

COAMATIC® Antithrombin - 82 1991 63

Intended use

For the quantitative determination of the heparin cofactor activity of Antithrombin (AT) in human citrated plasma.

Summary and principle

Antithrombin is the most important natural inhibitor of the coagulation cascade. By inhibiting the coagulation proteases, especially thrombin, factor Xa, and factor IXa, AT prevents uncontrolled coagulation and thrombosis. Plasma is incubated with an excess of factor Xa (FXa) in the presence of heparin. The residual quantity of FXa is determined by the rate of hydrolysis of the chromogenic substrate S-2765. The pNA release measured at 405 nm is inversely proportional to the AT level in the range from 0-120% of normal plasma.¹

1. AT + Heparin → [AT · Heparin]
2. [AT · Heparin] + FXa (excess) → [AT · Heparin · FXa] + FXa (residual)

FXa (residual) → Peptide + pNA

Composition

1. **S-2765, 8 mg** Lyophilized chromogenic substrate N-α-Cbo-D-Arg-Gly-Arg-pNA·2HCl. **1 vial**
2. **Buffer with heparin, 25 mL** Tris buffer, pH 8.2, ionic strength 0.25. **1 vial**
3. **Factor Xa, 29 nkat** Lyophilized purified bovine Factor Xa and bovine albumin. **1 vial**

PRECAUTION AND WARNINGS

Hazard class: **none**
 Hazard statements: **none**
 Precautionary statements: **none**
 This product is for *in vitro* diagnostic use.

Preparation

The reagents are reconstituted according to the specific instrument application. For microplate and test tube techniques:

1. **Substrate S-2765:** reconstitute with 10 mL of CLSI Type II water or equivalent. ²
2. **Factor Xa:** reconstitute with 10 mL of buffer with heparin. Replace the stoppers and swirl gently. Make sure of the complete reconstitution of the product. Keep reagent at 15-25°C for 10-30 min and invert before use.

NOTE: Other reagent reconstitution volumes may apply for automated methods. The reagents are not interchangeable between lots.

Storage conditions and stability

Unopened reagents are stable until the expiration date shown on the vial when stored at 2-8°C.

1. **S-2765:** Stability after reconstitution: 6 months at 2-8°C in the original vial.
2. **Buffer:** with heparin. Stability when opened: 3 months at 2-8°C in the original vial.
3. **Factor Xa:** Stability after reconstitution: 3 months at 2-8°C in the original vial.

WARNING: Do not use reagents beyond the expiry date printed on the package label. Discard if the substrate solution appears yellow. Avoid contamination by microorganisms.

Specimen collection and preparation

Nine parts of freshly drawn venous blood are collected into one part trisodium citrate. Centrifugation: 2000 x g for 10-20 minutes at 20-25°C. Refer to CLSI document H21-A5 for further instructions on specimen collection, handling and storage.⁵

Additional reagents and control plasmas

1. Deionized water, filtered through 0.22 mm or CLSI type II water.²
2. Calibration plasma
3. Control Plasma Abnormal and Normal
4. Saline (0.9% NaCl).
5. Acetic acid 20% or citric acid 2% (end-point methods).

Materials required but not provided

- Spectrophotometer, 405 nm (and 490 nm for microplate procedure)
- Microplate* or semi-micro cuvettes (1 cm)
- Centrifuge, 2000 x g
- Incubator 37°C ±0.2°C
- Vortex mixer
- Stopwatch
- Calibrated pipettes
- Plastic test tubes

*NOTE: Do not use microplates intended for coating!

Quality controls

Normal and abnormal controls are recommended for a complete quality control program.³ Assigned values of Controls should be traceable to the International Standard. Each laboratory should establish its own mean and standard deviation and should establish a quality control program to monitor laboratory testing. Controls should be analyzed at least every 8 hours in accordance with good laboratory practice. Refer to Westgard et al⁴ for identification and resolution for out of control situations.

Results

Antithrombin results are reported in activity (%).

Expected values

106±18% (2 SD, n=109; M=53 F=56) in a normal healthy population evaluated with Coamatic Antithrombin. Due to many variables which may affect results, each laboratory should establish its own normal range.

Procedures

All conditions and performance characteristics included in this package insert are referred to microplate method. Detailed instrument settings including instructions for preparation of the reagents for a variety of automated instruments are available on request from Chromogenix.

*NOTE: Not all instrument applications are available in all countries.

Calibration

A standard curve is obtained by analyzing different dilutions in saline of Calibration Plasma, to obtain antithrombin levels of 0, 25, 50, 75 and 100%. A standard about of 120% can be prepared by diluting 25 µL Calibration Plasma with 2500 µL of saline. The assigned value of calibrator plasma should be traceable to the International Standard.

Assay conditions for microplate and test tube techniques:

Samples/controls/standards	25 µL
Saline	3000 µL
Mix well	

Microplate method

Diluted samples/controls/standards to wells
 Factor Xa
 Incubate at 37°C, 90 sec
 S-2765 (pre-heat at 37°C)
 50 µL
 50 µL
 A. Kinetic method: read DA/min at 405 nm for 30-90 sec.
 B. End-point method: proceed as described below.
 Incubate at 37°C, 90 sec
 Acetic acid 20% or 2% citric acid
 50 µL

Mix
 Read the absorbance against water at 405 nm. If possible, read and subtract the absorbance at 490 nm in order to compensate for differences in the material of the microplate wells.

