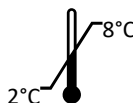




ACTICHROME® Heparin (Anti-FXa)

REF 832



Obelis s.a
Boulevard Général Wahis 53, 1030 Brussels, BELGIUM

INTENDED USE

ACTICHROME® Heparin (Anti-FXa) is a chromogenic assay intended for the quantitative measurement of therapeutic heparin, by measurement of factor Xa activity, in plasma from patients undergoing anticoagulant therapy. The assay is for use by laboratory professionals and may be performed manually, or by using semi-automated or automated coagulation analysers. The assay is for in vitro diagnostic use.

EXPLANATION OF THE TEST

The inhibitory effect of antithrombin III (AT-III) on thrombin, factor Xa and other coagulation serine proteases in plasma is increased several thousand-fold by heparin. This inhibition accounts for the anticoagulant effect of heparin. Low molecular weight heparin (LMWH) preparations appear to catalyze the reaction between factor Xa and AT-III more readily than the reaction between thrombin (FIIa) and AT-III. Unfractionated heparin (UFH) catalyzes both reactions equally. This makes the factor Xa inhibition test the most useful assay as it is applicable to the widest variety of heparin preparations.

PRINCIPLE OF THE METHOD

ACTICHROME Heparin (Anti-FXa) is a multi-step, chromogenic assay for measuring heparin activity by measuring residual factor Xa activity. In the first step, AT-III is added to the patient plasma and incubated at 37°C. In the second step, bovine factor Xa is added to the mixture and again incubated at 37°C. Heparin present in the patient sample will inhibit factor Xa activity. Last, a chromogenic substrate, highly specific for factor Xa, is added to the mixture followed by a final incubation at 37°C. Factor Xa activity present hydrolyses the substrate, releasing a p-nitroaniline (pNA) chromophore which turns the mixture yellow. The assay reaction is stopped by adding acetic acid, which turns the mixture blue. The absorbance of the pNA in the reaction solution at 405 nm is measured and compared to those values obtained from a standard curve generated using known heparin activity levels. The rate of factor Xa inhibition is directly proportional to the heparin concentration since both factor Xa and AT-III are in excess. The residual factor Xa activity is inversely proportional to the heparin concentration.^{1,2}

REAGENTS

The kit contains reagents sufficient to perform 200 tests using an automated coagulation analyzer, 100 tests if a manual end-point method is used.

R1 Bovine Factor Xa Reagent: 4 vials (lyophilized).

R2 Human Antithrombin III Reagent: 4 vials (lyophilized)

R3 SPECTROZYME® FXa: 4 vials each containing 4 µmoles of substrate (lyophilized).

WARNING

This product contains human source material that has been found to be non-reactive for Hepatitis B Surface Antigen (HBsAg), Hepatitis C Virus (HCV) and Human Immunodeficiency Virus Type 1 and Type 2 (HIV-1, HIV-2) using registered methods. As no known test method can provide complete assurance that products derived from human specimens will not transmit HBsAg, HCV, HIV-1, HIV-2 or other blood-borne pathogens, this reagent should be handled as recommended for any potentially infectious human specimen.

This product contains animal source material. As no known test method can provide complete assurance that products derived from animal specimens will not transmit blood-borne pathogens, this reagent should be handled as recommended for any potentially infectious human specimen.

Dispose of discarded material and packing in accordance with all applicable local regulations.

If any serious incident occurs when using ACTICHRONE Heparin (Anti-FXa), contact BioMedica Diagnostics or your local distributor, and report to your local competent authority.

Bovine Factor Xa	Warning		<table><tr><td>CONT</td><td>Tris-(hydroxymethyl)aminomethane</td></tr></table> H315, H319, H335, P261, P264, P280, P302 + P352, P305 + P351 + P338, P337 + P313	CONT	Tris-(hydroxymethyl)aminomethane
CONT	Tris-(hydroxymethyl)aminomethane				
Human Antithrombin III	Warning		H315, H319, H335, P261, P264, P280, P302 + P352, P305 + P351 + P338, P337 + P313		
SPECTROZYME® FXa	Warning		<table><tr><td>CONT</td><td>N-Methoxycarbonyl-D-cyclohexyl-glycyl-glycyl-arginine-para-nitroanilide acetate</td></tr></table> H315, H319, H335, P261, P264, P280, P302 + P352, P305 + P351 + P338, P337 + P313	CONT	N-Methoxycarbonyl-D-cyclohexyl-glycyl-glycyl-arginine-para-nitroanilide acetate
CONT	N-Methoxycarbonyl-D-cyclohexyl-glycyl-glycyl-arginine-para-nitroanilide acetate				

Hazard Statements

H315 Causes skin irritation.

