

**Měření přímých FXa inhibitorů, heparinu a jemu podobných látek za užití anti-Xa chromogenní metody, tekutá reagentie, připraveno k použití**

Revize: 04/2023

**POUŽITÍ:**

BIOPHEN™ Heparin LRT souprava je anti-Xa chromogenní test pro in vitro kvantitativní stanovení koncentrace heparinu a jemu podobných antikoagulií v lidské citrátové plazmě za užití automatizovaných nebo manuálních metod. Metoda je vhodná i pro stanovení Apixabanu, Rivaroxabanu, Edoxabanu nebo jiných přímých inhibitorů FXa, Těž je vhodná pro stanovení anti-Xa aktivity Arixtry® (Fondaparinux) a Organaru® (Danaparoid sodný) – nepřímých inhibitorů, jejichž aktivita v plazmě je zprostředkována v plazmě obsaženým antitrombinem (AT). Všechny reagentie jsou v tekutém stavu a připraveny k použití (LRT – Liquid reagent technology).

**SHRNUTÍ:**

**Technické:**

Heparin je sulfátovaný polysacharid s vysokou afinitou pro antitrombin (AT). V komplexu s heparinem je antitrombin silný a rychle působící inhibitor aktivity seriních estráz: IXa, Xa, XIa, IIa a trombin<sup>1,2</sup>. Nízkomolekulární heparin (LMWH) a podobné látky, jako je danaparoid sodný, jsou oproti trombinu více efektivní inhibitory FXa. Anti-Xa metoda testování je vhodná pro měření heparinu a analogů<sup>2,9</sup>.

BIOPHEN™ Heparin LRT souprava je chromogenní anti-Xa metoda určená pro homogenní měření nefrakcionovaného heparinu (UFH) a LMWH použitím jedné kalibrační křivky. Tato metoda je také užitečná pro stanovení anti-Xa aktivity Organaru® (Danaparoid sodný) a Arixtry® (Fondaparinux), nepřímých inhibitorů, jejichž aktivita je zprostředkována plazmatickým AT, a také pro stanovení přímých inhibitorů anti-Xa (Rivaroxaban, Aipxaban a Edoxaban) s jejich specifickými kalibrátory.

**Klinické:**

Hepariny (UFH a LMWH) se používají jako antikoagulans pro léčbu a preventivní indikaci. Alternativní antikoagulanty (Organaru® a Arixtra®) mohou být použity ve specifických případech. Měření koncentrace léčiv v plazmě pacienta umožní monitorování léčby a případné úpravy dávkování.

Rivaroxaban, Apixaban a Edoxaban jsou přímé orální antikoagulans (DOACs) podávané pro indikaci. Monitorování u pacientů není zapotřebí, ale měření hladiny léku může být užitečné pro nouzové operace nebo při podezření na předávkování (krvácivé riziko).

**PRINCIP:**

BIOPHEN™ Heparin LRT je chromogenní anti-Xa metoda založená na inhibici konstantního množství FXa testovaným heparinem (nebo jinou anti-Xa substancí) v přítomnosti endogenního antitrombinu. Zbýlý FXa hydrolytický štěpí FXa specifický substrát (SXA-11) za vzniku paranitroanilinu (pNA)<sup>3</sup>. Množství uvolněného pNA (měření absorbance při 405 nm) je nepřímo úměrné koncentraci heparinu (nebo jiné anti-Xa látky) přítomné v reakčním prostředí.

**Heparin a analoga:**

Heparin + AT → [AT Hep.]  
[AT Hep.] + [FXa (nadbytek)] → [FXa-AT-Hep.] + [zbýlý FXa]  
[FXa (zbýlý)] + SXa-11 → Peptid + pNA  
Rivaroxaban/Apixaban/Edoxaban (DiXal):  
DiXal + (FXa v nadbytku) → (FXa-DiXal) + zbytkový FXa  
FXa zbytkový + Substrát → Peptid + pNA

**REAGENCIE:**

**R1: Reagent 1:** Chromogenní substrát specifický k faktorů Xa (SXA-11), tekutá reagentie. Obsahuje Proclin.

**R2: Reagent 2:** Bovinní faktor Xa, tekutá reagentie, obsahuje BSA, Dextran sulfát<sup>4</sup> a malé množství Azidu sodného (0,9 g/l).

