

CE BIOPHEN HEPARIN 6

Ref.Nr. 221006

Chromogene Methode zur Bestimmung der anti-Faktor Xa-Aktivität von Heparin und Heparin-analogen Antikoagulanzen

In-vitro-Diagnostikum

www.hyphen-biomed.com
155, rue d'Eragny, F 95000 Neuville-sur-Oise
Tel. +33-1-3440 6510 | Fax +33-1-3448 7236
Vertrieb: www.coachrom.com
CoaChrom Diagnostica GmbH
Stolzenhalergasse 6, A 1080 Wien
Kostenfreie Nummern für Deutschland:
Tel. 0800-24 66 33-0 | Fax 0800-24 66 33-3
Tel. +43-1-699 97 97 | Fax +43-1-699 18 97

Revision: 16/07/2010

VERWENDUNGSZWECK:

BIOPHEN Heparin 6 ist ein Test zur chromogenen Bestimmung der Plasmaspiegel von Heparin bzw. Heparin-analogen Antikoagulanzen in humanem Citratplasma mit automatisierten oder manuellen Methoden.

KLINISCHE BEDEUTUNG:

Heparin und Heparin-analogen Antikoagulanzen werden im Rahmen therapeutischer oder präventiver Indikationen eingesetzt. Die Bestimmung der Spiegel im Patientenplasma erlaubt eine Überwachung der Therapie und eine Anpassung der Dosierung.

TESTPRINZIP:

BIOPHEN Heparin 6 ist eine chromogene anti-Faktor Xa-Methode zur Bestimmung von Unfraktioniertem Heparin (UFH) und Niedermolekularem Heparin (LMWH), unter Verwendung der gleichen Kalibrationskurve.

Heparin ist ein sulfatiertes Polysaccharid mit hoher Affinität für Antithrombin. Im Komplex mit Heparin entwickelt Antithrombin eine schnell wirkende und hohe inhibitorische Aktivität gegen gerinnungsaktive Serinesterasen wie Faktor IXa, Faktor Xa und Thrombin. LMWH und Heparin-analogen Substanzen, wie z.B. Orgaran® (Danaparoid-Na), hemmen Faktor Xa besser als Thrombin. Anti-FXa-Teste sind daher die Methoden der Wahl zur Bestimmung von Heparinen, deren analogen Substanzen und der Plasma-Antithrombin vermitteln anti-Faktor Xa Aktivität von Arixtra® (Fondaparinux).

BIOPHEN Heparin 6 ist eine kinetische Methode, die auf der Hemmung einer konstanten Menge zugesetzten Faktors Xa durch das Heparin (oder anderer anti-Xa Substanzen) in der Probe in Anwesenheit von endogenem Antithrombin und anschließender Spaltung eines Faktor Xa-spezifischen chromogenen Substrates (SXA-11) durch den restlichen Faktor Xa basiert. Dabei wird der Farbstoff para-Nitroanilin (pNA) aus dem chromogenen Substrat freigesetzt. Die Menge des freigesetzten pNA korreliert mit der Faktor Xa-Restaktivität. Die Farbentwicklung, gemessen bei 405 nm, ist damit umgekehrt proportional zur Heparinkonzentration in der Probe.

AT + Heparin → [AT•Heparin]
[AT•Hep.] + [FXa (Überschuss)] → [FXa•AT•Heparin] + [FXa (Rest)]
[FXa (Rest)] + SXa-11 → Peptid + pNA

IM KIT ENTHALTENE REAGENZIEN:

Eine Testpackung BIOPHEN Heparin 6 enthält 4 Flaschen eines chromogenen Faktor Xa-Substrates und 4 Flaschen bovinen Faktor Xa:

R1: Reagenz 1:

Chromogenes Faktor Xa-Substrat (SXA-11) mit Mannitol, lyophilisiert:
4 Flaschen mit je 15 mg. Mit 6 ml Aqua dest. bzw. laut Automaten-Adaptionsprotokoll rekonstituieren.

R2: Reagenz 2:

Boviner Faktor Xa, lyophilisiert:
4 Flaschen mit je ca. 15 µg. Mit 6 ml Aqua dest. bzw. laut Automaten-Adaptionsprotokoll rekonstituieren.

