

# BIOPHEN®

## HEPARIN ANTI-Xa (2 Stufen)

### # 221010

Chromogener anti-Faktor Xa 2-Stufen Test zur Bestimmung von Heparin in Plasma oder gereinigten Systemen gemäß Pharmakopöe (EP, USP) und FDA

Nur für *In-vitro*-Forschungszwecke

[www.hyphen-biomed.com](http://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](http://www.coachrom.com)  
CoaChrom Diagnostica GmbH  
Stolzenthalergasse 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: 26/02/2010

#### VERWENDUNGSZWECK:

Chromogener 2-Stufen Test zur Bestimmung von Heparin (UFH, LMWH) in einem Konzentrationsbereich von 0,005 bis 0,1 IE/ml\* oder von 0 bis 1 IE/ml (bei einer Probenverdünnung von 1:10). Mit dieser Methode kann Heparin sowohl in Humanplasma als auch in gereinigten Systemen bestimmt werden.

#### TESTPRINZIP:

Der BIOPHEN® Heparin anti-Xa (2 Stufen) Test ist eine chromogene anti-Xa Methode um Heparin in Plasma oder gereinigten Systemen zu bestimmen.

Heparin ist ein sulfatiertes Polysaccharid mit hoher Affinität für Antithrombin. Der Heparin-Antithrombin Komplex hat eine schnell wirkende und hohe inhibitorische Aktivität gegen gerinnungsaktive Serinesterasen wie Faktor IXa, Faktor Xa und Thrombin (Faktor IIa). LMWH und Heparin-analoga Substanzen, wie z.B. Danaparoid-Na, weisen eine weiter erhöhte anti-Xa als anti-IIa Hemmung auf. Pentasaccharide (z.B. Arixtra®) hemmen Faktor Xa noch spezifischer. Anti-FXa-Teste sind daher die Methode der Wahl zur Bestimmung von Heparin und deren analogen Substanzen.

Die chromogene 2-Stufen Methode basiert auf der Hemmung einer konstanten Menge Faktor Xa in Anwesenheit von exogenem Antithrombin durch das Heparin in der Probe (Stufe 1). Anschließend erfolgt die Spaltung eines Faktor Xa spezifischen, chromogenen Substrates CS11(65) durch den restlichen Faktor Xa. Dabei wird aus dem chromogenen Substrat der Farbstoff para-Nitroanilin (pNA) freigesetzt, die Menge des freigesetzten pNA korreliert mit der Faktor Xa-Restaktivität. Die Farbentwicklung, gemessen bei 405 nm, ist daher umgekehrt proportional zur Heparinkonzentration der Probe.

AT + Heparin → [AT·Heparin]

[AT·Hep.] + [FXa (Überschuss)] → [FXa·AT·Heparin] + [FXa (Rest)]

[FXa (Rest)] + Substrat → Peptid + pNA (Gelbfärbung)

#### IM KIT ENTHALTENEN REAGENZIEN:

Ein Testkit Heparin Anti-Xa (2-Stufen) enthält 2 Flaschen humanes Antithrombin (AT III), 2 Flaschen bovines Faktor Xa, 2 Flaschen chromogenes Faktor Xa-Substrat und 4 Flaschen Puffer.

#### *Reagenz 1 (R1): AT III*

Humanes Antithrombin (AT III), lyophilisiert:

2 Flaschen mit je etwa 5 IE/ml. Mit 1 ml Aqua dest. rekonstituieren, vor Gebrauch 1:5 mit Puffer verdünnen, um eine Lösung mit 1 IE/ml zu erhalten.

#### *Reagenz 2 (R2): Faktor Xa*

Gereinigter, bovines Faktor Xa, lyophilisiert. Die bovine Faktor Xa-Aktivität wird, um im Test eine optimale Reaktivität zu gewährleisten, lotspezifisch angepasst.

2 Flaschen mit je etwa 40 µg (bzw. 90 nkat bei Verwendung von CS-11(22) unter optimierten Bedingungen). Mit 1 ml Aqua dest. rekonstituieren, vor Gebrauch 1:5 mit Puffer verdünnen, um eine Lösung mit 8 µg/ml bzw. 18 nkat/ml zu erhalten.

