

BIOPHEN HEPARIN 6

Ref A221006



Manufactured By: HYPHEN BioMed

Measurement of Unfractionated Heparin (UFH), using an anti-Xa chromogenic method

For in vitro diagnostic use only

Last revision: 26/11/2008

INTENDED USE:

The Biophen Heparin 6 kit is a chromogenic assay for the quantitative determination of Unfractionated Heparin (UFH) in human citrated plasma using automated or manual method.

CLINICAL BACKGROUND:

Unfractionated Heparin (UFH) is currently used for curative or preventive indications. Measuring the heparin concentration in patients' plasma allows monitoring the therapy and adjusting drug dosage.

TEST PRINCIPLE:

Biophen heparin 6 is a chromogenic anti-Xa method developed for measuring homogeneously heparin (UFH), in plasma.

Heparin is a sulphated polysaccharide with an high affinity for antithrombin. When complexed with heparin, antithrombin exhibits a fast acting and potent inhibitory activity for coagulant serine esterases: IXa, Xa and thrombin.

Anti-Xa assays are then the methods of choice for measuring heparins and their analogues.

Biophen Heparin 6 is a kinetics method based on the inhibition of a constant amount of factor Xa, by the tested heparin in presence of endogenous antithrombin, and hydrolysis of a Factor Xa specific chromogenic substrate (SXA-11), by the factor Xa in excess. pNA is then released from the substrate. The amount of pNA released is then a relation of the residual factor Xa activity. There is an inverse relationship between the concentration of heparin and color development, measured at 405 nm.

Heparin + AT → [AT Hep.]
[AT Hep.] + [FXa (excess)] → [FXa-AT-Hep.] + [residual FXa]
[FXa (residual)] + SXa-11 → Peptide + pNA

REAGENTS SUPPLIED:

Biophen Heparin 6 kit contains 4 vials of a specific Factor Xa substrate, and 4 vials of bovine Factor Xa:

R1: Reagent 1:

Chromogenic substrate specific for factor Xa (SXA-11), lyophilized in presence of mannitol:

4 vials of 15 mg (to be restored with 6 mL of distilled water).

R2: Reagent 2:

Bovine Factor Xa, Lyophilised:

4 vials of about 15 µg (to be restored with 6 mL of distilled water).

Note:

- This assay was designed for minimizing the interference of anti-heparin substances in plasma, and especially that of PF4.
- Bovine Factor Xa was prepared from bovine plasma, which was tested for the absence of infectious agents, and collected from animals free from BSE. However, no test may totally exclude the absence of infectious agents. As any product of bovine origin, this factor Xa must be used with all the cautions required for handling a material potentially infectious.
- The bovine Factor Xa concentration is adjusted for each lot for providing the right reactivity in the assay.

REAGENTS REQUIRED BUT NOT PROVIDED:

Reagents:

- Distilled water.
- Acetic acid (20%) or 2% citric acid (end point method).
- Physiological Saline (0.9% NaCl).
- Plasma Calibrators with a known concentration of UFH, duly validated against an International Standard (NIBSC).
- Control plasmas for UFH.

Materials:

- Spectrophotometer or automatic instrument for chromogenic assays.
- Stopwatch.
- Calibrated pipettes.

STORAGE CONDITIONS:

Unopened reagents, must be stored at 2–8 °C, in their original packaging box. They are then stable until the expiration date printed on the label.

PREPARATION AND STABILITY OF REAGENTS:

Note: Reconstitution volumes can vary according to the automate used. Refer to each specific instrument adaptation and specific cautions on each instrument.

REAGENT 1: Factor Xa specific chromogenic substrate SXa-11

Reconstitute each vial with exactly 6 mL of distilled water. Shake thoroughly (vortex). Let to homogenize for 30 minutes at room temperature (18-25 °C), while shaking the vial from time to time (vortex), until complete dissolution of the content. Check the absence of any solid at the bottom of the vial.

Note: In all cases, before use, check the absence of solids at the bottom of the vial, which confirms that dissolution is complete. If necessary, incubate for 1 hour at RT or better at 37°C, while shaking (vortex) from time to time. If required, then additionally incubate overnight at room temperature.

Stabilize at room temperature and homogenize the content before each use (vortex). Stability of restored substrate, kept in its original vial:

- 3 months at 2-8°C.
- 7 days at room temperature.
- Do not freeze.

