

american diagnostica inc.

500 West Avenue, Stamford, CT 06902
Tel. (203) 602-7777 • Fax. (203) 602-2221



ENGLISH

ACTICHROME[®] Heparin (anti-fIIa)

REF 820



(CPT Code No. 85520)



american diagnostica GmbH
Kaplaneigasse 35, D-64319 Pfungstadt, Germany

INTENDED USE

ACTICHROME[®] Heparin (anti-fIIa) is an amidolytic chromogenic assay intended for the quantitative determination of therapeutic heparin in human plasma by measurement of factor IIa (thrombin) activity.

PRINCIPLE

The inhibitory effect of antithrombin III (AT-III) on factor IIa (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. The quantitative determination of plasma heparin levels by the measurement of their anti-factor IIa activity is a necessary tool for monitoring treatment efficacy.

Low molecular weight heparin (LMWH) preparations appear to catalyze the reaction between thrombin (fIIa) and AT-III less readily than the reaction between factor Xa and AT-III. Unfractionated heparin (UFH) catalyzes both reactions equally. In this assay, the rate of factor IIa inhibition is directly proportional to the heparin concentration since both factor IIa and AT-III are in excess. The residual factor IIa activity is inversely proportional to the heparin concentration.^{1,2}

REAGENTS

The kit contains sufficient reagents to perform 48 tests using a manual end-point method. Automated instruments yield a higher number of tests.

- R1 **Bovine Thrombin Reagent:** 6 vials each containing bovine thrombin (lyophilized).
- R2 **Human Antithrombin III Reagent:** 6 vials each containing human antithrombin III (lyophilized).
- R3 **SPECTROZYME[®] TH:** 6 vials each containing 1.8 µmoles of substrate (lyophilized).

REAGENTS AND EQUIPMENT REQUIRED BUT NOT PROVIDED

spectrophotometer set at 405 nm and laboratory timer or,
automated chromogenic photo-optical instrument
0.22 µm filtered deionized/distilled water for dilution
0.9% NaCl
glacial acetic acid
25 µL, 200 µL, 500 µL and 2500 µL pipettes
37°C water or dry bath
plastic test tubes or cuvettes
linear graph paper
commercially available normal plasma (e.g. ADI Cat. No. 258N)

REAGENT RECONSTITUTION AND STABILITY

Unreconstituted reagents are stable until the expiration date indicated on the label when stored at +2° - +8°C.

R1 Bovine Thrombin Reagent: Reconstitute with 2 mL filtered deionized/distilled water. Reconstituted reagent is stable for 2 weeks at +2° - +8°C and for 4 months at -20°C.

R2 Human Antithrombin III Reagent: Reconstitute with 5 mL filtered deionized/distilled water. Reconstituted material is stable for 2 weeks at +2° - +8°C and for 4 months at -20°C.

R3 SPECTROZYME® TH: Reconstitute with 2 mL filtered deionized/distilled water. Reconstituted material is stable for 2 months at +2° - +8°C and for 6 months at -20°C.

WARNING

The source material for the human antithrombin III 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 FDA Approved methods. As no known test method can provide complete assurance that products derived from human blood 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.

SPECIMEN COLLECTION

Nine volumes of blood is collected in 1 volume of 0.1M trisodium citrate and centrifuged at 3,000 x g for 15 minutes (See NCCLS standard H21-A3). Exercise great care in the centrifugation of the samples in order to minimize platelet alteration, as well as to achieve maximum removal of the platelets. Perform centrifugation within one hour after sample collection. Plasma should be stored at +2° - +8°C and assayed within 2 hours. Platelet poor plasma may be stored at -20°C for up to one month and then thawed once at 37°C, 30 minutes before testing.

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 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 a 6.0 USP unit/mL solution of heparin in saline (0.9% NaCl). When starting with a 1000 unit/mL heparin stock solution, pipette 30 µL of the heparin stock into 4.97 mL of the saline. Then prepare the heparin standards using the 6.0 USP unit/mL solution as shown in Table 1.

Table 1

Heparin Standard	Pooled Normal Plasma	Volume of Heparin Standard
0.6 unit/mL	900 µL	100 µL of 6.0 USP unit/mL
0.3 unit/mL	500 µL	500 µL of 0.6 USP unit/mL
0.15 unit/mL	500 µL	500 µL of 0.3 USP unit/mL
0.0 unit/mL	500 µL	None

Prepare a 1:16 dilution of each patient plasma specimen and each heparin standard by adding 25 µL of plasma specimen or standard to 375 µL of Human Antithrombin III Reagent.