#### *Reagenz 3 (R3): Chromogenes Substrat*

Chromogenes Substrat CS-11(65), spezifisch für Faktor Xa, lyophilisiert:

2 Flaschen mit je 4 mg (etwa 6 µmol). Mit 5 ml Aqua dest. Rekonstituieren, um eine Lösung mit 1,2 mM zu erhalten.

#### *Reagenz 4 (R4): Puffer*

Puffer: Tris 0,05 M, NaCl 0,175 M, EDTA 0,0075 M pH 8,4. Enthält 0,1% PEG und Natriumazid als Konservierungsmittel.

4 Flasche mit je 25 ml, gebrauchsfertig.

**Warnung:** Der Puffer enthält Natriumazid. Natriumazid (0,9 g/l) kann mit Blei oder Kupferarmaturen unter Bildung hochexplorier Metallazide reagieren. Bei Entsorgung der Lösung in den Abfluss muss mit großen Mengen Wasser nachgespült werden.

• Antithrombin wird aus Humanplasma hergestellt, das auf die Abwesenheit von HIV Antikörper, HBs Ag und HCV Antikörper getestet und negativ bewertet wurde. Kein Test kann jedoch mit absoluter Sicherheit die Abwesenheit infektiöser Substanzen ausschließen. Wie alle Produkte humanen Ursprungs muss diese Faktor Xa-Präparation daher mit allen Vorsichtsmaßnahmen, die im Umgang mit potentiell infektiösem Material erforderlich sind, gehandhabt werden.

• 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 Kombination der Reagenzien R1 und R2 sind auf die jeweilige Kitcharge optimiert.

#### 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.

Stabilitätsstudien bei 30°C zeigen, dass die Reagenzien ohne Beeinträchtigung bei Raumtemperatur verschickt werden können.

#### REKONSTITUTION UND STABILITÄT DER REAGENZIEN:

##### REAGENZ 1: Humanes Antithrombin (AT III)

Den Inhalt jeder Flasche mit exakt 1 ml Aqua dest. rekonstituieren und bis zur vollständigen Auflösung gut durchmischen (Vortex). Für 30 Minuten bei Raumtemperatur (18-25°C) stehen lassen und von Zeit zu Zeit schütteln. Unmittelbar vor Gebrauch mit R4 Puffer 1:5 verdünnen (wird der gesamte Inhalt einer Flasche benötigt, müssen 4 ml Puffer zugegeben werden). Vor Gebrauch vorsichtig mischen.

Stabilität des rekonstituierten Antithrombin in der Originalflasche (unter Vermeidung von Kontamination und Verdunstung):

- 15 Tage bei 2-8°C.
- 7 Tage bei Raumtemperatur (18-25°C).
- 2 Monate bei -20°C oder darunter (in einem Wasserbad bei 37°C für mindestens 15 Minuten auftauen)

Verdünntes Antithrombin ist 8 Stunden bei Raumtemperatur (18-25°C) oder bei 2-8°C stabil.

##### REAGENZ 2: Faktor Xa

Den Inhalt jeder Flasche mit exakt 1 ml Aqua dest. rekonstituieren und bis zur vollständigen Auflösung des Inhalts gut durchmischen (Vortex). Für 30 Minuten bei Raumtemperatur (18-25°C) stehen lassen und von Zeit zu Zeit schütteln. Unmittelbar vor Gebrauch mit R4 Puffer 1:5 verdünnen (wird der gesamte Inhalt einer Flasche benötigt, müssen 4 ml Puffer zugegeben werden). Vor Gebrauch vorsichtig mischen.

Stabilität des rekonstituierten Faktor Xa in der Originalflasche (unter Vermeidung von Kontamination und Verdunstung):

- 15 Tage bei 2-8°C.
- 7 Tage bei Raumtemperatur (18-25°C).
- 2 Monate bei -20°C oder darunter (in einem Wasserbad bei 37°C für mindestens 15 Minuten auftauen)

Verdünnter Faktor Xa ist 8 Stunden bei Raumtemperatur (18-25°C) oder bei 2-8°C stabil.

##### REAGENZ 3: Faktor Xa spezifisches chromogenes Substrat

Den Inhalt jeder Flasche mit exakt 5 ml Aqua dest. rekonstituieren und bis zur vollständigen Auflösung des Inhalts gut durchmischen (Vortex). Für 30 Minuten bei Raumtemperatur (18-25°C) stehen lassen und von Zeit zu Zeit schütteln. Vor Gebrauch vorsichtig mischen und darauf achten, dass das Lyophilisat vollständig gelöst ist.

