

Chrom-Z ATIII (anti Xa)

Instructions For Use

REF 5502, 5507

Kit CHROM-Z AT-III (anti-Xa)

Fiche technique

CHROM-Z AT-III (Anti-Xa) Kit

Anleitung

Kit CHROM-Z AT-III (anti-Xa)

Istruzioni per l'uso

Kit CHROM-Z AT-III (anti Xa)

Instrucciones de uso

Contents

English	1
Français	6
Deutsch	11
Italiano	16
Español	21



INTENDED PURPOSE

The Helena BioSciences CHROM-Z AT-III (anti-Xa) kit is intended for the quantitative determination of antithrombin III (AT-III) activity in human citrated plasma by chromogenic assay. 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 thrombosis¹⁻³. Deficiencies may occur in liver disease, disseminated intravascular coagulation (DIC), septicemia, pulmonary embolism, nephrotic syndrome, stroke, and thrombophlebitis⁴.

Most functional assays for AT-III rely on the ability of plasma to inactivate thrombin in the presence of heparin, such as the assay described by Odegard *et al.*⁴. 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 interference due to heparin cofactor II⁵ which does not inhibit factor Xa⁶.

In the present two-stage 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 (stage 1), residual factor Xa is determined with a factor Xa-specific chromogenic substrate (stage 2). The residual factor Xa activity is inversely proportional to the AT-III concentration.

WARNINGS AND PRECAUTIONS

The reagents contained in this kit are for in-vitro diagnostic use only - **DO NOT INGEST**. Wear gloves when handling all kit components. Refer to the product safety data sheets for risk and safety phrases and disposal information. Plasma products have been screened and found negative (unless otherwise stated on the kit box or vial) for the presence of Hepatitis B Antigen (HbsAg) HIV 1 and 2 antibody and HCV antibody, however they should be handled with the same precautions as a human plasma sample.

Some components of this kit contain sodium azide as a preservative. To prevent the build-up of potentially explosive metallic azides in metal plumbing, flush sinks with copious amounts of water and decontaminate regularly with sodium hydroxide solution.

COMPOSITION**1. Factor Xa Reagent**

Contains freeze-dried bovine factor Xa. Reconstitute each vial with 3x10ml (5502) or 5x2ml (5507) of distilled / deionised water. Allow to stand for 10 minutes and mix well before use.

2. Factor Xa Substrate

Contains freeze-dried CH₃OCO-D-CHA-Gly-Arg-pNA•AcOH. Reconstitute each vial with 3x10ml (5502) or 5x2ml (5507) of distilled / deionised water. Allow to stand for 10 minutes and mix well before use.

3. Sample Diluent:

Contains 4x10ml (5502) or 5x3ml (5507) 5x buffer concentrate with sodium azide at 0.1% 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. Dilute 1 +4 with distilled/deionised water and mix well.

4. Other Kit Components

Each kit contains instructions for use.

STORAGE AND SHELF-LIFE

1. Factor Xa Reagent

Unopened vials are stable until the expiry date indicated on the label. Reconstituted reagent is stable for 2 months at 2...6°C, 1 month at 17°C or 2 days at 37°C. AC-4 POS 32 @ 15°C = 48hrs

2. Factor Xa Substrate

Unopened vials are stable until the expiry date indicated on the label. Reconstituted reagent is stable for 2 months at 2...6°C, 1 month at 17°C or 7 days at 37°C. AC-4 POS 28 @ 37°C = 48hrs.

3. Sample Diluent:

Unopened vials are stable until the expiry date indicated on the label. Store diluted buffer in a tightly stoppered bottle at 2...6°C and use within one month.

ITEMS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

(Depending on Assay Method Used):

Cat. No. 5185 SARP

Glacial acetic acid

Coagulation instrument or spectrophotometer operable at 405nm

37°C water bath or dry bath

Laboratory timer

SPECIMEN 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 2000xg - 3000xg for 15 minutes. Plasma should be kept at 2...6°C. Testing should be completed within 2 hours of sample collection, or plasma can be stored frozen at -20°C for 2 weeks or -70°C for one month. Thaw quickly at 37°C prior to testing. DO NOT keep at 37°C for more than 5 minutes.

STEP BY STEP PROCEDURE

Preparation of Standard, Control and Patient Dilutions

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

Automated Methods, AC-4. (5502 x 400 samples, 5507 x 133 samples)

Refer to the appropriate AC-4 Operators Manual for detailed instructions.

Prepare all reagents as instructed under 'composition'

START=9s	METHOD=Chrom	MIX=0	PATIENT (Pat) vol=4µL pos=35 (CP)	Def. Plasma (DP) Vol=0µL
INCUB=30s	MATH=lin	CLEAN=Y	BUFFER (BUF) Vol=356µL Pos=40	R1(Factor Xa) Vol=75µL Pos=32
RUNTIME=90s	SENS=0	T-CORR=0 S-CORR=0	CLEAR (CLR) Vol=285µL	R2(Substrate) Vol=75µL Pos=28

Semi-Micro Endpoint Method

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

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

1. 200µl acetic acid,
2. 200µl standard dilution,
3. 200µl Factor Xa Reagent,
4. 200µl Factor Xa Substrate,
5. * 200µl water (optional).

* Some spectrophotometers require a minimum of 1ml 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. As many as ten determinations can be performed simultaneously with the same stop watch by staggering pipetting steps at five second intervals.

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:

1. Add 200µl diluted standard or patient plasma.
2. Incubate at 37°C for 1 minutes.
3. Add 200µl Factor Xa Reagent and mix.
4. Incubate at 37°C for 1 minute
5. Add 200µl Factor Xa Substrate
6. Measure rate of change of absorbance at 405nm for 1 minute

Calibration**a) Assay Calibration**

A commercially prepared plasma standard in which AT-III has been determined (eg. Helena BioSciences SARP (Cat. No. 5185)) should be used as a reference.

b) Calibration Curve

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 -

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

QUALITY CONTROL

Each laboratory should establish a quality control program. Normal and abnormal control plasmas should be tested prior to each batch of patient samples, to ensure satisfactory instrument and operator performance. If controls do not perform as expected, patient results should be considered invalid.

Helena BioSciences supply the following controls available for use with this product:

Cat. No. 5301 SAC-1

Cat. No. 5302 SAC-2

LIMITATIONS

Avoid icteric, lipaemic, and haemolysed samples. To ensure reproducible results, use accurate pipetting devices and observe recommended procedures with emphasis on incubation times and temperature.

REFERENCE 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 levels².

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Helena BioSciences or their representatives have determined the following performance characteristics as a guideline. Each laboratory should establish its own performance data.

Precision

The following estimates of precision (coefficient of variation or C.V.) were observed using an automated analyser utilising a kinetic measurement mode:

Within-assay reproducibility			Between-assay reproducibility		
	AT III Level	CV (%)		AT III Level	CV (%)
n=20	Normal	1.36	n=10	Normal	2.34
n=19	Abnormal	4.40	n=10	Abnormal	4.99

Sensitivity

This assay is designed to give a linear standard curve for AT-III levels between 7.5% and 150%. Samples over 150% should be diluted in Dilution Buffer and re-assayed.

Specificity

The specificity of the assay system has been established in studies employing plasma that has been selectively depleted of AT-III followed by the addition of purified AT-III to achieve various AT-III concentrations.

Accuracy

Comparison of the Helena BioSciences CHROM-Z AT-III kit with another commercially available kit for AT-III determination on 62 samples ranging from 30-130% AT-III activity, the following results were obtained:

$$y = 0.9665x + 0.0629, r^2 = 0.8893$$

BIBLIOGRAPHY

1. Hirsh, J. et al: 'Congenital antithrombin III deficiency. Incidence and clinical features.' *Am J. Med.*, 1989 ; 87 (suppl. 3B) 34S-38S.
2. Panicucci, F. et al: 'Antithrombin III, heparin cofactor and antifactor Xa in relation to age, sex and pathological condition.' *Haemostasis*, 1981; 9: 297-302.
3. Conlan, M.G. et al: 'Antithrombin: Antithrombin III: Associations with age, race, sex and cardiovascular disease risk factors.' *Thromb. Haemost.*, 1994; 72(4) 551-556.
4. Odegard, O.R. et al: 'Heparin cofactor activity measured with an amidolytic method.' *Thromb. Res.*, 1975; 6: 287-294.
5. Demers, C. et al: '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.*, 1993; 69: 231-235.
6. Tolefsen, D.M., Blank, M.K.: 'Detection of a new heparin-dependent inhibitor of thrombin in human plasma.' *J. Clin. Invest.*, 1981; 68: 589-596.
7. National Committee for the National Laboratory (NCCLS) Standards: Collection transport and preparation of blood specimens for coagulation testing and performance of coagulation assays. Document H21-A2, vol. 11, No. 23, 1991.