REF 221011 → R1 R2 4 lahvičky po 7,5 ml

REF 221013 → R1 R2 3 lahvičky po 3 ml

REF 221015 → R1 R2 4 lahvičky po 5 ml

**UPOZORNĚNÍ A VAROVÁNÍ:**

- Některé reagentie v soupravě obsahují materiál zvířecího původu. Proto musí být tyto reagentie považovány za potenciačně infekční se všemi odpovídajícími bezpečnostními opatřeními.
- Azid sodný může v kontaktu s olovenými a měděnými trubkami vytvářet výbušné azidy kovů.
- Odpad likvidujte podle místních příslušných regulací.
- Používejte pouze reagentie stejné šarže.
- Studie stability prokázaly, že reagentie mohou být přepravovány za pokojové teploty bez poškození.
- Pouze pro laboratorní použití In Vitro.

**PŘÍPRAVA REAGENCIÍ:**

**R1 R2** Reagentie připravena k použití; homogenizujte obsah a ihned vložte do analyzátoru podle příslušného aplikačního protokolu.

Pro manuální metodu měření nechte reagentii stabilizovat 10 minut při pokojové teplotě (18-25°C), homogenizujte před použitím.

**SKLADOVÁNÍ A STABILITA:**

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

**R1 R2** Stabilita reagentie po otevření, pokud je zabráněno odpařování a kontaminaci a pokud je reagentie skladována uzavřená, je:

- 6 měsíců při 2-8°C
- 14 dní za pokojové teploty (18 – 25°C)
- Nemrazte.
- Stabilita v analyzátoru: viz specifická aplikace.

Pokud substrát zežloutne, je kontaminovaný. Znehodnoťte lahvičku a načněte novou.

**REAGENCIE POTŘEBNÉ, V KITU NEPŘÍTOMNÉ:**

**Reagentie:**

- Destilovaná voda.
- Kyselina octová (20%) nebo 2% kyselina citrónová (pro end point metody).
- Fyziologický roztok (0,9% NaCl).
- Volitelné: Tris-NaCl-EDTA pufr, pH 7,85 (AR032A/K), speciální pufr snižující interferenci heparinu na přímé FXa inhibitory.
- Plazmatické kalibrátory se známou koncentrací jako jsou:

Kalibrátor	UFH	LMWH	Organaru®	Arixtra®
	222301	22001	222201	222501
Kontroly	223101/224101/ 223901	223001/223801/ 224201/223701/ 224301/224401	223501	224001

	Rivaroxaban standartní/nízké rozmezí	Apixaban standartní/nízké rozmezí	Edoxaban standartní/nízké rozmezí
Kalibrátory	222701 / 226001	226201 / 226101	226501 / 226401
Kontroly	224501 / 225101	225301 / 225201	225501 / 225401

Odkážete se na specifický aplikační protokol pro použitý analyzátor.

**Materiál:**

Spektrofotometr nebo automatický přístroj pro chromogenní testy.  
Stopy, Kalibrované pipety, plastové zkumavky nebo mikrotitrační destička.

**ODBĚR VZORKU A PŘÍPRAVA:**

Krev (9 dílů) by měla být opatrně odebrána do antikoagulantu citrátu tri-sodného (1 díl; 0,109 M, 3,2%) přímou venepunkcí. Můžete použít speciální zkumavky pro nefrakcionovaný heparin (CTAD – Citrát, Theophylline, Adenosin a Dipyridamol) První zkumavka by měla být znehodnocena.

Příprava a skladování vzorků se provádí dle lokálních doporučení (v USA směrnice CLSI H21-A5<sup>10</sup>).