H319 Causes serious eye irritation.

H335 May cause respiratory irritation.

Precautionary Statements:

P261 Avoid breathing dust/fume/gas/mist/vapors/spray.

P264 Wash thoroughly after handling.

P280 Wear protective gloves/ protective clothing/ eye protection/ face protection.

P302 + P352 IF ON SKIN: Wash with plenty of water.

P305 + P351+P338 IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.

P337 + P313 If eye irritation persists: Get medical advice/attention.

REAGENT PREPARATION AND STORAGE

Lyophilized reagents are stable until the expiration date indicated on the label when stored as instructed.

R1 Bovine Factor Xa Reagent: Reconstitute with 5 mL deionized water. Reconstituted reagent is stable for 4 weeks at –20°C.

R2 Human Antithrombin III Reagent: Reconstitute with 5 mL deionized water. Reconstituted reagent is stable for 4 weeks at –20°C.

R3 SPECTROZYME® FXa: Reconstitute with 5 mL deionized water. Reconstituted reagent is stable for 4 weeks at –20°C.

SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Only citrate collected platelet poor plasma may be used for this assay. Do Not Use EDTA collected plasma. See "Collection, Transport and Processing of Blood Specimens for Testing Plasma-based Coagulation Assays and Molecular Hemostasis Assays; Approved Guidelines-Fifth Edition", CLSI Document H21-A5, Vol. 28, No. 5, January 2008. Plasma collection should be performed as follows:

1. Collect 9 parts of blood into 1 part of 3.2% (0.109 M) trisodium citrate anticoagulant solution.
2. Centrifuge the blood sample at 3,000 x g for 15 minutes.
3. Plasma should be stored at 2° - 8°C and assayed within 2 hours. Alternatively, plasma may be stored at –70°C for up to 6 months
4. Frozen plasma should be thawed rapidly at 37°C. Thawed plasmas should be stored at 2°-8°C and assayed within 2 hours.

PROCEDURE

Materials Provided – See Reagents

Materials Required But Not Provided

Automated coagulation analyser set at 405 nm
Spectrophotometer set at 405 nm and laboratory time
deionized water
glacial acetic acid, 0.9% NaCl
25 µL, 200 µL, 500 µL and 2500 µL pipettes
37°C water or dry bath
plastic test tubes or cuvettes
commercially available normal plasma
Heparin – See 'Assay Calibration'

Assay Calibration

Pooled normal human plasma (from at least 20 normal donors) that has been collected in the same manner as plasmas to be tested or commercially available normal plasma may be used for preparation of the heparin standards. The specific heparin preparation used during therapy must be added to the pooled normal plasma to prepare the standards.

Prepare an 8.0 USP unit/mL solution of heparin in saline (0.9% NaCl). When starting with a 1000 unit/mL heparin stock solution, pipette 40 µL of the heparin stock into 4.96 mL of the saline. Then prepare the heparin standards using the 8.0 USP unit/mL solution as shown in Table 1.

Table 1 – Preparation of Heparin Standards

Heparin Standard	Pooled Normal Plasma	Volume of Heparin Standard
0.8 unit/mL	900 µL	100 µL of 8.0 USP unit/mL
0.4 unit/mL	500 µL	500 µL of 0.8 USP unit/mL
0.2 unit/mL	500 µL	500 µL of 0.4 USP unit/mL
0.0 unit/mL	500 µL	None

Assay Procedure

ACTICHROME Heparin (Anti-FXa) may be performed manually, or by using semi-automated or automated coagulation analysers.

Automated Instrumentation Method

BioMedica Diagnostics offers instrument applications for performing ACTICHROME Heparin (Anti-FXa) on several coagulation analysers. These instrument applications may contain platform specific programming and performance data which differ from that provided in this Instructions for Use. In these cases, the information contained in the instrument application supersedes the information in this Instruction for Use. Please consult the specific manufacturer's instrument manual for complete operating instructions. The performance of this assay was determined on an MLA ELECTRA 900C™ optical analyzer.

