

Quantitative determination of Antithrombin III (ATHROM-III) IVD

Store 2 - 8°C.

INTENDED USE

The ATHROM-III is a quantitative turbidimetric test for the measurement of antithrombin III in human serum or plasma.

PRINCIPLE OF THE METHOD

Anti-antithrombin III antibodies when mixed with samples containing antithrombin-III, form insoluble complexes. These complexes cause an absorbance change, dependent upon the antithrombin-III concentration of the patient sample, that can be quantified by comparison from a calibrator of known antithrombin-III concentration.

CLINICAL SIGNIFICANCE

Antithrombin III is a protein synthesized in the liver, normally present in the human plasma. It is the major inhibitor of the thrombin, and inhibits coagulation and limits the forming of blood clots. Antithrombin-III is also capable of activating other components of the coagulation cascade (eg, factor Xa), as well as plasmin. Antithrombin-III deficiency can cause or lead to thrombosis, a clot forming in a blood vessel. Clots forming in the legs and pulmonary embolism are most commonly reported. Antithrombin-III deficiency is usually inherited and affects males and females equally. All family members should be tested if there is history of the disease.

Acquired antithrombin-III deficiency can occur as a result of other conditions. It has been reported in patients with liver diseases, patients receiving certain kinds of chemotherapy, and patients using oral contraceptives.

REAGENTS

Diluent (R1)	Tris buffer 20 mmol/L, PEG 8000, pH 8.3 Sodium azide 0.95 g/L.
Antibody (R2)	Goat serum, anti-human antithrombin III, pH 7.5. Sodium azide 0.95 g/L.
Optional	Ref: 1102003 PROT CAL.

CALIBRATION

It must be used the PROT CAL to calibrate the reagent. The reagent (both monoreagent and bireagent) should be recalibrated every week, when the controls are out of specifications, and when changing the reagent lot or the instrument settings.

PREPARATION

Reagents: Ready to use.

Calibration Curve: Prepare the following PROT CAL dilutions in C1Na 9 g/L as diluent. Multiply the concentration of the ATHROM-III calibrator by the corresponding factor stated in table below to obtain the antithrombin-III concentration of each dilution.

Calibrator dilution	1	2	3	4	5	6
Calibrator (µL)	--	10	25	50	75	100
NaCl 9 g/L (µL)	100	90	75	50	25	-
Factor	0	0.1	0.25	0.5	0.75	1.0

STORAGE AND STABILITY

All the components of the kit are stable until the expiration date on the label when stored tightly closed at 2-8°C and contaminations are prevented during their use. Do not use reagents over the expiration date.

Reagent deterioration: The presence of particles and turbidity.

Do not freeze; frozen Antibody or Diluent could change the functionality of the test.

ADDITIONAL EQUIPMENT

- Thermostatic bath at 37°C.
- Spectrophotometer or photometer thermostatable at 37°C with a 340 nm filter (320 - 360 nm).

SAMPLES

Fresh serum or plasma. Sodium citrate should be used as anticoagulant. Stable 7 days at 2-8°C or 3 months at -20°C.

Do not use highly hemolyzed or lipemic samples.

PROCEDURE

1. Bring the reagents and the photometer (cuvette holder) to 37°C.
2. Assay conditions:

Wavelength : 340 nm
Temperature : 37 °C
Cuvette lighth path : 1cm

3. Adjust the instrument to zero with distilled water.

4. Pipette into a cuvette:

Reagent R1 (µL)	800
Sample or Calibrator (µL)	20

5. Mix and read the absorbance (A₁) after the sample addition.
6. Immediately, pipette into de cuvette:

Reagent R2 (µL)	200
-----------------	-----

7. Mix and read the absorbance (A₂) of calibrators and sample exactly 5 minutes after the R2 addition.

Spinreact has instruction sheets for several automatic analyzers. Instructions for many of them are available on request.

CALCULATIONS

Calculate the absorbance difference (A₂-A₁) of each point of the calibration curve and plot the values obtained against the antithrombin-III concentration of each calibrator dilution. Antithrombin-III concentration in the sample is calculated by interpolation of its (A₂-A₁) in the calibration curve.

QUALITY CONTROL

Control sera are recommended to monitor the performance of manual and automated assay procedures. Spinreact PROT CONTROL (Ref.:1102004) is available. Each laboratory should establish its own Quality Control scheme and corrective actions if controls do not meet the acceptable tolerances.

REFERENCE VALUES

Between 17 - 30 mg/dL. Each laboratory should establish its own reference range.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

1. **Measurement range:** Up to 70 mg/dL (Nota 1), under the described assay conditions. Samples with higher concentrations, should be diluted 1/5 in NaCl 9 g/L and retested again. The linearity limit depends on the sample / reagent ratio. It will be higher by decreasing the sample volume, although the sensitivity of the test will be proportionally decreased.
2. **Limit detection:** Values less than 7.4 mg/dL give non-reproducible results.
3. **Prozone effect:** No prozone effect was detected upon 200 mg/dL.
4. **Sensitivity:** Δ 7.5 mA / mg/dL.
5. **Precision:** The reagent has been tested for 20 days, using two levels of serum in a EP5-based study.

