichrom® AT III (A) è stata calcolata con Plasma di controllo N e Plasma di controllo P su un sistema Sysmex® CA-1500, eseguendo il test per 8 volte nell'arco di 5 giorni.

Il coefficiente di variazione intra-ciclo era compreso tra 1,3 % e 2,7 % rispettivamente per il Plasma di controllo N e il Plasma di controllo P. La variazione tra giorni è stata rispettivamente del 4,6 % e 7,6 %.

Confronto tra metodi

Da un confronto del Berichrom® AT III (A) con Berichrom® AT III (con diluizione manuale) su Hitachi 717, sono stati esaminati 111 campioni nell'intervallo fra 25 e 150 % della norma. E' stato rilevato un coefficiente di correlazione di 0,99 (intercetta asse y: -3,7 % e pendenza : 0,98).

Bibliografia

Vedere le istruzioni per l'uso in lingua inglese.

BCS, Berichrom e Dade sono marchi di Siemens Healthcare Diagnostics.

Sysmex è un marchio registrato di SYSMEX CORPORATION.

Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH
Emil-von-Behring-Str. 76
35041 Marburg/Germany
www.siemens.com/diagnostics

CE

Edizione Maggio 2010

Berichrom® Antitrombina III (A)
Berichrom AT III

Observe las secciones resaltadas - Información actualizada de la edición anterior de julio 2007

Uso Previsto
Para la determinación cuantitativa de la actividad funcional de antitrombina III (AT III) en plasmas utilizando analizadores automáticos así como para el diagnóstico de la reducción de la síntesis de AT III, o un aumento de su consumo y para el control de una tratamiento de sustitución.

Resumen y Explicación
La antitrombina III es un inhibidor plasmático de la trombina y del factor X activado formando de manera irreversible, con estas enzimas, un complejo inactivo. La inactivación de los factores de la coagulación se acelera rápidamente por medio de heparina. El Berichrom® Antitrombina III (A) sirve para la determinación rápida de la antitrombina III fisiológicamente activa y permite el diagnóstico de deficiencias heredadas o adquiridas de antitrombina III, las cuales representan un riesgo elevado de trombosis. Deficiencias adquiridas aparecen frecuentemente como consecuencia por ej., del consumo después de grandes operaciones o como consecuencia de una coagulación intravascular diseminada (CID) en sepsis, nefrosis, daños del parénquima del hígado (hepatitis, intoxicación por drogas, alcoholismo) y por anticonceptivos conteniendo estrógeno[1]. El test permite el reconocimiento precoz de pacientes con un riesgo elevado de trombosis.

Principio del Método
La antitrombina III de la muestra va a ser convertida, por medio de heparina, en un inhibidor instantáneo que inactiva la trombina añadida en exceso. La trombina residual se determina mediante un test cinético, en el cual se mide el aumento de la extinción a 405 nm según el siguiente esquema de reacción.

$$AT\ III_{muestra} + Trombina_{exceso} \xrightarrow{Heparina} [AT\ III\text{-}Trombina] + Trombina_{resto}$$

$$Tos\text{-}Gly\text{-}Pro\text{-}Arg\text{-}ANBA\text{-}IPA \xrightarrow{Trombinaresto} Tos\text{-}Gly\text{-}Pro\text{-}Arg\text{-}OH + ANBA\text{-}IPA$$

El cambio de absorbancia es inversamente proporcional a la actividad de antitrombina III presente en la muestra.

Reactivos
Nota: El Ensayo Berichrom® Antitrombina III (A) se puede utilizarse con métodos manuales o en analizadores de coagulación automáticos. Siemens Healthcare Diagnostics pone a su disposición Guías de Referencia (Hojas de Aplicación) para varios analizadores de coagulación. Las Guías de Referencia (Hojas de Aplicación) contienen información específica sobre el manejo de los analizadores y la realización del ensayo que puede ser diferente de la proporcionada en estas Instrucciones de Uso. En ese caso, la información contenida en las Guías de Referencia (Hojas de Aplicación) reemplaza a la proporcionada en estas Instrucciones de uso. Por favor, consulte también el manual de instrucciones del fabricante del equipo.