REAGENT 2: Factor Xa

Reconstitute each vial with exactly 6 mL of distilled water. Shake thoroughly until complete dissolution of the content (vortex). Let to homogenize for 30 minutes at room temperature (18-25 °C), while shaking the vial from time to time. Homogenize the content before each use. Stability of restored factor Xa, kept in its original vial:

- 3 months at 2-8°C.
- 7 days at room temperature.
- Do not freeze.

Cautions: In order to improve stability, reagents must be closed with their original screw cap following each use (white caps for factor Xa, yellow caps for SXa-11). Reagents must be handled with care, in order to avoid any contamination during use. If the substrate becomes yellow, this indicates presence of a contaminant. It must be rejected, and a new vial must be used. Incubating the reconstituted vials allows stabilising the reagents, and obtaining a homogeneous reactivity.

Note:

- R1 and R2 vials are closed under vacuum. Remove carefully the stopper, in order to avoid any lost of powder when opening the vials.
- According to the automated method used, the reagents can be reconstituted with volumes different from those recommended. In any case, the established reactive ratios (respective reagent concentrations in the reactive milieu) between factor Xa and its substrate must be strictly respected.
- Use only reagents from kits with a same lot number. Do not use reagents from kits with different lots when running the assay. Reagents R1 and R2 are optimized for each lot of kits.

PREPARATION OF PLASMA:

Blood (9 volumes) must be collected on 0.109 M citrate anticoagulant (1 volume), with great care, in order to avoid activation and PF4 release. Sampling must be performed through a net venipuncture, and the first drops must be discarded. Specific collection tubes for heparin testing, such as the CTAD (Citrate, Theophylline, Adénosine and Dipyridanole) tubes, can be used. They improve specimen stability.

- Within 1 hour, blood must be centrifuged at 3,000 g for 20 min at 18°C or below, and plasma decanted into a plastic tube, using a plastic pipette.
- Storage of plasma:
 - Up to 2 hours at 20°C
 - Up to 1 month frozen at –20°C or below (before use, thaw for 15 min. in a water bath at 37°C).

Refer to NCCLS document H21-A2 for further instructions on specimen collection, handling and storage.

D.750.02/BI/1006/US



8560 Gove Court - Mason, OH 45040

Phone: 513.770.1991

Toll Free: 866.783.3797

Fax: 513.573.9241

Email: info@aniara.com

www.aniara.com

TEST PROCEDURE:

The Biophen Heparin 6 kit is specifically designed for Kinetics methods, automated on instruments, and can also be used for end point methods. Adaptations on automates are available upon request. The assay is performed at 37°C and the color developed is measured at 405 nm. Whether the method used, the assay must be performed according to the scheme reported for the manual method in order to keep a homogeneous reactivity to UFH.

Manual method:

Into the microwell or the test tube, incubated at 37°C, introduce:

	Microwell	Test Tube
Undiluted plasma	12 µl	30 µl
Distilled water	36 µl	90 µl
R1: Substrate SXa-11 Preincubated at 37°C	80 µl	200 µl
Mix and incubate at 37°C, for 2-5 minutes then introduce:		
R2 : Factor Xa Preincubated at 37°C	80 µl	200 µl
Mix and incubate at 37°C for exactly,	90 sec.	120 sec.
Then stop the reaction by introducing		
Citric Acid (20g/L)	100 µl	500 µl
Mix and measure the absorbance at 405nm against the corresponding blank.		

The yellow color is stable for 2 hours.

The sample blank is obtained by mixing the reagents in the opposite order from that of the test i.e.: Citric acid (20g/l), substrate SXa-11, undiluted plasma, distilled water, factor Xa.

Measure the absorbance at 405 nm. The sample blank value must be deduced from the absorbance measured for the corresponding assay.

Note:

- If higher or lower reactive volumes are required for the method used, the same respective proportions for each reagent concentration, and for the overall reactive volume, must be strictly respected, in order to keep an homogeneous reactivity.

CALIBRATION:

Biophen Heparin 6, can then be calibrated with the **Biophen UFH calibrator (#A222301)**, set of 5 calibrators at various UFH concentrations, covering the assay dynamic range.

QUALITY CONTROL:

Use of quality control plasmas allows validating the calibration curve, from run to run, when using a same lot of reagents. Quality control plasmas (lyophilized) are available:

Biophen UFH Control: (low range) for UFH (#A223101).