Test tube method

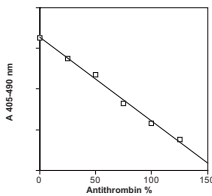
Use 200 µL instead of 50 µL for all pipetting steps.

ENGLISH - Insert revision 03/2015



Calculation

Plot the change in absorbance per minute (ΔA/min) or absorbance (A) for the standards against their antithrombin activity on linear graph paper. Plot ΔA/min or A on the Y axis and % antithrombin on the X axis. Connect the standard points with the best fitting straight line. Samples are evaluated based on this standard curve. An example of a typical standard curve (microplate method) is shown below.



Performance Characteristics

Limitations/interfering substances

No drug interference reported. Since the method is based on inhibition of factor Xa there is no influence from heparin cofactor II, α₂-macroglobulin or α₁-antitrypsin.^{6,7,8} In plasmas where contact activation has occurred, a contribution to the substrate activity might be produced. Thus an underestimation of the antithrombin level might follow. To improve the validity of the assay the value obtained in absence of factor Xa can be subtracted from the sample value. Bilirubin, haemoglobin and plasma from hyperlipaemic patients interfere in absorbance readings. In these cases individual plasma blanks are necessary when acid stopped methods are used.

Precision:

Microplate method	CV% (Within day)	n	CV% (Between days)	n
Mean (%AT)				
100	3.1	20	2.6	5
50	4.8	20	4.3	5

Correlation:

The assay has been compared with Coatest Antithrombin and Coacut Antithrombin R using normal plasmas, patient plasmas and mixtures of normal and deficiency plasmas.:

System	Slope	Intercept	r	Reference method	n
Microplate	1.03	-2.6	0.97	Coatest	45
ACL	1.01	-1.6	0.96	Coatest	43
Microplate	1.13	-7.5	0.99	Coacut	43
ACL	0.95	2.3	0.99	Coacut	43

The precision and correlation results were obtained using specific lots of reagents and controls.

Linearity:

System:
 Microplate 0 – 120% Antithrombin

Detection Limit:

System:
 Microplate: 5 % Antithrombin

Sensitivity:

System:
 Microplate mAbs / min per 1% Antithrombin activity : 7.9 / min

Determinations/kit

Microplate method: 200 Test Tube: 50

COAMATIC® Antithrombin - 82 1991 63

Verwendungszweck

Zur quantitativen Bestimmung der Heparin-Kofaktor-Aktivität von Antithrombin (AT) in menschlichem Citratplasma.

Grundlagen und Zusammenfassung

Antithrombin ist der wichtigste natürliche Inhibitor der Gerinnungskaskade. Durch Hemmung der Proteasen der Gerinnungskaskade (insbes. Thrombin, Faktor Xa und Faktor IXa) beugt Antithrombin einer unkontrollierten Gerinnung sowie Thrombosen vor.

Plasma wird mit einem Überschuss an Faktor Xa (FXa) in Anwesenheit von Heparin inkubiert. Die Bestimmung des restlichen FXa erfolgt anhand der Geschwindigkeit der Hydrolyse des chromogenen Substrats S-2765. Die bei 405 nm gemessene pNA-Freisetzung ist in einem Bereich von 0-120% Normalplasma-Aktivität umgekehrt proportional zur Antithrombin-Konzentration.¹

1. AT + Heparin → [AT · Heparin]
2. [AT · Heparin] + FXa ((Überschuß) → [AT · Heparin · FXa] + FXa (Rest)

FXa (Rest) → Peptid + pNA

Inhalt

1. **S-2765, 8 mg** Lyophilisiertes chromogenes Substrat N-α-Cbo-D-Arg-Gly-Arg-pNA·2HCl. **1 Flasche**
2. **Buffer with heparin, 25 mL** Tris-Puffer, pH 8,2, Ionenstärke 0,25. **1 Flasche**
3. **Factor Xa, 29 nkat** Lyophilisierter gereinigter boviner Faktor Xa und Rinderalbumin. **1 Flasche**

ACHTUNG: INFektionsRISIKO

Gefahrenklasse: **keine**
 Gefahrenhinweise: **keine**
 Sicherheitssätze: **keine**
 Dieses Produkt ist nur für die *in vitro* Diagnostik geeignet

Lösen der Reagenzien

Die Reagenzien werden entsprechend der spezifischen Geräteapplika-tionen rekonstituiert. Mikroplatten- und Manuelle-Methoden:

1. **Substrate S-2765:** mit 10,0 mL. Entionisiertes Wasser (0,22 mm filtriert oder Wasser CLSI Typ II)²
2. **Factor Xa:** mit 10,0 mL Puffer

Vorsichtig schwenken. Das Produkt muß vollständig rekonstituiert sein. 10-30 Minuten bei 15-25°C stehen lassen und vor Gebrauch vorsichtig mischen.