Stabilität des rekonstituierten Substrates in der Originalflasche (unter Vermeidung von Kontamination und Verdunstung):

- 2 Monate bei 2-8°C.
- 7 Tage bei Raumtemperatur (18-25°C).
- 2 Monate bei -20°C oder darunter (in einem Wasserbad bei 37°C für mindestens 15 Minuten auftauen)

##### REAGENZ 4: Puffer pH 8.4

Gebrauchsfertig. Vor Gebrauch durchmischen.

Stabilität nach dem Öffnen unter Vermeidung jeglicher Kontamination:

- 2 Monate bei 2-8°C.
- 7 Tage bei Raumtemperatur (18-25°C).

#### Vorsichtsmaßnahmen:

- Um die Stabilität zu gewährleisten, müssen die Reagenzien nach jedem Gebrauch mit der Original-Schraubkappe verschlossen werden.
- 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.
- Um jegliche Kontamination während des Gebrauchs zu vermeiden, sind die Reagenzien sorgfältig zu handhaben.
- Die Flaschen der Reagenzien R1, R2 und R3 werden unter Vakuum verschlossen. Die Gummiverschlüsse 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 kommen. In jedem Fall müssen jedoch die festgelegten reaktiven Verhältnisse (entsprechende Reagenzkonzentrationen im Testansatz) 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 ist in Bezug auf die Testcharge optimiert.

## ERFORDERLICHE, NICHT IM KIT ENTHALTENE, MATERIALIEN:

### Reagenzien:

- Aqua dest.
- 20% Essigsäure oder 2% Zitronensäure (Endpunkt-Methode).
- Normaler Citratplasmapool (hergestellt unter Vermeidung von Plättchenaktivierung), zur Erstellung einer Heparinkalibrationskurve.
- Heparin Referenzmaterial (BIOPHEN® Heparin Kalibrator Ref.Nr. 222001, BIOPHEN® UFH Kalibrator Ref.Nr. 222301, USP, EP oder Internationale Standards von NIBSC, Interne Referenzmaterialien, etc.)

### Geräte:

- Spektrophotometer oder Gerinnungsautomaten zur Analyse chromogener Tests.
- Stoppuhr.
- Geeichte Pipetten.

## PROBENGEWINNUNG

Gereinigte Systeme: Heparinpräparation wird mit R4 Puffer in den Arbeitsbereich des Testes (vorzugsweise 0,01 bis 0,1 IE/ml) verdünnt.

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

- Innerhalb 1 Stunde muss das Blut mit 3.000 g für 20 Minuten bei 18°C oder niedriger zentrifugiert werden. Das Plasma wird anschließend mit einer Kunststoffpipette in ein Kunststoffröhrchen überführt.
- Lagerung der Plasmaproben:
  - 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.

## KALIBRATION:

Die Kalibrationskurve wird mit einem kommerziell verfügbaren Kalibrator erstellt, alternativ kann ein interner Kalibrator verwendet werden.

Bei Verwendung von Heparin Referenzmaterialien werden die Kalibrationsverdünnungen mit normalem Citratplasmapool (für Plasmaproben) oder in R4 Puffer (für gereinigte Systeme) wie folgt hergestellt:

Heparin (IE/ml):	0,0	0,25	0,50	0,75	1,0
------------------	-----	------	------	------	-----

Um Analysen in Plasma zu kalibrieren, können auch kommerziell verfügbare Kalibratoren verwendet werden: BIOPHEN® Heparin Kalibrator Ref.Nr. 222001 und BIOPHEN® UFH Kalibrator Ref.Nr. 222301.

Vor Gebrauch werden die Kalibrationsverdünnungen 1:10 (0,1 ml + 0,9 ml) mit Puffer R4 verdünnt.

Die Kalibratorlösungen sollten unmittelbar vor Beginn der Messung hergestellt werden.

## TESTDURCHFÜHRUNG:

Der BIOPHEN® Heparin Anti-Xa 2-Stufen Test wurde spezifisch als kinetische Methode zur Durchführung auf Gerinnungsautomaten entwickelt, kann aber auch manuell als Endpunktmethode durchgeführt werden.

