



Determinación cronométrica de las heparinas (HNF y HBPM) mediante el método anti-Xa

● Contenido del kit:

- 4 viales de Reactivo 1 (Substrato Plasma)
- 4 viales de Reactivo 2 (F. Xa)
- 4 viales de Reactivo 3 (Phospholipids-Ca⁺⁺)

(REF 00691)



Enero 2010

Español 9

1/ UTILIZACIÓN DEL KIT

Determinación, en los aparatos de la línea STA[®] que pueden utilizar estos reactivos, del efecto potenciador de las heparinas no fraccionadas (HNF) y de bajo peso molecular (HBPM) sobre la antitrombina mediante la medida, en el plasma, de la actividad anti-Xa obtenida por el método cronométrico (1, 2).

2/ SUMARIO

Las heparinas (HNF y HBPM) son medicamentos anticoagulantes utilizados en los tratamientos curativos y preventivos de las enfermedades tromboembólicas. La determinación de la heparinemia del paciente permite controlar y adaptar el tratamiento (5).

3/ PRINCIPIO DEL TEST

El complejo heparina-antitrombina (AT) ejerce una acción inhibitoria sobre las serín-proteasas de la hemostasis.

La dosificación se realiza en dos etapas:

- acción inhibitoria del complejo AT-heparina, en un exceso de factor Xa purificado: [AT-heparina] + Xa (en exceso) → [AT-heparina-Xa] + Xa (residual)
- medición de la actividad coagulante del factor Xa residual mediante la adición de fosfolípidos y de calcio en presencia de un plasma sustrato que, además de un exceso de AT, aporta también al medio de reacción un exceso de los factores necesarios para la coagulación (F. II, fibrinógeno...) y permite así eliminar la interferencia de los factores aportados por el plasma probado.

4/ COMPOSICIÓN DEL KIT

Cada estuche de STA[®] - StacLOT[®] Heparin contiene una hoja con código de barras. Este código de barras contiene las siguientes informaciones: número de lote, referencia del kit, referencia de los reactivos, fecha de caducidad.

- **Reactivo 1:** plasma sustrato de origen humano, liofilizado.
- **Reactivo 2:** aproximadamente 0,3 UI de factor Xa bovino por ml de reactivo tras la reconstitución.
- **Reactivo 3:** fosfolípidos en medio cálcico (35 mM), liofilizados.

Algunos reactivos de este kit contienen productos de origen humano y/o animal. Cuando se ha utilizado plasma humano en la preparación de estos reactivos, se excluye previamente la presencia del antígeno HBs, de los anticuerpos anti-HCV, anti-HIV 1 y anti-HIV 2 con los correspondientes análisis. Sin embargo, ningún test puede garantizar de manera absoluta la ausencia de agentes infecciosos. Por eso, estos reactivos de origen biológico han de ser manipulados con las precauciones habituales, ya que se trata de productos potencialmente infecciosos.

5/ PRECAUCIONES

El estuche intacto se debe conservar a 2-8 °C. Estos reactivos se destinan exclusivamente a un uso *in vitro* y deben ser manipulados por personal de laboratorio. Utilizar únicamente reactivos de un mismo kit o de un mismo lote. Los residuos se eliminarán con arreglo a la reglamentación local vigente.

El kit STA[®] - StacLOT[®] Heparin está diseñado para los aparatos de la línea STA[®] que pueden utilizar estos reactivos. Antes de cualquier utilización, leer con atención el "Manual del Operador" del instrumento utilizado. Tener cuidado en el manejo de estos reactivos y las muestras.

6/ OBTENCIÓN Y TRATAMIENTO DE LA MUESTRA

La obtención de la muestra debe ajustarse a las recomendaciones para los exámenes de hemostasis. Un tratamiento inadecuado de la muestra puede provocar la aparición en el plasma de factor 4 plaquetario (PF4), inhibidor potencial de la heparina (HNF). Por consiguiente, se pondrá la mayor atención posible en la preparación de la muestra. En el caso de una heparinoterapia discontinua, se ha de precisar y conocer el plazo de tiempo que separa la obtención de la muestra de la inyección precedente o de la siguiente.

● Obtención de la muestra

- En tubo no humedecible con una solución de citrato trisódico 0,109 M: 1 vol. de citrato para 9 vol. de sangre,
- o, de preferencia, en tubo CTAD (disponible en Becton Dickinson), que es un tubo especialmente concebido para prevenir la inactivación de la heparina (4).