Pro informace o skladování plazmy se odkážete na reference<sup>10,11,12,13</sup>.

**PROVEDENÍ:**

Souprava je určena pro kinetickou metodu, automatické koagulometry a také může být užitá pro (manuální) end point metodu. Test je měřen při 37°C a rozvoj změn barvy je měřen při 405 nm.

Adaptace pro různé systémy jsou dostupné na vyžádání. Odkazujeme na specifické adaptace pro každý přístroj.

## Manuální metoda

1. Rekonstruuje kalibrátory a kontroly dle jejich příbalových letáků.
2. Naředěte vzorky, kalibrátory a kontroly ve fyziologickém roztoku dle níže uvedené tabulky.

Produkt	Kalibrátor	Kontroly	Ředění ve fyziologickém roztoku
LMWH	222001	223001/223801 224201/223701 224301/224401	1:2
UFH	222301	223101/224101 223901	1:2
Arixtra®	222501	224001	1:2
Orgaran®	222201	223501	1:2
Produkt	Kalibrátor	Kontroly	Ředění v fyziologickém roztoku nebo v AR032A/K
Rivaroxaban Standardní rozmezí	222701	224501	1:10
Rivaroxaban Nízké rozmezí	226001	225101	1:3
Apixaban Standardní rozmezí	226201	225301	1:16
Apixaban Nízké rozmezí	226101	225201	1:3
Edoxaban Standardní rozmezí	226501	225501	1:10
Edoxaban Nízké rozmezí	226401	225401	1:2

Stanovte kalibrační křivku a proveďte kontrolu kvality. Pokud jsou vzorky skladovány za pokojové teploty (18-25°C), testujte je ihned. Přesné koncentrace kalibrátorů a kontrol dané šarže jsou uvedeny na letáku přiloženém k jejich balení.

3. Pipetujte dle následující tabulky do zkumavek předehřátých na 37°C:

	Mikrotrrační destička	Zkumavka
Ředěná plazma, kontrola nebo kalibrátor	30 µl	100 µl
<b>R1</b> : Substrát Sxa-11 Předehřátý na 37°C	75 µl	250 µl
Promíchat a inkubovat v 37°C 2 minuty, potom přidat		
<b>R2</b> : Faktor Xa, předehřátý na 37°C	75 µl	250 µl
Promíchat a inkubovat v 37°C přesně po	60 sec	60 sec
Zastavit reakci následujícím způsobem		
Kyselina citrónová (2%)*	100 µl	350 µl
Promíchat a měřit absorbanci při 405 nm proti odpovídajícímu blank		

\*Nebo kyselina octová (20%). Žluté zbarvení je stabilní 2 hodiny.

Blank se získá smícháním v opačném pořadí než v testu: Kyselina citrónová (2%), R2, R1, ředěná plazma.

Měří se absorbance při 405 nm. Vzorek blank musí být odečten od absorbance naměřené u korespondujícího testu. Vytvořte blank, pokud je vzorek ikerický, lipemický, hemolyzovaný nebo pokud se jeho barva liší od standardu.

Testování Rivaroxabanu, Apixabanu a Edoxabanu (standardní rozmezí) by mělo být provedeno kinetickou metodou se zaznamenáním změny absorbance mezi 10 a 35 sekundou po přidání FXa (při ΔOD 405 nm). V takovém případě není nutné odečítat hodnotu blank nebo zastavovat reakci.