Der Test wird bei 37°C durchgeführt, die Farbentwicklung bei 405 nm gemessen.

Um eine homogene Reaktivität 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
Kalibrator oder Testplasma, verdünnt (1:10 oder entsprechend höhere Verdünnung)	40 µl*	200 µl
Antithrombin (R1)	40 µl*	200 µl
Mischen und für 2 Minuten bei 37°C inkubieren, dann zugeben:		
Faktor Xa (R2), präinkubiert bei 37°C	40 µl*	200 µl
Mischen und für exakt 2 Minuten bei 37°C inkubieren (Stufe 1), dann zugeben:		
Chromogenes Substrat (R3), präinkubiert bei 37°C	40 µl*	200 µl
Mischen und für exakt 2 Minuten bei 37°C inkubieren (Stufe 2)		
Stoppen der Reaktion durch Zugabe von:		
Zitronensäure (20g/l)	80 µl**	400 µl
<i>Mischen und Messung der Absorption bei 405 nm (A<sub>405</sub>) gegen den entsprechenden Probenleerwert.</i>		

(oder \*50 µl und \*\*100µl)

Die entstandene Gelbfärbung ist für 2 Stunden stabil.

Der Probenleerwert wird durch Mischen der Reagenzien in der umgekehrten Reihenfolge erhalten, d.h. Zitronensäure, Chromogenes Substrat, Faktor Xa, Antithrombin und Probe. Die Absorption des Probenleerwertes bei 405 nm ist von der Absorption des entsprechenden Probenwertes abzuziehen.

### Automatisierte Methode:

Applikationen für die gängigsten Analyseautomaten (STA-R, BCS, ACL etc.) sind auf Anfrage erhältlich. Je nach Automat können die Rekonstitutionsvolumina abweichen. In jedem Fall müssen jedoch die festgelegten reaktiven Verhältnisse (entsprechende Reagenzkonzentrationen im Testansatz) genau eingehalten werden.

### Anmerkung:

- Falls die verwendete Methode andere Reagenzienvolumina als die oben beschriebenen erfordert, müssen die Verhältnisse der Reagenzkonzentration und Reagenzvolumenta genau eingehalten werden, um eine homogene Reaktivität zu gewährleisten.
- Die Inkubationszeit der 1.Stufe muss genau eingehalten werden, weil Heparin die Antithrombin Aktivität katalysiert (5). Wird die Inkubationszeit für die Automatisierung geändert, müssen die Testparameter angepasst werden und in der Applikationsvorschrift vermerkt werden.

## QUALITÄTSKONTROLLE:

Die Verwendung von Qualitätskontrollplasmen ermöglicht bei Verwendung der gleichen Reagenzcharge die Analyse-zu-Analyse Validierung der Kalibrationskurve. Es sind verschiedene Kontrollplasmen verfügbar:

BIOPHEN® UFH Kontrolle: Ref.Nr. 223101

BIOPHEN® LMWH Kontrolle: Ref.Nr. 223001

BIOPHEN® LMWH Kontrolle Niedrig: Ref.Nr. 223701

Anmerkung: Eine neue Kalibrationskurve muss bei Wechsel der Testkitcharge, größeren Wartungsarbeiten am Messgerät und wenn die gemessenen Werte außerhalb des zu erwartenden Bereiches liegen, erstellt werden.

## ERGEBNISSE:

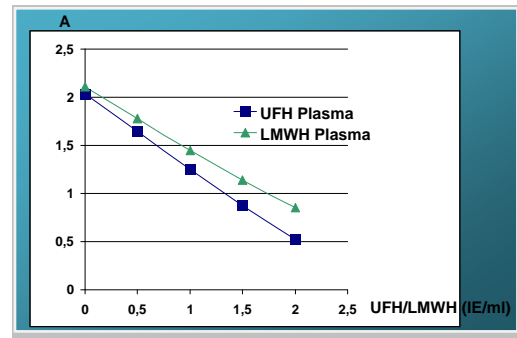
Auf Millimeterpapier wird die Heparin Konzentration (0 bis 0,1 IE/ml) auf der Abszisse (x-Achse) gegen die Absorption A<sub>405</sub> auf der Ordinate (y-Achse) aufgetragen. Alternativ kann eine Statistik-Software verwendet werden. Die Kalibration ist gültig bei: r<sup>2</sup> ≥ 0,98

