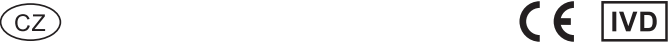


Erba Chrom Antithrombin III

Antitrombin III (chromogenní stanovení)



Kat. č.	Název balení	Obsah balení
EHL00008	Erba Chrom Antithrombin III	R1: 3 x 2 ml AT III Factor Xa R2: 3 x 2 ml AT III Factor Xa Substrate R3: 3 x 3 ml AT III Diluent



POUŽITÍ
Souprava Erba Chrom Antithrombin III je určena ke kvantitativnímu stanovení aktivity antitrombinu III (AT III) v lidské citrátové plazmě, jedná se o chromogenní stanovení.

KLINICKÝ VÝZNAM
AT III představuje hlavní inhibitor koagulační krve, inhibuje plazmatické sérové proteázy včetně faktorů IXa, Xa, XIa a trombinu. Míra inhibice je významně zvýšena v přítomnosti heparinu. AT III deficiencie může být vrozená nebo získaná a je spojena se zvýšeným rizikem trombózy.¹⁻³ Deficiencie se mohou vyskytovat u jaterních onemocnění, DIK – diseminované intravaskulární koagulační, septikémie, plicní embolie, renálního syndromu, při mozkové příhodě a tromboflebitidě.^{2,3}

PRINCIP METODY
Většina funkčních stanovení AT III spočívá ve schopnosti plazmy inaktivovat trombin v přítomnosti heparinu. Později bylo prokázáno, že metoda založená na schopnosti plazmy inhibovat faktor Xa v přítomnosti heparinu je mnohem přesnější, protože eliminuje interference způsobené kofaktorem heparinu II,⁴ který neinhibuje faktor Xa.⁵ V použité metodě je k ředěné plazmě obsahující AT III v přítomnosti nadbytku heparinu a vápníku přidán faktor Xa. Po úvodní inkubaci je aktivita zbývajících faktorů Xa stanovena chromogenním substrátem specifickým pro faktor Xa. Aktivita reziduálního faktoru Xa je nepřímo úměrná koncentraci AT III.

SLOŽENÍ ČINIDEL
R1 – AT III Factor Xa: obsahuje lyofilizovaný hovězí faktor Xa.
R2 – AT III Factor Xa Substrate: obsahuje lyofilizovaný CH₃OCCO-D-CHA-Gly-Arg-pNA-AcOH.
R3 – AT III Diluent: obsahuje koncentrát pufru (5x) s <1 % azidem sodným jako konzervačním činidlem. Po naředění pufr obsahuje 0,05 M Tris-HCl, 0,175 M NaCl, 7,5 mM Na₂EDTA a heparin sodný, pH 8,4.

UPOZORNĚNÍ A BEZPEČNOSTNÍ CHARAKTERISTIKY
• Pouze pro *in vitro* diagnostiku. S těmito činidly mohou pracovat pouze atestovaní laboratorní pracovníci.
• Zabraňte požití.
• Pokud pracujete se soupravou, používejte ochranné rukavice.
• Abyste zabránili kontaminaci, používejte čisté nebo jednorázové laboratorní vybavení.
• Případné zbytky činidel je nutno likvidovat podle vlastních interních předpisů v souladu se Zákonem o odpadech.

VAROVÁNÍ – BIOLOGICKÉ RIZIKO

Některá činidla, která jsou součástí této soupravy, obsahují látky lidského a/nebo živočišného původu. Vždy, když je k přípravě těchto reagentů vyžadována lidská plazma, je testována na přítomnost protilátek proti HIV 1, HIV 2 a HCV a na HBsAg a tyto výsledky jsou negativní. Nicméně žádná testovací metoda neposkytuje absolutní jistotu, že infekční agens nejsou přítomny. Proto všichni pracovníci musí být při práci s tímto biologickým materiálem mimořádně opatrní a pracovat zcela ve shodě s platnými bezpečnostními opatřeními jako by se jednalo o infekční materiál.

PŘÍPRAVA PRACOVNÍCH ROZTOKŮ.
R1 – obsah lahvičky rozpustíte ve 2 ml destilované/redestilované vody. Nechejte stát 10 minut a před použitím promíchejte.
R2 – obsah lahvičky rozpustíte ve 2 ml destilované/redestilované vody. Nechejte stát 10 minut a před použitím promíchejte.
R3 – naředíte 1 díl diluentu se 4 díly destilované/redestilované vody.