RESULTS:

The heparin concentration in the tested specimen is directly deduced from the calibration curve. Results are expressed in anti-Xa International Units/mL (IU/mL), by reference to the International Standards (NIBSC).

Using a semi-logarithmic scale:

The assay is linear up to 1.0 IU/mL anti-Xa for UFH.

EXAMPLE OF CALIBRATION CURVE AND QUALITY CONTROL:

The following calibration curve, obtained with UFH, is indicated as an example only. The calibration curve generated for the series of measures performed must be used.

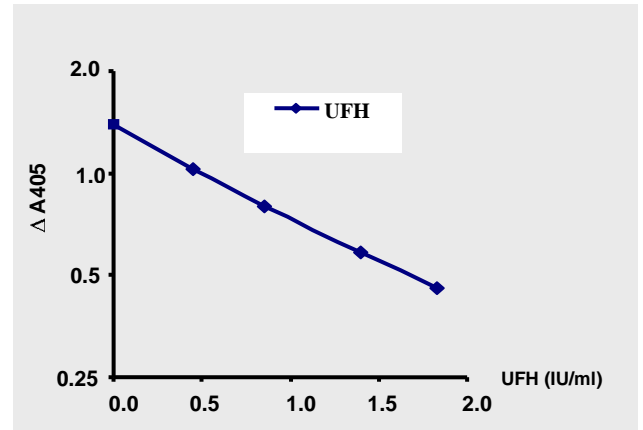
Quality Control: The calibration curve is acceptable when the concentrations measured for controls are within the acceptance range.

Note:

Include at least one quality control (at different levels) in each series, in order to validate it.

A new calibration curve must be carried out for each new batch of reagents, after an important maintenance of the instrument, or if measured values are not in compliance with the one expected.

Each laboratory can define its own acceptance range, according to the protocols and instruments used.



SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS:

- The enzymatic reaction is rapid, and allows obtaining a high sensitivity for this heparin assay.
- The detection threshold is of 0.05 IU/mL.
- Example of reproducibility obtained with plasmas supplemented within UFH, when using tACL 7000 Instrument (IL).

Sample	Intra Assay CV%	N	Inter Assay CV%	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

- Correlations: The BIOPHEN Heparin assay shows good correlation with Coamatic® Heparin performed on BCS and STA instruments, and with Rotachrom Heparin performed on STA-R instrument:

Coamatic® Heparin versus BIOPHEN Heparin (on BCS):

$$Y = 0.91 X - 0.03 \quad n=55 \quad r = 0.99$$

Coamatic® Heparin (on BCS) versus BIOPHEN Heparin (on STA):

$$Y = 0.87 X - 0.06 \quad n=55 \quad r = 0.98$$

BIOPHEN Heparin versus Rotachrom Heparin (on STA-R):

$$Y = 1.07 X + 0.06 \quad n=131 \quad r = 0.97$$

All the studies were conducted outside the US

Another study compared Biophen Heparin with Rotachrom Heparin in US.

The following data were generated:

$$\text{UFH: } N = 40 ; y = 0.93 x - 0.0207 ; r = 0.976 ; r^2 = 0.952$$

- Limitations of the procedure:

- Blood activation, during specimen collection and plasma preparation, may release platelet factor 4, which can inhibit heparin.
- No significant interference is observed for bilirubin concentrations <0.1 mg/ml, haemoglobin concentrations <2 mg/ml and triglycerides concentrations <1.25mg/ml. High levels of haemoglobin or of triglycerides may affect the results. In order to get the full assay performances, the working instructions must be carefully observed.
- If the ATIII concentration in the tested plasma is <50%, heparin can be underestimated as the result of lack of ATIII. A variant protocol, with an exogenous source of ATIII, must then be used.
- High ATIII concentrations (> 150%) could interfere with the assay and mimic presence of low amounts of heparin.
- Underestimation of heparin concentration and heparin resistance has been reported in some patients with amyloidosis (6).
- In order to get the optimal assay performances, comply strictly to the procedural instructions.

EXPECTED VALUES:

For obtaining the right efficacy along with the lowest bleeding risk, heparin dosage must be within the therapeutic range recommended by each drug manufacturer, and for each specific indication.

