



BIOPHEN HEPARIN 6

221006

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

In-vitro-Diagnostikum

HYPHEN BioMed

ZAC Neuville Université - 155, rue d'Eragny
Tel. +33-1-34 40 65 10, Fax: +33-1-34 48 72 36
95000 Neuville-sur-Oise - France | www.hyphen-biomed.com

Vertrieb in Deutschland: CoaChrom Diagnostica GmbH
Tel. (kostenlos) 0800-24 66 33-0, Fax (kostenlos) 0800-24 66 33-3
Vertrieb in Österreich: CoaChrom Diagnostica GmbH
Tel. +43-1-699 97 97, Fax +43-1-699 18 97
Stolzenthalerg. 6, 1080 Wien | www.coachrom.com



Revision: 21/09/2009

VERWENDUNGSZWECK:

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

KLINISCHE BEDEUTUNG:

Heparin und Heparin-analogen Antikoagulantien werden gegenwärtig 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 homogenen 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. Danaparoid-Na, hemmen Faktor Xa besser als Thrombin. Anti-FXa-Teste sind daher die Methoden der Wahl zur Bestimmung von Heparinen und deren analogen Substanzen.

BIOPHEN Heparin 6 ist eine kinetische Methode, die auf der Hemmung einer konstanten Menge zugesetzten Faktor Xa durch das Heparin 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 colyophilisiert:
4 Flaschen mit je 15 mg (mit 6 ml dest. Aqua dest. rekonstituieren).

R2: Reagenz 2:

Boviner Faktor Xa, lyophilisiert:
4 Flaschen mit je ca. 15 µg (mit 6 ml Aqua dest. zu 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 bovines 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).
- Plasmakalibratoren mit bekannter Konzentration von UFH, LMWH oder Danaparoid-Na, die ordnungsgemäß gegen einen Internationalen Standard (NIBSC) validiert sind.
- Kontrollplasmen für LMWH, UFH oder Danaparoid-Na.

Geräte:

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

LAGERUNG:

Ungeöffnete Reagenzien müssen bei 2–8 °C in der Originalverpackung gelagert werden. Sie 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 erhöhen, 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 sorgfältig zu handhaben, um jegliche Kontamination während des Gebrauchs zu vermeiden. 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 Flaschen von **R1** und **R2** 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 der Reagenzien von den empfohlenen Rekonstitutionsvolumina kommen. In jedem Fall müssen jedoch die festgelegten reaktiven Verhältnisse (entsprechende Reagenzkonzentrationen im Testansatz) zwischen Faktor Xa und chromogenem Substrat genau 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 Antikoagulant (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 Dokument H21-A2 veröffentlicht.

TESTDURCHFÜHRUNG:

Der Testkit BIOPHEN Heparin 6 wurde spezifisch als kinetische Methode zur Durchführung auf Gerinnungsautomaten entwickelt, kann aber auch als Endpunkt-Methode durchgeführt werden. Geräteadaptionen sind auf Anfrage erhältlich. Der Test wird bei **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 zum nachfolgend beschriebenen manuellen Testschema durchgeführt werden.

Manuelle Methode:

In Mikrotiterplatten oder Teströhrchen, die jeweils **bei 37°C** präinkubiert sind, wird nach folgendem Schema zugegeben:

	Mikrotiterplatte	Teströhrchen
Unverdünntes Plasma	12 µl	30 µl
Aqua dest.	36 µl	90 µl
R1: Substrat SXa-11 Präinkubiert bei 37°C	80 µl	200 µl
<i>Mischen und für 2-5 min. bei 37°C inkubieren, dann zugeben:</i>		
R2: Faktor Xa Präinkubiert bei 37°C	80 µl	200 µl
Mischen und bei 37°C inkubieren für exakt:	90 sec.	120 sec.
<i>Stoppen der Reaktion durch Zugabe von:</i>		
Zitronensäure (20g/l)	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.

Der Probenleerwert wird durch Mischen der Reagenzien in der umgekehrten Testreihenfolge erhalten, d.h. Zitronensäure (20g/l), Substrat SXa-11, unverdünntes Plasma, Aqua dest., Faktor Xa. Die Absorption des Probenleerwertes **bei 405 nm** ist von der Absorption des entsprechenden Probenwertes abziehen.