SKLADOVÁNÍ A STABILITA PRACOVNÍCH ROZTOKŮ
Neotevřená činidla, skladovaná při 2–8 °C, jsou stabilní do data expirace uvedeného na štítku.
Rekonstituovaná činidla:
Činidlo **R1** a **R2** jsou stabilní:
• 2 měsíce při 2–8 °C
• 1 měsíc při 17 °C
• 2 dny při 37 °C
Činidlo **R3**: naředěný diluent skladujte v dobře uzavřené láhvi při teplotě 2–8 °C. Naředěné činidlo můžete používat po dobu 1 měsíce.

POŽADOVANÉ REAGENCE, KTERÉ NEJSOU SOUČÁSTÍ SOUPRAVY
Erba Standard Plasma, kat. č. EHL00012
Kyselina octová ledová

ODBĚR A PŘÍPRAVA VZORKU
Při práci používejte plast nebo silikonizované sklo.
Krev (9 objemových dílů) odeberte do 3,2 % nebo 3,8 % citratu sodného (1 objemový díl) – antikoagulant.
Centrifugujte 15 minut při 1 500 x g a odseparujte plazmu.
Plazmu skladujte při 2–8 °C nebo 18–24 °C. Stanovení by mělo být provedeno do 4 hodin od odběru vzorku nebo plazma může být skladována při teplotě -20 °C po dobu 2 týdnů nebo při teplotě -70 °C po dobu 6 měsíců. Před stanovením rychle rozpustíte při +37 °C. Při této teplotě ponechte plazmu maximálně po dobu 5 minut.⁶

POSTUP MĚŘENÍ
Manuální metoda
Naředěte kalibrační plazmu (Erba Standard Plasma), kontroly a pacientské vzorky:

% AT III	Plazma	ředicí pufr
100 %	10 µL standardu	990 µL
50 %	500 µL 100 % standardu	500 µL
25 %	500 µL 50 % standardu	500 µL
12,5 %	500 µL of 25 % standardu	500 µL
Pacient, kontrola	10 µL Plazma	990 µL

A. Semi-Micro Endpoint metoda
• Stanovení provádějte v duplikátu.
• Do kyvety – zkumavky napipetujte 200 µl standardu, pacientského vzorku nebo kontroly (ředěné – viz. ředící tabulka).
• Inkubujte 2–4 minuty při 37 °C.
• Přidejte 200 µl Factor Xa reagent a promíchejte.
• Inkubujte přesně 1 minutu při 37 °C.
• Přidejte 200 µl Factor Xa Substrate a promíchejte.
• Inkubujte přesně 3 minuty při 37 °C.
• Přidejte 200 µl kyseliny octové (50 %) a promíchejte.
• * Přidejte 200 µl vody.
Žluté zbarvení reakčního produktu je stabilní minimálně 4 hodiny. Změřte absorbanci při 405 nm proti blanku připravenému dle následujícího postupu:
1. 200 µl kyselina octová
2. 200 µl ředěný standard
3. 200 µl Factor Xa reagent.
4. 200 µl Factor Xa Substrate.
5. 200 µl water
*některé spektrofotometry vyžadují minimální objem v kyvetě 1 ml.
V případě silně ikterického pacientského vzorku, připravte blank s tímto naředěným vzorkem a absorbanci blanku odečtěte od absorbance získané pro tento vzorek.

B. Kinetická metoda
Kinetický analyzátor může být použit pro měření počáteční rychlosti hydrolyzy chromogenního substrátu.
Do reakční kyvety:
1. Napipetujte 200 µl ředěného standardu nebo pacientské plazmy.
2. Inkubujte 1 minutu při 37 °C
3. Přidejte 200 µl Factor Xa reagent a promíchejte.
4. Inkubujte 1 minutu při 37 °C
5. Přidejte 200 µl Factor Xa Substrate.
7. změřte rychlost změny absorbance při 405 nm po dobu 1 minuty.
Do grafu vynesete naměřené absorbance každého standardu (osa y) proti % AT III (osa x), závislost by měla být lineární. Hodnoty AT III ve vzorcích plazmy pak odečtete z kalibrační. Přesné hodnoty pacientských vzorků opravte s korekcí na hodnoty kalibrační plazmy podle uvedeného vzorce:
% AT-III (opravená) = % AT-III (pacient) x % AT-III (standard) / 100

Automatická metoda
Postupujte podle informací uvedených v Uživatelském manuálu.

