

**BIOPHEN HEPARIN 3****REF 221003****R1 R2 3 x 3 ml****Měření Heparinu a Heparinu podobných antikoagulačních látek za užití anti Xa chromogenní metody.**

Revize: 06/2018

POUŽITÍ:

BIOPHEN Heparin 3 souprava je chromogenní test pro měření koncentrace heparinu a heparinu podobných antikoagulačních v lidské citrátové plazmě za užití automatizovaných nebo manuálních anti-Xa metod.

SOUHRN:

Heparin a heparinu podobné antikoagulační látky jsou v současnosti užívány v terapeutických a preventivních indikacích. Stanovení koncentrace heparinu v pacientské plazmě umožňuje monitorování terapie a úpravu dávek léku.

Biophen Heparin 3 je chromogenní anti-Xa metoda vyvinutá pro stanovení nefrakcionovaného heparinu (UHF) a nízkomolekulárního heparinu (LMWH) za užití identické kalibrační křivky.

Heparin je sulfátový polysacharid s vysokou afinitou k antitrombinu. Po vytvoření komplexu s heparinem antitrombin získá silnou a rychlou inhibiční aktivitu pro serinové proteázy: IXa, Xa, XIa, XIIa a trombin^{1,2}. LMWH a heparinová analoga, jako Danaparoid, inhibují efektivněji FXa než trombin. Anti-Xa testy jsou tedy metodou volby pro měření heparinu a jejich analogů. Jsou též užitečné pro určení anti-Xa aktivity Orgaranu® (danaparoid sodný), Arixtry® (Fondaparinux), zprostředkované AT obsaženým v plazmě vzorku.

PRINCIP TESTU:

Biophen Heparin 3 je kinetická metoda založená na inhibici konstantního množství FXa testovaným heparinem (nebo jinými látkami s anti-Xa efektem) v přítomnosti endogenního antitrombinu a hydrolyzou FXa specifického substrátu (SXA-11) zbylým FXa. je odštěpen ze substrátu pNA. Množství uvolněného pNA³ je úměrné zbytkové aktivitě FXa. Je zde nepřímá úměra mezi koncentrací heparinu ve vzorku a vytvořeným zbarvením měřeným při 405 nm.

Heparin + AT → [AT Hep.]

[AT Hep.] + [FXa (nadbytek)] → [FXa-AT-Hep.] + [zbylý FXa]

[FXa (zbylý)] + SXa-11 → Peptide + pNA

REAGENCIE:

Rekonstituční objemy jsou mírně odlišné dle druhu analyzátoru. Podrobnosti uvedeny v aplikačním protokolu konkrétního přístroje.

R1 Reagent 1:

Chromogenní substrát specifický k faktoru Xa (SXA-11), lyofilizovaný v přítomnosti mannitolu.

3 lahvičky po 3 ml (7,5 mg/lahvičku)

R2 Reagent 2:

Bovinní faktor Xa, obsahující dextran sulfát⁴, lyofilizovaný.

3 lahvičky po 3 ml (7,5 µg/lahvičku)

UPOZORNĚNÍ A VAROVÁNÍ:

- S každým produktem biologického původu musí být zacházeno jako s potenciálně infekčním.
- Pokud substrát zežlutne, je to známka kontaminace a nesmí být použit pro analýzu.
- Likvidace nepoužitých reagensů se musí řídit lokálními předpisy o nakládání s odpadem.
- Užívejte pouze reagensy ze souprav stejných šarží. Neužívejte reagensy ze souprav s rozdílnými šaržemi v jednom testu.
- S reagensy musí být zacházeno s opatrností, aby nedošlo ke kontaminaci během používání. Snižte co nejvíce možnost odparu reagensů zmenšením kontaktního povrchu reagensů se vzduchem. Odpařování reagensů snižuje stabilitu na palubě přístroje.
- Pro zajištění optimální stability uzavírejte lahvičky jejich vlastními zátkami.
- Stabilitní studie trvající 3 týdny při teplotě 30°C ukázaly, že reagensy mohou být přepravovány za pokojové teploty bez poškození.
- Bovinní FXa byl připraven z plazmy, která byla testována na nepřítomnost infekčních agens a odebrána od zvířat bez BSE. Nicméně, žádný test nemůže zcela vyloučit přítomnost infekčních agens. Jako jiné produkty