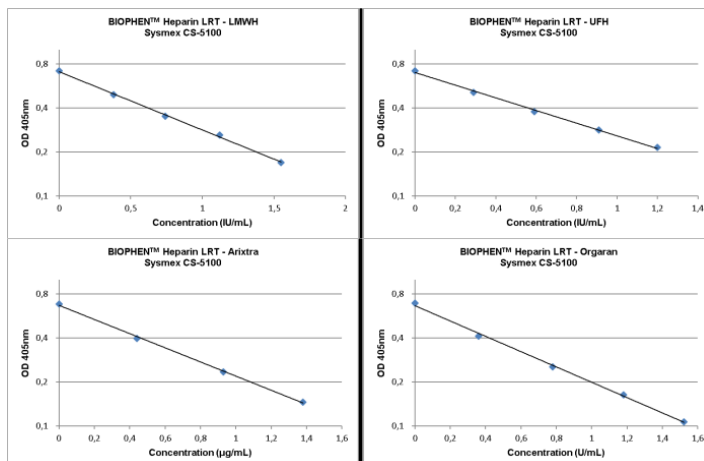
Pokud jsou použity jiné reakční objemy než výše uvedené, je nutné dodržet striktně poměr objemů reagentů. Uživatel je zodpovědný za validaci každé změny v provedení testu, která může ovlivnit výsledek.

## KALIBRACE:

BIOPHEN™ Heparin LRT může být kalibrován pro různé anti-Xa analyty: Hepariny a jejich analogy, Rivaroxaban, Apixaban a Edoxaban. Soupravy s kalibrátory pokrývající dynamické rozmezí těchto analytů jsou dostupné od výrobce Hyphen-BioMed (viz REAGENCIE POTŘEBNÉ, V KITU NEPŘÍTOMNÉ) a mohou být použity pro sestavení kalibrační křivky.

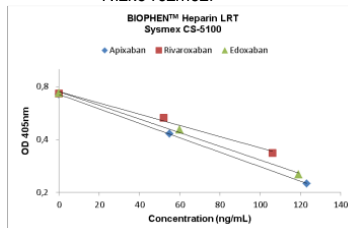
## Heparin, Arixtra® a Orgaran®:

Níže uvedené kalibrační křivky jsou jenom příklad. Uživatel musí sestavit vlastní kalibrační křivku pro vlastní podmínky měření.

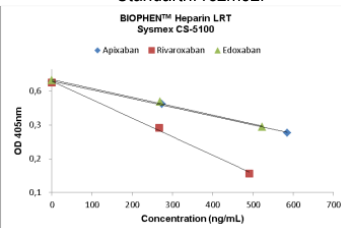


**Apixaban, Rivaroxaban, Edoxaban:** Níže uvedené kalibrační křivky jsou pouze příklad. Uživatel musí sestavit vlastní kalibrační křivku pro vlastní podmínky měření.

## Nízké rozmezí



## Standardní rozmezí



## KONTROLA KVALITY:

Užití kontrolních plazem umožňuje ověření kalibrační křivky stejně tak jako homogenity reaktivitu testu mezi sériemi při použití stejné šarže reagentů.

Začněte kontrolu kvality do každé série testů dle doporučení správné odborné laboratorní práce. Nová kalibrace musí být provedena nejméně pro každou novou šarži reagentie, po každé významné opravě či údržbě přístroje, nebo když výsledek kontrol je mimo přijatelné meze.

Každá laboratoř by si měla definovat a verifikovat přijatelné rozmezí pro vlastní analytický systém.

## VÝSLEDKY:

- Pro manuální end-point metodu vykreslete kalibrační křivku s absorbancí při OD 405 nm na ose Y a koncentrací na ose X.
  - Rivaroxaban nízké rozmezí, Edoxaban standardní rozmezí, Arixtra®, Orgaran®, UFH, LMWH – použijte Lin-Log měřítko (ng/ml – OD).
  - Rivaroxaban standardní rozmezí, Apixaban nízké rozmezí, a Edoxaban nízké rozmezí – použijte Lin-Lin měřítko (ng/ml – OD)

Pro kinetickou metodu použijte ΔOD 405 místo OD 405.

- Koncentrace heparinu (nebo jiné anti-Xa substance) v testovaném vzorku je přímo odvozena z kalibrační křivky, pokud je použito normální ředění.
- Pokud jsou použita jiná ředění, výsledky musí být násobeny použitým ředícím poměrem.
- Výsledky se vyjadřují v mezinárodních jednotkách na ml plazmy (IU/ml) pro Heparin, v IU/ml pro Orgaran®, v µg/ml pro Arixtra® nebo v ng/ml pro Rivaroxaban, Apixaban a Edoxaban.
- Výsledky testu by měly být interpretovány v souvislosti s klinickým stavem pacienta.