Materiales suministrados

Berichrom® Antitrombina III (A) REF *OWWR 15:*

6 x ⟶ 15 ml REAGENT THR, Reactivo de trombina

6 x ⟶ 3 ml SUBSTRATE, Reactivo sustrato

1 x 100 ml REAGENT THR DILUENT, Solución tampón

Berichrom® Antitrombina III (A) REF *OWWR 17:*

6 x ⟶ 5 ml REAGENT THR, Reactivo de trombina

3 x ⟶ 3 ml SUBSTRATE, Reactivo sustrato

1 x 30 ml REAGENT THR DILUENT, Solución tampón

Composición

Reactivo de trombina, trombina bovina liofilizada; heparina y aprotinina

Reactivo substrato, liofilizado; concentración en la solución lista para el uso: Tosilglicil-L-polil-L-arginil-5-amino-2-ácido nitrobenzoico-isopropilamida (Tos-Gly-Pro-Arg-ANBA-IPA) 4 mmol/l.

Solución tampón: Tris(hidroximetil) aminometano (100 mmol/l), NaCl (8,7 g/l), pH 8,2

Agente de conservación: azida de sodio (< 1g/l)

Advertencias y Medidas de Seguridad

1. Sólo para ser utilizado en diagnósticos *in vitro.*
2. Contiene azida sódica (< 1 g/l) como conservante. La azida sódica puede reaccionar con las tuberías de cobre y plomo y formar azidas metálicas explosivas. Cuando se eliminen los reactivos, enjuagar con agua abundante para evitar la acumulación de azidas, si la eliminación es a través de los desagües sanitarios de acuerdo con la normativa vigente.

Preparación de reactivos

REAGENT THR: Reconstituir con la cantidad de REAGENT THR DILUENT indicada en la etiqueta e incubar durante 30 min. entre +15 y +25 °C.

Para garantizar la homogeneidad del reactivo, después de la reconstitución y un poco antes de usarse, mezclar suavemente el reactivo disuelto.

SUBSTRATE: Reconstituir el contenido del frasco con la cantidad de agua destilada o desionizada indicada en la etiqueta.

NOTA: Asegurese que el SUBSTRATE esté también completamente disuelto.

Estabilidad y Condiciones de Almacenaje

El kit de ensayo, si se conserva cerrado entre +2 y +8 °C, se puede usar hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.

Estabilidad después de la reconstitución:

Temperatura	REAGENT THR	SUBSTRATE
+2 hasta +8 °C	2 semanas	6 semanas
-20 °C	3 meses	6 meses

El REAGENT THR reconstituido puede ser congelado y descongelado, en su frasco original hasta cinco veces y el SUBSTRATE hasta 10 veces. No sobrepasar el tiempo máximo de estabilidad dado en la tabla anterior. REAGENT THR DILUENT, una vez abierto, es estable durante 6 meses entre +2 y +8 °C.

Los datos de estabilidad en el instrumento vienen dados en las instrucciones de aplicación de los diferentes analizadores de coagulación.

Materiales necesarios pero no suministrados

Plasma humano estándar, REF ORKL

Plasma Control N, REF ORKE

Plasma Control P, REF OUPZ

Solución tampón imidazol, REF OQAA *o*

Dade® Tampón veronal Owren, REF B4234 *o*

Dade® Sistema tampón CA, REF B4265 *o*

Solución salina isotónica

Agua destilada o desionizada

Muestras
Para obtener el plasma, mezclar cuidadosamente 1 parte de solución de citrato de sodio (0,11 mol/l) con 9 partes de sangre venosa, evitando la formación de espuma. Se debe utilizar un sistema de toma cerrado o una jeringa. Por favor para detalles adicionales, refierase al documento CLSI H21-A5[2]. Centrifugar a continuación aprox. a 1.500 x g durante 15 min.