Anmerkung:

- Dieser Test wurde konzipiert, um die Beeinflussung durch anti-Heparin Substanzen im Plasma, insbesondere durch PF4, zu minimieren.
- Faktor Xa wird aus bovinem Plasma, das auf die Abwesenheit infektiöser Substanzen getestet und aus BSE-freien Tieren gewonnen wurde, hergestellt. Kein Test kann jedoch mit absoluter Sicherheit die Abwesenheit infektiöser Substanzen ausschließen. Wie alle Produkte bovinen Ursprungs muss diese Faktor Xa-Präparation daher mit allen Vorsichtsmaßnahmen, die im Umgang mit potentiell infektiösem Material erforderlich sind, gehandhabt werden.
- Die bovine Faktor Xa-Konzentration wird lotspezifisch angepasst, um die korrekte Reaktivität im Test zu gewährleisten

ERFORDERLICHE MATERIALIEN, DIE NICHT IM KIT ENTHALTEN SIND:

Reagenzien:

- Aqua dest.
- 20% Essigsäure oder 2% Zitronensäure (Endpunkt-Methode).
- Physiologische Kochsalzlösung (0,9% NaCl).
- Spezifische Plasmakalibratoren mit bekannter Konzentration von UFH, LMWH, Danaparoid-Na (Orgaran®) - kalibriert gegen einen internationalen Standard (NIBSC), oder Fondaparinux (Arixtra®).
- Kontrollplasmen für LMWH, UFH, Danaparoid-Na (Orgaran®) oder Fondaparinux (Arixtra®).

Geräte:

- Spektrophotometer oder Gerinnungsautomaten zur Bestimmung chromogener Teste.
- Stoppuhr.
- Geeichte Pipetten.

LAGERUNG:

Ungeöffnete Reagenzien müssen bei 2–8 °C in der Originalverpackung gelagert werden und sind dann bis zu dem auf dem Etikett aufgedruckten Verfalldatum stabil.

REKONSTITUTION UND STABILITÄT DER REAGENZIEN:

Anmerkung: Die Rekonstitutionsvolumina können in Abhängigkeit vom verwendeten Gerinnungsgerät unterschiedlich sein. Dazu ist die spezifische Geräteadaption zu beachten.

REAGENZ 1: Faktor Xa-spezifisches chromogenes Substrat SXa-11

Den Inhalt jeder Flasche mit exakt 6,0 ml Aqua dest. rekonstituieren und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren (18-25°C).

Vor Gebrauch vorsichtig mischen.

Stabilität des rekonstituierten Substrates in der Originalflasche:

- 3 Monate bei 2-8°C.
- 7 Tage bei Raumtemperatur.
- Nicht einfrieren.

REAGENZ 2: Faktor Xa

Den Inhalt jeder Flasche mit exakt 6,0 ml Aqua dest. rekonstituieren und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren (18-25°C).

Vor Gebrauch vorsichtig mischen.

Stabilität des rekonstituierten Substrates in der Originalflasche:

- 3 Monate bei 2-8°C.
- 7 Tage bei Raumtemperatur.
- Nicht einfrieren.

Vorsichtsmaßnahmen:

Um die Stabilität zu gewährleisten, müssen die Reagenzien nach jedem Gebrauch mit der Original-Schraubkappe verschlossen werden (weiße Kappe für Faktor Xa, gelbe Kappe für SXa-11).

Die Reagenzien sind, um jegliche Kontamination während des Gebrauchs zu vermeiden, sorgfältig zu handhaben. Falls das Substrat eine Gelbfärbung aufweist, ist dies ein Zeichen von Kontamination. Die betroffene Flasche ist zu verwerfen und eine neue Flasche muss verwendet werden.

Die Inkubation der Reagenzien nach Rekonstitution ermöglicht eine Stabilisierung der Reagenzien und gewährleistet eine homogene Reaktivität.