REFERENCES:

- 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).
- Holm H A et al. Heparin assays and bleeding complication in deep venous thrombosis with particular reference retroperitoneal bleeding. Thromb Haemostasis 53: 278-281 (1985).
- Shannon M, Hirsh B and J. Treatment of venous thromboembolism. Thromb Haemostasis vol 82 (2): 870-877 (1999).
- Leslie B et al. Investigation of the anticoagulant mechanism of a covalent antithrombin-heparin complex J Biol Chem 52 (273): 34730-34736 (1999).
- 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).
- Christiansen J, Lindqvist B. Heparin resistance in amyloidosis. Acta Med Scand, 181(6) : 723-4, 1967.



BIOPHEN HEPARIN 6

Ref. A221006

Determinación de heparina y de anticoagulantes de tipo heparínico mediante un método cromogénico anti-Xa

Para uso exclusivo en diagnóstico *in vitro*.



Fabricado por: HYPHEN BioMed

Última revisión: 21/09/2009

USO PREVISTO:

El kit Biophen Heparin 6 es un ensayo cromogénico para la determinación de la concentración de heparina y de anticoagulantes de tipo heparínico en plasma humano citratado mediante un método automático o manual.

FUNDAMENTOS CLÍNICOS:

En la actualidad, la heparina y los anticoagulantes de tipo heparínico se utilizan con fines curativos o preventivos. La determinación de la concentración de heparina en plasma de pacientes permite supervisar el tratamiento y ajustar la dosis del fármaco.

PRINCIPIO DEL ENSAYO:

BIOPHEN Heparin 6 es un método cromogénico anti-Xa desarrollado para determinar la heparina no fraccionada (HNF) y la heparina de bajo peso molecular (HBPM) de forma homogénea, utilizando la misma curva de calibración. La heparina es un polisacárido sulfatado con una gran afinidad por la antitrombina. En combinación con la heparina, la antitrombina muestra una actividad inhibitoria rápida y potente de las serina esterasas que intervienen en la coagulación: IXa, Xa y trombina. La HBPM y los análogos de la heparina, como el danaparoides sódico, son más eficaces que la trombina en la inhibición del factor Xa. Así pues, los ensayos anti-Xa son los métodos de elección para la determinación de heparinas y sus análogos.

BIOPHEN Heparin 6 es un método cinético basado en la inhibición de una cantidad constante de factor Xa, por parte de la heparina ensayada en presencia de antitrombina endógena, y la hidrólisis de un sustrato cromogénico específico de factor Xa (SXa-11), debido al exceso de factor Xa. Esto provoca la liberación de pNA del sustrato. Así, la cantidad de pNA liberada depende de la actividad residual del factor Xa. Existe una relación inversa entre la concentración de heparina y la producción de color, determinada a 405 nm.

Heparina + AT → [AT hep.]
[AT hep.] + [FXa (exceso)] → [FXa-AT-hep.] + [FXa residual]
[FXa (residual)] + SXa-11 → Péptido + pNA

REACTIVOS SUMINISTRADOS:

El kit BIOPHEN Heparin 6 contiene 4 viales de un sustrato de factor Xa específico y 4 viales de factor Xa bovino:

R1: Reactivo 1:

Sustrato cromogénico específico para factor Xa (SXa-11), liofilizado en presencia de manitol:

4 viales de 15 mg (para reconstitución con 6 ml de agua destilada).

R2: Reactivo 2:

Factor Xa bovino, liofilizado:

4 viales de aproximadamente 15 µg (para reconstitución con 6 ml de agua destilada).

Nota:

- Este ensayo ha sido diseñado para minimizar la interferencia de sustancias antiheparínicas en el plasma, y en especial la de PF4.
- El factor Xa bovino se ha preparado a partir de plasma bovino, que ha sido analizado para confirmar la ausencia de agentes infecciosos, y se ha obtenido a partir de animales libres de EEB. Sin embargo, no existe ninguna prueba que pueda excluir por completo la presencia de agentes infecciosos. Como cualquier producto de origen bovino, este factor Xa debe utilizarse con todas las precauciones requeridas para la manipulación de material potencialmente infeccioso.
- La concentración de factor Xa bovino se ajusta para cada lote con el fin de proporcionar la reactividad correcta en el ensayo.

REACTIVOS NECESARIOS NO SUMINISTRADOS:

Reactivos:

- Agua destilada.
- Ácido acético (20%) o ácido cítrico al 2% (método de punto final).
- Solución salina fisiológica (NaCl al 0,9%).
- Calibradores de plasma con una concentración conocida de HNF, HBPM o danaparoides sódico, debidamente validados frente a un estándar internacional (NIBSC).
- Plasmas de control para HBPM, HNF o danaparoides sódico.

