



REF 5502
REF 5507



Helena Biosciences Europe Europe, Queensway South, Team Valley Trading Estate, Gateshead, Tyne and Wear, NE11 OSD, United Kingdom
Tel: +44 (0)191 482 8440
Fax: +44 (0)191 482 8442
Email: info@helena-biosciences.com
Web: www.helena-biosciences.com

HL-2-1074P 2016/01 (12)

Antithrombin Xa (Chromogenic)

Instructions for use

INTENDED PURPOSE

The Antithrombin Xa (Chromogenic) kit is intended for carrying out chromogenic based haemostasis assays.

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

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 Odegaard *et al.*. 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 II[®] which does not inhibit factor Xa.

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. The Helena Biosciences Europe Antithrombin Xa (Chromogenic) kit is intended for the quantitative determination of antithrombin III (AT-III) activity in human citrated plasma by chromogenic assay.

WARNINGS AND PRECAUTIONS

The reagents contained in this kit are for *in vitro* diagnostic use only – DO NOT INGEST. Wear appropriate personal protective equipment when handling all kit components. Refer to the product safety declaration for the link to appropriate hazard and precautionary statements where applicable. Dispose of components in accordance with local regulations.

COMPOSITION

| Component | Content | Description | Preparation |
|---------------------|---|--|---|
| Factor Xa | 3 x 10 mL (REF 5502) 5 x 2 mL (REF 5507) | Contains freeze-dried bovine factor Xa. | Reconstitute each vial with: 10 mL (REF 5502) or 2 mL (REF 5507) of distilled / deionised water. Allow to stand for 10 minutes and mix well before use. |
| Factor Xa Substrate | 3 x 10 mL (REF 5502) 5 x 2 mL (REF 5507) | Contains freeze-dried CH ₃ OCO-D-CHA-Gly-Arg-pNA-AcOH. | Reconstitute each vial with: 10 mL (REF 5502) or 2 mL (REF 5507) of distilled / deionised water. Allow to stand for 10 minutes and mix well before use. |
| Sample Diluent | 4 x 10 mL (REF 5502) 5 x 3 mL (REF 5507) | Contains 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 Na ₂ EDTA and sodium heparin at pH 8.4. | Dilute 1 + 4 with distilled / deionised water and mix well. |

Each kit contains Instructions For Use.

ITEMS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

Coagulation instrument or spectrophotometer operable at 405 nm.

Depending on Assay Method Used:

- REF 5185 Calibration Plasma
- Glacial acetic acid
- 37°C water bath or dry bath
- Laboratory timer

STORAGE, SHELF-LIFE AND STABILITY

Unopened vials are stable until the given expiry date when stored under conditions indicated on the vial or kit label.

Factor Xa Reconstituted reagent is stable for 2 months at *2–8°C, 1 month at *17°C or 2 days at *37°C.

Factor Xa Substrate Reconstituted reagent is stable for 2 months at *2–8°C, 1 month at *17°C or 7 days at *37°C.

Sample Diluent Store diluted buffer in a tightly stoppered bottle at *2–8°C and use within one month.

SAMPLE COLLECTION AND PREPARATION

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

PROCEDURE

Preparation of Standard (REF 5185), Control and Patient Dilutions:

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

A. Semi-Micro Endpoint Method

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

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

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

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

If the patient plasma is very icteric, a second blank containing patient plasma dilution instead of standard dilution should be prepared and the absorbance subtracted from the absorbance obtained for the patient's AT-III determination. As many as ten determinations can be performed simultaneously with the same stop watch by staggering pipetting steps at five second intervals.

B. Kinetic Method

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

To a reaction cuvette:

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

INTERPRETATION OF RESULTS

a) Assay Calibration

A commercially prepared plasma standard in which AT-III has been determined eg. Helena Biosciences Europe Calibration Plasma (REF 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:

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

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.