Anmerkung:

- Die Reagenzflaschen werden unter Vakuum verschlossen. Die Verschlüsse sind vorsichtig zu entfernen, um einen Verlust von Lyophilisat beim Öffnen zu vermeiden.
- Entsprechend der verwendeten Automatenmethode kann es zu Abweichungen der Rekonstitutionsvolumina kommen. In jedem Fall müssen jedoch die festgelegten reaktiven Verhältnisse (entsprechende Reagenzkonzentrationen im Testansatz) zwischen Faktor Xa und chromogenem Substrat eingehalten werden.
- Es dürfen ausschließlich Reagenzien aus Testpackungen mit übereinstimmender Chargennummer verwendet werden. Zur Testdurchführung dürfen keine Reagenzien aus Testpackungen mit unterschiedlichen Chargennummern eingesetzt werden. Die Kombination der Reagenzien R1 und R2 ist in Bezug auf die Testcharge optimiert.

PROBENGEWINNUNG:

Blut (9 Volumenteile) wird mit großer Vorsicht in 0,109 M Citrat als Antikoagulanzen (1 Volumenteil) abgenommen, um Aktivierung und PF4-Freisetzung zu vermeiden. Die Blutabnahme erfolgt durch eine Venenpunktion, wobei die ersten Blutstropfen zu verwerfen sind. Spezifische Abnahmesysteme für Heparinbestimmungen, wie CTAD-(Citrat, Theophyllin, Adenosin und Dipyridamol) Röhrchen zur Verbesserung der Probenstabilität, können verwendet werden.

- Innerhalb 1 Stunde muss das Blut bei 3.000 g für 20 Minuten bei 18°C oder niedriger zentrifugiert werden. Das Plasma wird anschließend mit einer Plastikpipette in ein Plastikröhrchen überführt.
- Lagerung der Plasmaprobe:
 - Bis zu 2 Stunden bei 20°C
 - Bis zu 1 Monat tiefgefroren bei -20°C oder niedriger (vor Gebrauch für 15 Minuten im Wasserbad bei 37°C auftauen).

Weitere Vorschriften für die Probengewinnung, -handhabung und -lagerung sind im NCCLS/CLSI Dokument H21-A2 veröffentlicht.

TESTDURCHFÜHRUNG:

BIOPHEN Heparin 6 wurde als spezifische kinetische Methode zur Durchführung auf Gerinnungsautomaten entwickelt, kann aber auch als Endpunkt-Methode durchgeführt werden. Geräteadaptionen sind auf Anfrage erhältlich. Der Test wird bei 37°C durchgeführt, die Farbentwicklung bei 405 nm gemessen.

Um die homogene Reaktivität für UFH und LMWH zu gewährleisten, muss der Test in jedem Fall analog dem nachfolgend beschriebenen manuellen Testschema durchgeführt werden.

Manuelle Methode:

In Mikrotiterplatten oder Teströhrchen, die jeweils bei 37°C vorinkubiert wurden, wird nach folgendem Schema zugegeben:

	Mikrotiterplatte	Teströhrchen
Unverdünntes Plasma	12 µl	30 µl
Aqua dest.	36 µl	90 µl
R1: Substrat Sxa-11 vorinkubiert bei 37°C	80 µl	200 µl
<i>Mischen und für 2-5 Min. bei 37°C inkubieren, dann zugeben:</i>		
R2: Faktor Xa vorinkubiert bei 37°C	80 µl	200 µl
Mischen und bei 37°C inkubieren für exakt:	90 Sek.	120 Sek.
<i>Stoppen der Reaktion durch Zugabe von:</i>		
Zitronensäure (2%)	100 µl	500 µl
<i>Mischen und Messung der Absorption bei 405nm gegen den entsprechenden Probenleerwert.</i>		

Die gebildete Gelbfärbung ist für 2 Stunden stabil.

Ein Probenleerwert wird durch Mischen der Reagenzien in der umgekehrten Testreihenfolge erhalten, d.h. Zitronensäure (2%), Substrat Sxa-11, unverdünntes Plasma, Aqua dest., Faktor Xa. Die Absorption des Probenleerwertes bei 405 nm ist von der Absorption des entsprechenden Probenwertes abzuziehen.

Anmerkung: Falls die verwendete Methode andere Reagenzienvolumina als die oben beschriebenen erfordert, müssen die Verhältnisse der Reagenzienkonzentrationen und Reagenzienvolumina streng eingehalten werden.