Estabilidad de las muestras:

-20 °C	1 mes
entre +2 y +8 °C	2 días
entre +15 y +25 °C	6 horas

Las muestras almacenadas a -20 °C se deben descongelar en un plazo de 10 min. a +37 °C y se deben medir dentro de las 2 horas siguientes. No congelar varias veces. Usar el plasma sin diluir.

Procedimiento
Esquema de pipeteo (ejemplo)

Plasma citratado REAGENT THR	10 µl 600 µl
Mezclar e incubar 3 min. a +37 °C	
SUBSTRATE	100 µl
Determinar $\Delta E_{405\ nm}$/min	

Valoración

La valoración se hace automáticamente en los analizadores de coagulación.

Elaboración de la curva de calibración

Se realiza una curva de calibración con diferentes diluciones automáticas de Plasma humano estándar. La curva de calibración deberá realizarse de nuevo si se realiza algún cambio en el instrumento o en el lote de Berichrom® Antitrombina III (A) utilizado, o si se produce algún cambio en las condiciones experimentales.

Control de Calidad Interno

Rango normal: Plasma control N

Rango patológico: Plasma control P

Se deben medir dos niveles de control de calidad (intervalo normal e intervalo patológico) al iniciar un ciclo de pruebas, con cada calibración, al cambiar el frasco de reactivo y al menos cada ocho horas de cada jornada de análisis. Cada laboratorio debe establecer su propio rango de control de calidad, ya sea en base los valores teóricos y rangos dados por el fabricante del control o en valores de control determinados en el mismo laboratorio. Si el valor de control medido se encuentra fuera del intervalo determinado previamente, puede ser debido a los reactivos, la curva de referencia o el coagulómetro. Los resultados del paciente deben ser reportados solamente cuando el problema haya sido identificado, corregido y documentado.

Limitaciones del Procedimiento
Las dosis terapéuticas de hirudina u otros inhibidores directos de la trombina producirán valores de actividad falsamente elevados de la antitrombina III.

Algunas variantes genéticas muy poco comunes con una actividad funcional reducida, como la antitrombina III Basel, pueden dar resultados dentro del intervalo de normalidad.

Siemens ha validado el uso de los reactivos en varios analizadores para optimizar el rendimiento del producto y cumplir con las especificaciones del mismo. Las modificaciones definidas por el usuario no están garantizadas por Siemens dado que pueden afectar al rendimiento del sistema y a los resultados del ensayo. Es responsabilidad del usuario validar las modificaciones realizadas a estas instrucciones o el uso de los reactivos en analizadores distintos a los incluidos en las hojas de aplicaciones de Siemens o en estas instrucciones de uso.

Los resultados de esta prueba deberán interpretarse siempre de acuerdo con la historia clínica del paciente, la sintomatologia clínica y otras observaciones.

Valores esperados

Se analizaron las muestras plasmáticas obtenidas de donantes aparentemente sanos (n = 309) utilizando el ensayo Berichrom® Antitrombina III (A) en el Sistema BCS®/BCS® XP y se obtuvieron los siguientes resultados (percentil del 2,5 al 97,5): del 79,4 al 112 % de la norma (para adultos). Los resultados específicos de otros sistemas se dan en sus Guías de Referencia (Hojas de Aplicación) respectivas.

Los intervalos de normalidad varían de un laboratorio a otro, dependiendo de la población atendida y de la técnica, el método, el equipo y el lote de reactivos utilizados. Por ello, cada laboratorio debe establecer sus propios intervalos de normalidad y verificarlos cada vez que alguna de las variables mencionadas cambie.

Características Específicas del Test

Rango de medida

El rango de medida va desde 0 hasta 140 % de normalidad.

Especificidad

La aprotinina en el Reactivo de trombina bloquea la actividad de la plasmina que esté presente en la muestra[3].

Las interferencias por medio del cofactor II de la heparina, se pueden descartar ya que en el test se utiliza trombina bovina[4].

