

STA - ROTACHROM® HEPARIN
Determinación cromogénica de las heparinas (HNF y HBPM) y Fondaparinux

STA - ROTACHROM® HEPARIN ④

- Contenido del kit :
 - 4 viales de Reactivo 1 (Substrate)
 - 4 viales de Reactivo 2 (F. Xa)
 - 4 viales de Reactivo 3 (Solvent)

(REF 00612)

STA - ROTACHROM® HEPARIN ⑧

- Contenido del kit :
 - 8 viales de Reactivo 1 (Substrate)
 - 8 viales de Reactivo 2 (F. Xa)
 - 8 viales de Reactivo 3 (Solvent)

(REF 00661)

IVD CE

Enero 2013 Español 11

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) y del Fondaparinux (FDPX) sobre la antitrombina mediante la medida, en el plasma, de la actividad anti-Xa obtenida por el método amidolítico competitivo.

2/ SUMARIO

Las heparinas (HNF y HBPM) y el Fondaparinux son medicamentos anticoagulantes utilizados en los tratamientos curativos y preventivos de las enfermedades tromboembólicas.

La determinación de la actividad anti-Xa de las heparinas (HNF y HBPM) del paciente permite monitorizar y adaptar el tratamiento (3).

3/ PRINCIPIO DEL TEST

La función normal de una molécula de factor Xa desde su aparición en el plasma consiste en escindir su sustrato natural, la protrombina, para dar lugar a la trombina, enzima responsable de la formación del coágulo de fibrina. En presencia de heparina o Fondaparinux, se produce una competencia entre este mecanismo y el mecanismo de inhibición propio del complejo heparina/FDPX-antitrombina, inhibición que es ampliamente responsable de la acción anticoagulante de la heparina (1) o Fondaparinux (7).

El método propuesto es un método en un tiempo, basado en un principio comparable; a partir de la adición del factor Xa a la mezcla plasma + sustrato, se producen simultáneamente dos reacciones:

- hidrólisis del sustrato por parte del factor Xa,
- inhibición del factor Xa por parte del complejo heparina/FDPX-antitrombina.

Tras el periodo de tiempo necesario para el establecimiento del equilibrio de la reacción de competición, la liberación de parantiroanilina es inversamente proporcional a la concentración de heparina o Fondaparinux presente en el medio.

* El complejo heparina/FDPX-antitrombina se forma a partir de la heparina o del Fondaparinux y de la antitrombina (AT), propias del plasma testado.

4/ COMPOSICIÓN DEL KIT

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

- Reactivo 1:** sustrato cromógeno CBS 52.44 liofilizado, aproximadamente 4,2 µmoles (REF 00612) o 8,4 µmoles (REF 00661) por frasco de MAPA-Gly-Arg-pNA, AcOH.
- Reactivo 2:** factor Xa bovino, aproximadamente 1,1 UI (REF 00612) o 2,2 UI (REF 00661) por frasco, liofilizado.
- Reactivo 3:** disolvente para el Reactivo 2, vial de 4 ml (REF 00612) o de 8 ml (REF 00661).

El Reactivo 3 contiene azida sódica (< 1 g/l) como conservante. Es preciso eliminar con precaución los reactivos que contienen azida sódica. Si estos soluciones se vierten en el desagüe del lavabo, enjuagar con abundante agua para evitar la formación de azidas metálicas que, si están concentradas, pueden provocar explosiones.

Algunos reactivos de estos kits 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. Sólo para uso diagnóstico *in vitro*. Estos reactivos sólo deben ser utilizados por personal autorizado del laboratorio. Utilizar únicamente reactivos de un mismo kit o de un mismo lote. Los residuos se eliminarán con arreglo a la reglamentación local vigente.

