

BIOPHEN™

Heparin Anti-IIa (2-Stufen)

Art.Nr. 220005

Chromogener Anti-Faktor IIa 2-Stufen-Test zur Bestimmung von Heparin in Plasma oder gereinigten Systemen gemäß Pharmacopoeia (USP, EP)

Nur für Forschungszwecke,
nicht zur Verwendung als Diagnostikum



Vertrieb und Support:
CoaChrom Diagnostica GmbH
www.coachrom.com | info@coachrom.com
Tel. +43-1-236 222 1 | Fax +43-1-236 222 111
Kostenfreie Nummern für Deutschland:
Tel. 0800-24 66 33-0 | Fax 0800-24 66 33-3

VERWENDUNGSZWECK:

Der BIOPHEN™ Heparin Anti-IIa-Kit ist ein chromogener 2-Stufen-Test zur Bestimmung von Heparin (UFH, LMWH) mit automatisierten oder manuellen Methoden. Diese Methode dient ausschließlich dazu, Heparin in humanem Citratplasma oder in gereinigten Systemen zu bestimmen. **Der Testkit ist nur für Forschungszwecke und nicht für die Diagnose von Patienten zugelassen.**

ZUSAMMENFASSUNG:

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). Niedermolekulares Heparin (LMWH) und Heparin-analoge Substanzen, wie z.B. Danaparoid-Natrium, weisen eine stärker ausgeprägte Anti-Xa- als Anti-IIa-Hemmung auf, wohingegen unfraktioniertes Heparin (UFH) Thrombin und andere Serinesterasen effektiv hemmt. Anti-IIa-Tests sind die richtige Methode zur Bestimmung der Anti-IIa-Aktivität von großen Heparin-Molekülen¹.

Dieser Heparin-Test ist ein Anti-IIa 2-Stufen-Test zur genauen und sensitiven Bestimmung von Heparin-Konzentrationen in Plasma oder gereinigten Systemen. Die Probe ist vor der Analyse zu verdünnen. Gereinigtes humanes Thrombin (Faktor IIa), das im Test verwendet wird, ist hauptsächlich in der α -Form vorhanden (erhalten durch direkte Aktivierung von Prothrombin). In dieser Form weist es bei äquivalenter chromogener Aktivität eine höhere gerinnungsfördernde Reaktivität auf als in der β - oder γ -Form. Die Antithrombin- und Thrombin (Faktor IIa)-Reagenzien werden mit spezifischen Puffern gemäß US- und Europäischer Pharmacopoeia vorverdünnt³.

TESTPRINZIP:

Die chromogene 2-Stufen-Methode des BIOPHEN™ Heparin Anti-IIa-Kits basiert auf der Hemmung einer konstanten Menge Thrombin in Anwesenheit von exogenem Antithrombin durch das Heparin in der Probe (Stufe 1). Anschließend erfolgt die Spaltung eines Thrombin-spezifischen, chromogenen Substrates CS-01(38) durch das restliche Thrombin (Stufe 2). Dabei wird aus dem chromogenen Substrat der Farbstoff para-Nitroanilin freigesetzt, die Menge des freigesetzten pNA korreliert mit der Thrombin-Restaktivität. Die Farbentwicklung, gemessen bei 405 nm, ist daher umgekehrt proportional zur Heparinkonzentration der Probe.

Heparin + AT → [AT-Hep.]

[AT-Hep.] + [FIIa (Überschuss)] → [FIIa-AT-Hep.] + [FIIa (Rest)]

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

IM KIT ENTHALTENEN REAGENZIEN:

Reagenz 1 (R1): AT III

Humanes Antithrombin (AT III), lyophilisiert, ca. 1,25 IE/mL pro Flasche. Enthält BSA.

2 Flaschen mit je 1 mL

Reagenz 2 (R2): Thrombin (Faktor IIa)

Gereinigtes, humanes Thrombin, hauptsächlich in der α -Form, lyophilisiert, ca. 120 NIH (oder IE) pro Flasche (z.B. 150 nkat bei Verwendung von CS-01(38) unter optimierten Bedingungen).

2 Flaschen mit je 1 mL

Reagenz 3 (R3): Chromogenes Substrat

Chromogenes Substrat CS-01(38), spezifisch für Thrombin, lyophilisiert, ca. 6,25 mg pro Flasche.