Materiales:

- Espectrofotómetro o instrumento automatizado para ensayos cromogénicos.
- Cronómetro; pipetas calibradas.

CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO:

Los reactivos sin abrir deben almacenarse a 2-8 °C en el embalaje original para conservarse estables hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta.

PREPARACIÓN Y ESTABILIDAD DE LOS REACTIVOS:

Nota: los volúmenes de reconstitución pueden variar en función del instrumento automatizado utilizado. Consultar la adaptación a cada equipo específico.

REACTIVO 1: Sustrato SXa-11 cromogénico específico de factor Xa

Reconstituir cada vial con exactamente 6 ml de agua destilada. Agitar bien (agitadora vorticial). Dejar homogeneizar durante 30 minutos a temperatura ambiente (18-25 °C), mientras se agita el vial de vez en cuando (agitadora vorticial), hasta la completa disolución del contenido. Comprobar que no queden residuos sólidos en el fondo del vial.

Nota: antes de cada uso, comprobar siempre que no haya residuos sólidos en el fondo del vial, lo que confirma que la disolución es completa. Si es necesario, incubar durante 1 hora a temperatura ambiente, o mejor a 37 °C, mientras se agita (agitadora vorticial) de vez en cuando. Si se requiere, incubar también durante la noche a temperatura ambiente.

Antes de cada uso, estabilizar a temperatura ambiente y homogeneizar el contenido (agitadora vorticial). Estabilidad del sustrato reconstituido, conservado en el vial original:

- 3 meses a 2-8 °C.
- 7 días a temperatura ambiente.
- No congelar.

REACTIVO 2: Factor Xa bovino

Reconstituir cada vial con exactamente 6 ml de agua destilada. Agitar bien hasta la completa disolución del contenido (agitadora vorticial). Dejar homogeneizar durante 30 minutos a temperatura ambiente (18-25 °C), mientras se agita el vial de vez en cuando. Homogeneizar el contenido antes de cada uso. Estabilidad del factor Xa reconstituido, conservado en el vial original:

- 3 meses a 2-8 °C.
- 7 días a temperatura ambiente.
- No congelar.

Precauciones: para mejorar la estabilidad, los reactivos deben cerrarse después de cada uso con sus tapones de rosca originales (tapones de color blanco para factor Xa y de color amarillo para SXa-11). Para evitar la contaminación durante el uso, los reactivos deben manipularse con cuidado. Si el sustrato se vuelve amarillo, es indicativo de presencia de un contaminante. Debe descartarse y utilizar un vial nuevo. La incubación de los viales reconstituidos permite estabilizar los reactivos y obtener una reactividad homogénea.

Nota:

- Los viales R1 y R2 están cerrados al vacío. Extraer el tapón con cuidado para evitar perder polvo al abrir los viales.
- En función del método automatizado empleado, los reactivos pueden reconstituirse con volúmenes diferentes a los recomendados. En cualquier caso, deben respetarse estrictamente las proporciones de reactivo establecidas (las concentraciones respectivas de reactivo en el medio reactivo) entre el factor Xa y su sustrato.
- Utilizar únicamente reactivos de kits con el mismo número de lote. No utilizar reactivos de kits de diferentes lotes para realizar el ensayo. Los reactivos R1 y R2 han sido optimizados para cada lote de kits.

PREPARACIÓN DE PLASMA:

La sangre debe recogerse en un recipiente con anticoagulante citrato 0,109 M (en proporción 9:1) con sumo cuidado para evitar la activación y la liberación de PF4. La obtención de muestras debe realizarse por medio de venopunción aséptica. Es preciso descartar las primeras gotas. Pueden utilizarse tubos para extracción de sangre específicos para el análisis de heparina, como por ejemplo, los tubos CTAD (citrato, teofilina, adenosina y dipiridanol). Todos ellos mejoran la estabilidad de la muestra.

- En el plazo de 1 hora, la sangre debe centrifugarse a 3.000 g durante 20 minutos a una temperatura de 18 °C o inferior, y el plasma debe decantarse en un tubo de plástico empleando una pipeta de plástico.
- Almacenamiento del plasma:
 - Hasta 2 horas a 20 °C.
 - Hasta 1 mes congelado a una temperatura de -20 °C o inferior (antes de usarlo, descongelar durante 15 minutos en un baño María a 37 °C).