UTILISATION

Le kit CHROM-Z AT-III (anti-Xa) Helena BioSciences est utilisé pour la détermination quantitative de l'activité de l'antithrombine III (AT-III) dans le plasma humain citraté par dosage chromogénique. L'AT-III est l'un des principaux inhibiteurs de la coagulation sanguine car il inhibe des sérine-protéases du plasma dont les facteurs IXa, Xa, XIa et la thrombine. Le taux d'inhibition augmente de façon significative en présence d'héparine. Le déficit en AT-III, qui peut être congénital ou acquis, implique une augmentation du risque de thrombose^{1,3}. Un déficit peut être détecté en cas de maladie hépatique, de coagulation intravasculaire disséminée (CIVD), de septicémie, d'embolie pulmonaire, de syndrome néphrotique, d'ictus et de thrombophlébite^{2,3}.

La plupart des dosages fonctionnels de l'AT-III, comme celui décrit par Odegard et al⁴, se basent sur la capacité du plasma à inactiver la thrombine en présence d'héparine. Plus récemment, il a été prouvé qu'une méthode se basant sur la capacité du plasma à inhiber le facteur Xa en présence d'héparine est plus précise car l'interférence due au cofacteur II de l'héparine⁵, qui n'inhibe pas le facteur Xa⁶, est supprimée.

Dans la présente méthode en deux étapes, le facteur Xa est ajouté à une dilution de plasma contenant l'AT-III en présence d'ions calcium et d'héparine en excès. Après une période d'incubation initiale (étape 1), le facteur Xa résiduel est déterminé avec un substrat chromogénique spécifique du facteur Xa (étape 2). L'activité résiduelle du facteur Xa est inversement proportionnelle à la concentration en AT-III.

PRÉCAUTIONS

Les réactifs du kit sont à usage diagnostique in-vitro uniquement. **NE PAS INGÉRER.** Porter des gants pour la manipulation de tous les composants. Se reporter aux fiches de sécurité des composants du kit pour la manipulation et l'élimination.

Un dépistage des produits à base de plasma a été réalisé et a donné un résultat négatif (sauf indication contraire sur la boîte du kit ou sur le flacon) pour les antigènes de l'hépatite B (AgHBs), les anticorps anti VIH 1 et 2 et les anticorps anti VHC ; il est malgré tout nécessaire de les manipuler avec les mêmes précautions que pour les échantillons de plasma humain.

COMPOSITION

1. Réactif Facteur Xa

Chaque flacon contient du facteur Xa lyophilisé d'origine bovine.

Préparation: Reconstituer chaque flacon en ajoutant 3x10ml (5502) ou 5x2ml (5507) d'eau distillée ou désionisée. Laisser reposer 10 minutes et bien mélanger avant utilisation.

2. Substrat Facteur Xa

Chaque flacon contient du CH3OCO-D-CHA-Gly-Arg-pNA•AcOH lyophilisé.

Préparation: Reconstituer chaque flacon en ajoutant 3x10ml (5502) ou 5x2ml (5507) d'eau distillée ou désionisée. Laisser reposer 10 minutes et bien mélanger avant utilisation.

3. Diluant échantillon

Chaque flacon contient 4x10ml (5502) ou 5x3ml (5507) de tampon concentré 5 x additionné d'azide de sodium à 0,1% comme conservateur. Lorsqu'il est complètement dilué, le tampon contient Tris-HCl 0,05 M, NaCl 0,175 M, Na2EDTA 7,5mM et de l'héparine sodique à un pH de 8,4.

Préparation: Réaliser une dilution 1 + 4 avec de l'eau distillée / désionisée et bien mélanger.

4. Autres composants du kit

Chaque kit contient une fiche technique.

STOCKAGE ET CONSERVATION

1. Réactif Facteur Xa

Les flacons non ouverts sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette. Une fois reconstitué, le réactif est stable 2 mois entre 2...6°C, 1 mois à 17°C ou 2 jours à 37°C. AC-4 POS 32 @15°C = 48hrs.

2. Substrat Facteur Xa

Les flacons non ouverts sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette. Une fois reconstitué, le réactif est stable 2 mois entre 2...6°C, 1 mois à 17°C ou 7 jours à 37°C. AC-4 POS 28 @37°C = 48hrs.

3. Diluant échantillon

Les flacons non ouverts sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette. Conserver le tampon dilué dans une bouteille hermétiquement fermée entre 2...6°C et utiliser dans le mois suivant.

MATÉRIELS NÉCESSAIRES NON FOURNIS

(Suivant la méthode de dosage utilisée:)

Réf. 5185 SARP

Acide acétique glacial

Spectrophotomètre fonctionnant à 405nm

Bain sec ou bain-marie à 37°C

Chronomètre de laboratoire

PRÉLÈVEMENTS DES ÉCHANTILLONS

Utiliser tout au long du prélèvement du plastique ou du verre siliciné. Mélanger 9 volumes de sang et 1 volume de citrate de sodium à 3,2% ou 3,8%. Séparer le plasma après centrifugation à 2000xg 3000xg pendant 15 minutes. Conserver le plasma entre 2...6°C. L'analyse doit être terminée dans les 2 heures suivant le prélèvement de l'échantillon; sinon, il est possible de congeler le plasma 2 semaines à -20 °C ou un mois à -70°C. Décongeler rapidement à 37°C avant de réaliser l'analyse. NE PAS laisser à 37°C plus de 5 minutes.

MÉTHODOLOGIE

Préparation des dilutions étalon, contrôle et patient

%AT-III	Plasma	Tampon de dilution
100%	10µl étalon	990µl
50%	500µl étalon 100%	500µl
25%	500µl étalon 50%	500µl
12,5%	500µl étalon 25%	500µl
Patient ou contrôle	10µl plasma	990µl

Méthodes automatisées, AC-4. (5502 x 400 échantillons, 5507 x 133 échantillons)

Se conformer au manuel d'utilisation de AC-4 correspondant pour avoir des instructions détaillées.

Préparer tous les réactifs en suivant les indications du paragraphe Composition

START=9s	METHOD=Chrom	MIX=0	PATIENT (Pat) vol=4µL pos=35 (CP)	Def. Plasma (DP) Vol=0µL
INCUB=30s	MATH=lin	CLEAN=Y	BUFFER (BUF) Vol=356µL Pos=40	R1(Factor Xa) Vol=75µL Pos=32
RUNTIME=90s	SENS=0	T-CORR=0 S-CORR=0	CLEAR (CLR) Vol=285µL	R2(Substrate) Vol=75µL Pos=28

Méthode à point de virage semi-micro

1. Pipeter 200 μ l de dilution de plasma patient ou étalon/contrôle dans un tube à essai.
2. Incuber 2-4 minutes à 37°C.
3. Ajouter 200 μ l de réactif Facteur Xa et mélanger.
4. Incuber à 37°C pendant *exactement* 1 minute.
5. Ajouter 200 μ l de substrat Facteur Xa et mélanger.
6. Incuber à 37°C pendant *exactement* 3 minutes.
7. Ajouter 200 μ l d'acide acétique (50%) et mélanger.
8. * Ajouter 200 μ l d'eau (en option).

La couleur jaune du produit de réaction final est stable pendant au moins 4 heures. Lire l'absorbance à 405nm dans cuvette semi-micro de 1cm par rapport à un blanc préparé de la manière suivante:

1. 200 μ l d'acide acétique,
2. 200 μ l de dilution étalon,
3. 200 μ l de réactif Facteur Xa,
4. 200 μ l de substrat Facteur Xa,
5. * 200 μ l d'eau (en option).