Los estuches STA® - Rotachrom® Heparin están indicados en 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 sanguínea 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 un tubo con una solución de citrato trisódico 0,109 M: 1 vol. de citrato para 9 vol. de sangre.
 Para la dosificación de las heparinas, utilizar de preferencia tubos CTAD que son especialmente indicados para prevenir la inactivación de la heparina (2).
- Centrifugación**
 Se cuidará al máximo la centrifugación, con vistas a limitar la alteración de las plaquetas, así como el número de plaquetas residuales. Se centrifugará durante 15 minutos a 2000-2500 g a una temperatura cerca de los 18 °C.
 Esta centrifugación se llevará a cabo durante la hora siguiente a la obtención de la muestra sobre citrato convencional o durante las cuatro horas siguientes en el caso de la utilización de tubo CTAD (5). Cuando la muestra se obtiene con citrato convencional, es preferible efectuar una doble centrifugación (5).
- Conservación**
 El plasma se puede conservar durante 2 horas a 20 ± 5 °C con citrato convencional. Para la dosificación de las heparinas, el plasma se puede conservar durante 4 horas a 20 ± 5 °C en tubo CTAD (2).

7/ CONSERVACIÓN Y PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

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

- Reactivo 1**
 Reconstituir cada vial con 4 ml (REF 00612) o 8 ml (REF 00661) de agua destilada. Dejar estabilizarse la solución durante 60 minutos a temperatura ambiente (18-25 °C). Homogenizar. Luego, añadir un STA® - Reducer nuevo (REF 00797 o 00801) y el tapón perforado. La estabilidad del Reactivo 1 después de su reconstitución es:
 - para la dosificación de las heparinas (HNF y HBPM):
 - en el vial original con STA® - Reducer y tapón perforado:
 - 7 días en STA Compact® y STA-R® (REF 00612, 00661)
 - 8 días en STA Satellite® (REF 00612, 00661 - la REF 00612 solo se valida para el método STA® - Hybrid Hep Calibrator)
 - en el vial original tapado (no añadir el STA® - Reducer): 21 días a 2-8 °C (REF 00612).
 - para la dosificación de Fondaparinux:
 - 7 días en STA Compact® y STA-R® (REF 00612, 00661) en el vial original con STA® - Reducer y tapón perforado
 - 21 días a 2-8 °C (REF 00612) en el vial original tapado (no añadir el STA® - Reducer).

No se debe congelar.

- Reactivo 2**
 Es necesario verificar que la totalidad del liofilizado se encuentra en el fondo del vial. Si no es así, antes de la apertura se golpeará sobre una superficie sólida, con el fin de hacer que descienda el liofilizado hasta el fondo. Luego, reconstituir cada vial de Reactivo 2 con el contenido de un vial de Reactivo 3 (R3), incluido en el mismo estuche. Dejar estabilizarse la solución durante 60 minutos a temperatura ambiente (18-25 °C). Homogenizar. Luego, añadir un STA® - Reducer nuevo (REF 00797 o 00801) y el tapón perforado.
 La estabilidad del Reactivo 2 después de su reconstitución es:
 - para la dosificación de las heparinas (HNF y HBPM):
 - en el vial original con STA® - Reducer y tapón perforado:
 - 7 días en STA Compact® y STA-R® (REF 00612, 00661)
 - 8 días en STA Satellite® (REF 00612, 00661 - la REF 00612 solo se valida para el método STA® - Hybrid Hep Calibrator)
 - en el vial original tapado (no añadir el STA® - Reducer): 21 días a 2-8 °C (REF 00612).

- para la dosificación de Fondaparinux:
 - 7 días en STA Compact® y STA-R® (REF 00612, 00661) en el vial original con STA® - Reducer y tapón perforado
 - 21 días a 2-8 °C (REF 00612) en el vial original tapado (no añadir el STA® - Reducer).

- El **Reactivo 3 (R3)** está listo para su empleo.
- NB: Considerando las numerosas condiciones de almacenaje (parcialmente en el sistema, parcialmente a 2-8 °C), de estos reactivos y auxiliares, cada laboratorio debería establecer la propia estabilidad conforme al uso que haga. La misma no debe exceder los valores indicados que han sido obtenidos en condiciones controladas.** Cuando estén almacenados a 2-8 °C, atemperar los reactivos durante 30 minutos a temperatura ambiente (18-25 °C).