ANMERKUNG: Bei automatisierten Methoden sind unter Umständen andere Rekonstitutionsvolumina erforderlich. Reagenzien unterschiedlicher Chargen sind untereinander nicht austauschbar.

Lagerung und Haltbarkeit

Die verschlossenen Reagenzien sind bei 2-8°C bis zum aufgedruckten Verfalldatum haltbar.

1. **S-2765:** Haltbarkeit nach Rekonstitution: 6 Monate bei 2-8°C im Original-Behälter.
2. **Buffer:** Haltbarkeit nach Rekonstitution: 3 Monate bei 2-8°C im Original-Behälter.
3. **Factor Xa:** Haltbarkeit nach Rekonstitution: 3 Monate bei 2-8°C im Original-Behälter.

WARNHINWEIS: Nach Ablauf des auf dem Packungsetikett angegebenen Verfalldatums dürfen die Reagenzien nicht mehr verwendet werden. Substratlösung verwerten, falls sie gelblich verfärbt ist. Kontami-nation durch Mikroorganismen vermeiden.

Probenmaterial - Antikoaguliertes Plasma

9 Teile frisches, venöses Blut werden mit 1 Teil 0,1 mol/l Natriumcitrat gemischt und 10-20 Minuten mit 2000 x g bei 20- 25°C zentrifugieren. Weitere Informationen zu Gewinnung, Handhabung und Lagerung der Proben: siehe CLSI-Doku-ment H21-A5.⁵

Zusätzliche Reagenzien und Kontrollplasmen

1. Entionisiertes Wasser (0,22 mm filtriert oder Wasser CLSI Typ II)²
2. Kalibrationsplasma
3. Kontrollplasma Abnormal, Kontrollplasma Normal
4. Physiologische Kochsalzlösung (0,9% NaCl).
5. 20% Essigsäure oder 2% Zitronensäure (Endpunkt-Methode).

Zusätzlich benötigtes Material, nicht im Kit enthalten

- Spektrophotometer 405 nm (sowie 490 nm für die Mikroplatten-Technik)
- Mikroplatten* oder Halbmikroküvetten (1 cm)
- Zentrifuge (2000 x g)
- Inkubator 37°C ±+2°C
- Schüttler (Vortex)
- Stoppuhr
- Kalibrierte Pipetten
- Kunststoff-Teströhrchen

* ANMERKUNG: Keine zur Beschichtung vorgesehenen Mikrop latten verwenden!

Qualitätskontrolle

Zur Durchführung einer sachgemäßen Qualitätskontrolle empfiehlt sich die Verwendung von normalen und pathologischen Kontrollproben.³ Die angegebenen Werte der Kontrollen sollten auf Internationale Standards zurückzuführen sein. Jedes Labor sollte seinen eigenen Mittelwert mit Standardabweichung berechnen und ein Qualitätskontrollprogramm einführen, um das analytische Verfahren zu kontrollieren. In Übereinstimmung mit der "Good Laboratory Practice" (GLP) sollten Kontrollproben mindestens alle 8 Stunden getestet werden. Identifikation und Lösung von Problem Situationen: siehe Westgard et al.⁴

Ergebnisse

Die Ergebnisse der Bestimmung werden als Antithrombin-Aktivität ausgedrückt in [%].

Referenzbereiche

In einer normalen gesunden Population: 106±18% (2 Standardabweich-ungen, n=109, Männer=53, Frauen=56; Evaluation mit COAMATIC Antithrombin). Jedes Labor sollte einen eigenen Normalbereich erstellen.

Testdurchführung

Alle Bedingungen beigefügt in diesem Insert beziehen sich auf Mikroplatten- und Manuelle-Methode. Spezielle Automatenadaptionen sind auf Anfrage bei Chromogenix.

Kalibration

Durch Analyse von Kalibrationsplasma in unterschiedlichen Verdünnungen (0, 25, 50, 75 und 100% AT-Aktivität) erhält man eine Standardkurve. Eine Standardverdünnung mit 120% Aktivität erhält man durch Verdünnung von 25 µL Standard-Calibration plasma in 2500 µL Kochsalzlösung.

Der angegebene Wert des Kalibrationsplasmas sollte auf den Internationalen Standard zurückzuführen sein.

Verdünnung von Proben und Kontrollen

Verdünnung	25 µL
Physiologische Kochsalzlösung	3000 µL
Gut mischen	

Mikroplatten-Methode:

Proben/Kontrollen/Standards
 Faktor Xa
 Inkubation: 90 Sek. bei 37°C
 S-2765 (auf 37°C vorwärmen)
 50 µL
 50 µL
 A. Kinetische Methode: DE/Min. 30-90 Sek. messen
 B. Endpunkt-Methode:
 Inkubation: 90 Sek. bei 37°C
 20% Essigsäure oder 2% Zitronensäure
 50 µL
 Mischen

Falls, möglich, Extinktionen zusätzlich bei 490 nm messen und Werte entsprechend subtrahieren, um etwaige Einflüsse durch Materialunterschiede u. a. zu eliminieren.