Sensibilidad

El límite de detección está en 3,7 % de normalidad.

Precisión

La precisión de Berichrom® AT III (A) se calculó con Plasma Control N y Plasma Control P en un sistema Sysmex® CA-1500 durante 5 días en una determinación por octuplicado.

El coeficiente de variación dentro de la prueba fue del 1,3 % y del 2,7 % para el Plasma Control N y el Plasma Control P, respectivamente. El coficiente de variación Inter.-ensayo , fue del 4,6 % y 7,6 % respectivamente.

Comparación de métodos

Al comparar el Berichrom® AT III (A) con el Berichrom® AT III (con dilución manual) en el Hitachi 717, se determinaron 111 muestras en el rango de 25 hasta 150 % del valor norma. El coeficiente de correlación fue de 0,99 (Intercepción del eje y: -3,7 % de la normalidad; pendiente: 0,98).

Bibliografía

Ver instrucciones de utilización en inglés.

BCS, Berichrom y Dade son marcas comerciales de Siemens Healthcare Diagnostics.

Sysmex es una marca registrada de SYSMEX CORPORATION.

Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH
Emil-von-Behring-Str. 76
35041 Marburg/Germany
www.siemens.com/diagnostics

CE

Edición Mayo 2010

Berichrom® Antitrombina III (A)

Berichrom AT III

Secções sombreadas - Informações actualizadas versus a edição de Julho de 2007

Campo de aplicação

Para a determinação quantitativa da actividade funcional da antitrombina III (AT III) no plasma, em aparelhos automáticos de análise, tais como para o diagnóstico da síntese reduzida de AT III, aumento do consumo e para a monitorização da terapia de substituição.

Sumário e Explicação

A antitrombina III é o inibidor plasmático da trombina e do factor X activado e forma um complexo inactivo irreversível com essas enzimas. A inactivação dos factores de coagulação activados é acelerada, em grande quantidade, pela heparina. Berichrom® Antitrombina III (A) serve para a determinação rápida da antitrombina III fisiologicamente activa e permite o diagnóstico da deficiência hereditária e adquirida de antitrombina III, que representa um risco elevado de trombose. As deficiências adquiridas de antitrombina III ocorrem, frequentemente, como consequência do consumo após operações de maior dimensão, ou como consequência de coagulação intravascular disseminada (CID) nos casos de sepsis, nefroses, lesões hepáticas parenquimais (hepatite, intoxicação de drogas, alcoolismo) e contraceptivos contendo estrogénio[1]. O teste permite a detecção precoce dos pacientes com risco elevado de trombose.

Princípio do método

A antitrombina III da amostra é convertida num inibidor imediato através da heparina e inactiva a trombina presente. O conteúdo residual de trombina é determinado num teste cinético medindo o aumento da absorvância a 405 nm, segundo o seguinte esquema de reacção:

$$\text{AT III}_{\text{amostra}} + \text{Trombina}_{\text{excedente}} \xrightarrow{\text{Heparina}} [\text{AT III- Trombina}] + \text{Trombina}_{\text{Resto}}$$

$$\text{Tos-Gly-Pro-Arg-ANBA-IPA} \xrightarrow{\text{Trombina residual}} \text{Tos-Gly-Pro-Arg-OH} + \text{ANBA-IPA}$$

A alteração na absorção está inversamente correlacionada com a actividade de Antitrombina III na amostra.

Reagentes

Nota: Berichrom® Antitrombina III (A) pode ser utilizada manualmente ou em analisadores de coagulação automatizados. A Siemens Healthcare Diagnostics fornece guias de consulta (folhas de instruções de aplicação) para vários analisadores de coagulação. Os guias de consulta (folhas de instruções de aplicação) contêm informações específicas sobre o manuseamento e desempenho do analisador/teste que podem diferir das fornecidas nestas instruções. Numa situação destas, as informações contidas nos guias de consulta (folhas de instruções de aplicação) substituem as informações nestas instruções. Deverá ainda consultar o manual de instruções do fabricante do aparelho.