* Certains spectrophotomètres exigent un volume minimum de 1ml dans la cuvette.

Si le plasma du patient est très ictérique, il est nécessaire de préparer un second blanc contenant une dilution de plasma patient au lieu de la dilution étalon puis de soustraire l'absorbance obtenue pour la détermination de l'AT-III du patient. Il est possible de réaliser jusqu'à dix déterminations simultanément avec le même chronomètre en échelonnant les étapes de pipetage à des intervalles de cinq secondes.

Méthode cinétique

Un analyseur cinétique peut être utilisé pour mesurer le taux initial d'hydrolyse du substrat chromogénique. Voici la procédure à utiliser:

Dans une cuvette d'analyse,

1. Ajouter 200 μ l de plasma patient ou d'étalon dilué.
2. Incuber 1 minute à 37°C.
3. Ajouter 200 μ l de réactif Facteur Xa et mélanger.
4. Incuber 1 minute à 37°C.
5. Ajouter 200 μ l de substrat Facteur Xa.
6. Mesurer le taux de variation de l'absorbance à 405nm pendant 1 minute.

Étalonnage

a) Étalonnage du dosage

Il est nécessaire d'utiliser comme plasma de référence un plasma étalon préparé disponible sur le marché dont l'AT-III a été déterminée (par exemple, le SARP Helena BioSciences , réf. 5185).

b) Courbe d'étalonnage

Tracer, point par point, une courbe en représentant l'absorbance obtenue avec chacun des étalons servant à l'étalonnage de l'AT-III (axe des ordonnées) en fonction du % AT-III (en abscisse) sur du papier millimétré. La courbe correspondante doit être déterminée par analyse de régression

linéaire. L'AT-III des échantillons de plasma est déterminée par interpolation à partir de la courbe d'étalonnage. La concentration en AT-III de l'échantillon patient doit être rectifiée suivant la concentration en AT-III dans l'étalon:

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

CONTRÔLE QUALITÉ

Chaque laboratoire doit établir un programme de contrôle qualité. Les plasmas de contrôle, normaux et anormaux, doivent être testés avant chaque lot d'échantillons patients afin de s'assurer que l'instrument et l'opérateur offrent des performances satisfaisantes. Si les contrôles ne donnent pas les résultats prévus, les résultats du patient doivent être considérés comme non valables.

Helena BioSciences distribue les contrôles suivants à utiliser avec ce produit:

Réf. 5301 SAC-1

Réf. 5302 SAC-2

LIMITES

Éviter d'utiliser des échantillons ictériques, lipémiques ou hémolysés. Afin de garantir la reproductibilité des résultats, utiliser des dispositifs de pipetage précis et observer les procédures recommandées en respectant tout particulièrement la température et la durée d'incubation.

VALEURS DE RÉFÉRENCE

Les valeurs de référence peuvent varier d'un laboratoire à l'autre suivant les techniques et les systèmes utilisés. C'est pour cette raison qu'il appartient à chaque laboratoire de déterminer sa propre plage normale. La plage normale de l'AT-III dans le plasma est de 75 - 125%. Il est possible de mesurer un taux d'activité plasmatique de 30 - 60% chez les patients ayant un déficit héréditaire en AT-III^{1,2}. Plusieurs troubles cliniques ont été mis en rapport avec un déficit acquis en AT-III: maladie hépatique, CIVD, syndrome néphrotique, embolie pulmonaire, ictus et thrombophlébite. En outre, l'utilisation de contraceptifs oraux peut entraîner une diminution du taux d'AT-III¹.

PERFORMANCES

Helena BioSciences ou ses représentants ont déterminé à titre indicatif les performances suivantes. Chaque laboratoire doit établir ses propres données de performance.

Précision

Les estimations de précision suivantes (coefficient de variation ou CV) ont été observées avec un analyseur automatisé utilisant un mode de mesurage cinétique:

Reproductibilité intra-analyse			Reproductibilité inter-analyse		
	Taux AT III	CV (%)		Taux AT III	CV (%)
n=20	Normal	1,36	n=10	Normal	2,34
n=19	Anormal	4,40	n=10	Anormal	4,99

Sensibilité

Cette méthode de dosage doit donner une courbe d'étalonnage linéaire pour le taux d'AT-III entre 7,5% et 150%. Les échantillons ayant une activité supérieure à 150% doivent être dilués avec du tampon de dilution puis analysés de nouveau.

Spécificité

La spécificité de cette méthode de dosage a été établie dans des études utilisant du plasma qui a été sélectivement déplété de l'AT-III, puis auquel on a ajouté de l'AT-III purifiée pour obtenir diverses concentrations en AT-III.

Exactitude

Une comparaison du kit CHROM-Z AT-III Helena BioSciences avec d'autres kits disponibles sur le marché, réalisée sur 62 échantillons, offrant une activité d'AT-III entre 30 et 130%, a donné les résultats suivants:

$$y = 0,9665x + 0,0629, r^2 = 0,8893$$

BIBLIOGRAPHIE

1. Hirsh, J. et al: 'Congenital antithrombin III deficiency. Incidence and clinical features'. *Am J. Med.*, 1989 ; 87 (suppl. 3B) 34S-38S.
2. Panicucci, F. et al: 'Antithrombin III, heparin cofactor and antifactor Xa in relation to age, sex and pathological condition.' *Haemostasis*, 1981 ; 9 : 297-302.
3. Conlan, M. G. et al: 'Antithrombin: Antithrombin III: Associations with age, race, sex and cardiovascular disease risk factors.' *Thromb. Haemost.*, 1994 ; 72(4) 551-556.
4. Odegard, O. R. et al: 'Heparin cofactor activity measured with an amidolytic method.' *Thromb. Res.*, 1975 ; 6 : 287-294.
5. Demers, C. et al: '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.*, 1993 ; 69 : 231-235.
6. Tolefsen, D. M., Blank, M. K.: 'Detection of a new heparin-dependent inhibitor of thrombin in human plasma.' *J. Clin. Invest.*, 1981 ; 68 : 589-596
7. National Committee for the National Laboratory (NCCLS) Standards: Collection transport and preparation of blood specimens for coagulation testing and performance of coagulation assays. Document H21-A2, vol. 11, n° 23, 1991.

ANWENDUNGSBEREICH

Das Helena BioSciences CHROM-Z AT-III (Anti-Xa) Kit ist zur quantitativen Bestimmung der Antithrombin-III (AT-III)-Aktivität in humanem Citratplasma durch Chromogen-Test bestimmt. AT-III gehört zu den Haupt-Hemm Faktoren der Blutgerinnung, indem es Plasma-Serinproteasen einschließlich der Faktoren IXa, Xa, XIa, und Thrombin hemmt. Der Grad der Hemmung ist bei Anwesenheit von Heparin signifikant erhöht. Mangel an AT-III kann angeboren oder erworben sein und geht mit einem erhöhten Thrombose-Risiko einher^{1,3}. Mängel können bei Lebererkrankungen, Verbrauchskoagulopathie (DIC), septischem Fieber, Lungenembolie, nephrotischem Syndrom, Schlaganfall und Thrombophlebitis auftreten^{2,3}.

Die meisten Funktionstests auf AT-III beruhen, wie bei dem durch Odegard u. a. beschriebene Test, auf der Fähigkeit des Plasmas, Thrombin in Anwesenheit von Heparin zu inaktivieren⁴. Erst kürzlich hat man gezeigt, dass eine Methode, basierend auf die Fähigkeit des Plasmas Faktor Xa in Anwesenheit von Heparin zu hemmen, genauer sein kann, da sie Interferenzen aufgrund des Heparin Ko-Faktors II ausschließt⁵, das Faktor Xa nicht hemmt⁶.

Bei der vorliegenden Zwei-Phase-Methode wird Faktor Xa in Anwesenheit von Heparin und Calcium im Überschuss zu einer AT-III enthaltenen Plasmaverdünnung hinzu gegeben. Nach einer ersten Inkubationszeit (Phase 1) wird Restfaktor Xa mit einem Faktor Xa spezifischen, chromogenen Substrat (Phase 2) bestimmt. Die Restfaktor Xa Aktivität ist umgekehrt proportional zur AT-III Konzentration.

WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

Die Reagenzien dieses Kits sind nur zur in-vitro Diagnostik bestimmt. – **NICHT EINNEHMEN.** Beim Umgang mit den Kit-Komponenten ist das Tragen von Handschuhen erforderlich. Siehe die Sicherheitsdatenblätter mit Gefahrenhinweisen und Sicherheitsvorschlägen sowie Informationen zur Entsorgung. Die Plasmaprodukte sind mit negativem Befund auf Hepatitis B Antigen (HBsAg), HIV-1 und HIV-2 Antikörper und HCV-Antikörper getestet worden (wenn nicht auf Kit-Verpackung oder Fläschchen anders bezeichnet). Sie sollten trotzdem mit derselben Vorsicht wie humane Plasmaproben behandelt werden.

INHALT**1. Faktor Xa Reagenz**

Jedes Fläschchen enthält gefriergetrockneten Faktor Xa vom Rind.

Vorbereitung für den Gebrauch: Jedes Fläschchen mit 3x10ml (5502) oder 5x2ml (5507) destilliertem/entionisiertem Wasser rekonstituieren. 10 Minuten stehen lassen und vor Gebrauch gut mischen.

2. Faktor Xa Substrat

Jedes Fläschchen enthält gefriergetrocknetes $\text{CH}_2\text{OCO-D-CHA-Gly-Arg-pNA}\cdot\text{AcOH}$

Vorbereitung für den Gebrauch: Jedes Fläschchen mit 3x10ml (5502) oder 5x2ml (5507) destilliertem/entionisiertem Wasser rekonstituieren. 10 Minuten stehen lassen und vor Gebrauch gut mischen.

3. Proben-Verdünnungspuffer:

Jedes Fläschchen enthält 4x10ml (5502) oder 5x3ml (5507) 5 x Pufferkonzentrat mit 0,1% Natriumazid als Konservierungsmittel. Vorständig aufgelöst enthält der Puffer 0,05 mol Tris-HCl, 0,175 mol Na Cl, 7,5 mmol Na_2EDTA und Natriumheparin bei pH 8,4.

Vorbereitung für den Gebrauch: 1 + 4 mit destilliertem/entionisiertem Wasser verdünnen und gut mischen.

4. Weitere Kit-Komponenten

Jedes Kit enthält eine Gebrauchsanweisung.

LAGERUNG UND STABILITÄT

1. Faktor Xa Reagenz

Nicht geöffnete Fläschchen sind bis zum aufgedruckten Verfallsdatum stabil. Nach Rekonstitution ist das Reagenz für 2 Monate bei 2...6°C, 1 Monat bei 17°C und 2 Tage bei 37°C stabil. AC-4 POS 32 @15°C = 48hrs.

2. Faktor Xa Substrat

Nicht geöffnete Fläschchen sind bis zum aufgedruckten Verfallsdatum stabil. Nach Rekonstitution ist das Reagenz für 2 Monate bei 2...6°C, 1 Monat bei 17°C und 7 Tage bei 37°C stabil. AC-4 POS 28 @37°C = 48hrs.

3. Proben-Verdünnungspuffer:

Nicht geöffnete Fläschchen sind bis zum aufgedruckten Verfallsdatum stabil. Verdünnten Puffer in einer fest verschlossenen Flasche bei 2...6°C aufbewahren und innerhalb eines Monats verbrauchen.

NICHT MITGELIEFERTES, ABER BENÖTIGTES MATERIAL

(Je nach angewendeter Testmethode):

Kat. Nr. 5185 SARP

Eisessig

Spektralphotometer mit Wellenlänge 405nm

37°C Wasserbad oder Wärmeblock

Laborstoppuhr

PROBENENTNAHME UND VORBEREITUNG

Nur Plastik oder Silikon Glas verwenden. Blut (9 Teile) sollte in 3,2% oder 3,8% Natriumcitrat als Antikoagulant (1 Teil) entnommen werden. 15 Minuten bei 2000xg - 3000xg zentrifugieren und Plasma abpipettieren. Plasma bei 2 bis 6°C lagern. Plasma sollte innerhalb von 2 Stunden verarbeitet oder tief gefroren bei -20°C für 2 Wochen oder -70°C für einen Monat gelagert werden. Vor dem Testen schnell bei 37°C auftauen. Nicht länger als 5 Minuten bei 37°C belassen.

SCHRITT-FÜR-SCHRITT METHODE

Vorbereitung der Standard-, Kontroll- und Patientenverdünnungen.

%AT-III	Plasma	Verdünnungs-Puffer
100%	10µl Standard	990µl
50%	500µl 100% Std.	500µl
25%	500µl 50% Std.	500µl
12,5%	500µl 25% Std.	500µl
Patient oder Kontrolle	10µl Plasma	990µl

Automatisierte Methoden, AC-4. (5502 x 400 Proben, 5507 x 133 Proben)

Siehe Bedienungsanleitung des verwendeten Geräts für eine genaue Anleitung.

Alle Reagenzien wie unter "Inhalt" beschrieben vorbereiten.

START=9s	METHOD=Chrom	MIX=0	PATIENT (Pat) vol=4µL pos=35 (CP)	Def. Plasma (DP) Vol=0µL
INCUB=30s	MATH=lin	CLEAN=Y	BUFFER (BUF) Vol=356µL Pos=40	R1(Factor Xa) Vol=75µL Pos=32
RUNTIME=90s	SENS=0	T-CORR=0 S-CORR=0	CLEAR (CLR) Vol=285µL	R2(Substrate) Vol=75µL Pos=28

Halb-Mikro Endpunkt-Methode

1. 200µl Standard/Kontrolle- oder Patientenplasma-Verdünnung in ein Röhrchen geben.
2. Bei 37°C 2-4 Minuten inkubieren.
3. 200µl Faktor Xa-Reagenz zufügen und mischen.
4. GENAU 1 Minute bei 37°C inkubieren.
5. 200µl Faktor Xa-Substrat zufügen und mischen.
6. GENAU 3 Minuten bei 37°C inkubieren.
7. 200µl Eisessig (50 %) hinzugeben und mischen.
8. *200µl Wasser zufügen (optional).

Die gelbe Farbe des Reaktions-Endprodukts ist mindestens 4 Stunden stabil. Die Extinktion bei 405nm in einer 1cm Halb-Mikroküvette gegen einen wie folgt hergestellten Leerwert messen:

1. 200µl Eisessig,
2. 200µl Standardverdünnung,
3. 200µl Faktor Xa-Reagenz,
4. 200µl Faktor Xa-Substrat,
5. * 200µl Wasser (optional).

* Einige Spektrofotometer benötigen ein Minimum von 1ml Volumen in der Küvette.

Bei sehr ikterischem Patientenplasma sollte ein zweiter Leerwert mit Patientenplasma-Verdünnung anstatt Standard-Verdünnung hergestellt und diese Extinktion von der Extinktion der AT-III Bestimmung des Patienten abgezogen werden. Es kann mit derselben Stoppuhr bis zu 10 Bestimmungen gleichzeitig gestartet werden, indem die Pipettierschritte im Abstand von fünf Sekunden ausgeführt werden.

Kinetische Methode

Den Ausgangswert der Hydrolyse des chromogenen Substrats kann man mit einem kinetischen Analyseautomaten messen. Die Vorgehensweise ist wie folgt:

In eine Reaktionsküvette:

1. 200µl verdünnten Standard oder Patientenplasma geben.
2. Bei 37°C 1 Minuten inkubieren.
3. 200µl Faktor Xa-Reagenz zufügen und mischen.
4. 1 Minute bei 37°C inkubieren.
5. 200µl Faktor Xa-Substrat zufügen.
6. Extinktionsänderung über 1 Minute bei 405nm messen.