● Centrifugación

En la etapa de centrifugación hay que tener un especial cuidado para limitar la alteración de las plaquetas así como el número de plaquetas residuales. Centrifugar durante 15 minutos a 3 000 g a una temperatura de unos 18 °C. Esta centrifugación se debe realizar antes de 1 hora tras la obtención de la muestra cuando ésta se recoge en tubos con citrato convencional o antes de 4 horas cuando se recoge con CTAD (7). Cuando la muestra se obtiene con citrato convencional, es preferible efectuar una doble centrifugación (7).

● Conservación

El plasma se puede conservar 2 horas (citrato) o 4 horas (CTAD) a 20 ± 5 °C (4).

7/ PREPARACIÓN Y CONSERVACIÓN DE LOS REACTIVOS

● Preparación

Reconstituir cada vial de Reactivo 1, 2 o 3 con exactamente 1 ml de agua destilada. Dejar estabilizarse la solución durante 1 hora a temperatura ambiente (18-25 °C). Homogeneizar antes de usar.

● Conservación

Conservados a 2-8 °C y en su estado original, los reactivos son estables hasta la fecha de caducidad indicada en el estuche.

Estabilidad después de la reconstitución: 7 horas en STA Compact[®] y STA-R[®].

8/ REACTIVOS Y MATERIAL AUXILIARES

● STA[®] - Owren-Koller (REF 00360).

- Calibración: STA[®] - Heparinorm[®] H (REF 00684) para valorar las HNF, STA[®] - Heparinorm[®] HBPM/LMWH (REF 00681) para valorar las HBPM.

- Control de calidad: STA[®] - Heparin Control (REF 00683) para valorar las HNF, STA[®] - HBPM/LMWH Control (REF 00682) para valorar las HBPM.

- Instrumento de la línea STA[®] que puede utilizar estos reactivos.

- Equipamiento habitual en los laboratorios de análisis clínicos (centrifugadora, agua destilada...).

9/ PROCEDIMIENTO

9.1. Calibración

La calibración se realiza con los kits STA[®] - Heparinorm[®] H (HNF) o STA[®] - Heparinorm[®] HBPM/LMWH (HBPM). Preparar los tres reactivos de los kits y transferir al instrumento las informaciones contenidas en los códigos de barras de la hoja.

Las calibraciones se pueden visualizar en la pantalla del aparato con el menú "Calibración" (ver el "Manual del Operador").

9.2. Plasmas a probar

Los plasmas a probar se utilizan sin diluir. Se cargan en el instrumento (ver el "Manual del Operador" del aparato utilizado).

Seleccionar el(los) test(s) a realizar en los plasmas de pacientes.

9.3. Controles

Los controles son necesarios para comprobar la exactitud y la reproducibilidad de los resultados. Utilizar el estuche STA[®] - Heparin Control (HNF) o STA[®] - HBPM/LMWH Control (HBPM). Preparar estos controles y transferir al instrumento las informaciones contenidas en los códigos de barras de la hoja. Estos controles se utilizan sin diluir.

9.4. Determinación

Para la realización de la dosificación, seguir los protocolos (HNF o HBPM) descritos en los "Standardized Operating Procedures" del instrumento.

La determinación de la heparina (HNF o HBPM) en el plasma por valorar se procesa automáticamente por el analizador. Es necesario realizar las determinaciones de heparina en serie.

10/ RESULTADOS

El nivel de heparina de las muestras probadas aparece en tiempo real en UI/ml (HNF) o en UI anti-Xa/ml (HBPM) en la pantalla del instrumento (ver el "Manual del Operador"). El resultado debe interpretarse en función del estado clínico y biológico del paciente.

Si el aparato indica que los resultados obtenidos para los controles están fuera del rango indicado en la hoja de estos controles, asegurarse del buen funcionamiento de todo el sistema: condiciones operativas, reactivos, calibración, plasmas a probar, etc. Si es necesario, repetir las muestras.

11/ LIMITACIONES

- Obtención y tratamiento de la muestra: la centrifugación debe ser cuidadosa y completa para evitar la liberación de factor 4 plaquetario (ver el capítulo "6/ Obtención y tratamiento de la muestra").

- Como en la prueba se añade antitrombina, la valoración es independiente del nivel de antitrombina del paciente. Las valoraciones realizadas con los kits STA[®] - Rotachrom[®] Heparin (REF 00612, 00661) son dependientes del nivel de AT del paciente.

- Los inhibidores de la trombina (p. ej. hirudina, argatroban...) presentes en la muestra a probar pueden hacer que se sobrestime el nivel de heparina de la muestra.