Bei der manuellen Teströhrchen-Methode liegen die Werte für A<sub>405</sub> üblicherweise bei etwa 1,80 (±0,20) für eine Heparinkonzentration von 0 IE/ml und bei etwa 0,40 (±0,20) für eine Heparinkonzentration von 0,1 IE/ml. Bei der manuellen Methode in der Mikrotiterplatte liegen die Werte für A<sub>405</sub> üblicherweise bei etwa 1,20 (±0,20) für eine Heparinkonzentration von 0 IE/ml und bei etwa 0,30 (±0,20) für eine Heparinkonzentration von 0,1 IE/ml. Bei der Verwendung von Analyseautomaten können die Absorptionswerte je nach Gerät abweichen.

Der Heparinspiegel in der Probe kann direkt von der erstellten Kalibrationskurve abgeleitet werden. Die gemessene Probenkonzentration muss mit dem jeweiligen Verdünnungsfaktor multipliziert werden (z.B. x10 für Plasma).

## BEISPIELKALIBRATION:

Die nachfolgend gezeigten, mit UFH bzw. LMWH erstellten, Kalibrationskurven dienen lediglich als Beispiel. Zur Ergebnisberechnung von Proben darf ausschließlich die für die jeweilige Analysenserie gemessene Kalibrationskurve verwendet werden.



## LEISTUNGSMERKMALE:

Messbereich: 0,005 bis 0,1 IE/ml in der Testlösung (0 bis 1 IE/ml in Plasma).

Nachweisgrenze: etwa 0,005 IE/ml in der Testlösung.

Standardisierung: Internationales (NIBSC) oder Internes Referenzmaterial für Unfraktioniertes Heparin (UFH) oder Niedermolekulares Heparin (LMWH). Präparationen der Pharmakopoeia, gespik in Plasma. Um eine optimale Funktion des Testes zu gewährleisten, müssen die Vorschriften zur Testdurchführung genau eingehalten werden.

## EIGENSCHAFTEN:

Der BIOPHEN® Heparin anti-Xa 2-Stufen Test ist eine 2-Stufen-Methode um die Heparinkonzentration in Humanplasma oder gereinigten Systemen genau und sensitiv zu messen. Testplasma muss verdünnt im Test eingesetzt werden. Dieser Test entspricht den Pharmakopoeia und FDA Richtlinien zur Analyse von Heparinpräparaten.

## PROTOKOLLVARIANTE:

Wird ein höherer Messbereich benötigt, kann die Standardverdünnung (d=1:10) angepasst werden. Für einen Messbereich von 0 bis 2 IE/ml wird eine 1:20 Verdünnung verwendet. Die gemessenen Heparinkonzentrationen müssen dann mit dem jeweiligen Verdünnungsfaktor multipliziert werden (x2 für 1:20 Verdünnung).

## REFERENZEN

1. USP Pharmacopoeia Forum Vol. 35 (2) [Mar.-Apr.2009]. Proposed IRA Heparin Sodium or Heparin Sodium Injection Anti-Factor Xa activity
2. Hirsh J et al, Heparin : Mechanism of Action, Pharmacokinetics, Dosing Considerations, Monitoring, Efficacy, and Safety. Chest, 102 (4 Suppl), 337-351, 1992.
3. Lyon SG et al, Modification of an Amidolytic Heparin Assay to Express Protein-Bound Heparin and to Correct for the effect of Antithrombin III Concentration. Thromb Haemost. 58(3), 884-887, 1987.
4. Harenberg J et al, Anti-Factor Xa Determination in Blood: A New Method for Controlling Heparin Therapy. Semin Thromb Haemost 19 (suppl1), 79-85, 1993.
5. Beeck H et al, Measurement of antithrombin activity by thrombin-based and factor Xa-based chromogenic assays. Blood Coagul Fibrinolysis, 11(2), 127-135, 2000.
6. Holmer et al, Studies of the Mechanism of the Rate-Enhancing Effect of Heparin on the Thrombin-Antithrombin III Reaction. Eur. J. Biochem., 93, 1-5, 1979.
7. USP Statement on Heparin Potency Unit Assignment and Harmonization with the International Standard of Unfractionated Heparin (21 Aug 2009)

\* Für UFH, 1 Internationale Einheit entspricht 1 USP Einheit (7)