Manuellen-Methode

Bei sämtlichen Pipettierschritten: 200 µl anstelle von 50 µl einsetzen.

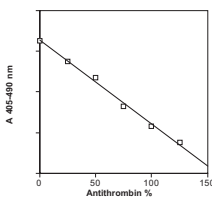
Ergebnisse

Extinktionsänderungen pro Minute (ΔE/Min.) oder Extinktionen (E) der Standardproben gegen die Antithrombin-Aktivitäten dieser Standardproben auf lineares graphisches Papier auftragen. Die Extinktionsänderungen (ΔE/Min) bzw. Extinktionen (E) werden auf der Y-Achse, die Antithrombin-Aktivität in [%] auf der X-Achse eingetragen.

DEUTSCH - Packungsbeilage Version 03/2015



Eine Gerade durch die Schnittpunkte ziehen. Man erhält eine Standardkurve, an der die Antithrombin-Aktivität der Proben abgelesen wird. Beispiel für eine typische Standardkurve (Mikroplatten-Methode):



Testeigenschaften

GRENZEN DES VERFAHRENS/INTERFERENZEN

Es sind keine medikamentösen Störfaktoren bekannt. Da die Analysenmethode auf der Inhibierung des Faktors Xa beruht, wird sie nicht durch Heparin-Kofaktor II, α₂-Makroglobulin oder α₁-Antitrypsin beeinflusst.^{6,7,8} Eine Kontaktaktivierung in den Plasmapro-ben kann zur Substrataktivität beitragen. Die Folge ist eine mögliche Unterschätzung des Antithrombin-Spiegels. Um die Validität des Assays zu verbessern, kann der in Abwesenheit von Faktor Xa erhaltene Wert vom Probenwert abgezogen werden. Bilirubin, Hämoglobin und lipämische Plasmaproben stören die Ermittlung der Extinktionen; in diesem Fall ist das Mitführen von Probenleerwerten erforderlich, wenn die Endpunkt-Methode durchgeführt wird.

Präzision:

Mikroti-ter-Methode	CV% (innerhalb der Testserie)	n	CV% (zwischen Testserien)	n
Mean (%AT)				
100	3.1	20	2.6	5
50	4.8	20	4.3	5

Correlation:

Der Assay wurde mit Coatest Antithrombin und Coacut Antithrombin R verglichen; getestet wurden Normalplasma-, Patientenplasma- sowie Mischungen aus Normal- und Mangel-plasmaproben.

System	Steigung	Ordinatenabschnitt	r	Referenzmethode	n
Mikroplatte	1.03	-2.6	0.97	Coatest	45
ACL	1.01	-1.6	0.96	Coatest	43
Mikroplatte	1.13	-7.5	0.99	Coacut	43
ACL	0.95	2.3	0.99	Coacut	43

Linearität:

System:
 Mikroplatte 0 – 120% Antithrombin

UNTERE NACHWEISGRENZE:

System:
 Mikroplatte: 5 % Antithrombin

Sensitivität:

System:
 Mikroplatte mAbs / min per 1% Antithrombin activity : 7.9 / min

Anzahl der Bestimmungen/Kit

Mikroplatten-Methode: 200 Manuelle-Methode: 50

COAMATIC® Antithrombin - 82 1991 63

Indicaciones de uso

Para la determinación cuantitativa de la actividad de la heparina como cofactor de la antitrombina III (AT) en plasma citrado humano.

Fundamento y resumen

La antitrombina es el inhibidor natural más importante de la cascada de coagulación. Al inhibir las proteasas de coagulación, en especial la trombina, el factor Xa y el factor IXa, la AT evita la coagulación no controlada y la trombosis.

El plasma se incuba con un exceso de factor Xa (FXa) en presencia de heparina. La cantidad residual de FXa se determina por la velocidad de hidrólisis del sustrato cromogénico S-2765. La liberación de pNA, determinada a 405 nm, es inversamente proporcional al nivel de AT en un rango del 0 al 120% de plasma normal.¹

1. AT + heparina → [AT · heparina]
2. [AT · heparina] + FXa (exceso) → [AT · heparina · FXa] + FXa (residual)

FXa (residual) → péptido + pNA

Composición

- El kit COAMATIC® Antithrombin consiste en:
1. **S-2765, 8 mg** Sustrato cromogénico liofilizado N-α-Cbo-D-Arg-Gly-Arg-pNA·2HCl. **1 vial**
 2. **Buffer with heparin, 25 mL** Tampón Tris, PH 8,2, fuerza iónica 0,25. **1 vial**
 3. **Factor Xa, 29 nkat** Factor Xa bovino purificado y liofilizado y albúmina bovina. **1 v**

CHROMOGENIX

COAMATIC® Antithrombin - 82 1991 63

Utilisation prévue des trousses

Dosage de l'activité cofacteur I héparine de l'antithrombine (AT) dans le plasma humain citraté.