REFERENČNÍ HODNOTY
Referenční hodnoty se mohou lišit v závislosti na místních podmínkách (typ populace apod.), použité technice a použitém systému. Proto je nutné, aby si každá laboratoř stanovila své vlastní normální rozmezí. Normální rozmezí hodnot AT III v plazmě je 75–125 %. Hodnoty aktivity v plazmě v rozmezí 30–60 % mohou být pozorovány u pacientů s vrozenou AT-III nedostatečností.^{1,2} Některé klinické stavy spojené se získanou AT-III nedostatečností – jaterní onemocnění, DIK, nefrotický syndrom, plicní embolie, mozková příhoda a tromboflebitida. Používání orální antikoncepce může vést ke sníženým hodnotám AT-III.²

KONTROLA KVALITY
Každá laboratoř by si měla založit vlastní program kontroly kvality.
Pro zajištění odpovídající kvality stanovení je doporučeno použít kontrolní plazmu. Je doporučeno použít dvě hladiny kontrolní plazmy, jednu v oblasti normálních hodnot pacientů (Erba Control N, kat. č. EHL00014 nebo Erba Control N Plus, kat. č. EHL00016) a druhou představující patologické hodnoty (Erba Control P Plus, kat. č. EHL00017).

OMEZENÍ
Nepoužívejte ikterické, lipemické a hemolytické vzorky.

VÝKONNOSTNÍ CHARAKTERISTIKY
Tyto výkonnostní charakteristiky byly získány na analyzátoru ECL. Výsledky se mohou lišit v případě použití jiného přístroje nebo manuální metody stanovení.
Linearity: Souprava Erba Chrom Antithrombin III poskytuje lineární kalibraci v rozmezí 10–140 %.

	Intra-assay (N = 10)		Inter-assay (N = 30)	
% AT III	98,7	55,6	98,4	56,4
CV (%)	0,52	1,38	0,44	2,79

LITERATURA
1. Hirsh J et al (1989) Congenital antithrombin III deficiency. Incidence and clinical features, Am J. Med, 87(suppl. 3B): 34S-38S
2. Panicucci F et al (1981) Antithrombin III, heparin cofactor and antifactor Xa in relation to age, sex and pathological condition, Haemostasis, 9: 297-302
3. Conlan MG et al (1994) Antithrombin: antithrombin III: Associations with age, race, sex and cardiovascular disease risk factors, Tromb. Haemost, 72(4): 551-556
4. Demers C et al (1993) An antithrombin III assay based on factor Xa inhibition provides a more reliable test to identify congenital antithrombin III deficiency than an assay based on thrombin inhibition, Thromb. Haemost, 69:231-235
5. Tølefsen DM, Blank MK (1981) Detection of a new heparin-dependent inhibitor of thrombin in human plasma, J.Clin. Invest, 68:589-596
6. Clinical and Laboratory Standards Institute (2008) Collection, Transport and Processing of Blood Specimens for Testing Plasma-Based Coagulation Assays and Molecular Haemostasis Assays: Approved Guideline, 5th edn. CLSI: H21-A5

Číslo šarže

Katalogové číslo

Datum expirace

In vitro Diagnostikum

Výrobce

Teplota skladování

Čtěte návod k použití

Obsah

Erba Chrom Antithrombin III

Antithrombin III (Chromogenic)



Cat. No.	Pack name	Packaging (Content)
EHL00008	Erba Chrom Antithrombin III	R1: 3 x 2 ml AT III Factor Xa R2: 3 x 2 ml AT III Factor Xa Substrate R3: 3 x 3 ml AT III Diluent



INTENDED USE

Erba Chrom Antithrombin III is intended for the quantitative determination of antithrombin III (AT-III) activity in human citrated plasma by chromogenic assay.

CLINICAL SIGNIFICANCE

AT-III is a major inhibitor of blood coagulation, acting to inhibit plasma serine proteases including factors IXa, Xa, XIa, and thrombin. The rate of the inhibition is significantly increased in the presence of heparin. AT-III deficiency may be congenital or acquired and is associated with an increased risk for thrombosis.¹⁻³ Deficiencies may occur in liver disease disseminated intravascular coagulation (DIC), septicæmia, pulmonary embolism, nephritic syndrome, stroke, and thrombophlebitis.^{2,3}

PRINCIPLE

Most functional assays for AT-III rely on the ability of plasma to inactivate thrombin in the presence of heparin. More recently, it has been shown that a method based on the ability of plasma to inhibit factor Xa in the presence of heparin may be more accurate, since it eliminates interferences due to heparin cofactor II* which does not inhibit factor Xa.⁵

In the present method, factor Xa is added to a plasma dilution containing AT-III in the presence of excess heparin and calcium. After an initial incubation period, residual factor Xa is determined with a factor Xa-specific chromogenic substrate. The residual factor Xa activity is inversely proportional to the AT-III concentration.