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 Europe supply the following controls available for use with this product:

| | |
|----------|------------------------------|
| REF 5301 | Speciality Assayed Control N |
| REF 5302 | Speciality Assayed Control A |

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 levels³.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Helena Biosciences Europe 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 were observed using an automated analyser utilising a kinetic measurement mode:

| AT-III Level | Intra-assay precision | | Inter-assay precision | |
|--------------|-----------------------|--------|-----------------------|--------|
| | n | CV (%) | n | CV (%) |
| Normal | 20 | 1.36 | 10 | 2.34 |
| Abnormal | 19 | 4.40 | 10 | 4.99 |

Sensitivity

This assay is designed to give a linear standard curve for AT-III levels between 7.5-150%. 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 Europe Antithrombin Xa (Chromogenic) 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:

$$y = 0.9665x + 0.0629 \quad r^2 = 0.8893$$

BIBLIOGRAPHY

- Hirsh J *et al* (1989) Congenital antithrombin III deficiency. Incidence and clinical features, *Am J Med*, **87**(suppl. 3B): 34S-38S
- Panicucci F *et al* (1981) Antithrombin III, heparin cofactor and antifactor Xa in relation to age, sex and pathological condition, *Haemostasis*, **9**: 297-302
- Conlan MG *et al* (1994) Antithrombin: Antithrombin III: Associations with age, race, sex and cardiovascular disease risk factors, *Thromb. Haemost.*, **72**(4): 551-556
- Odegaard OR *et al* (1975) Heparin cofactor activity measured with an amidolytic method, *Thromb. Res.*, **6**: 287-294
- Demers C *et al* (1993) An antithrombin III assay based on factor Xa inhibition provides a more reliable test to identify congenital antithrombin III deficiency than an assay based on thrombin inhibition, *Thromb. Haemost.*, **69**: 231-235
- Tolefsen DM, Blank MK (1981) Detection of a new heparin-dependent inhibitor of thrombin in human plasma, *J. Clin. Invest.*, **68**: 589-596
- Clinical and Laboratory Standards Institute (2008) Collection, Transport and Processing of Blood Specimens for Testing Plasma-Based Coagulation Assays and Molecular Haemostasis Assays: Approved Guideline, 5th edn. CLSI: H21-A5

Antithrombin Xa (Chromogenic)

Fiche technique

UTILISATION

Le kit Antithrombin Xa (Chromogenic) est destiné à la réalisation des analyses chromogènes de l'hémostasie.

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^{1,2}. 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.

La plupart des dosages fonctionnels de l'AT-III, comme celui décrit par Odegaard *et al.*³, 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'héparine⁴, qui n'inhibe pas le facteur Xa⁵, est supprimée.

Dans le 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 chromogène spécifique du facteur Xa (étape 2). L'activité résiduelle du facteur Xa est inversement proportionnelle à la concentration en AT-III. Le kit Antithrombin Xa (Chromogenic) Helena Biosciences Europe est utilisé pour la détermination quantitative de l'activité de l'antithrombine III (AT-III) dans le plasma humain citraté par dosage chromogène.

AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS

Les réactifs du kit sont à usage diagnostique *in vitro* uniquement – NE PAS INGÉRER. Porter un équipement de protection individuelle approprié lors de la manipulation de tous les composants du kit. Consulter la fiche de données de sécurité du produit pour obtenir le lien vers les phrases de risque et les conseils de prudence le cas échéant. Éliminer les composants conformément aux églementations locales.

COMPOSITION

| Composant | Contient | Description | Préparation |
|---------------------|---|--|---|
| Factor Xa | 3 x 10 mL (REF 5502) 5 x 2 mL (REF 5507) | Chaque flacon contient du facteur Xa lyophilisé d'origine bovine. | Reconstituer chaque flacon en ajoutant: 10 mL (REF 5502) ou 2 mL (REF 5507) d'eau distillée ou désionisée. Laisser reposer 10 minutes et bien mélanger avant utilisation. |
| Factor Xa Substrate | 3 x 10 mL (REF 5502) 5 x 2 mL (REF 5507) | Chaque flacon contient du CH ₃ OCO-D-CHA-Gly-Arg-pNA-AcOH lyophilisé. | Reconstituer chaque flacon en ajoutant: 10 mL (REF 5502) ou 2 mL (REF 5507) d'eau distillée ou désionisée. Laisser reposer 10 minutes et bien mélanger avant utilisation. |
| Sample Diluent | 4 x 10 mL (REF 5502) 5 x 3 mL (REF 5507) | Chaque flacon contient de tampon concentré 5x additionné d'acide de sodium à 0,1% comme conservateur. Lorsqu'il est complètement dilué, le tampon contient Tris-HCl 0,05 M, NaCl 0,175 M, Na ₂ EDTA 7,5 mM et de l'héparine sodique à un pH de 8,4. | Réaliser une dilution 1 + 4 avec de l'eau distillée / désionisée et bien mélanger. |

Chaque kit contient une fiche technique.