Manual End-point Method

1. Add 200 µL of AT-III to a plastic test tube.
2. Add 25 µL of plasma sample or heparin standard. Mix and incubate at 37°C for 2 minutes.
3. Add 200 µL of Bovine Factor Xa. Mix and incubate at 37°C for exactly 1 minute.
4. Add 200 µL of SPECTROZYME FXa. Mix and incubate at 37°C for exactly 5 minutes.
5. Add 200 µL of glacial acetic acid. Mix.
6. Add 200 µL of deionized water (optional).*
7. Read absorbance at 405 nm in a 1 cm cuvette against a blank prepared in the following order:

200 µL acetic acid
200 µL AT-III
25 µL pooled normal plasma
200 µL factor Xa
200 µL SPECTROZYME FXa
* 200 µL water (optional)

* Some spectrophotometers require a minimum of 1 mL volume in cuvette.

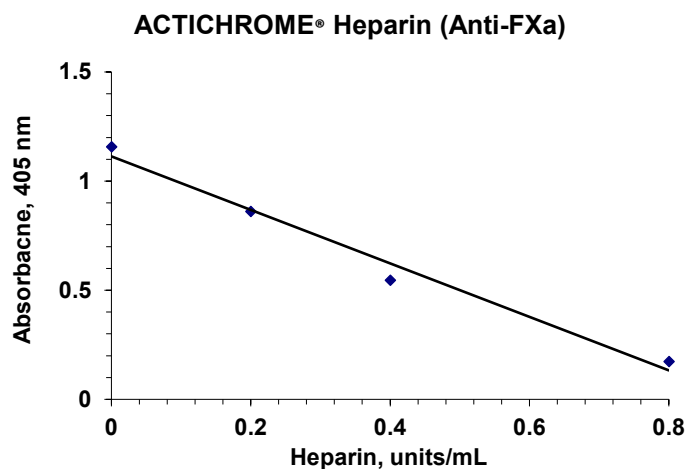
QUALITY CONTROL

Quality control samples should be run according to Laboratory Guidelines. Control samples should be run on freshly reconstituted reagent vials and each time the assay is run. Commercial heparin control plasma may be used for quality control of the assay. Alternatively, pooled normal plasma containing 0.5 and 0.25 units/mL heparin can be made and used as in-house controls. If quality control samples fail to yield heparin concentrations within the correct ranges in any given test, the test should be repeated with freshly reconstituted reagents.

RESULTS

Construct a standard curve by plotting the mean absorbance at a wavelength of 405 nm value for each heparin standard versus its corresponding concentration and draw the best-fit calibration curve. Interpolate the heparin in the unknown samples directly from the standard curve. A standard curve should be generated each time the assay is performed. The following curve is for demonstration purposes only.

Representative Standard Curve



LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

Different heparin preparations may elicit different slopes in the standard curve. The same heparin administered to the patient must be used to generate the standard curve.

Platelet contamination in plasma samples may result in the release of platelet factor 4 (PF4), a potent heparin neutralizer. PF4 released into plasma may result in an underestimation of the heparin concentration. Freezing and thawing of platelets is known to release PF4 from the platelets. If plasma is to be frozen and thawed prior to use in the assay, then the plasma must be prepared as described in the sample preparation section so that it is platelet poor.

INTERFERENCES

Icteric, lipemic and hemolyzed samples may interfere with assay results. Studies have shown that these samples result in an underestimation of the heparin concentration³.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Accuracy

A study performed using an automated instrument to evaluate ACTICHROME Heparin (Anti-FXa) against another commercially available chromogenic heparin assay (using unfractionated heparin) gave a correlation coefficient of 0.913 for 92 samples tested, with a regression equation of $y = 0.84x + 0.003$. The Standard Error of Estimation = 0.07.

A study performed using an automated instrument to evaluate ACTICHROME Heparin (Anti-FXa) against another commercially available chromogenic heparin assay (using low molecular weight heparin) gave a correlation coefficient of 0.895 for 26 samples tested, with a regression equation of $y = 1.36x - 0.139$. The Standard Error of Estimation = 0.14.