Kalibration**a) Testkalibration**

Als Referenz sollte ein kommerziell hergestellter Plasma-Standard mit bekanntem AT-III (z. B. Helena BioSciences SARP, Kat. Nr. 5185) verwendet werden.

b) Kalibrationskurve

Auf einem linearen Millimeterpapier die jeweiligen Extinktionen der einzelnen AT-III Kalibrationsstandards auf der y-Achse gegen % AT-III auf der x-Achse auftragen. Die Ausgleichsgerade sollte durch lineare Regressionsanalyse bestimmt werden. Das AT-III der

Plasmaproben kann dann mit Hilfe der Interpolation aus der Kalibrationskurve abgelesen werden. Die AT-III-Konzentration der Patientenprobe sollte der AT-III-Konzentration im Standard angeglichen werden -

$$\% \text{ AT-III (angeglichen) } = \% \text{ AT-III (Patient) } \times \% \text{ AT III (Standard) } / 100$$

QUALITÄTSKONTROLLE

Jedes Labor muss für eine eigene Qualitätskontrolle sorgen. Vor jeder Testreihe mit Patientenproben müssen normale und pathologische Kontrollplasmen getestet werden, um eine zufrieden stellende Geräteleistung und Bedienung zu gewährleisten. Liegen die Kontrollen außerhalb des Normbereichs, sind die Patientenergebnisse nicht zu verwenden.

In Verbindung mit diesem Produkt bietet Helena BioSciences die folgenden Kontrollen an:

Kat. Nr. 5301 SAC-1

Kat. Nr. 5302 SAC-2

EINSCHRÄNKUNGEN

Ikterische, lipämische und hämolytische Proben vermeiden. Zum Erhalt reproduzierbarer Ergebnisse Präzisionspipetten verwenden und die empfohlenen Vorgehensweisen einhalten mit besonderem Augenmerk auf Inkubationszeiten und Temperatur.

REFERENZWERTE

Referenzwerte können je nach Technik und verwendetem System von Labor zu Labor unterschiedlich sein. Aus diesem Grund sollte jedes Labor seinen eigenen Normalwertbereich erstellen.

Der AT-III Normalbereich beträgt 75-125% im Plasma.

Plasma-Aktivitäten von 30-60% können bei Patienten mit angeborenem AT-III-Mangel beobachtet werden^{1,2}. Verschiedenen klinische, mit einem erworbenen AT-III-Mangel einhergehende Zustände sind u. a.: Lebererkrankung, DIC, nephrotisches Syndrom, Lungenembolie, Schlaganfall und Thrombophlebitis. Zusätzlich können orale Verhütungsmittel zu verminderten AT-III-Werten führen².

LEISTUNGSEIGENSCHAFTEN

Die folgenden Leistungseigenschaften wurden von Helena BioSciences oder in ihrem Auftrag als Richtlinien ermittelt: Jede Labor muss seine eigenen Werte ermitteln.

Präzision

Die folgenden Präzisions-Schätzwerte (Variationskoeffizient oder VK.) wurden mit einem Analyseautomaten im kinetischen Messmodus festgestellt:

Reproduzierbarkeit innerhalb des Tests			Reproduzierbarkeit zwischen den Tests		
	AT III-Wert	VK (%)		AT III-Wert	VK (%)
n=20	Normal	1,36	n=10	Normal	2,34
n=19	Abnormal	4,40	n=10	Abnormal	4,99

Empfindlichkeit

Dieser Test ist so ausgelegt, dass er für AT-III-Werte zwischen 7,5% und 150% eine lineare Standardkurve ergibt. Proben über 150% sollten mit Verdünnungspuffer verdünnt und erneut getestet werden..

Spezifität

Die Spezifität des Testsystems wurde an Studien festgestellt, in denen zum Erhalt verschiedener AT-III-Konzentrationen Plasma eingesetzt wurde, das gezielt zuerst AT-III depletiert und dem dann gereinigtes AT-III zugesetzt wurde.

Genauigkeit

Ein Vergleich des Helena BioSciences CHROM-Z AT-III Kits mit einem anderen kommerziell erhältlichen Kit zur AT-III Bestimmung an 62 im Bereich von 30-130% AT-III Aktivität liegenden Proben, ergab die folgenden Ergebnisse:

$$y = 0,9665x + 0,0629, r^2 = 0,8893$$

LITERATUR

1. Hirsh, J. et al: 'Congenital antithrombin III deficiency. Incidence and clinical features.' Am J. Med., 1989 ; 87 (suppl. 3B) 34S-38S.
2. Panicucci, F. et al: 'Antithrombin III, heparin cofactor and antifactor Xa in relation to age, sex and pathological condition.' Haemostasis, 1981; 9: 297-302.
3. Conlan, M.G. et al: 'Antithrombin: Antithrombin III: Associations with age, race, sex and cardiovascular disease risk factors.' Thromb. Haemost., 1994; 72(4) 551-556.
4. Odegard, O.R. et al: 'Heparin cofactor activity measured with an amidolytic method.' Thromb. Res., 1975; 6: 287-294.
5. Demers, C. et al: '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., 1993; 69: 231-235.
6. Tolefsen, D.M., Blank, M.K.: 'Detection of a new heparin-dependent inhibitor of thrombin in human plasma.' J. Clin. Invest., 1981; 68: 589-596
7. National Committee for the National Laboratory (NCCLS) Standards: Collection transport and preparation of blood specimens for coagulation testing and performance of coagulation assays. Document H21-A2, vol. 11, No. 23, 1991.

PRINCIPIO

Il kit CHROM-Z AT-III (anti-Xa) di Helena BioSciences è stato formulato per la determinazione quantitativa dell'attività dell'antitrombina III (AT-III) in plasma citrato umano mediante dosaggio cromogenico. L'AT-III è un importante inibitore della coagulazione del sangue, che agisce inibendo le serinproteasi plasmatiche, compresi i fattori IXa, Xa, XIa e la trombina. Il tasso di inibizione risulta significativamente maggiore in presenza di eparina. La carenza di AT-III può essere congenita o acquisita ed è associata ad un maggiore rischio di trombosi^{1,3}. Le carenze possono verificarsi in presenza di patologie epatiche, coagulazione intravascolare disseminata (DIC), setticemia, embolia polmonare, sindrome nefrosica, ictus e tromboflebite^{2,3}.

La maggior parte dei dosaggi funzionali relativi all'AT-III si basa sulla capacità del plasma di inattivare la trombina in presenza di eparina, come accade per il dosaggio descritto da Odegard et al⁴. Più di recente, è stato dimostrato che un metodo basato sulla capacità del plasma di inibire il fattore Xa in presenza di eparina può offrire una maggiore accuratezza, in quanto elimina l'interferenza dovuta al cofattore II dell'eparina 5 che non inibisce il fattore Xa⁶.

Nell'attuale metodo a 2 stadi, il fattore Xa viene aggiunto ad una diluizione di plasma contenente AT-III in presenza di quantità eccessive di eparina e calcio. In seguito ad un periodo di incubazione iniziale (stadio 1), il fattore Xa residuo viene determinato con un substrato cromogenico specifico per il fattore Xa (stadio 2). L'attività del fattore Xa residuo è inversamente proporzionale alla concentrazione di AT-III.

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

I reagenti contenuti in questo kit sono destinati esclusivamente alla diagnostica in vitro - NON INGERIRE. Indossare guanti protettivi durante l'uso dei componenti del kit. Fare riferimento alle schede tecniche e dati di sicurezza per le avvertenze sui componenti dei Kit.

I prodotti plasmatici sono stati esaminati dando esito negativo (salvo diversamente indicato sulla confezione del kit o sul flacone) relativamente alla presenza dell'antigene dell'epatite B (HbsAg), dell'anticorpo anti-HIV 1 e 2 e dell'anticorpo anti-HCV; questi prodotti devono tuttavia essere manipolati con le stesse misure precauzionali adottate per un campione di plasma umano.

COMPOSIZIONE

1. Reagente per fattore Xa

Ogni flacone contiene fattore Xa bovino ottenuto per congelamento-disidratazione.

Preparazione per l'uso: Ricostituire ogni flacone con 3x10ml (5502) o 5x2ml (5507) di acqua distillata/deionizzata. Lasciare riposare per 10 minuti e miscelare bene prima dell'uso.

2. Substrato per fattore Xa

Ogni flacone contiene CH3OCO-D-CHA-Gly-Arg-pNA•AcOH ottenuto per congelamento-disidratazione.