- stejného původu, musí být FXa užit se všemi bezpečnostními opatřeními pro zacházení s potenciálně infekčním materiálem.
- Koncentrace FXa je regulována v každé šarži tak, aby bylo dosaženo dobré reaktivity testu.
- Provedte blank pro vyšetření vzorků lipemických, ikterických nebo hemolytických. Obdobně i tehdy, pokud má plazma neobvyklou barvu.
- Pokud je použita kinetická metoda, užívejte ΔOD405 nm místo OD405 nm.
- Pro použití In Vitro.

R2

H315: Způsobuje podráždění kůže.

H319: Způsobuje vážné podráždění očí.

H335: Může způsobit podráždění dýchacích cest.

PŘÍPRAVA A STABILITA REAGENCIE:

Lahvičky jsou uzavřeny pod vakuem. Zátku odstraňujte opatrně, aby nedošlo ke ztrátě lyofilizátu.

Rekonstituční objemy se mohou lišit podle používaného koagulometru. Odkazujeme na specifické přístrojové adaptace.

Pro manuální metodu:**R1 Reagent 1: Substrát specifický pro FXa (SXA-11)**

Každou lahvičku rekonstituujte přesně 3 ml destilované vody. Důkladně promíchejte pro správné rozpuštění lyofilizátu. Inkubujte v pokojové teplotě (18-25°C) 30 minut za občasného promíchání, dokud nedojde k úplnému rozpuštění obsahu lahvičky.

Promíchejte před každým použitím.

Stabilita rekonstituované reagensy, pokud je zabráněno kontaminaci a odpařování a je uchovávána v originální lahvičce:

- 3 měsíce v 2-8°C.**
- 7 dní za pokojové teploty (18-25°C).**
- Nemrazit.**

R2**Reagent 2: Faktor Xa**

Každou lahvičku rekonstituujte přesně 3 ml destilované vody. Důkladně promíchejte pro správné rozpuštění lyofilizátu. Inkubujte v pokojové teplotě (18-25°C) 30 minut za občasného promíchání, dokud nedojde k úplnému rozpuštění obsahu lahvičky. Před použitím opatrně promíchejte.

Stabilita rekonstituované reagensy, pokud je zabráněno kontaminaci a odpařování a je uchovávána v originální lahvičce:

- 3 měsíce v 2-8°C.**
- 7 dní v pokojové teplotě (18-25°C).**
- Nemrazit.**

SKLADOVÁNÍ:

Neotevřené reagensy musí být skladovány v teplotě 2-8°C, v jejich originálních obalech. Pak jsou stabilní až do data expirace vytištěného na obalu.

REAGENCIE POTŘEBNÉ, V KITU NEPŘÍTOMNÉ:**Reagensy:**

Destilovaná voda

Kyselina octová (20%) nebo 2% kyselina citrónová (pro end point metody)

Fyziologický roztok (0,9% NaCl)

Specifické plazmatické kalibrátory validované proti mezinárodním standardům (NIBSC) se známou koncentrací – např.:

	UFH	LMWH	Orgaran®	Arixtra®
Kalibrátor	222301	222001	222201	222501
Kontrola	223101	223001		
	224101	223801		
	223901	223701	223501	224001
		224301		
				224401

Materiál:

Spektrofotometr nebo automatický přístroj pro chromogenní testy.

Stopky, kalibrované pipety, plastové zkumavky, mikrotitrační destičky.

ODBĚR VZORKU:

Příprava a skladování vzorků musí být provedeno ve shodě s lokálními předpisy (např. v USA CLSI dokument H21-A5)

- **Vzorek:**

Lidská plazma získaná z citrátové plně krve.