Precision

The following estimates of coefficient of variation (CV) were observed using an automated spectrophotometer.

Table 2 – Intra-Assay and Inter-Assay Variations

UFH Concentration	Intra-Assay Variation	Inter-Assay Variation
0.44 units/mL	3.3 %	4.1 %
0.25 units/mL	5.6 %	4.8 %

LMW Heparin Concentration	Intra-Assay Variation	Inter-Assay Variation
0.48 units/mL	2.9 %	6.2 %
0.24 units/mL	5.1 %	9.3 %

Sensitivity

ACTICHROME Heparin (Anti-FXa) is designed to give a linear standard curve for heparin levels between 0 and 0.8 units/mL.

Specificity

Specificity of the assay has been ensured by the use of purified bovine factor Xa and purified human AT-III. In addition, the chromogenic substrate used to measure residual factor Xa activity is highly specific for factor Xa.

SUMMARY OF SAFETY AND PERFORMANCE

The Summary of Safety and Performance (SSP) is available in the European Database on Medical Devices (Eudamed), at <https://ec.europa.eu/tools/eudamed> under the Basic UDI-DI (GMN) 0062794400265Q, or upon request.

REFERENCES

1. Teien, A. N., Lie, M. and Abildgaard, U. Assay of heparin in plasma using a chromogenic substrate. *Thrombosis Research* **8**: 413-416, 1976.
2. Teien, A. N. and Lie, M. Evaluation of an amidolytic heparin assay method: Increased sensitivity by adding purified antithrombin III. *Thrombosis Research* **10**: 399-410, 1977.
3. Data on file at BioMedica Diagnostics.

MLA is a registered trademark of Instrumentation Laboratory, SpA

Changes from the previous revision are noted by red dotted lines in the left margin.

DEUTSCH

VERWENDUNGSZWECK

ACTICHROME® Heparin (Anti-FXa) ist ein chromogener Assay zur quantitativen Bestimmung von therapeutischem Heparin durch Messung der Faktor-Xa-Aktivität im Plasma von Patienten, die sich einer Antikoagulationstherapie unterziehen. Der Assay ist zur Verwendung durch Laborfachkräfte bestimmt und kann manuell oder mit halbautomatischen oder automatisierten Gerinnungsanalysatoren durchgeführt werden. Der Assay ist für die In-vitro-Diagnostik bestimmt.

ERKLÄRUNG DES TESTS

Die Hemmwirkung von Antithrombin III (AT-III) auf Thrombin, Faktor Xa und andere Gerinnungs-Serinproteasen im Plasma wird durch Heparin um das mehrere tausendfache verstärkt. Diese Hemmung erklärt die gerinnungshemmende Wirkung von Heparin. Heparinpräparate mit niedrigem Molekulargewicht (LMWH) scheinen die Reaktion zwischen Faktor Xa und AT-III leichter zu katalysieren als die Reaktion zwischen Thrombin (FIIa) und AT-III. Unfraktioniertes Heparin (UFH) katalysiert beide Reaktionen gleichermaßen. Dies macht den Faktor-Xa-Inhibitionstest zum nützlichsten Assay, da er auf die breiteste Vielfalt von Heparinpräparaten anwendbar ist.

PRINZIP DER METHODE

ACTICHROME Heparin (Anti-FXa) ist ein mehrstufiger, chromogener Assay zur Messung der Heparinaktivität durch Messung der Faktor-Xa-Restaktivität. Im ersten Schritt wird AT-III dem Patientenplasma zugesetzt und bei 37°C inkubiert. Im zweiten Schritt wird der Mischung Rinderfaktor Xa zugesetzt und erneut bei 37°C inkubiert. In der Patientenprobe vorhandenes Heparin hemmt die Faktor-Xa-Aktivität. Zuletzt wird ein chromogenes Substrat, das hochspezifisch für Faktor Xa ist, zu der Mischung gegeben, gefolgt von einer abschließenden Inkubation bei 37°C. Die vorhandene Faktor Xa-Aktivität hydrolysiert das Substrat und setzt ein p-Nitroanilin (pNA)-Chromophor frei, das die Mischung gelb färbt. Die Testreaktion wird durch Zugabe von Essigsäure gestoppt, wodurch sich die Mischung blau färbt. Die Extinktion des pNA in der Reaktionslösung bei 405 nm wird gemessen und mit den Werten verglichen, die aus einer Standardkurve erhalten wurden, die unter Verwendung bekannter Heparin-Aktivitätsniveaus erstellt wurde. Die Rate der Faktor-Xa-Hemmung ist direkt proportional zur Heparinkonzentration, da sowohl Faktor Xa als auch AT-III im Überschuss vorhanden sind. Die verbleibende Faktor-Xa-Aktivität ist umgekehrt proportional zur Heparinkonzentration.^{1,2}