EP5	CV (%)	
	17.85 mg/dl	35.93 mg/dl
Total	3.2%	3.5%
Within Run	0.8%	1%
Between Run	2.4%	2.4%
Between Day	2%	2.3%

6. **Accuracy:** Results obtained using this reagent did not show systematic differences when compared with reference reagents. Details of the comparison experiments are available on request.

The results of the performance characteristics depend on the used analyzer.

INTERFERENCES^{5,6}

Bilirubin (up to 25 mg/dL) does not interfere. Rheumatoid factors (≥ 200 IU/mL) and lipemia (≥ 6 g/L), and hemoglobin (≥ 9 g/L), interfere. Other substances may interfere^{5,6}.

NOTES

1. Linearity depends on the calibrator concentration.
2. Clinical diagnosis should not be made on findings of a single test result, but should integrate both clinical and laboratory data.

BIBLIOGRAPHY

1. Clinical Guide to Laboratory Tests, Edited by NW Tietz W B Saunders Co., Philadelphia, 483, 1983.
2. Pesce AJ and Kaplan, LA. Methods in Clinical Chemistry. The CV Mosby Company, St. Louis MO, 1987.
3. Buller HR et al. Critical care Medicine 1982; 10: 311.
4. Kauffman et al. Am J Med 1978; 65: 607.
5. Young DS. Effects of drugs on clinical laboratory tests, 4th ed. AACC Pres, 1995.
6. Friedman and Young. Effects of disease on clinical laboratory tests, 3th ed. AACC Pres, 1997.

PACKAGING

Ref.: 1102016	Cont.	R1. Diluent: 1 x 40 mL R2. Antibody: 1 x 10 mL
---------------	-------	---



Determinación cuantitativa de Antitrombina III (ATHROM-III) IVD

Conservar a 2 - 8°C.

USO RECOMENDADO

Ensayo turbidimétrico para la cuantificación de antitrombina III en suero o plasma humano.

PRINCIPIO DEL METODO

Los anticuerpos antitrombina III forman compuestos insolubles cuando se combinan con la antitrombina III de la muestra del paciente, ocasionando un cambio de absorbancia proporcional a la concentración de antitrombina III en la muestra, y que puede ser cuantificada por comparación con un calibrador de antitrombina III de concentración conocida.

SIGNIFICADO CLINICO

La antitrombina III es una proteína sintetizada en el hígado, normalmente presente en el plasma humano. Es el inhibidor más importante de la trombina, e inhibe la coagulación y limita la formación de coágulos sanguíneos. La antitrombina III activa otros componentes de la cascada de coagulación (ej. factor Xa), así como la plasmina.

El déficit de antitrombina III puede causar o conducir a la trombosis, la formación de coágulos en los vasos sanguíneos. Los coágulos que se forman en las extremidades inferiores y el embolismo pulmonar son ejemplos típicos. La deficiencia de antitrombina III es normalmente hereditaria y afecta tanto a hombres como mujeres. Todos los miembros de una misma familia afectada por esta enfermedad deberían controlarse.

La deficiencia de antitrombina III adquirida puede aparecer como resultado de otras condiciones tales enfermedades hepáticas, tratamientos de quimioterapia, o el uso de contraceptivos orales.

REACTIVOS

Diluyente (R1)	Tampón tris 20 mmol/L, PEG 8000, pH, 8,3. Azida sódica 0,95 g/L.
Anticuerpo (R2)	Suero de cabra, anti-antitrombina III humana, pH 7,5. Azida sódica 0,95 g/L.
Opcional:	Ref: 1102003PROT CAL.

CALIBRACION

Debe utilizarse el PROT CAL para la Calibración. El reactivo (tanto monoreactivo como bireactivo) se debe recalibrar cada semana, cuando los controles están fuera de especificaciones, y cuando el lote de reactivo o la configuración del instrumento cambia.

PREPARACION

Reactivos: Listos para el uso.

Curva de Calibración: Preparar las siguientes diluciones del PROT CAL en CINA 9 g/L como diluyente. Para obtener las concentraciones de cada dilución de antitrombina III, multiplicar la concentración de antitrombina III del calibrador por el factor correspondiente indicado en la tabla:

Dilución calibrador	1	2	3	4	5	6
Calibrador (µL)	--	10	25	50	75	100
CINA 9 g/L (µL)	100	90	75	50	25	-
Factor	0	0.1	0,25	0,5	0,75	1,0

CONSERVACION Y ESTABILIDAD

Todos los componentes del kit son estables hasta la fecha de caducidad cuando se mantienen los viales bien cerrados a 2-8°C, y se evita la contaminación durante su uso. No utilizar reactivos que hayan sobrepasado la fecha de caducidad.