2 Flaschen mit je 1 mL

ANMERKUNGEN UND WARNHINWEISE:

- Alle Produkte biologischen Ursprungs müssen mit den erforderlichen Vorsichtsmaßnahmen und als potentiell infektiös behandelt 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.
- Bei der Entsorgung sind die lokalen Entsorgungsrichtlinien zu befolgen.
- Es dürfen ausschließlich Reagenzien aus Packungen mit übereinstimmender Chargennummer verwendet werden. Die Kombination der Reagenzien ist in Bezug auf die jeweilige Charge optimiert.
- Die Reagenzien sind sorgfältig zu behandeln, um jegliche Kontamination während der Verwendung zu vermeiden. Um Verdunstung der Reagenzien während der Verwendung soweit wie möglich zu vermeiden, ist die Verdunstungsfläche so gering wie möglich zu halten. Verdunstung verringert die Reagenzstabilität in Analysenautomaten.
- Das zur Herstellung des humanen Thrombins und AT III verwendete Humanplasma wurde auf die Abwesenheit von HIV-Antikörpern, Hbs Ag und HCV-Antikörpern getestet. Das zur Herstellung des BSA verwendete bovine Plasma wurde auf die Abwesenheit infektiöser Substanzen getestet und aus BSE-freien Tieren gewonnen.
- Um die Stabilität zu gewährleisten, müssen die Reagenzflaschen nach jedem Gebrauch mit der Original-Schraubkappe verschlossen werden.
- Stabilitätsstudien für 3 Wochen bei 30°C haben gezeigt, dass die Packungen ohne Beeinträchtigung bei Raumtemperatur versendet werden können.
- Bei lipämischem, ikterischem oder hämolysiertem Plasma, oder bei unüblicher Färbung ist ein Leerwert mitzuführen.
- Bei der kinetischen Methode ist ΔOD 405nm anstatt OD 405nm zu verwenden.
- α -Thrombin weist bei äquivalenter chromogener Aktivität eine im Vergleich zu anderen Thrombin-Formen höhere koagulatorische Aktivität auf. NIH ist eine zur Angabe der Gerinnung verwendete Einheit. Die Thrombin-Konzentration ist zwecks Reaktivität und Linearität für die jeweilige Kitcharge optimiert.
- Zur *in-vitro*-Diagnostik

R2: H315: Ruft Hautirritationen hervor.
H319: Ruft schwere Augenirritationen hervor.

VORBEREITUNG UND STABILITÄT DER REAGENZIEN:

Die Reagenzflaschen sind unter Vakuum verschlossen. Die Gummistopfen sind vorsichtig zu öffnen, um einen Verlust an Reagenz zu vermeiden.

Reagenz 1 (R1): AT III,

Reagenz 2 (R2): Humanes Thrombin (Faktor IIa) und

Reagenz 3 (R3): Thrombin-spezifisches chromogenes Substrat

Den Inhalt einer Flasche mit exakt 1 mL aqua dest. rekonstituieren und bis zur vollständigen Auflösung gut durchmischen. Für 30 Minuten bei Raumtemperatur (18-25°C) inkubieren und gelegentlich schütteln.

Anschließend unmittelbar vor Gebrauch 1:5 mit dem für das zu testende Heparin geeigneten Puffer verdünnen (siehe unten stehende Tabelle; wird der gesamte Inhalt einer Flasche benötigt, müssen 4 mL Puffer zu 1 mL Reagenz zugegeben werden). Den Inhalt vor jedem Gebrauch homogenisieren.

Stabilität der rekonstituierten, in der Originalflasche gelagerten Reagenzien (unter Vermeidung von Kontamination und Verdunstung):

- 15 Tage bei 2-8°C.
- 4 Tage bei Raumtemperatur (18-25°C).
- 6 Monate bei $\leq -20^\circ\text{C}$.

*Kann einmalig gefroren und aufgetaut werden (so schnell wie möglich einfrieren). Bei 37°C auftauen, wobei die Dauer an die Plasmavolumina anzupassen ist. Die Stabilität des aufgetauten Reagenzes ist unter den Arbeitsbedingungen des jeweiligen Labors zu prüfen.

Die Stabilität der verdünnten Reagenzien muss unter den jeweiligen Laborbedingungen überprüft werden.

Gemessenes Heparin	Verdünnung des Reagenz		Menge an Puffer (für 1 mL Reagenz)		Verwendeter Puffer	
	LMWH	UFH	LMWH	UFH	LMWH	UFH
R1	1:5	1:5	4 mL	4 mL	AR005L	AR030K / AR031K
R2	1:5	1:5	4 mL	4 mL	AR005L	AR030K / AR031K
R3	1:5	1:5	4 mL	4 mL	AR029K	aqua dest.