REAGENZIEN

Der Kit enthält ausreichend Reagenzien für die Bestimmung von 200 Testpunkten bei Durchführung der automatisierten koagulationsanalysator, 100 Testpunkten wenn eine manuelle Endpunkt Methode verwendet wird.

R1 Bovine Factor Xa Reagenz: 4 Fläschchen (lyophilisiert).

R2 Human Antithrombin III Reagenz: 4 Fläschchen (lyophilisiert)

R3 SPECTROZYME® FXa: 4 Fläschchen mit je 4 µmol Substrat (lyophilisiert).

VORSICHTSMAßNAHMEN UND WARNHINWEISE

Für die Herstellung von Antithrombin III verwendeten Spender wurden mit Hilfe von FDA zugelassenen Methoden auf Hepatitis B-Oberflächenantigen (HBsAg), Hepatitis C Virus (HCV) und Humanes Immundefizienzvirus Typ 1 und Typ 2 (HIV-1, HIV-2) getestet und für negative befunden. Da sich HBsAg, HCV, HIV-1, HIV-2 und andere Infektionserreger derzeit mit keiner bekannten Testmethode mit völliger Sicherheit ausschließen lassen, muss dieses Reagenz als potentiell infektiös betrachtet und entsprechend gehandhabt werden, wie bei humanen Serum- und Blutproben üblich.

Entsorgen Sie weggeworfenes Material und Verpackung in Übereinstimmung mit allen geltenden örtlichen Vorschriften.

Wenn bei der Verwendung von ACTICHROME Heparin (Anti-FXa) ein schwerwiegender Vorfall auftritt, wenden Sie sich an BioMedica Diagnostics oder Ihren örtlichen Händler und melden Sie dies Ihrer zuständigen örtlichen Behörde.

Bovine Factor Xa	Warnung		CONT	Tris-(hydroxymethyl)aminomethane
			H315, H319, H335, P261, P264, P280, P302 + P352, P305 + P351 + P338, P337 + P313	
Human Antithrombin III	Warnung		H315, H319, H335, P261, P264, P280, P302 + P352, P305 + P351 + P338, P337 + P313	
			CONT	Methoxycarbonyl-D-cyclohexylglycyl-glycyl-arginine-para-nitroanilide acetate
SPECTROZYME® FXa	Warnung		H315, H319, H335, P261, P264, P280, P302 + P352, P305 + P351 + P338, P337 + P313	

Gefahren H315 Verursacht Hautreizungen.
Aussagen: H319 Verursacht schwere Augenreizung.
H335 Kann die Atemwege reizen.

Sicherheitshinweise: P261 Einatmen von Staub/Rauch/Gas/-Nebel/Dampf/Aerosol vermeiden.
P264 Nach Gebrauch gründlich waschen.
P280 Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen.
P302 + P352 BEI KONTAKT MIT DER HAUT: Mit viel Wasser und Seife waschen.

P305 + P351+P338 BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen.
P337 + P313 Bei anhaltender Augenreizung: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.

VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

Ungeöffnete Reagenzien sind bis zu dem auf den Etiketten aufgedruckten Verfallsdatum zu verwenden, wenn sie bei 2° - 8°C gelagert werden.

- R1 Rinder Faktor Xa Reagenz:** 1 Fläschchen mit 5 ml deionisiertem Wasser lösen. Rekonstituiert 4 Wochen bei –20°C haltbar.
- R2 Humanes Antithrombin III Reagenz:** 1 Fläschchen mit 5 ml deionisiertem Wasser lösen. Rekonstituiert 4 Wochen bei –20°C haltbar.
- R3 SPECTROZYME® FXa:** 1 Fläschchen mit 5 ml gefiltertem deionisiertem oder destilliertem Wasser lösen. Rekonstituiert 4 Wochen bei –20°C haltbar.