12/ INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

La heparina está ausente en los plasmas normales. La heparinemia obtenida se debe analizar en función del tratamiento administrado al paciente (tipo de heparina, posología, modo de administración, hora de la toma de la muestra...) y del grado de anticoagulación deseado (8).

Sea cual sea la naturaleza de la heparina utilizada (HNF o HBPM) y sea cual sea la dosis (curativa o preventiva), se llevarán a cabo recuentos plaquetarios regulares antes y durante el tratamiento, a la búsqueda de una eventual trombocitopenia inducida por heparina (TIH) (6). Dicha trombocitopenia se podrá poner en evidencia con la ayuda del kit Asserachrom[®] HPIA (REF 00615) que permite detectar específicamente los anticuerpos anti-heparina-factor 4 plaquetario presentes en la mayoría de las TIH.

Según el contexto clínico, una dosificación de la antitrombina puede resultar de utilidad.

13/ CARACTERÍSTICAS DEL MÉTODO

- Límite de detección - Intervalo de medición**
En método HNF en STA®, el límite de detección es de 0,10 UI/ml y el intervalo de medición va hasta los 0,60 UI/ml.
En método HBPM en STA®, el límite de detección es de 0,10 UI anti-Xa/ml y el intervalo de medición va hasta los 1,0 UI anti-Xa/ml.
- Reproducibilidad**
Se han llevado a cabo estudios de reproducibilidad intra- e inter-series en muestras que contenían heparina. Los resultados obtenidos en STA® con el STA® - Staclo® Heparin están indicados en las tablas siguientes:
– heparinas no fraccionadas

Muestra	Reproducibilidad intra-serie		Reproducibilidad inter-series	
	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4
n	10	10	10	10
$\bar{X}$ (UI/ml)	0,38	0,61	0,32	0,66
DS (UI/ml)	0,01	0,01	0,01	0,02
CV (%)	2,1	2,2	3,4	2,4

– heparinas de bajo peso molecular

Muestra	Reproducibilidad intra-serie		Reproducibilidad inter-series	
	Muestra a	Muestra b	Muestra c	Muestra d
n	10	10	10	10
$\bar{X}$ (UI anti-Xa/ml)	0,43	0,88	0,37	0,88
DS (UI anti-Xa/ml)	0,02	0,03	0,02	0,04
CV (%)	4,1	3,3	6,8	4,9

14/ VARIANTES

Los capítulos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 11 y 12 precedentes, son también válidos para la dosificación con el método semiautomático o al baño maría.

- 14.1. Preparación y conservación de los reactivos**
La preparación de los reactivos es idéntica a la indicada en el capítulo 7 del presente folleto.
Tras la reconstitución, la estabilidad de los reactivos es la siguiente:
Reactivo 1: 8 horas a 20 ± 5 °C
Reactivo 2: 8 horas a 20 ± 5 °C
Reactivo 3: 8 horas a 37 °C (para evitar el fenómeno de evaporación, se aconseja tapar el vial entre los usos).
- 14.2. Reactivos y material auxiliares**
 - Calibración: **STA® - Heparinorm® H** (REF 00684) para valorar las HNF, **STA® - Heparinorm® HBPM/LMWH** (REF 00681) para valorar las HBPM.
 - Control de calidad: **STA® - Heparin Control** (REF 00683) para valorar las HNF, **STA® - HBPM/LMWH Control** (REF 00682) para valorar las HBPM.
 - Equipamiento habitual en los laboratorios de análisis clínicos (centrifugadora, baño maría o instrumento como el ST art®, cronómetro, pipetas, agua destilada...).

- 14.3. Calibración**
 - Heparina no fraccionada
Para el seguimiento de los tratamientos con heparina no fraccionada, la recta de calibración se realizará con los plasmas **STA® - Heparinorm® H**.
 - Heparina de bajo peso molecular
Para el seguimiento de los tratamientos con heparina de bajo peso molecular, la recta de calibración se realizará con los plasmas **STA® - Heparinorm® HBPM/LMWH**.

- 14.4. Plasmas a probar y controles**
Los plasmas a probar y los controles se utilizan sin diluir.

- 14.5. Determinación**
Se deberá respetar el siguiente protocolo:

En un tubo de plástico a 37 °C:	HNF	HBPM
• Plasma (patrón, paciente o control)	50 µl	25 µl
• Reactivo 1	100 µl	
• Mezclar, incubar	60 s	
• Reactivo 2	100 µl	
• Mezclar, incubar exactamente	60 s	
• Poniendo en marcha un cronómetro, añadir el Reactivo 3 preincubado a 37 °C	100 µl	
Mezclar. Apuntar el tiempo de coagulación (segundos).		