Material fornecido

Berichrom® Antitrombina III (A) REF OWWR 15*:*

6 x ⟶ 15 ml REAGENT THR, Reagente de trombina

6 x ⟶ 3 ml SUBSTRATE, Reagente de substrato

1 x 100 ml REAGENT THR DILUENT, Solução tampão

Berichrom® Antitrombina III (A) REF OWWR 17*:*

6 x ⟶ 5 ml REAGENT THR Reagente de trombina

3 x ⟶ 3 ml SUBSTRATE Reagente de substrato

1 x 30 ml REAGENT THR DILUENT solução tampão

Composição

Reagente de trombina, Trombina bovina, liofilizada; heparina e aprotinina.

Reagente de substrato, liofilizado; concentração na solução de uso: Tosilglicil-L-prolil-L-arginil-5-amino-2-ácido nitrobenzóico - isopropilamido (Tos-Gly-Pro-Arg-ANBA-IPA) 4 mmol/l

Solução tampão: Tris(hidroximetil)-aminometano (100 mmol/l), NaCl (8,7 g/l), pH 8,2

Conservante: Azida de sódio (< 1 g/l)

Advertências e medidas de precaução

1. Só para uso diagnóstico *in vitro.*
2. Contém azida de sódio (< 1 g/l) como conservante. A azida de sódio pode reagir com os tubos de cobre ou de chumbo das canalizações de esgotos formando compostos explosivos. Elimine este produto de forma correcta e de acordo com as regulamentações locais.

Preparação dos reagentes

REAGENT THR: Dissolver com a quantidade de REAGENT THR DILUENT indicada no rótulo e incubar, antes de usar, durante 30 min., no mínimo, entre +15 e +25 °C.

Para garantir a homogeneidade do reagente, misturar ligeiramente o reagente dissolvido depois de reconstituído e pouco tempo antes deve ser usado.

SUBSTRATE: Dissolver o conteúdo do frasco com a quantidade de água destilada ou desionizada indicada no rótulo.

OBSERVAÇÃO: Certifique-se de que o SUBSTRATE também é diluído integralmente.

Estabilidade e condições de armazenamento

O kit de teste pode ser utilizado até à data de validade indicada no rótulo desde que conservado a +2 a + 8 °C, sem nunca ter sido aberto.

Estabilidade após reconstituição:

Temperatura	REAGENT THR	SUBSTRATE
+2 a +8 °C	2 semanas	6 semanas
-20 °C	3 meses	6 meses

O REAGENT THR reconstituído pode ser congelado e descongelado no frasco original até cinco vezes e o SUBSTRATE até dez vezes. Neste caso, a duração da estabilidade máxima indicada na tabela não deve ser excedida.

O REAGENT THR DILUENT, uma vez aberta, mantém-se estável durante 6 meses entre +2 a +8 °C.

As indicações sobre a estabilidade no aparelho estão mencionadas nas instruções de aplicação para os diferentes coagulómetros.

Materiais necessários mas não fornecidos

Plasma humano standard, REF ORKL

Plasma de controlo N, REF ORKE

Plasma de controlo P, REF OUPZ

Solução tampão Imidazol, REF OQAA, *ou*

Tampão Veronal de Owren Dade® , REF B4234 *ou*

Tampão sistema CA Dade®, REF. B4265 *ou*

Solução isotónica de cloreto de sódio

Água destilada ou desionizada

Amostras

Para a obtenção do plasma, misturar cuidadosamente 1 parte de solução de citrato de sódio (0,11 mol/l) com 9 partes de sangue venoso, evitando a formação de espuma. Deverá usar-se um sistema de colheita fechado ou uma seringa. A este respeito, por favor observe também as indicações no documento CLSI H21-A5[2]. Centrifugar imediatamente a 1.500 x g, durante 15 min. no mínimo.