Anmerkung: Falls die verwendete Methode andere Reagenzienvolumina als die oben beschriebenen erfordert, müssen die Verhältnisse der Reagenzienkonzentrationen und Reagenzienvolumina streng eingehalten werden, um eine homogene Reaktivität für UFH und LMWH zu gewährleisten.

KALIBRATION:

BIOPHEN Heparin 6 ermöglicht 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 IU/ml).

Zur Bestimmung von Orgaran® (Danaparoid-Natrium) muss der spezifische Kalibrator **Biophen Orgaran® Calibrator (#222201)** verwendet werden (5 Konzentrationen im Bereich 0 bis ca. 1,6 IU/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 des BIOPHEN Heparin Testes für UFH und LMWH, von Analyse zu Analyse, bei Verwendung der gleichen Reagenzchargen. 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

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 des Testes durch Bilirubin <0,1 mg/ml, Hämoglobin <2 mg/ml und zum Plasma zusätzlich hinzugefügte Triglyzeride von <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 Bestimmungen des Heparinspiegels kommen, hervorgerufen durch Mangel von AT. In diesem Fall muss eine modifizierte Methode unter Verwendung einer exogenen AT-Quelle durchgeführt werden.
- 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 Heparinspiegel in der Probe kann direkt aus der Kalibrationskurve abgeleitet werden. Die Ergebnisse werden in Internationalen anti-Xa Einheiten/mL (IU/mL) angegeben.

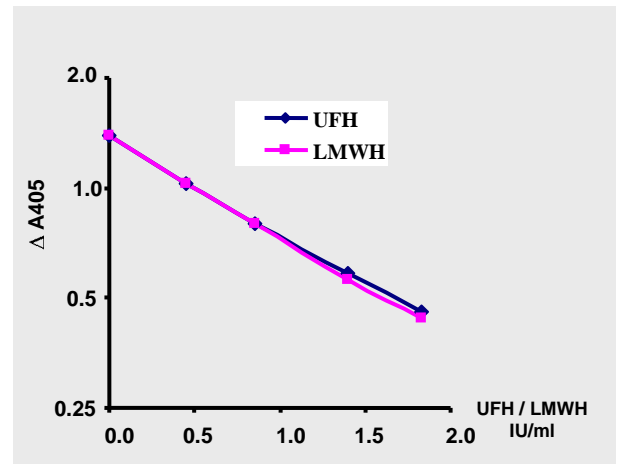
Im semilogarithmischen Maßstab ist der Test:

Linear bis zu 1,0 IU/ml für UFH.

Linear bis zu 2,0 IU/ml für LMWH.

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 dieser Methode zur Heparinbestimmung. Die Nachweisgrenze der Methode liegt bei 0,05 IU/ml.

Beispielwerte für die Reproduzierbarkeit der Methode, gemessen mit Proben, die mit UFH oder LMWH versetzt wurden (Gerät: ACL-7000, IL).

Probe	Intra-assay VK [%]	N	Inter-assay VK [%]	N
UFH Level 1 (0,38 IU/ml)	2,1	15	2,0	20
UFH Level 2 (0,74 IU/ml)	1,0	15	2,3	20
LMWH Level 3 (0,88 IU/ml)	0,9	15	1,5	20
LMWH Level 4 (1,32 IU/ml)	0,5	15	1,6	20
LMWH Low Level 1 (0,25 IU/ml)	2,3	15	1,9	20
LMWH Low Level 2 (0,50 IU/ml)	1,4	15	2,1	20

ERWARTETE WERTE:

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

REFERENZEN:

1. 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).
2. 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).
3. Shannon M, Hirsh B and J. Treatment of venous thromboembolism. Thromb Haemostasis vol 82 (2): 870-877 (1999).
4. Leslie B et al. Investigation of the anticoagulant mechanism of a covalent antithrombin-heparin complex J Biol Chem 52 (273): 34730-34736 (1999).
5. 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).
6. Christiansen J, Lindqvist B. Heparin resistance in amyloidosis. Acta Med Scand, 181(6) : 723-4, 1967.