MATÉRIEL NÉCESSAIRE NON FOURNI

Spectrophotomètre fonctionnant à 405 nm.

Suivant la méthode de dosage utilisée:

- REF 5185 Calibration Plasma
- Acide acétique glacial
- Bain sec ou bain-marie à *37°C
- Chronomètre de laboratoire

CONSERVATION, DURÉE DE VIE UTILE ET STABILITÉ

Les flacons non ouverts sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée s'ils sont conservés dans les conditions indiquées sur l'étiquette du kit ou du flacon.

Factor Xa Une fois reconstitué, le réactif est stable 2 mois entre *2–8°C, 1 mois à *17°C ou 2 jours à *37°C.

Factor Xa Substrate Une fois reconstitué, le réactif est stable 2 mois entre *2–8°C, 1 mois à *17°C ou 7 jours à *37°C.

Sample Diluent Conserver le tampon dilué dans une bouteille hermétiquement fermée entre *2–8°C et utiliser dans le mois suivant.

PRÉLÈVEMENT ET PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

Utiliser tout au long du prélèvement du plastique ou du verre siliconé. Mélanger 9 volumes de sang et 1 volume de citrate de sodium à 3,2% ou 3,8%. Séparer le plasma après centrifugation à 1500 x g pendant 15 minutes. Conserver le plasma entre *2–8°C ou *18–24°C. L'analyse doit être terminée dans les 4 heures suivant le prélèvement de l'échantillon ; sinon, il est possible de congeler le plasma 2 semaines à -20°C ou 6 mois à -70°C. Décongeler rapidement à *37°C avant de réaliser l'analyse. Ne pas laisser à *37°C plus de 5 minutes.

PROCÉDURE

Préparation des dilutions étalon (REF 5185), contrôle et patient:

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

A. Méthode à point de virage semi-micro

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

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

- 200 µL d'acide acétique.
- 200 µL de dilution étalon.
- 200 µL de réactif Facteur Xa.
- 200 µL de substrat Facteur Xa.
- * 200 µL d'eau (en option).

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

Si le plasma du patient est très icterique, 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.

B. Méthode cinétique

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

Dans une cuvette d'analyse:

- Ajouter 200 µL de plasma patient ou d'étalon dilué.
- Incuber 1 minute à *37°C.
- Ajouter 200 µL de réactif Facteur Xa et mélanger.
- Incuber 1 minute à *37°C.
- Ajouter 200 µL de substrat Facteur Xa.
- Mesurer le taux de variation de l'absorbance à 405 nm pendant 1 minute.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

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 Calibration Plasma Helena Biosciences Europe, REF 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:

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

LIMITES

Éviter d'utiliser des échantillons icteriques, 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.

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 valides.

Helena Biosciences Europe distribue les contrôles suivants à utiliser avec ce produit:

| | |
|----------|------------------------------|
| REF 5301 | Speciality Assayed Control N |
| REF 5302 | Speciality Assayed Control A |

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-III³.

CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCES

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

Precision

Les estimations de précision suivantes ont été observées avec un analyseur automatisé utilisant un mode de mesurage cinétique:

| Taux AT-III | Précision intra-série | | Précision inter-séries | |
|-------------|-----------------------|--------|------------------------|--------|
| | n | CV (%) | n | CV (%) |
| Normal | 20 | 1,36 | 10 | 2,34 |
| Anormal | 19 | 4,40 | 10 | 4,99 |

Sensibilité

Cette méthode de dosage doit donner une courbe d'étalonnage linéaire pour le taux d'AT-III entre 7,5-150%. 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 dépleté 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 Antithrombin Xa (Chromogenic) Helena Biosciences Europe avec d'autres kits disponibles sur le marché, réalisée sur 62 échantillons, offrant une activité d'AT-III entre 30-130%, a donné les résultats suivants:

$$y = 0.9665x + 0.0629 \quad r^2 = 0.8893$$

BIBLIOGRAPHIE

- Hirsh J *et al* (1989) Cong