LAGERUNG:

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

ERFORDERLICHE MATERIALIEN, DIE NICHT IM KIT ENTHALTEN SIND:

Reagenzien:

- Aqua dest.
- 20% Essigsäure oder 2% Zitronensäure (Endpunkt-Methode).
- Spezifische Puffer wie z.B.:

Produktbezeichnung	Art.Nr.
Tris-EDTA-NaCl-PEG, pH 8,4	AR030K
Tris-EDTA-NaCl-BSA, pH 8,4	AR031K
Tris-NaCl-BSA, pH 7,4	AR005L
Tris-NaCl, pH 7,4	AR028K
Tris-EDTA-NaCl, pH 8,4	AR029K

- Kalibrations- und Kontrollplasmen mit bekannter Konzentration des zu messenden Heparins. Für die Bestimmung in Plasma können die folgenden Produkte verwendet werden:

Produktbezeichnung	Art.Nr.
BIOPHEN UFH Kontrollplasmen*	223101
BIOPHEN UFH Kalibrationsplasmen*	222301

* Plasmen mit bekannter Anti-Xa-Aktivität.

- Internationales Referenzmaterial gemäß USP bzw. EP oder interne Referenzmaterialien, spezifisch für das zu bestimmende Heparin

Geräte:

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

PROBENGEWINNING

Die Gewinnung und Lagerung der Proben hat gemäß aktueller lokaler Vorschriften zu erfolgen.

Proben: Humanes Plasma mit Tri-Natrium Citrat als Antikoagulant.

Blutabnahme: Blut (9 Volumenteile) wird vorsichtig in 0,109 M Citrat als Antikoagulant (1 Volumenteil) abgenommen. Die Blutabnahme erfolgt durch Venenpunktion. Spezifische Abnahmeröhrchen für die Testung von unfraktioniertem Heparin, z.B. CTAD (Citrat, Theophyllin, Adenosin und Dipyridamol)-Röhrchen können genutzt werden. Das erste Röhrchen ist zu verwerfen.

Zentrifugation: Die Zentrifugation sollte aufgrund einer möglichen Neutralisierung von Heparin durch Plättchenfaktor-4 innerhalb von 1 Stunde nach Blutabnahme bei Citrat bzw. innerhalb von 4 Stunden nach Blutentnahme mit CTAD erfolgen. Die Herstellung von plättchenarmem Plasma hat gemäß einem validierten, laborspezifischen Verfahren zu erfolgen, z.B. durch Zentrifugation bei Raumtemperatur (18-25°C) für 15 Minuten bei 2500g. Das Plasma wird anschließend in ein Kunststoffröhrchen überführt.

Lagerung der Plasmaproben bis zu 4.5:

- 4 Stunden bei Raumtemperatur (18-25°C).
- 1 Monat tiefgefroren bei -20°C oder
- 18 Monate bei -70°C

Gefrorene Plasmaproben sollten bei 37°C aufgetaut, anschließend behutsam gemischt und dann sofort getestet werden. Niederschläge sind durch gründliches Mischen sofort nach dem Auftauen und vor dem Testen zu resuspendieren.

TESTDURCHFÜHRUNG:

Der BIOPHEN™ Heparin Anti-IIa-Kit 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.

Automatisierte Methoden: Adaptionsanleitungen für Gerinnungsautomaten sind auf Anfrage erhältlich. Die Besonderheiten der jeweiligen Anwendung und spezifische Warnhinweise für den jeweiligen Automaten sind zu beachten.

Testmethode:

1. Die Kalibratoren und Kontrollen sind anhand deren Inserts zu rekonstituieren. Die Kalibratoren sollten mit spezifischen Puffern (für das zu messende Heparin) wie in der unten stehenden Tabelle verdünnt werden, um den Kalibrationsbereich zu erhalten:

Konzentration LMWH (IE/mL)	0,135	0,25	0,50	0,75	1,00
LMWH-Lösung mit 1 IE/mL	135 µl	250 µl	500 µl	750 µl	1 mL
Spezifischer Puffer	865 µl	750 µl	500 µl	250 µl	-

Konzentration UFH (IE/mL)	0,135	0,25	0,50	0,75	1,00
UFH-Lösung mit 1 IE/mL	135 µl	250 µl	500 µl	750 µl	1 mL
Spezifischer Puffer	865 µl	750 µl	500 µl	250 µl	-

Vorverdünnung analog zu Proben und Kontrollen:

	Verdünnung		Spezifischer Puffer	
	LMWH	UFH	LMWH	UFH
Kalibratoren	1:25	1:25	AR005L (EP) oder AR028K (USP)	AR030K oder AR031K

Um Analysen in Plasma zu kalibrieren, können auch kommerziell verfügbare Kalibrationsplasmen verwendet werden (BIOPHEN UFH Kalibrationsplasmen, Art.Nr. 222301). Um eine optimale Testleistung zu gewährleisten, sollten die Kalibratorlösungen unmittelbar vor Beginn der Messung zu erstellen.