- **Odběr vzorku:**

Krev (9 dílů) musí být odebrána do 0,109 M citrátového antikoagulantia (1 díl), přímou venepunkcí s velkou opatrností – pro zabránění aktivace a uvolnění PF4, který je potenciálním inhibítorem heparinu. Je možné použít i speciální odběrové zkumavky CTAD (citrát, Theophylline, Adenosine, Dipyridamol). První odebraná zkumavka by měla být znehodnocena.

- **Centrifugace:**

Pro monitorování UFH může dojít při delším prodlení k uvolnění PF4. Proto by u takového vzorku měla být centrifugace provedena do 1 hodiny po a do 4 hodin po odběru při použití zkumavek CTAD (Citrát, Theophylline, Adenosin a Dipyridamol) při jeho skladování za pokojové teploty.

Použijte validovanou metodu centrifugace, kterou si ověříte kvalitu získané plazmy chudé na destičky. Například 15 minut při 2500g za pokojové teploty (18-25°C). Užívejte zkumavky a pipety z materiálu, který neaktivuje koagulaci.

- **Skladování plazmy:**

- 2 hodiny při pokojové teplotě (18-25°C)
- 1 měsíc při -20°C
- 18 měsíců při -70°C⁵

Rozmrazení vzorků by mělo být rychlé, při 37°C. Vzorek poté promíchejte a testujte neprodleně. Případný precipitát před testováním rozmíchejte.

PROVEDENÍ:

Biophen Heparin 3 souprava je speciálně určena pro kinetickou metodu, automatické koagulometry a také může být použita jako end point metoda.

Adaptace pro koagulometry je přístupná na vyžádání. Test je měřen při 37°C a rozvoj změny barvy je měřen při 405 nm. Podle toho, která metoda je užitá, test musí být proveden ve shodě s doporučeným schématem pro manuální metodu, aby se dodržela homogenní reaktivita UHF a LMWH.

Automatizované metody:

Adaptace pro různé systémy jsou dostupné na vyžádání. Odkazujeme na specifické aplikace pro různé analyzátoři.

Manuální metoda:

Provedení v mikrotitrační destičce nebo zkumavce, inkubované v 37°C.

	Mikrotitrační destička	Zkumavka
Neředěná plazma	12 µl	30 µl
Destilovaná voda	36 µl	90 µl
R1 Substrát SXa-11 Předehřátý na 37°C	80 µl	200 µl
Promíchat a inkubovat v 37°C 2-5 minut		
R2 Faktor Xa, předehřátý na 37°C	80 µl	200 µl
Promíchat a inkubovat v 37°C přesně po	90 sec	120 sec
Zastavení reakce přidáním		
Kyselina citrónová (2%) nebo octová (20g/l)	100 µl	500 µl
Promíchat a měřit absorbanci při 405 nm proti odpovídajícímu blank		

Žluté zbarvení je stabilní 2 hodiny.

Blank se získá smícháním v opačném pořadí než v testu: Kyselina citrónová (2%), FXa, substrát SXa-11, destilovaná voda, neředěná plazma.

Měří se absorbance při 405 nm. Vzorek blank musí být odečten od absorbance naměřené u korespondujícího testu.

Pokud jsou požadovány jiné objemy než výše uvedené, měl by být zachován poměr mezi koncentrací a objemem reagentů. Je odpovědností každého uživatele pak provést validaci takové modifikace k vyloučení vlivu na správnost výsledku.

KALIBRACE:

Specifické kalibrátory, pokrývající dynamické rozmezí, výrobce Hyphen-BioMed jsou uvedeny v tabulce REAGENCIE A MATERIÁL POTŘEBNÝ, V KITU NEPŘÍTOMNÝ. Tyto kalibrátory mohou být použity pro stanovení obecné kalibrační křivky pro UFH i LMWH.

Biophen Heparin 3 nabízí homogenní reaktivitu k UHF i LMWH. Test může být kalibrován na **BIOPHEN Heparin Calibrator (222001)** pro různé typy heparinů (5 koncentrací od 0 do 1,45 IU/ml nejméně).

Pro měření Orgaranu® (Sodium Danaparoid) musí být užit specifický kalibrátor **BIOPHEN Orgaran® Calibrator (222201)**, 5 koncentrací od 0 do 1,45 IU/ml.