Consultar el documento H21-A2 del NCCLS para obtener más información sobre la obtención, la manipulación y el almacenamiento de muestras.

D.750.21/BI/1006



6580 Gove Court · Mason, OH 45040

Phone: 513.770.1991

Toll Free: 866.783.3797

Fax: 513.573.9241

Email: info@aniara.com

www.aniara.com

PROCEDIMIENTO DE ENSAYO:

El kit Biophen Heparin 6 está específicamente diseñado para métodos cinéticos automatizados en instrumentos, y también puede utilizarse para métodos de punto final. Las adaptaciones para instrumentos automatizados están disponibles previa solicitud. El ensayo se lleva a cabo a **37 °C** y el color que aparece se determina a **405 nm**.

Con independencia del método utilizado, el ensayo debe realizarse conforme al esquema notificado para el método manual a fin de mantener una reactividad homogénea para HNF y HBPM.

Método manual:

En el micropocillo o tubo de ensayo incubado a **37 °C**, introducir:

	Micropocillo	Tubo de ensayo
Plasma no diluido	12 µl	30 µl
Agua destilada	36 µl	90 µl
R1: Sustrato SXa-11 Preincubado a 37 °C	80 µl	200 µl
Mezclar e incubar a 37 °C durante 2-5 minutos y luego añadir:		
R2: Factor Xa Preincubado a 37 °C	80 µl	200 µl
Mezclar e incubar a 37 °C durante exactamente:	90 s	120 s
A continuación, parar la reacción mediante la adición de:		
Ácido cítrico (20 g/l)	100 µl	500 µl
Mezclar y determinar la absorbancia a 405 nm frente al blanco correspondiente.		

El color amarillo es estable durante 2 horas.

El blanco de muestra se obtiene mezclando los reactivos en el orden inverso al del ensayo, es decir: ácido cítrico (20 g/l), sustrato SXa-11, plasma no diluido, agua destilada y factor Xa.

Determinar la absorbancia a **405 nm**. El valor del blanco de muestra debe deducirse de la absorbancia determinada para el ensayo correspondiente.

Métodos automatizados:

Las adaptaciones a los distintos analizadores (STA-R, BCT, BCS, etc.) están disponibles previa solicitud. **Los volúmenes de reconstitución pueden variar en función del instrumento automatizado utilizado. Consultar la adaptación y las precauciones específicas de cada instrumento.**

Nota:

- Si para el método utilizado se requieren volúmenes de reactivo mayores o menores que los indicados anteriormente, deben respetarse las mismas proporciones entre las concentraciones y los volúmenes respectivos de reactivo utilizados a fin de mantener el rendimiento del ensayo.
- Analizar un blanco de muestra en presencia de plasmas de aspecto muy lechoso por exceso de lípidos, de color amarillo por exceso de bilirrubina o hemolizados, o si los plasmas presentan un color diferente del habitual.

CALIBRACIÓN:

Puesto que Biophen Heparin 6 ofrece una reactividad homogénea para HNF y HBPM, el ensayo puede calibrarse con **Biophen Heparin Calibrator (Ref. A222001)** para la determinación de HNF o HBPM (5 concentraciones de 0 a 1,6 UI/ml). Para la determinación de Orgaran® (danaparoides sódico) debe utilizarse un calibrador específico: **Biophen Orgaran® Calibrator Ref. A22201)** (5 concentraciones de 0 a 1,6 UI/ml).

Si se requiere un calibrador específico para HNF, **Biophen UFH Calibrator (Ref. A222301)** está disponible.

CONTROL DE CALIDAD:

El uso de plasmas de control de calidad permite validar la curva de calibración así como la reactividad homogénea del ensayo de Biophen Heparin para HNF y HBPM, entre distintos análisis, cuando se utilizan reactivos de un mismo lote. Se dispone de distintos tipos de controles:

Biophen UFH Control: (intervalo bajo) para HNF (Ref. A223101).

Biophen LMWH Control: (intervalo alto) para HBPM (Ref. A223001).

Biophen Orgaran® Control: (control para danaparoides sódico [Orgaran®]) (Ref. A223501).