Preparazione per l'uso: Ricostituire ogni flacone con 3x10ml (5502) o 5x2ml (5507) di acqua distillata/deionizzata. Lasciare riposare per 10 minuti e miscelare bene prima dell'uso.

3. Diluente per campioni:

Ogni flacone contiene 4x10ml (5502) o 5x3ml (5507) 5x tampone concentrato con sodio azide allo 0,1% come conservante. In seguito a completa diluizione, il tampone contiene 0,05M Tris-HCl, 0,175M NaCl, 7,5mM Na2EDTA e sodio eparina con pH 8.4.

Preparazione per l'uso: Diluire 1+4 con acqua distillata/deionizzata e miscelare bene.

4. Altri componenti del kit

Ogni kit contiene un foglio procedurale.

CONSERVAZIONE E STABILITÀ**1. Reagente per fattore Xa**

I flaconi non aperti sono stabili fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta. Dopo la ricostituzione, il reagente è stabile per: 2 mesi a 2...6°C, 1 mese a 17°C e 2 giorni a 37°C. AC-4 POS 32 @15°C = 48hrs.

2. Substrato per fattore Xa

I flaconi non aperti sono stabili fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta. Dopo la ricostituzione, il reagente è stabile per: 2 mesi a 2...6°C, 1 mese a 17°C e 7 giorni a 37°C. AC-4 POS 28 @37°C = 48hrs.

3. Diluente per campioni:

I flaconi non aperti sono stabili fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta. Conservare il tampone diluito in una bottiglia tappata ermeticamente a 2...6°C ed utilizzarlo entro un mese.

MATERIALI NECESSARI MA NON IN DOTAZIONE

(In funzione del metodo di dosaggio utilizzato):

Cod. N. 5185 SARP

Acido acetico glaciale

Spettrofotometro funzionante a 405 nm

Bagnomaria o bagno secco a 37°C

Timer da laboratorio

RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Nel corso dell'intera procedura è necessario utilizzare plastica o vetro siliconizzato. Il sangue (9 parti) deve essere raccolto in sodio citrato al 3,2% o al 3,8% come anticoagulante (1 parte). Separare il plasma in seguito a centrifugazione a 2000xg - 3000xg per 15 minuti. Il plasma deve essere conservato a 2...6°C. I test devono essere completati entro 2 ore dalla raccolta dei campioni; in alternativa, il plasma può essere conservato congelato a -20°C per 2 settimane o a -70°C per un mese. Decongelare rapidamente a 37°C prima di eseguire i test. Non conservare a 37°C per oltre 5 minuti.

PROCEDURA

Preparazione di diluizioni standard, di controllo e del paziente

%AT-III	Plasma	Tampone di diluizione
100%	10µl standard	990µl
50%	500µl 100% std	500µl
25%	500µl 50% std	500µl
12,5%	500µl 25% std	500µl
Paziente o controllo	10µl plasma	990µl

Metodi automatici, AC4. (5502 x 400 campioni, 5507 x 133 campioni)

Fare riferimento al manuale utente dello AC-4 appropriato per conoscere le istruzioni dettagliate

Preparare tutti i reagenti secondo le istruzioni riportate nel paragrafo COMPOSIZIONE.

START=9s	METHOD=Chrom	MIX=0	PATIENT (Pat) vol=4µL pos=35 (CP)	Def. Plasma (DP) Vol=0µL
INCUB=30s	MATH=lin	CLEAN=Y	BUFFER (BUF) Vol=356µL Pos=40	R1(Factor Xa) Vol=75µL Pos=32
RUNTIME=90s	SENS=0	T-CORR=0 S-CORR=0	CLEAR (CLR) Vol=285µL	R2(Substrate) Vol=75µL Pos=28

Metodo end-point semi-micro

1. Aggiungere ad una provetta di prova 200 μ l di diluizione di plasma standard/di controllo o del paziente.
2. Incubare a 37°C per 2-4 minuti.
3. Aggiungere 200 μ l di reagente per fattore Xa e miscelare.
4. Incubare a 37°C per 1 minuto ESATTO.
5. Aggiungere 200 μ l di substrato per fattore Xa e miscelare.
6. Incubare a 37°C per 3 minuti ESATTI.
7. Aggiungere 200 μ l di acido acetico (50%) e miscelare.
8. *Aggiungere 200 μ l di acqua (optional).

Il colore giallo del prodotto di reazione finale è stabile per almeno 4 ore. Leggere l'assorbanza a 405nm in una cuvetta semi-micro da 1cm rispetto ad un blank preparato nel seguente ordine:

1. 200 μ l di acido acetico;
2. 200 μ l di diluizione standard;
3. 200 μ l di reagente per fattore Xa;
4. 200 μ l di substrato per fattore Xa;
5. * 200 μ l di acqua (optional).

* Alcuni spettrofotometri richiedono un volume minimo di 1 ml nella cuvetta.

Se il plasma del paziente è molto itterico, è necessario preparare un secondo blank contenente una diluizione di plasma del paziente anziché una diluizione standard e sottrarre l'assorbanza dall'assorbanza ottenuta per la determinazione dell'AT-III del paziente. Con lo stesso cronometro possono essere eseguite fino a 10 misurazioni, distanziando le fasi di pipettaggio ad intervalli di 5 secondi.

Metodo cinetico

È possibile utilizzare un analizzatore cinetico per misurare il tasso iniziale di idrolisi del substrato cromogenico. La procedura da utilizzare è la seguente:

Ad una cuvetta di reazione:

1. Aggiungere 200 μ l di plasma standard o del paziente diluito.
2. Incubare a 37°C per 1 minuto.
3. Aggiungere 200 μ l di reagente per fattore Xa e miscelare.
4. Incubare a 37°C per 1 minuto.
5. Aggiungere 200 μ l di substrato per fattore Xa.
6. Misurare il tasso di variazione dell'assorbanza a 405 nm per 1 minuto.

Calibrazione

a) Calibrazione del dosaggio

Uno standard plasmatico disponibile in commercio in cui sia stata determinata l'AT-III (ad es. Helena BioSciences SARP (Cod. N. N. 5185)) deve essere utilizzato come riferimento.

b) Curva di calibrazione

Tracciare l'assorbanza ottenuta con ciascuno degli standard di calibrazione dell'AT-III sull'asse Y rispetto alla % AT-III sull'asse X utilizzando una carta per grafici lineari. La linea di "best fit" deve

essere determinata mediante un'analisi di regressione lineare. L'AT-III nei campioni di plasma può essere determinata per interpolazione dalla curva di calibrazione. La concentrazione di AT-III nel campione del paziente deve adeguata in relazione alla concentrazione di AT-III nello standard:

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

CONTROLLO QUALITÀ

Ogni laboratorio deve definire un programma di controllo qualità. I plasmi di controllo normali e anormali devono essere testati prima di ogni lotto di campioni di pazienti, per garantire un livello prestazionale soddisfacente sia per quanto riguarda lo strumento che per l'operatore. Qualora i controlli non funzionassero come previsto, i risultati relativi ai pazienti dovranno essere considerati non validi.

Helena BioSciences mette a disposizione i seguenti controlli utilizzabili con questo prodotto:

Cod. N. 5301 SAC-1

Cod. N. 5302 SAC-2

LIMITI

Evitare campioni itterici, lipemici ed emolizzati. Per garantire risultati riproducibili, utilizzare dispositivi di pipettaggio precisi e rispettare le procedure raccomandate, prestando particolare attenzione ai tempi di incubazione e alla temperatura.

VALORI DI RIFERIMENTO

Per la sicurezza del paziente è necessario che il sistema sia monitorato continuamente da un operatore qualificato. Per tale motivo ciascun laboratorio dovrà elaborare un proprio range normale.

Il range normale di AT-III è di 75-125% nel plasma.

In pazienti con carenza di AT-III ereditaria è possibile osservare livelli di attività plasmatica pari al 30-60%^{1,2}. Tra le numerose condizioni cliniche associate alla carenza di AT-III acquisita rientrano: patologie epatiche, DIC, sindrome nefrosica, embolia polmonare, ictus e tromboflebite. Anche l'utilizzo di contraccettivi orali può portare alla riduzione dei livelli di AT-III².

CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI

Le caratteristiche prestazionali sotto riportate sono state determinate da Helena BioSciences o dai propri rappresentanti a titolo di linee guida. Ciascun laboratorio dovrà pertanto elaborare i propri dati prestazionali.

Precisione

Le seguenti stime di precisione (coefficiente di variazione o C.V.) sono state osservate utilizzando un analizzatore automatico provvisto di una modalità di misurazione cinetica:

Riproducibilità entro il dosaggio			Riproducibilità tra i dosaggi		
	Livello di AT III	CV (%)		Livello di AT III	CV (%)
n=20	Normale	1.36	n=10	Normale	2.34
n=19	Anomalo	4.40	n=10	Anomalo	4.99

Sensibilità

Questo dosaggio è studiato per fornire una curva standard lineare per i livelli di AT-III tra il 7,5% e il 150%. I campioni oltre il 150% devono essere diluiti nel tampone di diluizione e saggiati nuovamente.

Specificità

La specificità del sistema di dosaggio è stata stabilita in studi nei quali il plasma è stato selettivamente depleto di AT-III e quindi addizionato di AT-III depurata, per ottenere varie concentrazioni di AT-III.

Accuratezza

Effettuando un confronto del kit CHROM-Z AT-III di Helena BioSciences con un altro kit disponibile in commercio per la determinazione dell'AT-III su 62 campioni con attività di AT-III compresa nel range 30-130%, sono stati ottenuti i seguenti risultati:

$$y = 0.9665x + 0.0629, r^2 = 0.8893$$

BIBLIOGRAFIA

1. Hirsh, J. et al: 'Congenital antithrombin III deficiency. Incidence and clinical features.' Am J. Med., 1989 ; 87 (suppl. 3B) 34S-38S.
2. Panicucci, F. et al: 'Antithrombin III, heparin cofactor and antifactor Xa in relation to age, sex and pathological condition.' Haemostasis, 1981; 9: 297-302.
3. Conlan, M.G. et al: 'Antithrombin: Antithrombin III: Associations with age, race, sex and cardiovascular disease risk factors.' Thromb. Haemost., 1994; 72(4) 551-556.
4. Odegard, O.R. et al: 'Heparin cofactor activity measured with an amidolytic method.' Thromb. Res., 1975; 6: 287-294.
5. Demers, C. et al: '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., 1993; 69: 231-235.
6. Tolefsen, D.M., Blank, M.K.: 'Detection of a new heparin-dependent inhibitor of thrombin in human plasma.' J. Clin. Invest., 1981; 68: 589-596
7. National Committee for the National Laboratory (NCCLS) Standards: Collection transport and preparation of blood specimens for coagulation testing and performance of coagulation assays. Document H21-A2, vol. 11, No. 23, 1991.

USO PREVISTO

El Kit CHROM-Z AT-III (anti-Xa) de Helena BioSciences está diseñado para la determinación cuantitativa de actividad de antitrombina III (AT-III) en plasma humano citratado mediante una valoración cromógeno. La AT-III es el mayor inhibidor de la coagulación sanguínea, que actúa inhibiendo las proteasas de la serina del plasma incluidos los factores IXa, Xa, XIa y trombina. La tasa de inhibición aumenta significativamente en presencia de heparina. El déficit en AT-III puede ser congénito o adquirido y se asocia a aumento de riesgo de trombosis^{1,3}. Pueden producirse deficiencias en las hepatopatías, la coagulación intravascular diseminada (CID), la septicemia, la embolia pulmonar, el síndrome nefrótico, el ictus y la tromboflebitis^{2,3}.

La mayoría de los estudios funcionales de AT-III dependen de la capacidad del plasma para inactivar la trombina en presencia de heparina, como ocurre en el estudio descrito por Odegard et al⁴. Estudios más recientes han demostrado que puede ser más preciso un método basado en la capacidad del plasma para inactivar el factor Xa, ya que elimina la interferencia debida al cofactor II 5 de heparina, que no inhibe el factor Xa⁶.

En este método de dos fases, se añade el factor Xa a una dilución de plasma que contenga AT-III en presencia de calcio y heparina en exceso. Tras un periodo inicial de incubación (fase 1), se determina el factor Xa residual con un sustrato cromógeno específico para factor Xa (fase 2). La actividad residual del factor Xa es inversamente proporcional a la concentración de AT-III.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

Los reactivos contenidos en este kit son sólo para uso diagnóstico – NO SE DEBEN INGERIR. Usar guantes para manejar todos los componentes del kit. Consultar la hoja con los datos de seguridad del producto acerca de los riesgos de los componentes, avisos de seguridad y consejos para su eliminación.

Se han estudiado los productos plasmáticos y han resultado negativos (a menos que se indique otra cosa en la caja del kit o en el vial) para la presencia de antígeno de la hepatitis B (HbsAg), anticuerpos frente a VIH 1 y VIH 2 y anticuerpo del VHC, aunque deben manejarse con las mismas precauciones que una muestra de plasma humano.

COMPOSICIÓN**1. Reactivo de Factor Xa**

Cada vial contiene factor Xa bovino liofilizado.

Preparar para el uso: Reconstituir cada vial con 3x10ml (5502) ó 5x2ml (5507) de agua destilada/desionizada. Dejar reposar durante 10 minutos y mezclar bien antes de usar.

2. Sustrato de Factor Xa

Cada vial contiene CH3OCO-D-CHA-Gly-Arg-pNA•AcOH liofilizado

Preparar para el uso: Reconstituir cada vial con 3x10ml (5502) ó 5x2ml (5507) de agua destilada/desionizada. Dejar reposar durante 10 minutos y mezclar bien antes de usar.

3. Diluyente de muestras:

Cada vial contiene 4x10ml (5502) ó 5x3ml (5507) de concentrado tampón 5 x con azida sódica a 0,1% como conservante. Una vez diluido completamente, el tampón contiene 0,05M Tris-HCl, 0,175 M NaCl, 7,5mM Na2EDTA y heparina sódica de pH 8,4.

Preparar para el uso: Diluir 1+4 con agua destilada/desionizada y mezclar bien.

4. Otros componentes del kit

Cada kit contiene instrucciones de uso.

ALMACENAMIENTO Y PERÍODO DE VALIDEZ

1. Reactivo de Factor Xa

Los viales no abiertos permanecen estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta. Una vez reconstituido el reactivo permanece estable durante: 2 meses a 2...6°C, 1 mes a 17°C y 2 días a 37°C. AC-4 POS 32 @15°C = 48hrs.

2. Sustrato de Factor Xa

Los viales no abiertos permanecen estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta. Una vez reconstituido el reactivo permanece estable durante: 2 meses a 2...6°C, 1 mes a 17°C y 7 días a 37°C. AC-4 POS 28 @37°C = 48hrs.

3. Diluyente de muestras:

Los viales no abiertos permanecen estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta. Guardar el tampón diluido en un frasco herméticamente cerrado a 2...6°C y utilizar en el plazo de un mes.

ARTÍCULOS NECESARIOS NO SUMINISTRADOS

(Dependiendo del método de valoración utilizado):

Nº Cat. 5185 SARP

Ácido acético glacial

Espectrofotómetro que funcione a 405 nm

Baño seco o baño maría a 37°C

Cronómetro de laboratorio

RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

Debe usarse siempre plástico o vidrio siliconizado. Debe recogerse sangre (9 partes) en el anticoagulante citrato sódico al 3,2% o al 3,8% (1 parte). Se separa el plasma después de la centrifugación a 2000xg - 3000xg durante 15 minutos. El plasma debe conservarse a 2...6°C. Las pruebas deberían terminarse en 2 horas desde la recogida de las muestras o el plasma puede conservarse congelado a -20°C durante 2 semanas o -70°C durante un mes. Descongelar rápidamente a 37°C antes de realizar la prueba. NO CONSERVAR a 37°C durante más de 5 minutos.