2. Die Proben und Kontrollen sind mit den spezifischen Puffern wie in der unten stehenden Tabelle zu verdünnen:

Probe	Art.Nr.	Verdünnung	Spezifischer Puffer
LMWH Kontrollplasmen	-	1:25	AR005L (EP) oder AR028K (USP)
BIOPHEN UFH Kontrollplasmen	223101	1:25	AR030K oder AR031K
LMWH Proben	-	1:25	AR005L (EP) oder AR028K (USP)
UFH Proben	-	1:25	AR030K oder AR031K

Die Kalibrationskurve ist zu erstellen und mittels Qualitätskontrollen zu überprüfen. Verdünnte Proben sollten innerhalb von 2 Stunden getestet werden, wenn sie bei Raumtemperatur gelagert werden (18-25°C). Bitte beachten Sie, dass die exakte Konzentration von Kalibratoren und Kontrollen für jede Charge auf einem der Packung beigelegten Dokument angegeben ist.

3. In Mikrotiterplatten oder Kunststoff-Teströhrchen, die jeweils bei 37°C präinkubiert werden, wird nach folgendem Schema zugegeben:

	Mikrotiterplatte	Teströhrchen
Probe, Kalibrator oder Kontrolle (verdünnt)	40 µL	200 µL
R1: Humanes Antithrombin, präinkubiert bei 37°C	40 µL	200 µL
Mischen und für 2 Minuten bei 37°C inkubieren, dann zugeben:		
R2: Humanes Thrombin, präinkubiert bei 37°C	40 µL	200 µL
Mischen und für exakt 2 Minuten bei 37°C inkubieren, dann zugeben:		
R3: Chromogenes Substrat, präinkubiert bei 37°C	40 µL	200 µL
Mischen und bei 37°C inkubieren für exakt	2 Min.	90 Sek.
Stoppen der Reaktion durch Zugabe von:		
Zitronensäure (2%)*	80 µL	400 µL
Mischen und Messung der Absorption bei 405nm gegen den entsprechenden Probenleerwert.		

*Oder Essigsäure (20%)

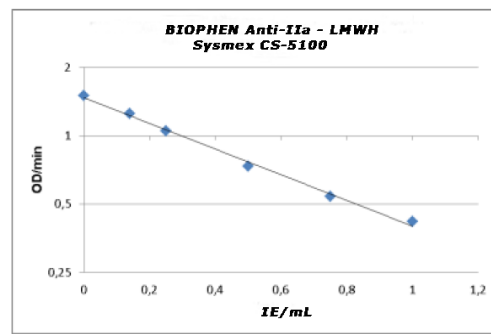
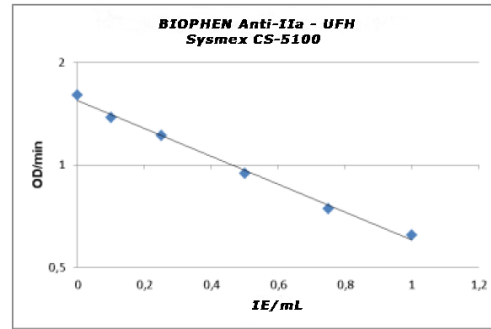
Die gebildete Gelbfärbung ist 2 Stunden stabil. Der Probenleerwert wird durch Mischen der Reagenzien in der umgekehrten Testreihenfolge erhalten, d.h. Zitronensäure (2%), R3, R2, R1, verdünnte Probe. Die Absorption des Probenleerwertes bei 405 nm ist von der Absorption des entsprechenden Probenwertes abzuziehen.

Falls die verwendete Methode andere Reagenzvolumenta als die oben beschriebenen erfordert, müssen die Verhältnisse der Reagenzkonzentrationen und Reagenzvolumenta genau eingehalten werden, um eine optimale Testleistung zu gewährleisten. Der Anwender ist für die Validierung jeglicher Änderungen und deren Auswirkungen auf die Ergebnisse verantwortlich.

KALIBRATION:

Der Test kann für die Messung von LMWH, UFH und ihren Analoga kalibriert werden. Spezielle Kalibratoren und Kontrollen, die den dynamischen Bereich des Tests abdecken, sind bei HYPHEN BioMed erhältlich (siehe Abschnitt ERFORDERLICHE MATERIALIEN, DIE NICHT IM KIT ENTHALTEN SIND) und können für die Erstellung der Kalibrationskurve verwendet werden.