Contexte et resume

L'antithrombine est le principal inhibiteur naturel de la cascade de la coagulation. En inhibant les protéases de la coagulation – notamment la thrombine, le facteur Xa et le facteur IXa – l'AT fait obstacle a coagulation sans frein et prévient la thrombose.

Le plasma est incubé avec un excès de facteur Xa (FXa) en présence d'héparine. La quantité résiduelle de FXa est déterminée par le taux d'hydrolyse du substrat chromogène S-2765. La libération de pNA mesurée à 405 nm est inversement proportionnelle au taux d'AT dans la fourchette de 0 à 120% du plasma normal.¹

AT + héparine → [AT - héparine]

[AT - héparine] + FXa (excès) → [AT - héparine · FXa] + FXa (résiduel)

FXa (résiduel) → peptide + pNA

Composition

La trousse COAMATIC® Antithrombin contient :

- | | |
|--|-----------------|
| 1. S-2765, 8 mg | 1 flacon |
| Substrat chromogène lyophilisé N-α-Cbo-D-Arg-Gly-Arg-pNA-2HCl. | |
| 2. Buffer with heparin, 25 mL | 1 flacon |
| Tampon Tris pH 8,2 – force ionique 0,25. | |
| 3. Factor Xa, 29 nkat | 1 flacon |
| Facteur Xa bovin purifié lyophilisé et albumine bovine. | |

ATTENTION:

Classe de danger: **Aucune**

Indications de danger: **Aucune**

Conseils de prudence: **Aucune**

Ces produits sont à usage diagnostic *in vitro*.

Préparation des réactifs

Les réactifs sont reconstitués selon les indications fournies dans les applications spécifiques de chaque instrument. Pour les techniques utilisant une microplaque ou un tube à essai:

- Substrate S-2765**: reconstituer avec 10,0 ml d'eau désionisée, ou eau CLSI type II.²
- Factor Xa**: reconstituer avec 10,0 ml de tampon.

Remettre les bouchons en place et agiter doucement par rotation. S'assurer que la reconstitution du produit est totale. Maintenir le réactif à 15–25°C pendant 10 à 30 minutes et retourner avant mise en oeuvre.

REMARQUE: Il se peut que d'autres volumes de reconstitution des réactifs s'appliquent dans le cas des méthodes automatiques. Les réactifs ne sont pas interchangeables entre lots.

Conditions de conservation et stabilité

Les réactifs en ampoule scellée sont stables à 2–8°C jusqu'à la date de péremption qui figure sur l'étiquette.

- S-2765**: Stabilité après reconstitution: 6 mois à 2–8°C dans le flacon d'origine.
 - Buffer**: Stabilité après ouverture: 3 mois à 2–8°C dans le flacon d'origine.
 - Factor Xa**: Stabilité après reconstitution: 3 mois à 2–8°C dans le flacon d'origine.
- MISE EN GARDE: Ne pas utiliser les réactifs au-delà de la date de péremption figurant sur l'étiquette. Jeter la solution de substrat si elle présente une coloration jaune. Eviter la contamination par des microorganismes des les réactifs.

Recueil des échantillons

Neuf volumes de sang veineux fraîchement prélevé sont recueillis dans un volume de citrate trisodique.

Centrifugation: 2000 x g pendant 10 à 20 minutes à 20–25°C. Pour des instructions complémentaires concernant le recueil, la manipulation et la conservation des échantillons, se reporter au document H21-A5 CLSI.⁵

Réactifs nécessaires mais non fournis

- Eau désionisée, filtrée sur filtre de 0,22 mm, ou eau CLSI type II.²
- Plasma calibrant étalonné par rapport à un standard international.
- Témoins normaux et anormaux
- De l'eau physiologique (NaCl à 0,9%).
- Acide acétique à 20% ou acide citrique à 2% (méthode en point final).

COAMATIC® Antithrombin - 82 1991 63

Uso

Per la determinazione quantitativa dell'attività del cofattore eparinico dell' Antitrombina (AT) nel plasma umano citrato.

Introduzione e principio del metodo

L'antitrombina è il più importante inibitore naturale della cascata coagulativa. Inibendo le proteasi della coagulazione, specialmente la trombina, il fattore Xa ed il fattore IXa, la AT previene la coagulazione incontrollata e quindi la trombosi.

Il plasma viene incubato con un eccesso di fattore Xa (FXa) in presenza di eparina. La quantità residua di FXa viene determinata dalla velocità di idrolisi del substrato cromogeno S-2765. Il rilascio di pNA misurato a 405 nm è inversamente proporzionale al livello di AT.¹

AT + eparina → [AT · eparina]

[AT · eparina] + FXa (eccesso) → [AT · eparina · FXa] + FXa (residuo)

FXa (residuo) → Peptide + pNA

Composizione

Il kit COAMATIC Antithrombin contiene :

- | | |
|--|---------------|
| 1. S-2765, 8 mg | 1 vial |
| Substrato cromogeno liofilizzato N-α-Cbo-D-Arg-Gly-Arg-pNA-2HCl. | |
| 2. Buffer with heparin, 25 mL | 1 vial |
| Tampone Tris, pH 8,2 forza ionica 0,25. | |
| 3. Factor Xa, 29 nkat | 1 vial |
| Fattore Xa bovino purificato e liofilizzato, e albumina bovina. | |

Avvertenze:

Classe di pericolo: **nessuno**

Indicazionii di pericolo: **nessuno**

Consigli di prudenzas: **nessuno**

Per l'impiego diagnostico *in vitro*.