PROCEDIMIENTO PASO A PASO

Preparación de diluciones estándar, control y paciente:

%AT-III	Plasma	Tampón de dilución
100%	10µl estándar	990µl
50%	500µl 100% Est.	500µl
25%	500µl 50% Est.	500µl
12,5%	500µl 25% Est.	500µl
Paciente o control	10µl Plasma	990µl

Métodos automatizados, AC-4. (5502 x 400 muestras, 5507 x 133 muestras)

Consúltese el Manual del Operador del AC-4 adecuado para instrucciones detalladas.

Preparar todos los reactivos como se indica en "composición".

START=9s	METHOD=Chrom	MIX=0	PATIENT (Pat) vol=4µL pos=35 (CP)	Def. Plasma (DP) Vol=0µL
INCUB=30s	MATH=lin	CLEAN=Y	BUFFER (BUF) Vol=356µL Pos=40	R1 (Factor Xa) Vol=75µL Pos=32
RUNTIME=90s	SENS=0	T-CORR=0 S-CORR=0	CLEAR (CLR) Vol=285µL	R2 (Substrate) Vol=75µL Pos=28

Método de punto final semi-micro

1. Añadir 200µl de dilución de plasma estándar/control o paciente a un tubo de prueba.
2. Incubar a 37°C durante 2-4 minutos.
3. Añadir 200µl de reactivo de Factor Xa y mezclar.
4. Incubar a 37°C durante EXACTAMENTE 1 minuto.
5. Añadir 200µl de reactivo de Factor Xa y mezclar.
6. Incubar a 37°C durante EXACTAMENTE 3 minutos.
7. Añadir 200µl de ácido acético (50%) y mezclar.
8. * Añadir 200µl de agua (opcional)

El color amarillo del producto de reacción final permanece estable durante al menos 4 horas. Leer la absorbencia a 405nm en una cubeta semi-micro de 1cm sobre un blanco preparado del siguiente modo:

1. 200µl de ácido acético,
2. 200µl de solución estándar,
3. 200µl de reactivo de Factor Xa,
4. 200µl de sustrato de Factor Xa,
5. * 200µl de agua (opcional).

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

Si el plasma del paciente es muy icterico, debe prepararse un segundo blanco con dilución de plasma paciente en vez de una dilución estándar y debe restarse la absorbencia de la absorbencia obtenida por la determinación de AT-III del paciente. Se pueden realizar hasta diez determinaciones simultáneamente con el mismo cronómetro, escalonando los pasos de pipeteado en intervalos de cinco segundos.

Método cinético

Debe utilizarse un analizador cinético para medir la tasa inicial de hidrólisis del sustrato cromógeno. El procedimiento que debe utilizarse es el siguiente:

En una cubeta de reacción

1. Añadir 200µl de plasma paciente o estándar diluido.
2. Incubar a 37°C durante 1 minuto.
3. Añadir 200µl de reactivo de Factor Xa y mezclar.
4. Incubar a 37°C durante 1 minuto.
5. Añadir 200µl de sustrato de Factor Xa.
6. Medir la tasa de cambio de absorbencia a 405nm durante 1 minuto.

Calibración**a) Calibración del estudio**

Debe utilizarse como referencia un estándar de plasma preparado de forma comercial en el que se haya determinado AT-III (p.ej. Helena BioSciences SARP (Nº. Cat. 5185)).

b) Curva de calibración

Representa la absorbencia obtenida con cada estándar de calibración de AT-III en el eje y frente al porcentaje (%) de AT-III en el eje x en un papel de gráfico lineal. La línea de mejor ajuste debe determinarse mediante un análisis lineal de regresión. Puede determinarse la AT-III en muestras de plasma interpolando desde la curva de calibración. Debe ajustarse la concentración de AT-III en la muestra del paciente para la concentración de AT-III en el estándar -

$$\% \text{ AT-III (ajustado)} = \% \text{ AT-III (paciente)} \times \% \text{ AT III (estándar)} / 100$$

CONTROL DE CALIDAD

Cada laboratorio debe establecer un programa de control de calidad. Los plasmas de control normales y anormales deben estudiarse antes de cada lote de muestras del paciente, para asegurar un funcionamiento adecuado del instrumento y el operador. Si los controles no se realizan como se esperaba, los resultados del paciente deben considerarse inválidos.

Helena BioSciences suministra los siguientes controles disponibles para usar con este producto:

Nº Cat. 5301 SAC-1

Nº Cat. 5302 SAC-2

LIMITACIONES

Evitar muestras ictericas, lipémicas y hemolizadas. Para garantizar resultados reproducibles, utilizar dispositivos de pipeteado precisos y seguir los procedimientos recomendados con especial atención a los tiempos de incubación y temperatura.

VALORES DE REFERENCIA

Los valores de referencia pueden variar entre los laboratorios dependiendo de las técnicas y sistemas usados. Por esta razón, cada laboratorio debe establecer su propio intervalo normal.

El intervalo normal de AT-III es 75-125% en plasma.

Los niveles de actividad de plasma del 30 - 60% pueden observarse en pacientes con deficiencia hereditaria de AT-III^{1,2}. Entre los estados clínicos asociados con la deficiencia adquirida de AT-III se incluyen: hepatopatía, CID, síndrome nefrótico, embolia pulmonar, ictus y tromboflebitis. Además, el uso de contraceptivos orales puede conllevar una reducción de los niveles de AT-III².

CARACTERÍSTICAS FUNCIONALES

Helena BioSciences o sus representantes han determinado las siguientes características de rendimiento como directriz. Cada laboratorio debe establecer sus propios datos de rendimiento.

Precisión

Se observaron las siguientes valoraciones de precisión (coeficiente de variación o CV) con un analizador automático que utiliza un modo de medición cinética:

Reproducibilidad dentro de cada ensayo			Reproducibilidad entre distintos ensayos		
	Nivel AT III	CV (%)		Nivel AT III	CV (%)
n=20	Normal	1,36	n=10	Normal	2,34
n=19	Anormal	4,40	n=10	Anormal	4,99

Sensibilidad

Este estudio está pensado para ofrecer una curva estándar lineal para niveles de AT-III entre 7,5% y 150%. Las muestras que superan un 150% deben diluirse en un Tampón de dilución y estudiarse de nuevo.

Especificidad

La especificidad del sistema de valoración se ha establecido en estudios que utilizan plasma al que se le ha deplecionado en AT-III de forma selectiva y añadido posteriormente AT-III purificado para lograr distintas concentraciones de AT-III.

Exactitud

Se obtuvieron los siguientes resultados en una comparación del kit CHROM-Z AT-III de Helena BioSciences con otro disponible a nivel comercial para determinar AT-III en 62 muestras que abarcan desde un 30% a un 130% de actividad de AT-III:

$$y = 0,9665x + 0,0629, r^2 = 0,8893$$

BIBLIOGRAFÍA

1. Hirsh, J. et al: 'Congenital antithrombin III deficiency. Incidence and clinical features.' *Am J. Med.*, 1989; 87 (suppl. 3B) 34S-38S.
2. Panicucci, F. et al: 'Antithrombin III, heparin cofactor and antifactor Xa in relation to age, sex and pathological condition.' *Haemostasis*, 1981; 9: 297-302.
3. Conlan, M.G. et al: 'Antithrombin: Antithrombin III: Associations with age, race, sex and cardiovascular disease risk factors.' *Thromb. Haemost.*, 1994; 72(4) 551-556.
4. Odegard, O.R. et al: 'Heparin cofactor activity measured with an amidolytic method.' *Thromb. Res.*, 1975; 6: 287-294.
5. Demers, C. et al: '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.*, 1993; 69: 231-235.
6. Tolefsen, D.M., Blank, M.K.: 'Detection of a new heparin-dependent inhibitor of thrombin in human plasma.' *J. Clin. Invest.*, 1981; 68: 589-596
7. National Committee for the National Laboratory (NCCLS) Standards: Collection transport and preparation of blood specimens for coagulation testing and performance of coagulation assays. Document H21-A2, vol. 11, No. 23, 1991.

Helena Biosciences Europe
Queensway South
Team Valley Trading Estate
Gateshead
Tyne and Wear
NE11 0SD

Tel: +44 (0) 191 482 8440
Fax: +44 (0) 191 482 8442
Email: info@helena-biosciences.com
www.helena-biosciences.com

HL-2-1074P 2008/09 (9)