## LIMITY:

- Abyste zajistili optimální výkon měření, následujte pozorně instrukce validované výrobcem HYPHEN BioMed.
- Jakákoliv reagentie neobvyklého vzhledu nebo vykazující známky kontaminace musí být znehodnocena.
- Jakákoliv vzorky neobvyklého vzhledu nebo vykazující známky aktivace musí být znehodnoceny.
- Aktivace koagulace během odběru vzorku a přípravy plazmy může uvolnit destičkový faktor 4 (PF4), který může inhibovat heparin. Tento test je sestaven tak, aby byl minimalizován vliv interferujících anti-heparinových substancí v plazmě, zejména PF4.
- Jestliže je koncentrace AT v testované plazmě menší než 50%, hladina heparinu, Arixtra® nebo Orgaran® může být podceněna v důsledku nedostatku AT. Musí pak být použit variantní protokol s exogenně dodaným AT. Je tedy užitečné stanovit současně i AT měřeného vzorku. Měl by být použit variantní protokol s exogenním AT. Vysoké hladiny AT s koncentrací >150% mohou interferovat v testu a jeví se pak jako přítomnost malého množství heparinu.
- Vzorky s vysokou koncentrací mohou být ředěny v normální poolové plazmě.
- Podcenění koncentrace heparinu a tím i závěr heparinová rezistence se může objevit u některých nemocných s amyloidosou 5.

- Pokud je používána jednotná kalibrační křivka (LMWH/UFH), zkontrolujte, zda přístroj a použitá aplikace dovoluje dobré překrytí LMWH a UFH kalibrace v konkrétních podmínkách testování.
- V případě podání antidot andexanet alfa komerčně dostupné soupravy pro anti-Xa aktivitu nejsou vhodné pro měření aktivity anti-Xa<sup>14,15</sup>. FXa inhibitor se odpoutá od andexanet alfa, což vede k falešně zvýšeným výsledkům, a tudíž k podcenění obratné aktivity andexanetu alfa. Výsledky s BIOPHEN™ Heparin LRT nebyly získány.

#### OČEKÁVANÉ HODNOTY:

Ani-Xa medikamenty se nevyskytují v normální plazmě. Pro správný účinek s nejmenším rizikem krvácení musí být dávkování heparinu v terapeutickém rozmezí schváleno výrobcem medikamentu pro každou specifickou indikaci<sup>7,8,11</sup>. Normální rozmezí, terapeutické rozmezí a rozmezí krvácivého rizika (podle medikamentu) musí být definováno podle místních platných regulací.

#### CHARAKTERISTIKA:

- **Nižší limit a měřicí rozmezí byly definovány dle použitého analytického systému.**
- Pro standardní rozmezí je pro Rivaroxaban/Edoxaban/Apixaban kalibrační rozsah od cca 0 do 600 ng/ml.
- Pro nízké rozmezí je pro Rivaroxaban kalibrační rozsah od cca 0 do 100 ng/ml a pro Apixaban/Edoxaban cca 0 do 120 ng/ml.
- Kalibrační rozmezí je od cca 0 do 1,50 IU/ml pro UFH, od 0 do 1,75 IU/ml pro LMWH, od 0 do 1,60 µg/ml pro Arixtru® a od 0 do 1,75 U/ml pro Orgaran®.
- Enzymatická reakce je rychlá a umožňuje vysokou citlivost pro testy.
- Studie byly provedeny výrobcem na 1 šarži reagentie a na přístroji CS-5100. Posouzeno bylo minimálně 10 sérií testů za den, nejméně jedno opakování pro každou sérii za užití kontrolního materiálu. Byly získány níže uvedené výsledky