Estabilidade das amostras:

-20 °C 1 mês

+2 a +8 °C 2 dias

+15 a +25 °C 6 horas

Descongelar os plasmas conservados a -20 °C, durante um período de tempo de 10 min. a +37 °C e executar depois a determinação num espaço de tempo de 2 horas. Não congelar várias vezes. O plasma é utilizado não diluído.

Procedimento

Esquema de pipetagem (exemplo)

Plasma citratado REAGENT THR	10 µl 600 µl
Misturar e incubar durante 3 min a +37 °C	
SUBSTRATE	100 µl
Determinar ΔE_{405nm}/min	

Avaliação

A avaliação é efectuada automaticamente pelo coagulómetro.

Estabelecimento da curva de referência

Uma curva de referência é gerada pela determinação automática de diferentes soluções de plasma humano padrão. A curva de referência tem que ser gerada novamente se houver uma alteração no instrumento ou no lote de Berichrom® Antithrombin III (A) utilizada ou caso haja alguma alteração nas condições experimentais.

Controlo interno de qualidade

Intervalo normal: Plasma de controlo N

Intervalo patológico: Plasma de controlo P

No início de cada processamento de teste, juntamente com cada calibração, dever-se-ão medir dois níveis de material de controlo de qualidade (intervalo normal e patológico), após alterações no frasco de reagente e, pelo menos, a intervalos de oito horas em cada dia de teste. Cada laboratório deverá determinar o seu intervalo de controlo de qualidade próprio, com base nos valores e intervalos teóricos indicados pelo fabricante dos controlos, ou com base nos valores de controlo determinados no laboratório. Se o valor de controlo medido ficar fora do intervalo previamente determinado, nesse caso os reagentes, a curva de referência e o analisador de coagulação devem ser examinados. Os resultados do paciente só devem ser divulgados quando a problemática for identificada, corrigida e documentada.

Limitações do procedimento

Doses terapêuticas de hirudina ou de outros inibidores directos da trombina irão provocar uma actividade erroneamente aumentada da antitrombina III.

Algumas variantes genéticas muito raras com actividade funcional reduzida como, por exemplo, a Antitrombina III Basel, podem originar resultados dentro do intervalo de referência.

A Siemens validou a utilização destes reagentes em vários analisadores, com o intuito de optimizar o desempenho do produto e satisfazer as especificações do produto. As modificações definidas pelo utilizador não são suportadas pela Siemens, na medida em que podem afectar o desempenho do sistema e os resultados do ensaio. Constitui responsabilidade do utilizador validar as modificações efectuadas nestas instruções ou em relação ao uso dos reagentes noutros analisadores que não os incluídos nas folhas de instruções de aplicação da Siemens ou nestas instruções de utilização.

Os resultados deste teste devem sempre ser interpretados em conjunto com o histórico médico do doente, estado clínico e outros dados de interesse.

Intervalo de referência

Amostras de plasma obtidas de dadores aparentemente saudáveis (n = 309) foram testadas utilizando o teste Berichrom® Antitrombina III (A) no Sistema BCS®/BCS® XP tendo apresentado os seguintes resultados (percentil 2,5 a 97,5): 79,4 a 112 % da norma (para adultos). Outros resultados específicos dos sistemas são fornecidos nos respectivos guias de consulta (folhas de instruções de aplicação).

Os intervalos de referência variam de laboratório para laboratório, dependendo da população servida, da técnica, do método, do equipamento e do lote de reagentes utilizados. Por conseguinte, cada laboratório tem que estabelecer os seus próprios intervalos de referência ou verificá-los sempre que uma ou mais das variáveis acima mencionadas sejam alteradas.

Características do teste

Intervalo de medição

O intervalo de medição vai de 0 a 140 % do valor normal.

Especificidade

A aprotinina no reagente de trombina bloqueia a actividade da plasmina, caso exista na amostra[3].

As interferências pelo cofactor II de heparina podem ser desprezadas, uma vez que no teste é utilizada trombina bovina[4].