PROBENABNAHME UND VORBEREITUNG

Nur Thrombozyten-armes Zitratplasma sollte für den Test verwendet werden. Kein EDTA verwenden. Siehe "Collection, Transport and Processing of Blood Specimens for Testing Plasma-based Coagulation Assays and Molecular Hemostasis Assays; Approved Guideline-Fifth Edition", CLSI Document H21-A5, Vol. 28, No. 5, 2008. Die Vorbereitung der Blutproben sollte wie folgt durchgeführt werden:

1. 9 Teile Blut in 1 Teil 3.2% (0.109 M) Trinatrium-Zitrat Antikoagulans Lösung geben.
2. Blut Proben bei 3,000 x g für 15 Minuten zentrifugieren.
3. Das Plasma sollte bei 2°-8°C gelagert und innerhalb von 2 h bestimmt werden. Alternativ kann das Plasma bei –70°C bis zu 6 Monate gelagert werden.
4. Gefrorenes Plasma sollte zügig bei 37°C aufgetaut werden. Aufgetautes Plasma sollte bei 2°-8°C gelagert und innerhalb von 2 Stunden bestimmt werden.

TESTDURCHFÜHRUNG

Kitkomponenten – Siehe Reagenzien

Notwendige Materialien, die nicht mitgeliefert werden

Spektrophotometer (Messwellenlänge 405 nm) und Stoppuhr oder
Automatischer photo-optischer Analyseautomat
deionisiertes Wasser
Eisessig
0.9% NaCl-Lösung

Pipetten mit variablem Volumen (25 - 2500 µl)
Inkubator oder Wasserbad (37°C)
Kunststoff-Reaktionsgefäße oder Küvetten
Normalplasma
Heparin – Siehe „Testkalibrierung“

TESTKALIBRIERUNG

Zur Herstellung der Heparin-Standards sollte normales Humanplasma, gepoolt von mindestens 20 normalen Spendern verwendet werden, das auf die gleiche Weise gewonnen wurde, wie die zu testenden Plasmaproben, oder ein kommerzielles Normalplasma. Für die Heparin-Standards wird die für die Behandlung verwendete Heparin Präparation verwendet und dem gepoolten Normalplasma zugesetzt.

Eine Heparin-Lösung mit 8.0 USP units/ml in physiologischer Kochsalzlösung (0.9% NaCl) ansetzen. Wenn die Heparin-Stocklösung beispielsweise eine Konzentration von 1000 units/ml hat, werden 40 µl Heparin Stocklösung in 4.96 ml 0.9% NaCl pipettiert. Die Heparin-Standards mit der 8,0 USP unit/ml Lösung wie in Tabelle 1 dargestellt herstellen:

Tabelle 1 - Herstellung der Heparin Standards

Heparin Standard Konzentration	Normalplasma Volumen	Heparin Standard Volumen
0,8 unit/ml	900 µl	100 µl of 8,0 USP unit/ml
0,4 unit/ml	500 µl	500 µl of 0,8 USP unit/ml
0,2 unit/ml	500 µl	500 µl of 0,4 USP unit/ml
0,0 unit/ml	500 µl	-

TestDurchführung

ACTICHROME Heparin (Anti-FXa) kann manuell oder mit halbautomatischen oder automatisierten Gerinnungsanalysatoren durchgeführt werden.

Automatisierte Instrumentierungsmethode

BioMedica Diagnostics bietet Instrumentenanwendungen zur Durchführung von ACTICHROME Heparin (Anti-FXa) auf mehreren Gerinnungsanalysatoren. Diese Geräteanwendungen können plattformspezifische Programmier- und Leistungsdaten enthalten, die von denen in dieser Gebrauchsanweisung abweichen. In diesen Fällen ersetzen die in der Geräteanwendung enthaltenen Informationen die Informationen in dieser Gebrauchsanweisung. Eine vollständige Bedienungsanleitung finden Sie im jeweiligen Gerätehandbuch des Herstellers. Die Leistung dieses Assays wurde auf einem optischen Analysegerät MLA ELECTRA 900C TM bestimmt.