Vzorek	Intra assay				Inter assay			
	N	Průměr	CV%	SD	N	Průměr	CV%	SD
UFH Level 1	10	0.19 IU/ml	2,8	0.01	20	0.20 IU/ml	5,7	0.01
UFH Level 2	10	0.56 IU/ml	0,9	0.01	20	0.57 IU/ml	1,3	0.01
LMWH Level 3	10	0.78 IU/ml	1,0	0.01	20	0.80 IU/ml	1,1	0.01
LMWH Level 4	10	1.22 IU/ml	0,6	0.01	20	1.18 IU/ml	1,2	0.02
Rivaroxaban	30	317,3 ng/ml	0,9	2,80	20	310 ng/ml	1,2	3,60
Rivaroxaban Low	30	80.5 ng/ml	0,7	0.53	22	85.3 ng/ml	4,1	3.51
Apixaban	30	207 ng/ml	1,2	2,53	20	212,3 ng/ml	2,6	5,58
Apixaban Low	30	84.6 ng/ml	1,2	0.98	20	83.9 ng/ml	2,2	1.82
Edoxaban	40	314 ng/ml	0,9	2,80	120	306 ng/ml	1,5	4,70
Edoxaban Low	40	85,4 ng/ml	1,8	0,70	120	85,8 ng/ml	3,8	3,20
Orgaran®	10	1.00 U/ml	0,5	0.01	20	1.00 U/ml	0,9	0.01
Arixtra®	10	1.18 µg/ml	0,6	0.01	20	1.19 µg/ml	0,6	0.01

- Korelace s referenční metodou (LCMS :MS vs BIOPHEN™ Heparin LRT, Edoxaban):  
**System CS-5100: n = 144 y = 0,98x + 2,43 r = 0,998**  
Pro ostatní molekuly viz specifické aplikační protokoly pro použitý analyzátor.
- **Interference:** Viz specifické aplikační protokoly pro každý analyzátor.

#### 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. Christiansen J and Lindqvist B. Heparin resistance in amyloidosis. Acta Med Scand (1967).
6. Holm HA *et al.* Heparin assays and bleeding complication in deep venous thrombosis with particular reference retroperitoneal bleeding. Thromb Haemost (1985).
7. Shannon M *et al.* Treatment of venous thromboembolism. Thromb Haemost (1999).
8. Castellone DD and Van Cott EM. Laboratory monitoring of new anticoagulants. Am.J.Hematol (2010).
9. Gray E. *et al.* Heparin and low-molecular-weight heparin. Thromb Haemost. (2008)
10. CLSI Document H21-A5: "Collection, transport, and processing of blood specimens for testing plasma -based coagulation assays and molecular hemostasis assays; approved guideline". (2008).
11. Douxfils J, *et al.* Non-VKA Oral Anticoagulants: Accurate Measurement of Plasma Drug. BioMed Research International. (2015).
12. Mauge L. and Alhenc-Gelas M. Stabilité pré-analytique des paramètres de la coagulation: revue des données disponibles. Ann Biol Clin. (2014)
13. Birri N *et al.* Stability of low molecular weight heparin anti-factor Xa activity in citrated whole blood and plasma. Br J Haematol (2011).
13. Birri N *et al.* Stability of low molecular weight heparin anti-factor Xa activity in citrated whole blood and plasma. Br J Haematol (2011).
14. Commercial anti-FXa activity assays are unsuitable for measuring anti-FXa activity following administration of andexanet alfa. European Medicine Agency [Internet]. 2020 Jun [cited 2020 Jun 17]. Available from <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/dhpc/ondexxya-andexanet-alfacommercial-anti-fxa-activity-assays-are-unsuitable-measuring-anti-fxa>
15. Tomoda H. *et al.* Andexanet Alfa for Bleeding with Factor Xa Inhibitors. NEngl J Med. (2019).

#### SYMBOLY:

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

**R1** H317: Může způsobit alergickou kožní reakci.