Pro měření Arixtry® (Fondaparinux) musí být užit specifický kalibrátor **BIOPHEN Arixtra® Calibrator (222501)** – (4 koncentrace od 0 do 1.35 µg/ml).

Pokud se požaduje specifický kalibrátor pro UHF, je k dispozici – **BIOPHEN UHF Calibrator (222301)**.

Při použití semilogaritmického měřítka je:

Linearita do 1.50 IU/ml anti-Xa pro UFH

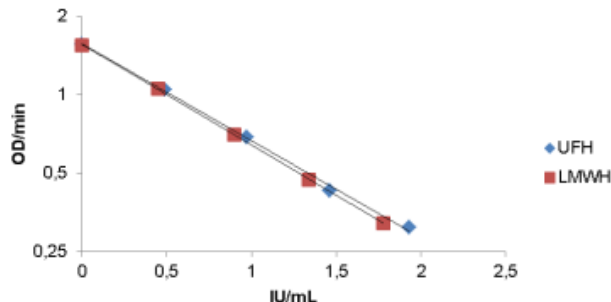
Linearita do 2.00 IU/ml anti-Xa pro LMWH

Linearita do 1.60 µg/ml anti-Xa pro Arixtru®

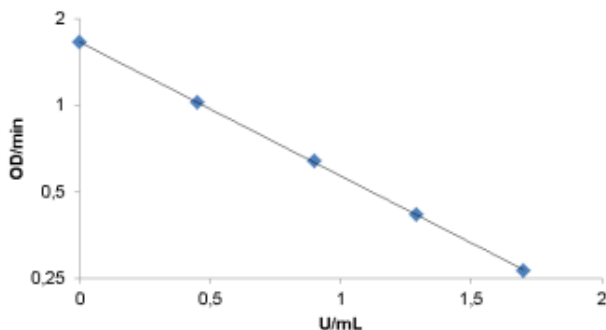
Linearita do 1.75 IU/ml anti-Xa pro Orgaran®

Níže uvedené kalibrační křivky, získané pro UFH, LMWH, Arixtru® a Orgaran® jsou pouze příkladem. Pro konkrétní testovací podmínky by měly být zhotoveny kalibrační křivky pro každou serii testů nebo každou novou šarži reagentů.

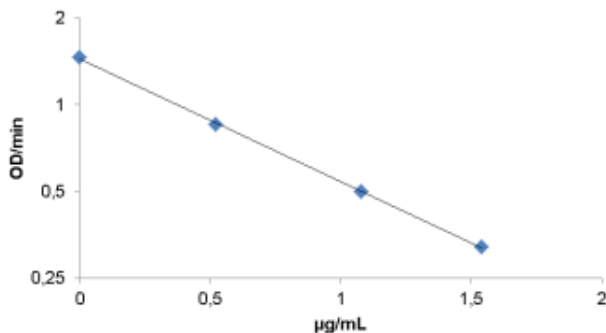
Calibration curve of UFH and LMWH on STAR instrument



Calibration curve of Orgaran on STAR instrument



Calibration curve of Arixtra on STAR instrument



KONTROLA KVALITY:

Užití kontrolních plazem umožňuje ověření kalibrační křivky stejně tak jako homogenity reaktivity testu mezi sériemi při použití stejné šarže reagensů. Kontrola kvality by měla být provedena pro každou novou sérii, podle dobrých laboratorních praktik, aby bylo možné validovat výsledky. Nová kalibrace by měla být provedena při nové šarži reagensie, po každé významné údržbě nebo opravě přístroje, nebo když jsou výsledky kontrolních materiálů mimo přijatelné rozmezí. Každá laboratoř by si měla ověřit vlastní přijatelné rozmezí pro vlastní podmínky.

VÝSLEDEK:

- Koncentrace heparinu (nebo jiné testované substance s anti Xa aktivitou) v testovaném vzorku je přímo odvozena z kalibrační křivky.
- Výsledky se vyjadřují v Anti Xa mezinárodních jednotkách na ml plazmy (IU/ml), v µg/ml pro Arixtru® nebo v U/ml pro Orgaran®.
- Výsledky by měly být interpretovány ve shodě s klinickým a biologickým stavem pacienta.

