

CE BIOPHEN HEPARIN (LRT)

Ref.Nr. 221011 (4 x 7,5 ml)

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

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

Version: 16/07/2010

VERWENDUNGSZWECK:

BIOPHEN Heparin (LRT-„Liquid Reagent Technology“) ist ein Test zur chromogenen Bestimmung der Plasmaspiegel von Heparin bzw. Heparin-analogen Antikoagulanzen in humanem Citratplasma mit automatisierten oder manuellen Methoden. Alle Reagenzien liegen gebrauchsfertig in flüssiger Form vor.

KLINISCHE BEDEUTUNG:

Heparin und Heparin-analoga Antikoagulanzen 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 (LRT) 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-analoga Substanzen, wie z.B. Na-Danaparoid, hemmen Faktor Xa besser als Thrombin. Anti-FXa-Teste sind daher die Methoden der Wahl zur Bestimmung von Heparinen, analoger Substanzen und auch der Plasma-Antithrombin vermittelten anti-FXa Aktivität von Arixtra® (Fondaparinux).

BIOPHEN Heparin (LRT) ist eine kinetische Methode, die auf der Hemmung einer konstanten Menge zugesetzten Faktor Xa durch das Heparin (bzw. anderer anti-FXa 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:

R1: Reagenz 1:

Chromogenes Faktor Xa-Substrat (Sxa-11), Flüssigreagenz.

4 Flaschen mit je 7,5 ml.

R2: Reagenz 2:

Boviner Faktor Xa, Flüssigreagenz.

4 Flaschen mit je 7,5 ml.

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.
- Enthält als Konservierungsmittel Natriumazid (<1g/l), welches mit Blei- bzw. Kupferarmaturen unter Bildung hochexplosiver Metallazide reagieren kann. Bei Entsorgung der Lösung in den Abzug muss mit großen Mengen Wasser nachgespült werden.
- Um eine optimale Reaktivität im Test zu gewährleisten, wird die bovine Faktor Xa-Konzentration lotspezifisch angepasst.
- Reagenzien aus unterschiedlichen Kitchargen nicht miteinander mischen.

ERFORDERLICHE MATERIALIEN, DIE NICHT IM KIT ENTHALTEN SIND:

Reagenzien:

- Aqua dest.
- 20% Essigsäure oder 2% Zitronensäure (Endpunkt-Methode).
- Physiologische Kochsalzlösung (0,9% NaCl).
- Kalibratoren mit bekannter Konzentration an UFH, LMWH, Na-Danaparoid oder Arixtra® (Fondaparinux), möglichst gegen einen internationalen Standard (NIBSC) validiert.
- Kontrollplasmen für LMWH, UFH, Organan® oder Arixtra®.

Geräte:

- Photometer 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.

STABILITÄT DER REAGENZIEN:

Anmerkung: Die gerätespezifische Adaptionsanleitung ist zu beachten.

Reagenz 1:

Faktor Xa-spezifisches chrom. Substrat Sxa-11 (Braune Flasche)

Gebrauchsfertiges Flüssigreagenz.

Um eine homogene Reaktivität zu gewährleisten, vor Verwendung 30 Minuten bei Raumtemperatur (18-25 °C) inkubieren und anschließend leicht durchmischen.

Stabilität des in der Originalflasche gelagerten, geöffneten Substrates unter der Voraussetzung, dass dieses nicht kontaminiert wurde und keine Verdunstung erfolgte:

- 6 Monate bei 2-8°C.
- 14 Tage bei Raumtemperatur (18-25°C).
- Nicht einfrieren.

Reagenz 2:

Faktor Xa (Klare Flasche)

Gebrauchsfertiges Flüssigreagenz.

Um eine homogene Reaktivität zu gewährleisten, vor Verwendung 30 Minuten bei Raumtemperatur (18-25 °C) inkubieren und anschließend leicht durchmischen.

Stabilität des in der Originalflasche gelagerten, geöffneten Faktor Xa unter der Voraussetzung, dass dieses nicht kontaminiert wurde und keine Verdunstung erfolgte:

- 6 Monate bei 2-8°C.
- 14 Tage bei Raumtemperatur (18-25°C).
- Nicht einfrieren.

Vorsichtsmaßnahmen: Um die Stabilität zu gewährleisten, müssen die Reagenzien nach jedem Gebrauch mit der Original-Schraubkappe verschlossen werden.

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 bei Raumtemperatur ermöglicht eine Stabilisierung der Reagenzien und gewährleistet eine homogene Reaktivität.