- 14.6. Resultados**
En papel semi-logarítmico, anotar en abscisas (escala milimétrica) las concentraciones de heparina de los puntos de la calibración y en ordenadas (escala logarítmica) los correspondientes tiempos de coagulación (segundos). Trazar la recta de calibración y deducir las heparinemias de los plasmas probados.
Comprobar que los resultados obtenidos para los controles se sitúan en los intervalos indicados en la hoja incluida en el kit. Si el resultado estuviera fuera del intervalo de valores, es preciso asegurarse del buen funcionamiento de todo el sistema: condiciones de ensayo, reactivos, plasmas en los que se efectúa el test, calibración, etc. Si es necesario, repetir las muestras.

- 14.7. Limitaciones**
Las reacciones enzimáticas implicadas en esta dosificación son rápidas, lo que le confiere una sensibilidad excelente (3). Esto hace que sea necesario respetar escrupulosamente los tiempos y temperaturas (37 ± 0,5 °C) indicados en el protocolo.

- 14.8. Características del método**
 - Límite de detección - Intervalo de medición**
En método HNF, el límite de detección es de 0,10 UI/ml y el intervalo de medición va hasta los 0,60 UI/ml.
En método HBPM, el límite de detección es de 0,10 UI anti-Xa/ml y el intervalo de medición va hasta los 1,0 UI anti-Xa/ml.
 - Reproducibilidad**
Se han realizado estudios de reproducibilidad intra- e inter-series en muestras que contenían heparina. Los resultados obtenidos en ST art® están indicados en las tablas siguientes:
– heparinas no fraccionadas

Muestra	Reproducibilidad intra-serie		Reproducibilidad inter-series	
	Muestra 1'	Muestra 2'	Muestra 3'	Muestra 4'
n	24	24	10	10
$\bar{X}$ (UI/ml)	0,38	0,69	0,49	0,59
DS (UI/ml)	0,01	0,02	0,03	0,03
CV (%)	3,6	3,1	6,5	4,6

– heparinas de bajo peso molecular

Muestra	Reproducibilidad intra-serie		Reproducibilidad inter-series	
	Muestra a'	Muestra b'	Muestra c'	Muestra d'
n	24	24	10	10
$\bar{X}$ (UI anti-Xa/ml)	0,57	0,78	0,38	0,74
DS (UI anti-Xa/ml)	0,02	0,02	0,03	0,03
CV (%)	3,9	2,9	8,1	4,2

BIBLIOGRAFÍA

1. YIN E.T., WESSLER S., BUTLER J.V.:
"Plasma heparin: a unique, practical, submicrogram sensitive assay". J. Lab. Clin. Med., **81**, 298-310, 1973.

2. CHEN A.L., HERSHGOLD E.J., WILSON D.E.:
"One stage assay of heparin". J. Lab. Clin. Med., **85**, 5, 843-854, 1975.

3. JUHAN-VAGUE I., AILLAUD M.-F., RIERA H., MARTINOLI J.-L.:
"Dosage de l'activité anti-Xa de l'héparine". Feuil. Biol., **22**, 33-37, 1981.

4. CONTANT G., GOUAULT-HEILMANN M., MARTINOLI J.-L.:
"Heparin inactivation during blood storage: Its prevention by blood collection in citric acid, theophylline, adenosine, dipyrindamole - C.T.A.D. mixture". Thromb. Res., **31**, 365-374, 1983.

5. SCULLY M.F., DECOUSUS H.A., ELLIS V., PARKER C., GIRARD P., KAKKAR V.V.:
"Measurement of heparin in plasma: influence of inter-subject and circadian variability in heparin sensitivity according to method". Thromb. Res., **46**, 447-455, 1987.

6. BARROWCLIFFE T.W., THOMAS D.P.:
"Heparin and low molecular weight heparin" in "Haemostasis and Thrombosis", Bloom A.L., Forbes C.D., Thomas D.P., Tuddenham E.G.D. Edinburgh: Churchill Livingstone, third edition, **2**, 1417-1438, 1994.

7. "Etude des différents paramètres intervenant dans les variables préanalytiques (revue de la littérature)". Sang Thromb. Vaiss., **10**, 5-18, 1998.

8. BONEU B., POTRON G., GRUEL Y., NGUYEN P., AIACH M.:
"Utilisation des héparines en pratique médicale courante". Sang Thromb. Vaiss., **12**, 12-25, 2000.