Sensibilidade

O limite de detecção situa-se em 3,7 % do valor normal

Precisão

A precisão de Berichrom® AT III (A) foi calculada com plasma de controlo N e plasma de controlo P num sistema Sysmex® CA-1500 ao longo de 5 dias numa determinação repetida 8 vezes.

O coeficiente de variação dentro de cada execução foi de 1,3 % e 2,7 % para o plasma de controlo N e o plasma de controlo P, respectivamente. De dia para dia, foi de 4,6 % e 7,6 %, respectivamente.

Comparação de métodos

Numa comparação de Berichrom® AT III (A) com Berichrom® AT III (com diluição manual) no sistema Hitachi 717, foram determinadas 111 amostras no intervalo de 25 a 150 % do valor normal. O coeficiente de correlação situou-se em 0,99 (intercepção do eixo y: -3,7 % da norma; declive: 0,98).

Bibliografia

Ver Instruções em inglês.

BCS, Berichrom e Dade são marcas comerciais da Siemens Healthcare Diagnostics.
Sysmex é uma marca registada da SYSMEX CORPORATION.

Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH
Emil-von-Behring-Str. 76
35041 Marburg/Germany
www.siemens.com/diagnostics

Edição Maio 2010

Symbols Key / Symbolschlüssel / Explication des Symboles / Interpretazione simboli / Clave de los Símbolos / Chave dos Símbolos

2	Do not reuse / Nicht zur Wiederverwendung / Ne pas réutiliser / Non riutilizzare / No reutilizar / Não reutilizar
EXP CCYY-MM-DD	Use By / Verwendbar bis / Utiliser jusque / Utilizzare entro / Fecha de caducidad / Prazo de validade
LOT	Batch Code / Chargenbezeichnung / Code du lot / Codice del lotto / Código de lote / Código do lote
REF	Catalogue Number / Bestellnummer / Référence du catalogue / Numero di catalogo / Número de catálogo / Referência de catálogo
	Caution, consult accompanying documents / Achtung, Begleitdokumente beachten / Attention voir notice d'instructions / Attenzione, vedere le istruzioni per l'uso / Atención, ver instrucciones de uso / Atenção, consulte a documentação incluída
	Manufacturer / Hersteller / Fabricant / Fabbricante / Fabricante / Fabricante
EC REP	Authorized Representative in the European Community / Bevollmächtigter in der Europäischen Gemeinschaft / Mandataire dans la Communauté européenne / Mandatario nella Comunità Europea / Representante autorizado en la Comunidad Europea / Representante autorizado na Comunidade Europeia
Σ	Contains sufficient for <n> tests / Inhalt ausreichend für <n> Tests / Contenu suffisant pour "n" tests / Contenuto sufficiente per "n" saggi / Contenido suficiente para <n> ensayos / Conteúdo suficiente para "n" ensaios
IVD	*In Vitro* Diagnostic Medical Device / *In Vitro* Diagnostikum / Dispositif médical de diagnostic *in vitro* / Dispositivo medico-diagnostico *in vitro* / Producto sanitario para diagnóstico *in vitro* / Dispositivo médico para diagnóstico *in vitro*
	Temperature Limitation / Temperaturbegrenzung / Limites da température / Limiti di temperatura / Límite de temperatura / Limites de temperatura
	Consult Instructions for Use / Gebrauchsanweisung beachten / Consulter les instructions d'utilisation / Consultare le istruzioni per l'uso / Consulte las instrucciones de uso / Consulte as instruções de utilização
NON STERILE	Non-sterile / Nicht steril / Non stérile / Non sterile / No estéril / Não estéril
CE	CE Mark / CE Zeichen / Marquage CE / Marchio CE / Marca CE
CONTENTS	Contents / Inhalt / Contenu / Contenuto / Contenido / Conteúdo
→	Reconstitution Volume / Rekonstitutionsvolumen / Volume de reconstitution / Volume di ricostituzione / Volumen de reconstitución / Volume de reconstituição
LEVEL	Level / Konzentration / Niveau / Livello / Nivel / Nível

2006-09_EFIGSP

© 2010 Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH.
All rights reserved.