Manuelle End-Punkt Methode

1. 200 µL humanes Antithrombin-III Reagenz in ein Testgefäß geben.
2. 25 µL Plasmaprobe oder Heparin-Standard zugeben. Mischen und 2 min bei 37°C inkubieren.
3. 200 µL bovinen Faktor Xa zugeben. Mischen und genau 1 min bei 37°C inkubieren.
4. 200 µL SPECTROZYME FXa Substrat zugeben. Mischen und genau 5 min bei 37°C inkubieren.
5. 200 µL Eisessig zugeben und mischen.
6. *200 µL gefiltertes deionisiertes Wasser zugeben (optional).
7. Die optische Dichte bei 405 nm in einer 1 cm semi-mikro Küvette gegen einen Leerwert messen, der wie folgt angesetzt wird:
200 µL Essigsäure
200 µL humanes Antithrombin III Reagenz
25 µL Normalplasma
200 µL Faktor Xa Reagenz
200 µL SPECTROZYME FXa Substrat
200 µL Wasser (optional)

* Einige Spektralphotometer benötigen ein Mindestvolumen von 1 ml in der Küvette.

QUALITÄTSKONTROLLE

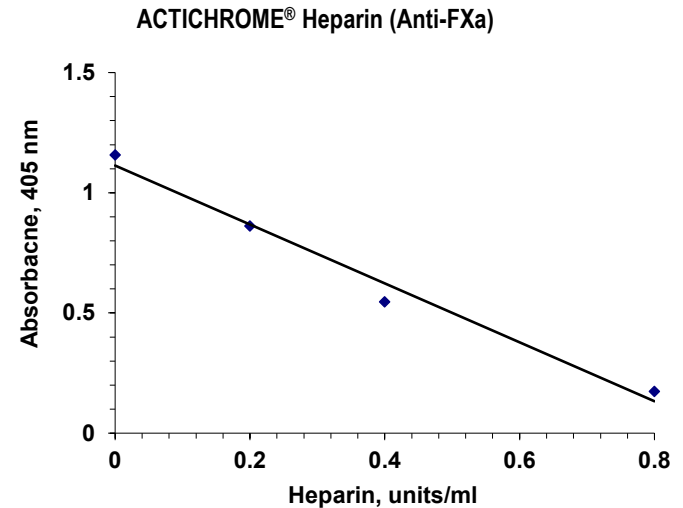
Gemäß der Allgemeinen Laborrichtlinien sollten bei jeder Testdurchführung Kontrollproben mitgeführt werden. Kommerziell erhältliches Heparin Kontrollplasma kann als Qualitätskontrolle verwendet werden. Alternativ kann gepooltes humanes Normalplasma, versetzt mit 0.5 und 0.25 units/ml Heparin, verwendet werden. Wenn die Kontrollen nicht im zu erwartenden Bereich liegen, sollte der Test mit frisch rekonstituierten Reagenzien wiederholt werden.

ERGEBNISSE

Die Standardkurve wird erstellt, indem man die Mittelwerte der bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessenen Extinktionswerte für die einzelnen Heparin Standards gegen die entsprechende Konzentration aufträgt. Durch die einzelnen Punkte wird eine Gerade gelegt, so dass die Summe der Abweichungen am geringsten ist („line of best fit“). Die Heparin Konzentration in den Patientenproben kann durch Interpolation von der

Standardkurve ermittelt werden. Bei jeder Testdurchführung muss eine neue Standardkurve ermittelt werden. Die im Folgenden abgebildete Standardkurve ist nur zu Demonstrationszwecken.

Repräsentative Standardkurve



GRENZEN DES VERFAHRENS

Verschiedene Heparin Präparationen können unterschiedliche Steigungen der Standardkurve bedingen. Daher muss unbedingt die Heparin-Präparation für die Standardkurve verwendet werden, die auch den Patienten verabreicht wurde. Noch im Plasma enthaltene Plättchen können Platelet Factor 4 (PF4) sezernieren, ein potenter Heparin Inhibitor. Im Plasma vorhandener PF4 kann daher eine Unterschätzung der tatsächlichen Heparin Konzentration bewirken. Einfrieren und Auftauen von Plasma begünstigt die Freisetzung von PF4 aus den Plättchen. Wenn Plasma vor der Testung eingefroren wird, muss das Plasma entsprechend dem Kapitel „Probenabnahme und Vorbereitung“ präpariert werden, damit es möglichst frei von Plättchen ist.