COMPOSITION

R1 – AT III Factor Xa: Contains freeze-dried bovine factor Xa.

R2 – AT III Factor Xa Substrate: Contains freeze-dried CH₃OCO-D-CHA-Gly-Arg-pNA-AcOH.

R3 – AT III Diluent: Contains 5x buffer concentrate with sodium azide at <1 % as preservative. When fully diluted, buffer contains 0.05 M Tris-HCl, 0.175 M NaCl, 7.5 mM Na₂EDTA and sodium heparin at pH 8.4.

WARNINGS AND PRECAUTIONS

- For *in vitro* diagnostic use only. These reagents are to be used by certified medical laboratory personnel only.
- Do not ingest.
- Wear gloves when handling all kit components.
- Only use clean or single use laboratory equipment to avoid contaminations.
- The eventual rest of reagents should be disposed of in accordance with the internal regulations and in compliance with local and national regulations relating to the safe handling of waste.



WARNING – POTENTIAL BIOHAZARDOUS MATERIAL

Some reagents provided in this kit contain materials of human and/or animal origin. Whenever human plasma is required for the preparation of these reagents, the plasmas are tested for the antibodies to HIV 1, HIV 2 and HCV, and for hepatitis B surface antigen. and results are found to be negative. However, no test method can offer complete assurance that infectious agents are absent. Therefore, users of reagents of these types must exercise extreme care in full compliance with regulatory safety precautions in the manipulation of these biological materials as if they were infectious.

WORKING REAGENT.

R1 – AT III Factor Xa: Reconstitute with 2 ml of distilled/deionised water. Allow to stand for 10 minutes and mix before use.

R2 – AT III Factor Xa Substrate: Reconstitute with 2 ml of distilled/deionised water. Allow to stand for 10 minutes and mix before use.

R3 – AT III Diluent: Dilute 1 volume of diluent for 4 volume of distilled/deionised water.

STABILITY AND STORAGE

The unopened reagents are stable till the expiry date stated on the bottle and kit label when stored at 2–8 °C.

Reconstituted reagents are stable for

R1 – AT III Factor Xa and **R2** – AT III Factor Xa Substrate:

- 2 months at 2–8 °C.
- 1 month at 17 °C
- 2 days at 37 °C.

R3 – AT III Diluent: Store diluted buffer in a tightly stoppered bottle at 2–8 °C and use in one month.

REAGENTS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

Erba Standard Plasma (Cat. No.: EHL00012)

Glacial acetic acid

SAMPLE COLLECTION AND PREPARATION

Plastic or siliconised glass should be used throughout. Blood (9 parts) should be collected into 3.2 % or 3.8 % sodium citrate anticoagulant (1 part). Separate plasma after centrifugation at 1500 x g for 15 minutes. Plasma should be kept at 2–8 °C or 18–24 °C. Testing should be completed within 4 hours of sample collection, or plasma can be storage frozen at -20 °C for 2 weeks or -70 °C for 6 months. Thaw quickly at 37 °C prior to testing. Do not keep at 37 °C for more than 5 minutes.⁶

PROCEDURE

Manual Method

Preparation of plasma standard (Erba Standard Plasma), Control and Patient Dilutions:

% AT III	Plasma	Dilution Buffer
100 %	10 µl Standard	990 µl
50 %	500 µl of 100 % Std	500 µl
25 %	500 µl of 50 % Std	500 µl
12.5 %	500 µl of 25 % Std	500 µl
Patient or control	10 µl Plasma	990 µl

A. Semi-Micro Endpoint Method

- Add 200 µl standard / control or patient plasma dilution to a test tube.
- Incubate at 37 °C for 2–4 minutes.
- Add 200 µl Factor Xa Reagent and mix.
- Incubate at 37 °C for EXACTLY 1 minute.
- Add 200 µl Factor Xa Substrate and mix.
- Incubate at 37 °C for EXACTLY 3 minutes.
- Add 200 µl acetic acid (50%) and mix.
- * Add 200 µl water (optional).

The yellow colour of the final reaction product is stable for at least 4 hours. Read absorbance at 405 nm in a 1 cm semi-micro cuvette against a blank prepared in the following order:

- 200 µl acetic acid.
- 200 µl standard dilution.
- 200 µl Factor Xa reagent.
- 200 µl Factor Xa Substrate.
- *200 µl water (optional).