KALIBRATION:

BIOPHEN Heparin 6 bietet eine homogene Reaktivität für UFH und LMWH und kann mit Biophen Heparin Calibrator (#222001) für die verschiedenen Arten der Heparine kalibriert werden (5 Konzentrationen im Bereich 0 bis ca. 1,6 IE/ml). Zur Bestimmung von Orgaran® (Danaparoid-Natrium) muss der Biophen Orgaran® Calibrator (#22201) verwendet werden (5 Konzentrationen im Bereich 0 bis ca. 1,6 IE/ml). Zur Bestimmung von Arixtra® (Fondaparinux) muss der Biophen Arixtra® Calibrator (#222501) verwendet werden (4 Konzentrationen im Bereich 0 bis ca. 1,5 µg/ml). Wenn ein spezifischer Kalibrator für UFH erforderlich ist, kann Biophen UFH Calibrator (#222301) verwendet werden.

QUALITÄTSKONTROLLE:

Die Verwendung von Qualitätskontrollplasmen ermöglicht die Validierung der Kalibrationskurve und der homogenen Reaktivität der BIOPHEN Heparin Charge von Analyse zu Analyse. Es sind verschiedene Qualitätskontrollen erhältlich, z.B.:

Biophen UFH Control (niedriger Bereich): #223101
Biophen LMWH Control (hoher Bereich): #223001
Biophen Orgaran® Control (für Na-Danaparoid): #223501
Biophen Arixtra® Control (für Fondaparinux): #224001

EINSCHRÄNKUNGEN DES TESTES:

- Aktivierung der Probe während der Blutentnahme oder Plasmagewinnung kann zur Freisetzung von Plättchenfaktor 4 führen, welcher Heparin inhibieren kann.
- Eine signifikante Beeinflussung der Heparinbestimmung durch - dem Plasma zusätzlich zugefügten - Bilirubin <0,1 mg/ml, Hämoglobin <2 mg/ml, Triglyzeride <1,25mg/ml wurde nicht beobachtet. Ein Einfluss hoher Hämoglobin- oder Triglyzeridkonzentrationen auf die Ergebnisse kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. Um eine optimale Funktion des Testes zu gewährleisten, muss die Arbeitsanweisung genau eingehalten werden.
- Bei einer AT-Konzentration in der Probe von <50% kann es zu falsch-niedrigen Messungen des Heparinspiegels kommen. Ebenso kann die AT vermittelte anti-Xa Aktivität von Arixtra® bei niedrigen AT Plasmaspiegel vermindert sein. In diesem Fall muss eine modifizierte Methode unter Verwendung einer exogenen AT-Quelle durchgeführt werden. Die Bestimmung des Patienten AT Spiegels wird empfohlen.
- Hohe Antithrombinkonzentrationen (>150%) können mit den Test interferieren und die Anwesenheit von geringen Mengen an Heparin vortäuschen.
- Falsch-niedrige Bestimmungen des Heparinspiegels und Heparin-Resistenz wurden in einigen Patienten mit Amyloidose beobachtet (6).
- Um eine optimale Funktion des Testes zu gewährleisten, müssen die Vorschriften zur Testdurchführung genau eingehalten werden.

ERGEBNISSE:

Der Gehalt an Heparin (bzw. anderer anti-Xa Substanzen) in der Probe kann direkt aus der Kalibrationskurve abgeleitet werden. Die Ergebnisse werden in Internationalen anti-Xa Einheiten/ml (IE/ml) bzw. µg/ml (Arixtra®) angegeben.

Im semilogarithmischen Maßstab ist der Test:

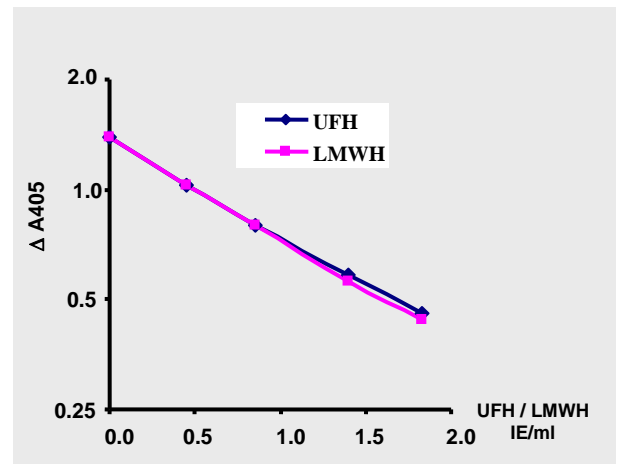
Linear bis zu 1,0 IE/ml für UFH.