INTERFERENZEN

Ikterische, lipämische und hämolytische Proben können mit dem Test interferieren und die Ergebnisse verfälschen. Studien haben gezeigt, dass solche Proben eine zu niedrige Heparin Konzentration ergeben.³

LEISTUNGSMERKMALE

Genauigkeit

Der Benutzer sollte für die jeweils benutzte Methode und das jeweilige Gerät seine eigenen Leistungsmerkmale ermitteln. Ein Vergleich des ACTICHROME Heparin (Anti-FXa) Tests auf einem automatisierten Analyseautomaten mit einem anderen kommerziellen chromogenen Heparintest (Verwendung von unfraktioniertem Heparin) lieferte folgende

Ergebnisse: Bei 92 getesteten Proben wurde ein Korrelationskoeffizient von 0,913 mit einer Regressionsgleichung von $y = 0.84x + 0.003$ erzielt. Standardfehler der Schätzung = 0,07.

Ein Vergleich des ACTICHROME Heparin (Anti-FXa) Tests auf einem automatisierten Analyseautomaten mit einem anderen kommerziellen chromogenen Heparintest (Verwendung von niedermolekularem Heparin) lieferte folgende Ergebnisse: Bei 26 getesteten Proben wurde ein Korrelationskoeffizient von 0,895 mit einer Regressionsgleichung von $y = 1,36x + 0.139$ erzielt. Standardfehler der Schätzung = 0,14.

Präzision

Mit einem automatisierten Analyseautomaten wurden die folgenden Variations-Koeffizienten (VK) ermittelt.

Tabelle 2 – Intra-Assay und Inter-Assay Variationen

UFH Konzentration	Intra-Assay Variation	Inter-Assay Variation
0,44 units/ml	3,3 %	4,1 %
0,25 units/ml	5,6 %	4,8 %

LMW Heparin Konzentration	Intra-Assay Variation	Inter-Assay Variation
0,48 units/ml	2,9 %	6,2 %
0,24 units/ml	5,1 %	9,3 %

Sensitivität

Der ACTICHROME Heparin (Anti-FXa) Test hat einen linearen Messbereich von 0 bis 0,8 units Heparin/ml.

Spezifität

Die Spezifität des Tests wurde durch die Verwendung von gereinigtem bovinem Faktor Xa und gereinigtem humanem AT-III gewährleistet. Zudem ist das für die Bestimmung der restlichen Faktor Xa-Aktivität verwendete Substrat hochspezifisch für Faktor Xa.

ZUSAMMENFASSUNG DER SICHERHEIT UND LEISTUNG

Die Zusammenfassung der Sicherheit und Leistung (SSP) ist in der Europäischen Datenbank für Medizinprodukte (Eudamed) unter <https://ec.europa.eu/tools/eudamed> unter der Basic UDI-DI (GMN) 0062794400265Q verfügbar, oder auf Anfrage.

LITERATURHINWEISE

1. Teien, A. N., Lie, M. and Abildgaard, U. Assay of heparin in plasma using a chromogenic substrate. *Thrombosis Research* **8**: 413-416, 1976.
2. Teien, A. N. and Lie, M. Evaluation of an amidolytic heparin assay method: Increased sensitivity by adding purified antithrombin III. *Thrombosis Research* **10**: 399-410, 1977.
3. Data on file at BioMedica Diagnostics.

MLA ist ein ist ein geschützter Markenname von Instrumentation Laboratory, SpA

Änderungen gegenüber der vorherigen Revision sind durch rot gepunktete Linien am linken Rand gekennzeichnet.

DEFINITION OF SYMBOLS // BEDEUTUNG DER SYMBOLE

	Consult instructions for use	Gebrauchsanleitung beachten
	Warning	Warnung
	In vitro diagnostic medical device	Medizinisches Produkt zur in vitro-Diagnostik
	Manufacturer	Hersteller
	Temperature limitation: Store at 2°C to 8°C	Bei 2°C bis 8°C lagern
	Batch code / Lot number	Charge
	Expiration Date	Verfallsdatum
	Catalog number	Katalog-Nr
	CE Mark	CE-Siegel
	European Authorised Representative	Autorisierte Vertretung für Europa
	Contains sufficient for <n> tests	Inhalt ausreichend für <n> Tests
	contains	enthält