Preparazione

I reagenti vengono ricostituiti in accordo alle specifiche applicazioni strumentali. Per metodo in micropiastra e in provetta:

- Substrate S-2765**: ricostituire con 10 mL di acqua CLSI Tipo II water o equivalente. ²
- Factor Xa**: ricostituire con 10 mL di tampone con eparina.

Tappare e agitare leggermente.Assicurarsi che il prodotto sia completamente ricostituito. Mantenere i reagenti a 15-25°C per 10-30 min. e capovolgere prima dell'uso.

NOTA: Per i metodi automatici i volumi di ricostituzione dei reagenti possono essere diversi. Diversi lotti di reagenti non sono intercambiabili.

Condizioni di conservazione e stabilità

I reagenti, se non aperti, sono stabili a 2-8°C fino alla data di scadenza stampata sull'etichetta.

- S-2765**: S tabilità dopo ricostituzione: 6 mesi a 2-8°C se conservato nella fiala originale.
 - Buffer**: Stabilità dopo apertura della fiala: 3 mesi a 2-8°C se mantenuto nella fiala originale.
 - Factor Xa**: Stabilità dopo ricostituzione: 3 mesi a 2-8°C nella fiala originale.
- ATTENZIONE: Non usare i reagenti dopo la data di scadenza stampata sull' etichetta. Non usare la soluzione di substrato se appare gialla. Evitare la contaminazione da microorganismi.

Raccolta dei campioni

Nove volumi di sangue venoso appena prelevato vengono mescolati con 1 parte di citrato trisodico. Centrifugare a 2000 x g per 10-20 minuti a 20-25°C. Riferirsi al documento CLSI H21-A5 per ulteriori istruzioni sulla raccolta, il trattamento e la conservazione di campioni.⁵

Reagenti necessari ma non forniti

- Acqua deionizzata filtrata con filtro da 0,22 mm o CLSI tipo II.²
- Plasma umano di calibrazione calibrato contro uno Standard Internazionale.
- Plasma di controllo Normale a Patologico
- Soluzione fisiologica (0,9% NaCl)
- Acido acetico 20% o acido citrico 2% (metodi di end point).

COAMATIC® Antithrombin - 82 1991 63

PORTUGUÊS - Revisão do folheto 03/2015

Para a revisão actual deste folheto informativo em Português, contacte o representante da Chromogenix da sua área.

PRECAUÇÕES E ADVERTÊNCIAS:

Classe de perigo: **nenhuma**

Advertências de perigo: **nenhuma**

Recomendações de prudência: **nenhuma**

Este reagente destina-se a utilização em diagnóstico *in vitro*.

Matériel nécessaire mais non fourni

- Spectrophotomètre à 405 nm (et 490 nm pour la procédure sur microplaque)
- Microplaques* ou semi-micro cuvettes (1 cm)
- Centrifugeuse à 2000 x g
- Incubateur à 37°C ±0,2°C
- Agitateur
- Pipettes jaugées
- Tubes à essai en plastique

*REMARQUE: Ne pas utiliser de microplaques pour faire du coating!

Contrôle de qualité

Le recours à des témoins normaux et anormaux est recommandé en vue d'un programme complet de contrôle de qualité.³ Les valeurs assignées des contrôles doivent suivre l'étalon international. Il appartient à chaque laboratoire d'établir sa propre moyenne et son propre écart type, ainsi que de mettre sur pied un programme de contrôle de qualité des tests de laboratoire. Les témoins doivent être analysés toutes les 8 h au minimum, conformément aux BPL. On se reportera à Westgard et coll⁴ pour l'identification et la résolution des situations non maîtrisables.

Resultats

Les résultats de l'antithrombine sont indiqués en activité (%).

Valeurs

106% ± 18% (2 écarts types; n=109; M =53, F=56) parmi une population saine normale évaluée au moyen du Coamatic Antithrombin.

Compte tenu des nombreuses variables susceptibles d'avoir une répercussion sur les résultats, il appartient à chaque laboratoire d'établir ses propres valeurs de référence.

Procédures

Toutes les conditions contenues dans la brochure annexée à la confection se rapportent à la Méthode en microplaque.

Des adaptations détaillées, pour de nombreux automates avec les consignes de préparation des, sont disponibles chez CHROMOGENIX et leurs distributeurs sur simple demande.

Étalonnage

Une courbe standard est obtenue en analysant différentes dilutions en eau physiologique de plasma calibrant , étalonné par rapport à un standard international, pour obtenir des taux d'antithrombine de 0, 25, 50, 75 et 100%. Un standard de 120% peut être préparé en diluant 25 µL de plasma avec 2500 µL de eau physiologique.