Linear bis zu 2,0 IE/ml für LMWH.

Linear bis zu 1,5 µg/ml für Arixtra®.

BEISPIELKALIBRATION:

Die nachfolgend gezeigten Kalibrationskurven, die mit UFH bzw. LMWH erhalten wurden, dienen lediglich als Beispiel. Zur Ergebnisberechnung von Proben dürfen ausschließlich die für die jeweilige Analysenserie gemessenen Kalibrationskurven verwendet werden.



QUALITÄTSKONTROLLE:

Die Kalibration ist gültig wenn die damit gemessenen Konzentrationen der Qualitätskontrolle innerhalb des Vertrauensbereiches liegen.

Anmerkung: Jedes Labor kann eigene Vertrauensbereiche festlegen, entsprechend der verwendeten Testvorschriften und Geräte.

SPEZIFISCHE LEISTUNGSMERKMALE:

Die enzymatische Reaktion verläuft schnell und ermöglicht die hohe Sensitivität der Methode. Die Nachweisgrenze liegt bei 0,05 IE/ml bzw. 0,05 µg/ml.

Beispielwerte für die Reproduzierbarkeit der Methode, gemessen mit Proben, die mit UFH, LMWH oder Arixtra® versetzt wurden.

Probe	Intra-assay VK [%]	N	Inter-assay VK [%] ACL-7000	N
UFH Level 1 (0,38 IE/ml)	2,1	15	2,0	20
UFH Level 2 (0,74 IE/ml)	1,0	15	2,3	20
LMWH Level 3 (0,88 IE/ml)	0,9	15	1,5	20
LMWH Level 4 (1,32 IE/ml)	0,5	15	1,6	20
LMWH Low Level 1 (0,25 IE/ml)	2,3	15	1,9	20
LMWH Low Level 2 (0,50 IE/ml)	1,4	15	2,1	20
Probe	Intra-assay VK [%] ACL-7000	N	Inter-assay VK [%] STA-R/ACL-7000/Manuell	N
Arixtra® Level 1 (0,44 µg/ml)	3,5	20	4,4	9
Arixtra® Level 2 (1,18 µg/ml)	2,1	20	3,0	9

ERWARTETE WERTE:

Um die optimale Wirksamkeit bei gleichzeitig niedrigstem Blutungsrisiko zu erzielen, muss die Heparindosierung innerhalb des vom jeweiligen Hersteller empfohlenen therapeutischen Bereiches für die jeweilige Indikation liegen.

REFERENZEN:

- Hemker HC, Beguin S. The mode of action of heparin In-vitro and In-vivo. In: heparin and platelet polysaccharides Plenum Press, New York 221-230 (1992).
- Holm H A et al. Heparin assays and bleeding complication in deep venous thrombosis with particular reference retroperitoneal bleeding. Thromb Haemostasis 53: 278-281 (1985).
- Shannon M, Hirsch B and J. Treatment of venous thromboembolism. Thromb Haemostasis vol 82 (2): 870-877 (1999).
- Leslie B et al. Investigation of the anticoagulant mechanism of a covalent antithrombin-heparin complex J Biol Chem 52 (273): 34730-34736 (1999).
- Charles K M et al. Design synthesis and structure activity relationship of a series of arginine aldehydes factor Xa Inhibitors. Part 1: structure based on the (D)-Arg-Gly-Arg tripeptide sequence. Bioorganics Med chem Letter 10 (2000): 13-16 (1999).
- Christiansen J, Lindqvist B. Heparin resistance in amyloidosis. Acta Med Scand, 181(6): 723-4, 1967.
- Laboratory monitoring of new anticoagulants. Donna D. Castellone and Elizabeth M. VanCott, Am. J. Hematol. 85:185-187, 2010