*Some spectrophotometers require a minimum of 1 ml volume in the cuvette.

If the patient plasma is very icteric, a second blank containing patient plasma dilution instead of standard dilution should be prepared and the absorbance subtracted from the absorbance obtained for the patient's AT-III determination

B. Kinetic Method

A kinetic analyser may be used to measure the initial rate of hydrolysis of the chromogenic substrate. The procedure to be used is as follows:

To a reaction cuvette:

- Add 200 µl diluted standard or patient plasma.
- Incubate at 37 °C for 1 minutes.
- Add 200 µl Factor Xa reagent and mix.
- Incubate at 37 °C for 1 minute.
- Add 200 µl Factor Xa Substrate.
- Measure rate of change of absorbance at 405 nm for 1 minute.

Plot the absorbance obtained with each of the AT-III calibration standards on the y-axis against % AT-III on the x-axis using linear graph paper. The line of best fit should be determined by linear regression analysis. The AT-III in plasma samples can be determined by interpolation from the calibration curve. The AT-III concentration in the patient specimen should be adjusted for the AT-III concentration in the standard:

$$\% \text{ AT-III (adjusted) } = \% \text{ AT-III (patient) } \times \% \text{ AT-III (standard) } / 100$$

Automated Method

Refer to the instrument's operator's manual.

REFERENCES VALUES

Reference values can vary between laboratories depending on the techniques and systems in use. For this reason each laboratory should establish its own normal range. The normal range of AT-III is 75–125% in plasma. Plasma activity levels of 30–60% can be observed in patients with hereditary AT-III deficiency.^{1,2} Several clinical conditions associated with acquired AT-III deficiency include: liver disease, DIC, nephrotic syndrome, pulmonary embolism, stroke, and thrombophlebitis. In addition, oral contraceptive use may lead to reduced AT-III levels.²

QUALITY CONTROL

Each laboratory should establish a quality control program.

To ensure adequate quality, control plasmas are recommended. It is suggested to use two levels of control, one close to the normal patient values (Erba Control N, Cat. No.: EHL00014 or Erba Control N Plus, Cat. No.: EHL00016) and the second representative the pathologic values (Erba Control P Plus, Cat. No.: EHL00017)

LIMITATIONS

Avoid icteric, lipaemic, and haemolysed samples.

PERFORMANCES

These performances have been obtained using an analyzer ECL. Results may vary if a different instrument or manual procedure is used.

Linearity: The Erba Chrom Antithrombin III reagent is designed to give a linear calibration in the range of 10–140 %.

Precision:

	Intra-assay precision (N = 10)		Inter-assay precision (N = 30)	
% AT III	98.7	55.6	98.4	56.4
CV (%)	0.52	1.38	0.44	2.79

REFERENCES

- Hirsh J et al (1989) Congénital antithrombin III deficiency. Incidence and clinical features, Am J. Med, 87(suppl. 3B): 34S-38S
- Panicucci F et al (1981) Antithrombin III, heparin cofactor and antifactor Xa in relation to age, sex and pathological condition, Haemostasis, 9: 297-302
- Conlan MG et al (1994) Antithrombin: antithrombin III: Associations with age, race, sex and cardiovascular disease risk factors, Tromb. Haemost, 72(4): 551-556
- Demers C et al (1993) An antithrombin III assay based on factor Xa inhibition provides a more reliable test to identify congenital antithrombin III deficiency than an assay based on thrombin inhibition, Thromb. Haemost, 69:231-235
- Tølefsen DM, Blank MK (1981) Detection of a new heparin-dependent inhibitor of thrombin in human plasma, J.Clin. Invest, 68:589-596
- Clinical and Laboratory Standards Institute (2008) Collection, Transport and Processing of Blood Specimens for Testing Plasma-Based Coagulation Assays and Molecular Haemostasis Assays: Approved Guideline, 5th edn. CLSI: H21-A5

USED SYMBOLS

LOT Lot Number

IVD In vitro Diagnostics

See Instruction for Use

REF Catalogue Number

Manufacturer

CONT Content

Expiry Date

Storage Temperature

QUALITY SYSTEM CERTIFIED
ISO 13485

Erba Lachema s.r.o., Karásek 2219/1d, 621 00 Brno, CZ
e-mail: diagnostics@erbamannheim.com, www.erbamannheim.com

N/134/20/FINT

Date of revision: 15. 5. 2020

10020372
10020415

Erba Chrom Antithrombin III

Набір Антитромбін AT III



Кат. номер	Назва на упаковці	Вміст
EHL00008	Набір Антитромбін AT III	R1: 3 x 2 мл AT III Фактор Ха R2: 3 x 2 мл AT III Фактор Ха Субстрат R3: 3 x 3 мл AT III Розчинник



ЗАСТОСУВАННЯ

Набір Антитромбін AT III призначений для кількісного визначення активності антитромбіну III (AT-III) у цитратній плазмі крові людини методом хромогенного аналізу.