Dilution des échantillons et des témoins:

Echantillons/témoins/standards

25 µL
3000 µL

Eau physiologique

50 µL
50 µL

Bien mélanger

50 µL

Méthode en microplaque:

Echantilons/témoins/standards dilués

50 µL
50 µL

Facteur Xa

50 µL

Incuber à 37°C pendant 90 secondes.

S-2765 (préchauffer à 37°C)

A. Méthode cinétique: lire DA/mn à 405 nm pendant 30–90 secondes.

B. Méthode en point final: procéder comme décrit ci-dessous.

Incuber à 37°C pendant 90 secondes.

Acide acétique à 20% ou acide citrique à 2%

50 µL

Mélanger

Lire l'absorbance par rapport à l'eau à 405 nm. Si possible, lire et soustraire l'absorbance à 480 nm afin de compenser les interférences dues à la microplaque.

Méthode en tube:

Utiliser 200 µl au lieu de 50 µl pour toutes les étapes de pipetage.

Materiale necessario ma non incluso nel kit

- Spettrofotometro, 405 nm, (e 490 nm per procedimento su micropiastra)
- Micropiastra o cuvette semi-micro (1 cm)
- Centrifuga, 2000 x g
- Termostato a 37°C ±0,2°C
- Miscelatore Vortex
- Contasecondi
- Pipette calibrate
- Provette in plastica

NOTA: Non utilizzare micropiastre per coating!

Controllo di qualità

Per un programma completo di controllo di qualità si raccomanda diusare controlli normali e anormali.³ I valori assegnati per i controlli utilizzati dovrebbero essere riferiti ad uno Standard Internazionale. Ogni laboratorio deve stabilire i propri valori di media e deviazione standard e istituire anche un programma di controllo di qualità per il monitoraggio dei test di laboratorio. I controlli vanno analizzati almeno ogni otto ore secondo le buone pratiche di laboratorio. Riferirsi a Westgard et al per identificare e risolvere eventuali situazioni fuori controllo.⁴

Risultati

I risultati di Antithrombina sono riportati in attività (%).

Valori di Riferimento

106 ±18% (2 DS, n=109; M=53 F=56) in una popolazione normale in buona salute testata con Coamatic Antithrombin. Dato che molti fattori possono influenzare i risultati, ogni laboratorio dovrebbe stabilire i proprio intervallo di valori normali.

Procedura

Tutte le condizioni riportate in questo inserto sono riferite al metodo in micropiastra. Applicazioni e volumi di ricostituzione dei reagenti per una vasta gamma di strumenti sono disponibili su richiesta da Chromogenix.

Calibrazione

La curva standard viene effettuata analizzando differenti diluizioni di plasma normale di calibrazionr calibrato contro Standard Internazionale, in soluzione fisiologica per ottenere livelli di antitrombina di 0, 25, 50, 75, e 100%. Lo standard di 120% viene preparato diluendo 25 µL di plasma con 2500 µL di soluzione fisiologica.

Per tecniche in micropiastra e provetta:

Diluzione dei campioni e dei controlli

Campioni/controlli/standard

25 µL
3000 µL

Soluzione fisiologica

50 µL
50 µL

Miscelar bene

50 µL

Metodo in micropiastra

Campioni/controlli/standard diluiti

50 µL
50 µL

Fattore Xa

50 µL

Incubare a 37°C per 90 sec

S-2765 (pre-riscaldato a 37°C)

A. Metodo cinetico: leggere il DA/min a 405 nm per 30-90 sec.

B. Metodo end-point: procedere come segue:

Incubare a 37°C per 90 sec.

Acido acetico al 20% o acido citrico al 2%

50 µL

Miscelar

Leggere l'assorbanza contro acqua a 405 nm. Se possibile, leggere e sottrarre l'assorbanza a 490 nm per compensare le differenze esistenti nel materiale dei pozzetti delle micropiastre.

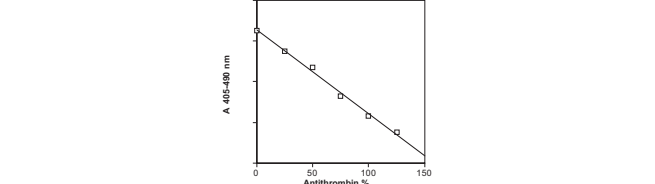
Metodo in provetta

Usare 200 µL invece di 50 µL in tutte le fasi di pipettamento.

FRANÇAIS - Révision de la notice 03/2015

Calcul

Sur une feuille de papier millimétré, tracer la droite d'étalonnage ΔA/ minutes en fonction du % en AT pour la méthode cinétique. Pour la méthode en point final, tracer la droite étalon avec l'absorbance en ordonnée et le % en AT en abscisse. Relier les points standard par la droite la mieux ajustée. Les échantillons sont évalués sur la base de cette courbe standard. Un exemple de courbe standard type (méthode sur microplaque) est présenté ci-dessous.