PROCEDURE

Manual End-point Method

1. Add 200 µL of Human Antithrombin III Reagent to a plastic test tube.
2. Add 25 µL of 1:16 dilution of plasma sample or heparin standard.
3. Mix and incubate at 37°C for 2 minutes.
4. Add 200 µL of Bovine Thrombin Reagent.
5. Mix and incubate at 37°C for exactly 2 minute.
6. Add 200 µL of SPECTROZYME TH Substrate.
7. Mix and incubate at 37°C for exactly 1 minute.
8. Add 200 µL of glacial acetic acid. Mix.
9. Add 200 µL of filtered deionized water (optional)*.
10. Read absorbance at 405 nm in a 1 cm semi-micro cuvette against a blank prepared in the following order:
 - 200 µL acetic acid
 - 200 µL Human Antithrombin III Reagent
 - 25 µL pooled normal plasma diluted 1:16 in Human Antithrombin III Reagent
 - 200 µL Bovine Thrombin Reagent
 - 200 µL SPECTROZYME TH Substrate
 - 200 µL water (optional)*

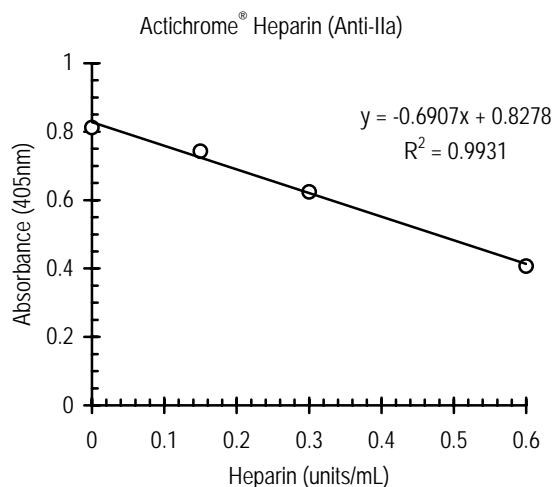
* Some spectrophotometers require a minimum of 1 mL volume in cuvette.

Automated Instrumentation Method

Automated chromogenic photo-optical instrument procedures utilize an initial rate reaction rather than an end-point method as described above. Please refer to the manufacturer's instrument manuals for chromogenic assay procedures. The performance of this assay was determined on an MLA® 900C optical analyzer. The instrument application is available from American Diagnostica upon request.

CALIBRATION CURVE

Plot the absorbance obtained at 405 nm for each heparin standard against its concentration on linear graph paper. The heparin in patient plasma can be determined by interpolation from the calibration curve (see sample calibration curve). The sample curve shown below is for example only. A standard curve should be generated each time the assay is performed.



LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

This assay is not optimized to measure patient samples containing low molecular weight heparins (LMWH). LMWH preparations appear to catalyze the reaction between thrombin (fIIa) and AT-11 less readily than the reaction between factor Xa and AT-III.

Different heparin preparations may elicit different slopes in the standard curve. The 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 concentration.³

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Accuracy

A study performed using an automated instrument to evaluate ACTICHROME Heparin (anti-fIIa) against another commercially available chromogenic heparin assay gave a correlation coefficient of 0.967 for 88 samples tested, with a regression equation of $y = 0.845x + 0.027$. The Standard Error of Estimation = 0.03.

Precision

The following estimates of coefficient of variation (CV) were observed using an automated chromogenic photo-optical instrument.

Table 2

Heparin Concentration	Intra-Assay Variation	Inter-Assay Variation
0.42 units/mL	4.7%	7.6%
0.23 units/mL	10.8%	9.6%

Sensitivity

ACTICHROME Heparin (anti-fIIa) is designed to give a linear standard curve for heparin levels between 0.0 and 0.6 units/mL.

Specificity

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

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.

REFERENCES

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

MLA is a registered trademark of Instrumentation Laboratory, SpA

DEUTSCH

VERWENDUNGSZWECK

ACTICHROME® Heparin (anti-fIIa) ist ein amidolytischer chromogener Test zur quantitativen Bestimmung von therapeutischem Heparin in humanem Plasma über die Bestimmung der Faktor IIa (Thrombin) Aktivität.

PRINZIP DER METHODE

Heparin verstärkt den inhibitorischen Effekt von Antithrombin III (AT-III) auf Faktor IIa (Thrombin), Faktor Xa und weitere koagulatorische Serinproteasen im Plasma um ein Vielfaches. Die anti-koagulatorische Wirkung von Heparin beruht auf diesem inhibitorischen Effekt. Die Effizienz einer Heparin-Behandlung lässt sich über die anti-Faktor IIa Aktivität von Heparin im Plasma quantitativ verfolgen.