Die nachfolgend gezeigten Kalibrationskurven (Sysmex® CS-Serie) dienen lediglich als Beispiel. Zur Ergebnisberechnung von Proben dürfen ausschließlich die für die jeweilige Analysenserie gemessenen Kalibrationskurven verwendet werden.



QUALITÄTSKONTROLLE:

Die Verwendung von Qualitätskontrollplasmen ermöglicht bei Verwendung der gleichen Reagenzcharge die Validierung der Kalibrationskurve und der homogenen Reaktivität des Tests von Analyse zu Analyse. Gemäß guter Laborpraxis ist bei jeder Testserie eine Qualitätskontrolle zu inkludieren, um die generierten Ergebnisse zu überprüfen. Zumindest bei Chargenwechsel, größeren Wartungsarbeiten am Analysenautomaten oder wenn die Kontrollen außerhalb des Vertrauensbereiches liegen, muss eine Neukalibration erfolgen. Jedes Labor sollte die Richtigkeit der Zielwerte und Akzeptanzbereiche unter den eigenen Testbedingungen überprüfen.

ERGEBNISSE:

- Bei der manuellen Endpunktmethode wird die Heparin-Konzentration auf der x-Achse (Abszisse / Lin) gegen die korrespondierende Absorption (A405) auf der y-Achse (Ordinate) aufgetragen.
- Wenn die Standardverdünnung verwendet wird, kann die Heparin-Konzentration in der Probe direkt von der Kalibrationskurve abgeleitet werden.
- Die Ergebnisse werden für UFH und LMWH in Internationalen Einheiten/mL (IE/mL) angegeben.
- Wird ein abweichender Verdünnungsfaktor verwendet, so ist die gemessene Konzentration ist mit dem verwendeten Verdünnungsfaktor zu multiplizieren.

Die erhaltenen Ergebnisse dürfen nur zu Forschungszwecken und nicht für die Diagnose bei Patienten verwendet werden.

EINSCHRÄNKUNGEN DES TESTES:

- Um eine optimale Testleistung zu gewährleisten und die Spezifikationen zu erfüllen, sollten die technischen Anweisungen von HYPHEN BioMed sorgsam beachtet werden. Für die Validierung jeglicher Änderungen dieser Anweisungen ist das Labor verantwortlich.
- Jegliches Reagenz mit unüblicher Erscheinung oder Anzeichen von Kontamination muss verworfen werden. Jegliche verdächtige Proben oder jene mit Anzeichen für Aktivierung müssen verworfen werden. Plasmen, die Gerinnsel oder Anzeichen für Kontaminationen aufweisen, sind zu verworfen.
- Wird ein höherer Messbereich für Heparin benötigt, kann die Standardverdünnung (d=1:25) entsprechend angepasst werden. Zum Beispiel ist dann für einen Messbereich von 0 bis 2 IE/mL eine Verdünnung 1:50 (d.h. d/2) oder für einen Messbereich von 0 bis 4 IE/mL eine Verdünnung von 1:100 (d.h. d/4) zu verwenden. Die gemessenen Heparin-Konzentrationen müssen in diesem Fall mit dem jeweiligen Verdünnungsfaktor multipliziert werden.
- Volumina und Inkubationszeiten wurden für eine leichtere Handhabung und Automatisierung der Methode aufeinander abgestimmt, entsprechen aber den durch die Pharmacopoeia empfohlenen Angaben.
- Der Verdünnungspuffer für das LMWH-Protokoll (Art.Nr. AR028K) enthält gemäß USP kein BSA. Bei einer sehr hohen Verdünnung erhöht die Zugabe von BSA die Robustheit der Ergebnisse.

REFERENZEN:

1. Van Putten J et al. Automated spectrophotometric heparin assays. Comparison of methods. Haemostasis, 14, 195-204, 1984.
2. USP40, effective May 1, 2017.
3. Ph. Eur., 9th Edition, effective January 1, 2017.
4. Woodhams B. et al. Stability of coagulation proteins in frozen plasma. Blood coagulation and Fibrinolysis. 2001
5. Mauge L. and Alhenc-Gelas M. Stabilité pré-analytique des paramètres de la coagulation: revue des données disponibles. Ann Biol Clin. 2014.

SYMBOLS:

Verwendete Symbole und Zeichen sind in der ISO-Norm 15223-1 gelistet. Das der Packung beiliegende Zeichenerklärungs-Blatt ist zu beachten.