КЛІНІЧНЕ ЗНАЧЕННЯ

AT-III є основним інгібітором згортання крові шляхом впливу на плазменні серинові протеази, зокремо на фактори IXa, Xa, XIa і тромбін. Ефективність інгібування значно підвищується за наявності гепарину. Дефіцит AT-III може бути вродженим або набутим і пов'язується з підвищеним ризиком тромбозу.¹⁻³ Нестача антитромбіну III може виникати під час захворювань печінки, при дисемінованому внутрішньосудинному згортанні (ДВС-синдром), септицемії, емболії легеневої артерії, нефротичному синдромі і тромбозі, а також внаслідок інсульту.^{2, 3}

ПРИНЦИП РЕАКЦІЇ

Більшість функціональних тестів на AT-III ґрунтуються на здатності плазми деактивувати тромбін у присутності гепарину. Натомість нещодавно було доведено більш високу точність методу, який ґрунтується на здатності плазми деактивувати фактор Ха також у присутності гепарину. В цьому випадку усувається вплив кофактору II * гепарину, який не інгібує фактор Ха.⁵

Згідно цього методу фактор Ха додається до розведеної плазми із вмістом AT-III, у присутності надлишку гепарину і кальцію. Після початкової інкубації залишкова активність фактору Ха, яка є обернено пропорційною до концентрації антитромбіну III (AT-III), визначається за допомогою специфічного хромогенного субстрату.

СКЛАД РЕАГЕНТІВ

Реагент 1 – Фактор Ха антитромбіну III: Містить ліофілізований фактор Ха (з BPX).
Реагент 2 – Субстрат фактору Ха антитромбіну III: Містить ліофілізований CH₃OCO-D-CHA-Gly-Arg-pNA-ACOH.
Реагент 3 – Розчинник антитромбіну III: Містить концентрат буферу (5x) із вмістом натрію азиду (<1 %) у якості консерванту. Розведений буфер містить розчини 0,05M тріс-HCl, 0,175M NaCl, 7,5mM Na₂EDTA і натрію гепарин (рН 8,4).

ЗАСТЕРЕЖЕННЯ І ЗАХОДИ БЕЗПЕКИ

- Ліше для in vitro діагностики професійно підготовленим персоналом медичної лабораторії.
- Уникати ковтання.
- Користуватися захисними рукавичками при поводженні з усіма компонентами набору.
- Запобігати контамінації, використовувати лише чисті або одноразові лабораторні приналежності.
- Залишки реагентів повинні утилізуватися у відповідності до діючих локальних або національних правил для даних видів матеріалів.



УВАГА! ПОТЕНЦІЙНО БІОЛОГІЧНО НЕБЕЗПЕЧНИЙ МАТЕРІАЛ

Реагенти набору містять матеріали людського та (або) тваринного походження. Використана для виготовлення реагентів плазма крові людини перевірена на відсутність антитіл до вірусу ВІЛ 1, ВІЛ 2 та гепатиту С, а також поверхневого антигену гепатиту В. Оскільки жодним методом неможливо повністю виключити присутність інфекційних агентів, працювати необхідно із суворим дотриманням заходів безпеки під час роботи з потенційно інфікованими матеріалами.

ПРИГОТУВАННЯ РЕАГЕНТІВ

Реагент 1 – Фактор Ха антитромбіну III: Відновити за допомогою 2 мл дистильованої або деіонізованої води. Залишити на 10 хвилин; перед використанням перемішати.
Реагент 2 – Субстрат фактору Ха антитромбіну III: Відновити за допомогою 2 мл дистильованої або деіонізованої води. Залишити на 10 хвилин; перед використанням перемішати.
Реагент 3 – Розчинник антитромбіну III: Розвести у дистильованій або деіонізованій воді у співвідношенні 1:4.