LIMITY:

- Pro zajištění optimálního průběhu testu by měla být dodržena specifikace a technické instrukce validované výrobcem Hyphen-BioMed. Laboratoř je odpovědná za validaci změn v těchto instrukcích. Reagensie, která má neobvyklý vzhled nebo jeví známky kontaminace, by neměla být používána.
- Plazma s obsahem koagula nebo se známkami kontaminace, by neměla být testována.
- Aktivace koagulace během odběru vzorku a přípravy plazmy může uvolnit destičkový faktor 4 (PF4), který může inhibovat heparin. Tento test je navržen tak, aby vliv anti-heparinových substancí (a zejména PF4) v plazmě byl minimalizován
- Nebyly pozorovány žádné interference pro bilirubin do 0,1 mg/ml, hemoglobin do 2 mg/ml a triglyceridy do 1,25 mg/ml. Vysoké hladiny hemoglobinu nebo triglyceridů mohou ovlivnit výsledek. Aby byl test plně funkční, musí být pečlivě posouzeny pracovní instrukce.
- Jestliže je koncentrace AT v testované plazmě menší než 50%, hladina heparinu, Arixtru® i Orgaranu® může být podceněna v důsledku nedostatku AT. Musí pak být použit variantní protokol s exogenně dodaným AT. Je užitečné stanovit AT vzorku.
- Vysoké hladiny AT s koncentrací > 150% mohou interferovat v testu a jeví se pak jako přítomnost malého množství heparinu.
- Podcenění koncentrace heparinu a tím i závěr heparinová rezistence se může objevit u některých nemocných s amyloidosou⁶.

OČEKÁVANÉ HODNOTY:

Pro správný terapeutický efekt a minimalizaci krvácivého rizika by mělo být dávkování léku v souladu s doporučením jeho výrobce pro danou indikaci^{7,8,9}. Výsledek by měl být interpretován v souladu s klinickým stavem pacienta.

CHARAKTERISTIKA:

Detekční rozhraní je 0.05 IU/ml pro Heparin (nebo pro Orgaran® 0.05 U/ml a 0,05 µg/ml pro Arixtru®).

Příklad reprodukovatelnosti získané pro plazmy suplementované UFH, LMWH a Arixtrou:

Vzorek	Intra Assay CV% ACL7000 (IL)	n	Inter Assay CV% ACL7000 (IL)	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 Level 1 (0.25 IU/mL)	2.3	15	1.9	20
LMWH Level 2 (0.50 IU/mL)	1.4	15	2.1	20

Vzorek	Intra Assay CV% ACL7000 (IL)	n	Inter Assay CV% STAR (Stago)/ACL7000/manuální	n
Arixtra Lev1 (0.44 µg/mL)	3.5	20	4.4	9
Arixtra Lev 2 (1.18 µg/mL)	2.1	20	3.0	9

REFERENCE:

1. Hemker HC and Beguin S. The mode of action of heparin In-vitro and in-vivo. Adv Exp Med Biol (1992).
2. Leslie B et al. Investigation of the anticoagulant mechanism of a covalent antithrombin-heparin complex J Biol Chem (2000).
3. Marlowe CK 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. Bioorg Med Chem Lett (2000).
4. 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 Hemost (1987).
5. Woodhams B et al. Stability of coagulation proteins in frozen plasma. Blood Coag Fibrinolysis. (2001).
6. Christiansen J and Lindqvist B. Heparin resistance in amyloidosis. Acta Med Scand (1967).
7. Holm HA et al. Heparin assays and bleeding complication in deep venous thrombosis with particular reference retroperitoneal bleeding. Thromb Haemost (1985).
8. Shannon M et al. Treatment of venous thromboembolism. Thromb Haemost (1999).
9. Castellone DD and Van Cott EM. Laboratory monitoring of new anticoagulants. Am.J.Hematol (2010).

SYMBOLY:

Použité symboly a znaky jsou v seznamu ISO standard 15223-1, viz dokument definice symbolů.