Indicadores de deterioro: La presencia de partículas y turbidez.

No congelar; la congelación del Anticuerpo o Diluyente puede afectar la funcionalidad de los mismos.

MATERIAL ADICIONAL

- Baño de agua a 37°C.

- Espectrofotómetro o fotómetro con cubeta termostatable a 37°C para lecturas a 340 nm (320-360 nm).

MUESTRAS

Suero o plasma fresco, recogido con citrato sódico como anticoagulantes. Estable 7 días a 2-8°C o 3 meses a -20°C.

No utilizar muestras altamente hemolizadas o lipémicas.

PROCEDIMIENTO

- Calentar los reactivos y el fotómetro (portacubetas) a 37°C.
- Condiciones del ensayo:
 - Longitud de onda: 340 nm
 - Temperatura: 37°C
 - Paso de luz de la cubeta: 1 cm
- Ajustar el espectrofotómetro a cero frente a agua destilada.
- Pipetear en una cubeta:

Reactivo R1 (µL)	800
Muestra o Calibrador (µL)	20

- Mezclar y leer la absorbancia (A_1) después de la adición de la muestra.
- Inmediatamente después, pipetear en la cubeta:

Reactivo R2 (µL)	200
------------------	-----

- Mezclar y leer la absorbancia (A_2) exactamente después de 5 minutos de añadir el reactivo R2.

Spinreact dispone de adaptaciones detalladas a la mayoría de analizadores automáticos del mercado. Solicite la información a su distribuidor.

CALCULOS

Calcular la diferencia de absorbancias ($A_2 - A_1$) obtenidas para los distintos calibradores, y construir la curva de calibración de los valores obtenidos frente a las concentraciones de antitrombina III de cada dilución del Calibrador. La concentración de antitrombina III en la muestra se calcula por interpolación de su diferencia ($A_2 - A_1$) en la curva de calibración.

CONTROL DE CALIDAD

Se recomienda utilizar sueros control para controlar los ensayos tanto en procedimiento manual como en automático. Spinreact dispone del PROT CONTROL Ref: 1102004.

Cada laboratorio debería establecer su propio Control de Calidad y establecer correcciones en el caso de que los controles no cumplan con las tolerancias exigidas.

VALORES DE REFERENCIA

Entre 17 - 30 mg/dL. Es recomendable que cada laboratorio establezca sus propios valores de referencia.

CARACTERISTICAS DEL METODO

- Rango de medida:** hasta 70 mg/dL en las condiciones descritas del ensayo. Las muestras con valores superiores deben diluirse 1/5 con CINA 9 g/L y ensayarse de nuevo. El intervalo de medida depende de la relación muestra/reactivo. Disminuyendo el volumen de muestra, se aumenta el límite superior del intervalo de medida, aunque se reduce la sensibilidad.
- Límite de detección:** valores por debajo de 7,4 mg/dL dan lugar a resultados poco reproducibles.
- Sensibilidad:** 7,5 mA / mg/dL.
- Efecto prozona:** No se observa hasta valores de 200 mg/dL.
- Precisión:** El reactivo ha sido probado durante 20 días con dos niveles diferentes de suero en un estudio basado en las normas EP5 (NCCLS).

EP5	CV (%)	
	17.85 mg/dl	35.93 mg/dl
Total	3.2%	3.5%
Within Run	0.8%	1%
Between Run	2.4%	2.4%
Between Day	2%	2.3%

- Exactitud:** El comportamiento de este método fue comparado con reactivos de referencia. Los resultados obtenidos no muestran diferencias significativas. Los detalles del estudio están disponibles bajo solicitud.

Las características del método pueden variar según el analizador utilizado.

INTERFERENCIAS

Bilirrubina (hasta 25 mg/dL), no interfiere. La hemoglobina (≥ 9 g/L), lípidos (≥ 6 g/L) y factores reumatoideos (≥ 200 UI/mL), interfieren. Otras sustancias pueden interferir^{5,6}.

NOTAS

- El diagnóstico clínico no debe realizarse únicamente con los resultados de un único ensayo, sino que debe considerarse al mismo tiempo los datos clínicos del paciente.

BIBLIOGRAFIA

- Clinical Guide to Laboratory Tests, Edited by NW Tietz W B Saunders Co., Philadelphia, 483, 1983.
- Pesce AJ and Kaplan, LA. Methods in Clinical Chemistry. The CV Mosby Company, St. Louis MO, 1987.
- Buller HR et al. Critical care Medicine 1982; 10: 311.
- Kauffman et al. Am J Med 1978; 65: 607.
- Young DS. Effects of drugs on clinical laboratory tests, 4th ed. AACC Pres, 1995.
- Friedman and Young. Effects of disease on clinical laboratory tests, 3th ed. AACC Pres, 1997.

PRESENTACION

Ref.: 1102016	Cont.	R1. Diluyente: 1 x 40 mL
		R2. Anticuerpo: 1 x 10 mL