ЗБЕРІГАННЯ І СТАБІЛЬНІСТЬ

Невідкриті реагенти є стабільними до вичерпання вказаного на упаковці терміну придатності за умови зберігання за температури 2–8 °C. Відновлені (розведені) реагенти є стабільними упродовж:

- Реагент 1** (Фактор Ха антитромбіну III) і **Реагент 2** – (Субстрат фактору Ха антитромбіну III):
 - 2 місяця за температури 2–8 °C.
 - 1 місяця за температури 17 °C.
 - 2 дні за температури 37 °C.
- Реагент 3** (Розчинник антитромбіну III): Розведений буфер зберігати у щільно закритому флаконі за температури 2–8 °C, використовувати упродовж 1 місяця.

НЕОБХІДНІ ДОДАТКОВІ МАТЕРІАЛИ

Стандартна плазма (Erba Standard Plasma) (кат. номер EHL00012)
Кристалізована оцтова кислота

ВІДБІР І ПІДГОТОВКА ЗРАЗКІВ

Використовувати посуд з органічного або силіконованого скла. Кров (9 частин) необхідно відібрати в антикоагулянт: 3,2% або 3,8% натрію цитрат (1 частина). Відділити плазму крові центрифугуванням на 1500 x g упродовж 15 хвилин. Плазму зберігати за температури 2–8 °C або 18–24 °C, аналіз провести упродовж 4 годин з моменту відбору. Для більш тривалого зберігання плазму необхідно заморозити, тривалість зберігання у замороженому вигляді: 2 тижні за температури -20 °C або 6 місяців за температури -70 °C. Безпосередньо перед початком аналізу розморозити за температури 37 °C. Не утримувати за температури 37 °C понад 5 хвилин.⁶

ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ

Ручний метод

Підготовка Стандартної плазми (Erba Standard Plasma), контролю і зразків пацієнта:

% AT III	Плазма	Розчинник (Реагент 3)
100 %	10 мкл стандарту	990 мкл
50 %	500 мкл 100 % стандарту	500 мкл
25 %	500 мкл 50 % стандарту	500 мкл
12.5 %	500 мкл 25 % стандарту	500 мкл
Контроль / Зразок пацієнта	10 мкл плазми	990 мкл

A. Метод кінцевої точки (напіvmікрометод)

- Додати в пробірку 200 мкл розведеного стандарту (контролю, зразка пацієнта).
- Інкубувати за температури 37 °C упродовж 2-4 хвилин.
- Додати 200 мкл Реагенту 1 (Фактор Ха антитромбіну III) і перемішати.
- Інкубувати за температури 37 °C упродовж точно 1 хвилини.
- Додати 200 мкл Реагенту 2 (Субстрат фактору Ха антитромбіну III) і перемішати.
- Інкубувати за температури 37 °C упродовж точно 3 хвилин.
- Додати 200 мкл оцтової кислоти (50%) і перемішати.
- Додати 200 мкл води (за необхідності)*.

Жовтий колір кінцевого продукту реакції є стабільним упродовж принаймні 4 годин. Виміряти поглинання на 405 nm у 1-сантиметровій напіvmікроковеті у порівнянні з бланком, підготовленим наступним чином:

- 200 мкл оцтової кислоти.
- 200 мкл Реагенту 3 (Розчинник антитромбіну III).
- 200 мкл Реагенту 1 (Фактор Ха антитромбіну III).
- 200 мкл Реагенту 2 (Субстрат фактору Ха антитромбіну III).
- 200 мкл води (за необхідності)*.

Примітка * Деякі спектрофотометри потребують об'єм щонайменше 1 мл у вимірвальній коветі. Якщо зразок пацієнта має дуже виразні ознаки жовтяниці, необхідно підготувати коригувальний бланк, який замість розчинника (Реагент 3) містить плазму пацієнта. Поглинання коригувального бланку необхідно відняти від значення поглинання, отриманого під час аналізу зразка.

В. Кінетичний метод

Для визначення початкової швидкості гідролізу хромогенного субстрату можна використати кінетичний аналізатор. Процедура є наступною:

В реакційну ковету:

- Додати 200 мкл розведеного стандарту (контролю, зразка пацієнта).
- Інкубувати за температури 37 °C упродовж 1 хвилини.
- Додати 200 мкл Реагенту 1 (Фактор Ха антитромбіну III) і перемішати.
- Інкубувати за температури 37 °C упродовж 1 хвилини.
- Додати 200 мкл Реагенту 2 (Субстрат фактору Ха антитромбіну III) і перемішати.
- Виміряти швидкість зміни поглинання на 405 nm упродовж 1 хвилини.