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO:

- La activación sanguínea, durante la obtención de la muestra y la preparación del plasma, puede provocar la liberación del factor plaquetario 4 (PF4), que es capaz de inhibir la heparina.
- No se observan interferencias significativas en las concentraciones de bilirrubina < 0,1 mg/ml, las concentraciones de hemoglobina < 2 mg/ml y las concentraciones de triglicéridos < 1,25 mg/ml añadidas a los plasmas. Niveles elevados de hemoglobina o triglicéridos pueden afectar a los resultados. Para sacar un rendimiento total del ensayo deben seguirse con atención las instrucciones de uso.
- Si la concentración de antitrombina III (AT III) en el plasma analizado es < 50%, puede que se infravalore la heparina como consecuencia de la falta de AT III. En tal caso, debe utilizarse un protocolo diferente con una fuente exógena de AT III.
- En algunos pacientes con amiloidosis se ha notificado una infravaloración de la concentración y resistencia de la heparina (6).
- Si se desea obtener un rendimiento óptimo del ensayo, deben seguirse estrictamente las instrucciones de uso.

RESULTADOS:

La concentración de heparina en la muestra analizada se deduce directamente de la curva de calibración. Los resultados se expresan en unidades internacionales de anti-Xa/ml (UI/ml).

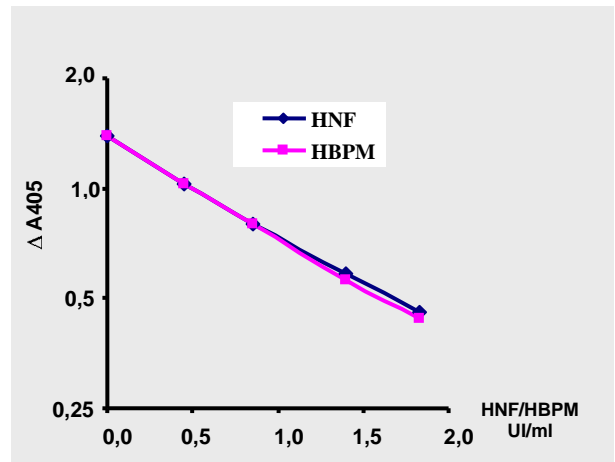
Mediante una escala semilogarítmica:

El ensayo es lineal hasta 1,0 UI/ml de anti-Xa para HNF.

El ensayo es lineal hasta 2,0 UI/ml de anti-Xa para HBPM.

EJEMPLO DE CURVA DE CALIBRACIÓN:

Las curvas de calibración que se muestran a continuación, obtenidas con HNF o HBPM, solo se indican a modo de ejemplo. Debe utilizarse la curva de calibración generada para la serie de determinaciones llevadas a cabo.



CONTROL DE CALIDAD:

La curva de calibración es aceptable cuando las concentraciones determinadas para los controles se sitúan dentro del intervalo de aceptación.

Nota:

Debe incluirse al menos un control de calidad (a diferentes niveles) en cada serie a fin de validarla.

Debe generarse una nueva curva de calibración para cada nuevo lote de reactivos, tras una operación principal de mantenimiento del instrumento o si los valores determinados no se corresponden con lo previsto.

Cada laboratorio puede definir su propio intervalo de aceptación en función de los protocolos y los instrumentos utilizados.

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO ESPECÍFICAS:

Esta reacción enzimática es rápida y permite obtener una gran sensibilidad para este análisis de heparina.

El umbral de detección es de 0,05 UI/ml.

Ejemplo de reproducibilidad obtenido con plasmas complementados con HNF o HBPM, utilizando el instrumento ACL-7000 (IL).

Muestra	% CV intraensayo	N	% CV interensayo	N
Nivel 1 HNF (0,38 UI/ml)	2,1	15	2,0	20
Nivel 2 HNF (0,74 UI/ml)	1,0	15	2,3	20
Nivel 3 HBPM (0,88 UI/ml)	0,9	15	1,5	20
Nivel 4 HBPM (1,32 UI/ml)	0,5	15	1,6	20
Nivel 1 bajo HBPM (0,25 UI/ml)	2,3	15	1,9	20
Nivel 2 bajo HBPM (0,50 UI/ml)	1,4	15	2,1	20

VALORES PREVISTOS:

Para obtener la eficacia correcta y el menor riesgo de sangrado, la dosis de heparina debe hallarse dentro del intervalo terapéutico recomendado por cada laboratorio farmacéutico, y para cada indicación específica.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

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 Haemostasis 53: 278-281 (1985).
3. Shannon M, Hirsh B and J. Treatment of venous thromboembolism. Thromb Haemostasis 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.