8/ REACTIVOS Y MATERIAL AUXILIARES

- STA® - Owren-Koller** (REF 00360).
- Calibración: **STA® - Hybrid Hep Calibrator** (REF 00687) para valorar las HNF y HBPM, **STA® - Heparinorm® H** (REF 00684) para valorar las HNF, **STA® - Calibrator HBPM/LMWH** (REF 00685) para valorar las HBPM, **STA® - Fondaparinux Calibrator** (REF 00354) para valorar las Fondaparinux.
- Control de calidad: **STA® - Heparin Control** (REF 00683) para valorar las HNF, **STA® - Quality HBPM/LMWH** (REF 00686) para valorar las HBPM, **STA® - Fondaparinux Control** (REF 00355) para valorar las Fondaparinux.
- Instrumento de la línea STA® que puede utilizar estos reactivos.
- STA® - mini Reducer REF 00797 (STA® - Rotachrom® Heparin ④) o STA® - maxi Reducer REF 00801 (STA® - Rotachrom® Heparin ⑧).
- Equipamiento habitual en los laboratorios de análisis clínicos.

9/ PROCEDIMIENTO

9.1. Calibración

La calibración se lleva a cabo con la ayuda de los estuches STA® - Hybrid Hep Calibrator (HNF y HBPM), STA® - Heparinorm® H (HNF), STA® - Calibrator HBPM/LMWH (HBPM) o STA® - Fondaparinux Calibrator (FDPX). Preparar los reactivos de estos estuches y transferir al aparato las informaciones contenidas en los códigos de barras de la hoja. La curva de calibración se puede ver en la pantalla del instrumento con la ayuda del menú "Calibration" (ver el "Manual del Operador").

9.2. Plasmas a testar

Los plasmas a testar se utilizan puros. Introducirlos en el instrumento (ver el "Manual del Operador" del aparato utilizado). Seleccionar el(los) test(s) a efectuar en los plasmas de pacientes.

9.3. Controles

Estos controles son necesarios para verificar la exactitud y la reproducibilidad de los resultados. Utilizar los estuches STA® - Heparin Control (HNF), STA® - Quality HBPM/LMWH (HBPM) o STA® - Fondaparinux Control (FDPX). Preparar estos controles y transferir al aparato las informaciones contenidas en los códigos de barras de la hoja. Estos controles se utilizan puros.

9.4. Análisis

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

El aparato lleva a cabo automáticamente la medición de la heparina (HNF o HBPM) o Fondaparinux de los plasmas en los que se va a efectuar el test a 405 nm, a medida que se van introduciendo las muestras.

10/ RESULTADOS

El nivel de heparina o Fondaparinux de las muestras en las que se ha llevado a cabo el test se muestra en tiempo real en UI/ml (HNF), UI anti-Xa/ml (HBPM) o µg/ml (FDPX) en la pantalla del aparato (ver el "Manual del Operador"). El resultado debe interpretarse en función del estado clínico y biológico del paciente.

Si el aparato señala que los resultados obtenidos para los controles se sitúan fuera del intervalo de valores indicado en la hoja incluida en los estuches STA® - Heparin Control, STA® - Quality HBPM/LMWH o STA® - Fondaparinux Control, es preciso asegurarse del buen funcionamiento de todo el sistema: condiciones operativas, reactivos, calibración, plasmas en los que se efectúa el test, 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 (véase el capítulo "6/ Obtención y tratamiento de la muestra").
- Se ha demostrado que la hemoglobina, la bilirrubina y los triglicéridos no interfieren en la dosificación (HNF, HBPM y FDPX) si sus concentraciones son inferiores, respectivamente, a 2 g/l, 66 mg/l (113 µmoles/l) y 3,6 g/l.

12/ INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

La heparina/Fondaparinux está ausente en los plasmas normales. Las actividades anti-Xa obtenida se debe analizar en función del tratamiento administrado al paciente (tipo de anticoagulante, posología, modo de administración, hora de la toma de la muestra...) y del grado de anticoagulación deseado (6).