Anmerkung:

- Entsprechend der verwendeten Automatenmethode müssen in jedem Fall die festgelegten reaktiven Verhältnisse (entsprechende Reagenzkonzentrationen im Testansatz) zwischen Faktor Xa und chromogenem Substrat genau eingehalten werden.
- Es dürfen ausschließlich Reagenzien aus Packungen mit übereinstimmender Chargennummer verwendet werden. Die Kombination der Reagenzien R1 und R2 ist in Bezug auf die Testcharge optimiert.

PROBENGEWINNUNG

Blut (9 Volumenteile) wird, um Aktivierung und PF4-Freisetzung zu vermeiden, vorsichtig in 0,109 M Citrat als Antikoagulanzen (1 Volumenteil) abgenommen. Die Blutabnahme erfolgt durch Venenpunktion, wobei die ersten Blutstropfen zu verwerfen sind. Spezifische Abnahmesysteme für Heparinbestimmungen, wie CTAD-(Citrat, Theophyllin, Adenosin und Dipyridanol) Röhren 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 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 GEHT oder NCCLS/CLSI Dokument H21-A2 veröffentlicht.

TESTDURCHFÜHRUNG:

BIOPHEN Heparin (LRT) 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 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 vorinkubiert wurden, wird nach folgendem Schema zugegeben:

	Mikrotiterplatte	Teströhrchen
Unverdünntes Plasma	15 µl	50 µl
Physiolog. Kochsalzlösung	15 µl	50 µl
R1: Substrat SXa-11 vorinkubiert bei 37°C	75 µl	250 µl
<i>Mischen und für 2 Minuten bei 37°C inkubieren, dann zugeben:</i>		
R2 : Faktor Xa vorinkubiert bei 37°C	75 µl	250 µl
Mischen und bei 37°C inkubieren für exakt:	60 Sek.	60 Sek.
<i>Stoppen der Reaktion durch Zugabe von:</i>		
Zitronensäure (20g/l)	100 µl	350 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, Physiologische Kochsalzlösung, Faktor Xa. Die Absorption des Probenleerwertes bei 405 nm ist von der Absorption des entsprechenden Probenwertes abzuziehen.

Automatisierte Methoden:

Adaptionsanleitungen für verschiedene Gerinnungsautomaten sind auf Anfrage verfügbar.

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.
- Bei hoch-lipämischen, ikterischen oder hämolysierten Plasmen und solchen mit einer starken Färbung wird ein Probenleerwert empfohlen.

KALIBRATION:

BIOPHEN Heparin (LRT) ermöglicht homogene Reaktivität für UFH bzw. LMWH und kann mit **BIOPHEN Heparin Kalibrator (Ref.Nr. 222001)** für die verschiedenen Heparine kalibriert werden (5 Konzentrationen im Bereich 0 bis ca. 1,6 IE/ml). Zur Bestimmung von Orgaran® (Na-Danaparoid) muss der spezifische Kalibrator **BIOPHEN Orgaran® Kalibrator (Ref.Nr. 222001)** (5 Konzentrationen im Bereich 0 bis ca. 1,6 IE/ml) und für Arixtra® (Fondaparinux) **BIOPHEN Arixtra® Kalibrator (Ref.Nr. 222501)** (4 Konzentrationen im Bereich 0 bis ca. 1,5 µg/ml) verwendet werden. Wenn ein spezifischer Kalibrator für UFH erforderlich ist, kann **BIOPHEN UFH Kalibrator (Ref.Nr. 222301)** verwendet werden.

QUALITÄTSKONTROLLE:

Die Verwendung von Qualitätskontrollplasmen ermöglicht die Validierung der Kalibrationskurve und der homogenen Reaktivität des BIOPHEN Heparin (LRT) Testes für UFH und LMWH, von Analyse zu Analyse, bei Verwendung der gleichen Reagenzchargen. Es sind verschiedene Qualitätskontrollen erhältlich, z.B.:

BIOPHEN UFH Kontrolle (niedriger Bereich):	Ref.Nr. 223101
BIOPHEN LMWH Kontrolle (hoher Bereich):	Ref.Nr. 223001
BIOPHEN Orgaran® (Na-Danaparoid) Kontrolle:	Ref.Nr. 223501
BIOPHEN Arixtra® (Fondaparinux) Kontrolle:	Ref.Nr. 224001

EINSCHRÄNKUNGEN DES TESTES:

- Aktivierung der Probe während der Blutentnahme oder Plasmagewinnung kann zur Freisetzung von Plättchenfaktor 4 führen, welcher Heparin inhibieren kann.
- Eine Beeinflussung der Heparinbestimmung durch Bilirubin <0,1 mg/ml, Hämoglobin <2 mg/ml und zum Plasma zusätzlich hinzugefügte Triglyzeride von <1,25 mg/ml wurde nicht beobachtet. Der Einfluss hoher Hämoglobin- oder Triglyzeridkonzentrationen auf die Ergebnisse kann jedoch nicht völlig ausgeschlossen werden.
- Plasmaproben mit einer Antithrombin (AT) Konzentration von <50% können zu falsch-niedrigen Heparinergebnissen führen, auch Arixtra® Spiegel können dadurch zu niedrig angezeigt werden. In diesem Fall muss eine modifizierte Methode unter Verwendung einer exogenen AT-Quelle durchgeführt werden. Die zusätzliche Bestimmung von AT kann hilfreich sein.
- Hohe AT Werte (>150%) können zu leicht erhöhten Ergebnissen führen.
- Falsch-niedrige Bestimmungen des Heparinspiegels und Heparin-Resistenz wurden bei einigen Patienten mit Amyloidose beobachtet (6).
- Wird eine gemeinsame Kalibrationskurve für LMWH und UFH verwendet, sollte diese mit den entsprechenden LMWH/UFH Kontrollplasmen überprüft werden.

- Um eine optimale Funktion des Testes zu gewährleisten, müssen die Vorschriften zur Testdurchführung genau eingehalten werden.

ERGEBNISSE:

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

Im semilogarithmischen Maßstab ist der Test:

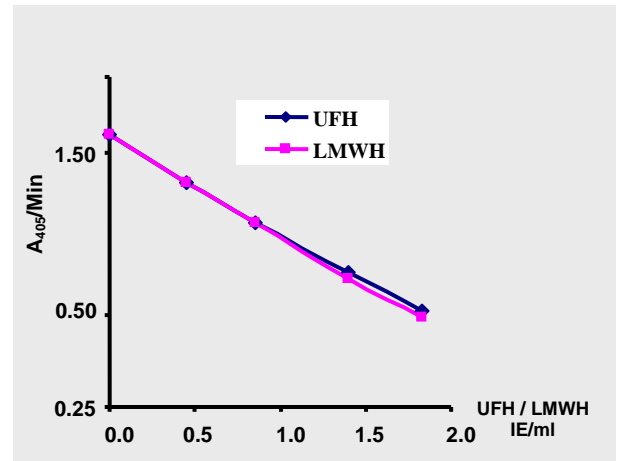
Linear bis zu 1,0 IE/ml für UFH.

Linear bis zu 2,0 IE/ml für LMWH.

Linear bis zu 1,5 µg/ml für Arixtra®.

BEISPIEL FÜR EINE KALIBRATIONS-KURVE:

Die nachfolgend gezeigten Kalibrationskurven, die mit UFH bzw. LMWH auf STA-R 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:

Bei jeder Testserie ist eine Qualitätskontrolle (mit unterschiedlichen Werten) zu inkludieren. 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. Jedes Labor kann, entsprechend der verwendeten Testvorschriften und Geräte, eigene Vertrauensbereiche festlegen.

SPEZIFISCHE LEISTUNGSMERKMALE:

Die enzymatische Reaktion verläuft schnell und ermöglicht die hohe Sensitivität dieser Methode. Die Nachweisgrenze liegt bei 0,05 IE/ml (bzw. 0,05 µg/ml bei Arixtra®). Beispielwerte für die Reproduzierbarkeit der Methode, gemessen mit UFH und LMWH versetzten Proben (Gerät: STA-R, Stago Diagnostica):

Probe	Intra-assay VK%	N	Inter-assay VK%	N
UFH Level 1 (0,21 IE/ml)	8,6	10	8,8	10
UFH Level 2 (0,47 IE/ml)	2,8	10	2,1	10
LMWH Level 3 (0,77 IE/ml)	2,5	10	1,7	10
LMWH Level 4 (1,18 IE/ml)	1,4	10	3,1	8

BIOPHEN Heparin (LRT) zeigt eine gute Korrelation mit BIOPHEN Heparin (STA-R):
 $N = 98$ $Y = 0,985X - 0,031$ $r^2 = 0,991$

ERWARTETE WERTE:

Um die optimale Wirksamkeit bei gleichzeitig niedrigem 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 Haemostas* 53: 278-281 (1985).
3. Shannon M, Hirsh B and J. Treatment of venous thromboembolism. *Thromb Haemostas* 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.
7. Laboratory monitoring of new anticoagulants", Donna D.Castellone, and Elizabeth M.VanCott, *Am.J.Hematol.*85:185-187,2010.