Niedermolekulare Heparin (LMWH) Präparationen scheinen die Reaktion zwischen AT-III und Faktor IIa weniger gut zu verstärken als die Reaktion zwischen AT-III und Faktor Xa. Unfraktioniertes Heparin (UFH) verstärkt beide Reaktionen gleich gut. In diesem Test ist die Inhibition von Faktor IIa direkt proportional zur Heparin Konzentration, da sowohl Faktor IIa und AT-III im Überschuss vorliegen. Die restliche Faktor IIa Aktivität ist daher umgekehrt proportional zur Heparin Konzentration.^{1,2}

REAGENZIEN

Der Test enthält ausreichend Reagenzien für die Bestimmung von 48 Testpunkten bei Durchführung der manuellen Endpunkt Methode. Die automatisierte Durchführung ermöglicht die Analyse von mehr Testpunkten.

- R1 Bovine Thrombin Reagent:** 6 Fläschchen mit bovinem Thrombin (lyophilisiert).
- R2 Human Antithrombin III Reagent:** 6 Fläschchen mit humanem Antithrombin III (lyophilisiert).
- R3 SPECTROZYME® TH:** 6 Fläschchen mit je 1.8 µmol Substrat (lyophilisiert).

WEITERE BENÖTIGTE REAGENZIEN UND GERÄTE

Spektrophotometer (Messwellenlänge 405 nm) und Stoppuhr oder, Automatischer photo-optischer Gerinnungsautomat
0.22 µm gefiltertes deionisiertes/destilliertes Wasser
0.9% NaCl-Lösung
Eisessig
Pipetten mit variablem Volumen (25 - 2500 µL)
Inkubator oder Wasserbad (37°C)
Kunststoff-Reaktionsgefäße oder Küvetten
Normalplasma (z.Bsp. ADI REF 258N)

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 Bovine Thrombin Reagent:** 1 Fläschchen mit 2 mL gefiltertem deionisiertem oder destilliertem Wasser lösen. Rekonstituiert 2 Wochen bei 2° - 8°C oder 4 Monate bei -20°C haltbar.
- R2 Human Antithrombin III Reagent:** 1 Fläschchen mit 5 mL gefiltertem deionisiertem oder destilliertem Wasser lösen. Rekonstituiert 2 Wochen bei 2° - 8°C oder 4 Monate bei -20°C haltbar.
- R3 SPECTROZYME® TH:** 1 Fläschchen mit 2 mL gefiltertem deionisiertem oder destilliertem Wasser lösen. Rekonstituiert 2 Wochen bei 2° - 8°C oder 6 Monate bei -20°C haltbar.

VORSICHTSMAßNAHMEN UND WARNHINWEISE

Für die Herstellung von Antithrombin III verwendeten Spender wurden mit Hilfe FDA zugelassener Methoden auf Hepatitis B-Oberflächenantigen (HBsAg), Hepatitis C Virus (HCV) und Humanes Immundefizienzvirus Typ 1 and 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.

PROBENNAHME

Die Gewinnung der Plasmaprobe ist wie folgt durchzuführen: 9 Teile Blut in ein Teil 0.1M tri-Natriumzitrat abnehmen und bei 3,000 x g für 15 Minuten zentrifugieren (siehe hierzu auch die NCCLS-Veröffentlichung H21-A3). Die Zentrifugation sollte vorsichtig durchgeführt werden um eine Veränderung der Plättchen zu verhindern und eine möglichst vollständige Entfernung der Plättchen zu erzielen. Die Zentrifugation innerhalb einer Stunde nach der Blutentnahme durchführen. Plasma sollte bei 2° - 8°C aufbewahrt werden und innerhalb von 2 Stunden getestet werden. Alternativ kann das Plasma auch bis zu 1 Monat bei -20°C gelagert werden und 30 min vor der Testung bei 37°C einmalig aufgetaut werden.

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. Für die Heparin-Standards wird die für die Behandlung verwendete Heparin Präparation verwendet und dem gepoolten Normalplasma zugesetzt.

Eine Heparin-Lösung mit 6.0 USP units/mL in physiologischer Kochsalzlösung (0.9% NaCl) ansetzen. (z. Bsp. wenn die Heparin-Stocklösung eine Konzentration von 1000 units/mL hat: 30 µl Heparin Stocklösung in 4.97 mL 0.9% NaCl). Die Heparin-Standards wie in Tabelle 1 dargestellt herstellen:

Tabelle 1

Heparin Standard Konzentration	Normalplasma Volumen	Heparin Standard Volumen
0,6 units/mL	900 µL	100 µL of 6,0 USP unit/mL
0,3 units/mL	500 µL	500 µL of 0,6 USP unit/mL
0,15 units/mL	500 µL	500 µL of 0,3 USP unit/mL
0.0 units/mL	500 µL	-

Die Patientenplasma Proben und die Heparin-Standards werden 1:16 verdünnt, indem 25 µL Probe bzw. Standard und 375 µL humanes Antithrombin III Reagenz gemischt werden.