Caracteristiques et performances

LIMITES / FACTEURS INTERFERENTS

Aucune interférence médicamenteuse n'a été signalée. Du fait que la méthode repose sur l'inhibition du facteur Xa, il n'y a pas d'influence du cofacteur II de l'héparine, de l'α₂-macroglobuline ou de l'α₁-antitrypsine.^{5,7,8} Dans les plasmas où s'est produite une activation de contact, ceci risque de contribuer à l'activité du substrat, entraînant une possibilité de sous-estimation du taux d'antithrombine. En vue d'améliorer la validité du dosage, on peut soustraire de la valeur de l'échantillon celle obtenue en l'absence de facteur Xa. La bilirubine, l'hémoglobine et le plasma de patients hyperlipidémiques interfèrent au niveau de la densité optique. Il est nécessaire dans ces cas de réaliser des blanc individuels lors de la mise en oeuvre de méthodes eu point final.

Precision:

Méthode sur microplaque	CV% (Intra-journalier)	n	CV% (Inter-journalier)	n
Moyenne (%AT)				
100	3.1	20	2.6	5
50	4.8	20	4.3	5

Corrélation:

Le dosage a été comparé aux coffrets Coatest Antithrombin et Coacute Antithrombin R en utilisant des plasmas normaux, des plasmas de patients et des mélanges de plasmas normaux et déficitaires:

Appareils	Pente	Ordonnée a l'origine	r	Méthode de référence	n
Microplaque	1.03	-2.6	0.97	Coatest	45
ACL	1.01	-1.6	0.96	Coatest	43
Microplaque	1.13	-7.5	0.99	Coacute	43
ACL	0.95	2.3	0.99	Coacute	43

Linéarité:

Appareil

Microplaque	0 – 120% Antithrombine
-------------	------------------------

LIMITE DE DETECTION

Appareil

Microplaque:	5 % Antithrombine
--------------	----------------------------------

Appareils

ACL Futura	mAbs / min per 1% de activité de l'Antithrombine: 8.22 / min
------------	--

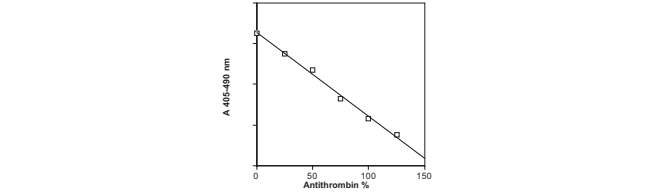
Nombre de dosages par trousses

Méthode en microplaque: 200	Méthode en tube à: 50
-----------------------------	-----------------------

ITALIANO - Revisione dell'inserto 03/2015

Calcoli

Riportare su carta da grafico lineare la variazione nell'assorbanza per minuto (ΔA/min) o l'assorbanza (A) degli standard rispetto alla loro attività antitrombinica. Riportare ΔA/min o A sull'asse Y ed il % di antitrombina sull'asse X.Tracciare una linea retta con i punti ottenuti. I campioni vanno determinati sulla base di questa curva standard. Un esempio di una tipica curva standard secondo il metodo della micropiastra è mostrato qui sotto.



Caratteristiche del metodo

Limitazioni/ Sostanze interferenti

Non sono state riportate interferenze da farmaci. Poiché il metodo è basato sull'inibizione del fattore Xa non si hanno interferenze da parte del cofattore II eparinico, dell' α₂-macroglobulina o α₁-antitripsina.^{5,7,8} Nei campioni di plasma in cui si sia verificata attivazione da contatto, ci si può attendere un contributo all' attività del substrato. Ciò potrebbe risultare in una sottostima del livello antitrombinico. Onde migliorare la validità dei test, il valore ottenuto in assenza di fattore Xa può essere sottratto dal valore del campione. La bilirubina, l'emoglobina e i lipidi interferiscono con la lettura dell'assorbanza. In questi casi è necessario eseguire un bianco campione se viene utilizzato il metodo "end point".

Precisione:

Metodo micropiastra	CV% (Intra-serie)	n	CV% (Inter-serie)	n
Media (%AT)				
100	3.1	20	2.6	5
50	4.8	20	4.3	5

Correlazione:

Il metodo è stato paragonato con il Coatest Antithrombin ed il Coacute Antithrombin R usando plasma normali , plasma di pazienti e miscele di plasma normali e carenti.

Sistema	Pendenza	Intercetta	r	Metodo riferimento	n
Microplate	1.03	-2.6	0.97	Coatest	45
ACL	1.01	-1.6	0.96	Coatest	43
Microplate	1.13	-7.5	0.99	Coacute	43
ACL	0.95	2.3	0.99	Coacute	43

COAMATIC® Antithrombin - 82 1991 63

Printed Insert Sheet: 302078
Revision: R4
Issued: 03/2015
C.O.: 452836

LANGUAGES

ENGLISH
DEUTSCH
ESPAÑOL
FRANÇAIS
ITALIANO
PORTUGÊS

TECHNICAL SPECS

PAPER: White paper, 50-60 g/m² weight.
SIZE: 11 x 17" (280 x 432 mm.).
PRINT: Front/Back.

PRINT COLOR: Top rule Orange Pantone 137, all
remaining type in black
Back - All type in black.