Нанести на міліметровий папір значення поглинання для всіх стандартних розчинів по осі Y і їх концентрації по осі X. Лінійний графік залежності побудувати за методом лінійної регресії. Концентрація AT-III у зразках пацієнтів має бути скоригована з урахуванням концентрації у стандарті:

$$\% \text{ AT-III (кориг.)} = \% \text{ AT-III (зразка)} \times \% \text{ AT-III (стандарту)} / 100$$

Автоматичний метод

Див. Інструкцію користувача обладнання.

НОРМАЛЬНІ ВЕЛИЧИНИ

Нормальні величини показника антитромбіну III можуть коливатися у залежності від реагентів і методів його визначення. З огляду на це, кожна лабораторія самостійно встановлює діапазони нормальних значень. В-цілому нормальний діапазон для AT-III у плазмі крові становить 75–125 %. Занижена активність у діапазоні 30–60% спостерігається у пацієнтів із спадковим дефіцитом AT-III.^{1, 2} Низьку клінічних станів також пов'язують з набутим дефіцитом AT-III, серед них хвороби печінки, ДВС-синдром, нефротичний синдром, емболія легеневої артерії, інсульт і тромбоз. Крім цього, до зниження рівня AT-III може призводити застосування оральних контрацептивів.²

КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Кожна лабораторія встановлює власні процедури контролю якості. Рекомендованим є використання контрольних плазм крові з двома рівнями контролю, один з яких для нормальних (близьких до нормальних) значень: Контрольна плазма нормальна, кат. номер EHL00014 або Контрольна плазма нормальна Плюс, кат. номер EHL00016, другий – для патологічних значень: Контрольна плазма патологія Плюс, кат. номер EHL00017.

QUALITY SYSTEM CERTIFIED
ISO 13485

ОБМЕЖЕННЯ ЗАСТОСУВАННЯ

Уникати використання ліпемічних і гемолізованих зразків, а також зразків із ознаками жовтяниці.

ПАРАМЕТРИ РЕАГЕНТІВ

Наведені значення отримувалися на аналізаторах Erba серії ECL і можуть відрізнятися від отриманих ручним методом або на інших аналізаторах.

Лінійність: Набір реагентів Антитромбін AT III проявляє лінійність калібрувальних графіків у діапазоні значень 10–140%.

Точність:

	Внутрішньосерійна (N = 10)		Міжсерійна (N = 30)	
% AT III	98.7	55.6	98.4	56.4
СКВ (%)	0.52	1.38	0.44	2.79

ЛІТЕРАТУРА

- Hirsh J et al (1989) Congenital antithrombin III deficiency. Incidence and clinical features, Am J. Med, 87(suppl. 3B): 34S-38S
- Panicucci F et al (1981) Antithrombin III, heparin cofactor and antifactor Xa in relation to age, sex and pathological condition, Haemostasis, 9: 297-302
- Conlan MG et al (1994) Antithrombin: antithrombin III: Associations with age, race, sex and cardiovascular disease risk factors, Tromb. Haemost. 72(4): 551-556
- Demers C et al (1993) An antithrombin III assay based on factor Xa inhibition provides a more reliable test to identify congenital antithrombin III deficiency than an assay based on thrombin inhibition, Tromb. Haemost. 69:231-235
- Tofelsen DM, Blank MK (1981) Detection of a new heparin-dependent inhibitor of thrombin in human plasma, J.Clin. Invest. 68:589-596
- Clinical and Laboratory Standards Institute (2008) Collection, Transport and Processing of Blood Specimens for Testing Plasma-Based Coagulation Assays and Molecular Haemostasis Assays: Approved Guideline, 5th edn. CLSI: H21-A5

UA Уповноважений представник в Україні:
ТОВ „ЕРБА ДІАГНОСТИКС УКРАЇНА“
01042, Київ, вул. ЮННА ПАВЛА II, буд. 21, офіс 401
тел. +38-050-4483456
ukraine@erbamannheim.com

ВИКОРИСТАНІ ПОЗНАЧКИ

LOT Номер партії	IVD In vitro діагностика	Перед використанням уважно вивчіть Інструкцію
REF Каталогний номер	Виробник	CONT Вміст
Термін придатності	Температура зберігання	Національний знак відповідності для України

Erba Lachema s.r.o., Karásek 2219/1d, 621 00 Brno, CZ
e-mail: diagnostics@erbamannheim.com, www.erbamannheim.com

N/134/20/F/INT

Дата проведення контролю: 15. 5. 2020