TESTDURCHFÜHRUNG

Manuelle End-Punkt Methode

1. 200 µL humanes Antithrombin III Reagenz in ein Testgefäß geben.
2. 25 µL 1:16 verdünnte Plasmaprobe oder Heparin-Standard zugeben.
3. Mischen und 2 min bei 37°C inkubieren.
4. 200 µL des bovinen Thrombin Reagenz zugeben.
5. Mischen und genau 2 min bei 37°C inkubieren.
6. 200 µL of SPECTROZYME TH Substrat zugeben
7. Mischen und genau 1 min bei 37°C inkubieren.
8. 200 µL Eisessig zugeben und mischen.
9. *200 µL gefiltertes deionisiertes Wasser zugeben (optional).

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 Pool 1:16 in humanem Antithrombin III Reagenz verdünnt
200 µL BovinesThrombin Reagenz
200 µL SPECTROZYME TH Substrat
200 µL Wasser (optional)

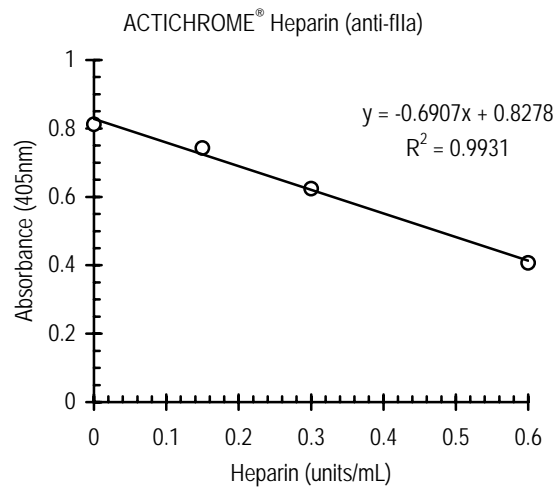
* Einige Spektralphotometer benötigen ein Mindestvolumen von 1 mL in der Küvette.

Automatisierte Geräte Methode

Bei der Verwendung von automatisierten photooptischen Geräten wird in der Regel die anfängliche Reaktionsrate bestimmt und keine End-Punkt Messung vorgenommen. Berücksichtigen Sie bitte die Anleitung des Herstellers für chromogene Testverfahren. Der Test wurde auf einem MLA® 900C optischen Analyseautomaten evaluiert. Die Instrumentenapplikation kann von American Diagnostica angefordert werden.

STANDARDKURVE

Die Messwerte der Heparin-Standards werden in einer linearen Graphik dargestellt (x-Achse: Heparin-Konzentration, y-Achse: optische Dichte bei 405 nm gemessen). 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. Die abgebildete Standardkurve ist lediglich ein Beispiel. Bei jeder Testdurchführung muss eine neue Standardkurve ermittelt werden.



BESCHRÄNKUNGEN UND STÖRUNGEN

Der Test ist nicht für die Bestimmung von Patientenplasmen optimiert, die niedermolekulares Heparin enthalten. Niedermolekulares Heparin scheint die Reaktion zwischen AT-III und Faktor IIa weniger gut zu verstärken als die Reaktion zwischen AT-III und Faktor Xa.

Verschiedene Heparin Präparationen können daher 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 „Probennahme“ präpariert werden, damit es möglichst frei von Plättchen ist.

Icterische, 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-fIIa) Tests auf einem photoptischen Analyseautomaten mit einem anderen kommerziellen chromogenen Heparintest lieferte folgende Ergebnisse, Bei 88 getesteten Proben wurde ein Korrelationskoeffizient von 0,967 mit einer Regressionsgleichung von $y = 0.845x + 0.027$ erzielt.

Präzision

Mit einem photoptischen Analyseautomaten wurden die folgenden Variationskoeffizienten (VK) ermittelt.

Tabelle 2

Heparin Konzentration	Intra-Assay Variation	Inter-Assay Variation
0.42 units/mL	4.7%	7.6%
0.23 units/mL	10.8%	9.6%

Sensitivität

Der ACTICHROME Heparin (anti-fIIa) Test hat einen linearen Messbereich von 0.0 and 0.6 units Heparin/mL.

Spezifität

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

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.

LITERATURHINWEISE

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

MLA is a registered trademark of Instrumentation Laboratory, SpA