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) (4). Esta trombocitopenia se podrá poner en evidencia con la ayuda de los tests **Asserachrom® HPIA** (REF 00615), **Asserachrom® HPIA - IgG** (REF 00624) o **Stic Expert® HIT** (REF 01058, 01059) que permiten 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**
 El límite de detección en el STA-R® para el método de HNF/HBPM con el STA® - Hybrid Hep Calibrator es de 0,10 UI/ml y la linealidad, para valorar las HNF está asegurada hasta 1,00 UI/ml y hasta 2,00 UI anti-Xa/ml para valorar las HBPM.
 El límite de detección en los STA® para el método HNF con el STA® - Heparinorm® H es de 0,10 UI/ml y la linealidad está asegurada hasta 0,70 UI/ml.
 El límite de detección en los STA®, para el método HBPM con el STA® - Calibrator HBPM/LMWH es de 0,10 UI anti-Xa/ml y la linealidad está asegurada hasta 2,00 UI anti-Xa/ml.
 El límite de detección en el STA-R® para el método Fondaparinux con el STA® - Fondaparinux Calibrator es de 0,10 µg/ml y la linealidad está asegurada hasta 2,00 µg/ml.

• Reproducibilidad

Se han llevado a cabo estudios de reproducibilidad, intra e inter-series en muestras que contenían heparina o Fondaparinux. Los resultados obtenidos en el STA® o STA-R® con el STA® - Rotachrom® Heparin están indicados en las tablas siguientes:

– HNF (metodología STA® - Heparinorm® H)

Muestra	Reproducibilidad intra-serie		Reproducibilidad inter-serie	
	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4
n	21	21	10	10
\bar{X} (UI/ml)	0,23	0,53	0,26	0,54
DS (UI/ml)	0,01	0,02	0,01	0,02
CV (%)	4,6	3,1	4,8	4,0

– HBPM (metodología STA® - Hybrid Hep Calibrator)

Muestra	Reproducibilidad intra-serie		Reproducibilidad inter-serie	
	Muestra 1'	Muestra 2'	Muestra 3'	Muestra 4'
n	21	21	10	10
\bar{X} (UI/ml)	0,36	0,53	0,32	0,67
DS (UI/ml)	0,02	0,02	0,01	0,02
CV (%)	4,4	3,2	4,3	2,8

– HBPM (metodología STA® - Calibrator HBPM/LMWH)

Muestra	Reproducibilidad intra-serie		Reproducibilidad inter-serie	
	Muestra a	Muestra b	Muestra c	Muestra d
n	21	21	10	10
\bar{X} (UI anti-Xa/ml)	0,83	1,49	0,80	1,41
DS (UI anti-Xa/ml)	0,02	0,05	0,03	0,07
CV (%)	2,5	3,1	4,1	4,9

– HBPM (metodología STA® - Calibrator HBPM/LMWH)

Muestra	Reproducibilidad intra-serie		Reproducibilidad inter-serie	
	Muestra a'	Muestra b'	Muestra c'	Muestra d'
n	21	21	10	10
\bar{X} (UI anti-Xa/ml)	0,66	1,34	0,71	1,39
DS (UI anti-Xa/ml)	0,03	0,05	0,04	0,05
CV (%)	4,6	3,8	5,9	3,6

- FDPX (metodología STA® - Fondaparinux Calibrator)

Muestra	Reproducibilidad intra-serie		Reproducibilidad inter-serie	
	Muestra A	Muestra B	Muestra C	Muestra D
n	21	21	10	10
\bar{X} ($\mu\text{g/ml}$)	0,55	1,37	0,56	1,38
DS ($\mu\text{g/ml}$)	0,02	0,03	0,02	0,04
CV (%)	2,9	2,3	3,4	2,9

BIBLIOGRAFÍA

1. KAKKAR V.V.:
"Low dose heparin in the prevention of venous thromboembolism".
Thromb. Diath. Haemorrh., **33**, 87-96, 1974.
2. CONTANT G., GOUAULT-HEILMANN M., MARTINOLI J.L.:
"Heparin inactivation during blood storage: Its prevention by blood collection in citric acid, theophylline, adenosine, dipyridamole - C.T.A.D. mixture". Thromb. Res., **31**, 365-374, 1983.
3. 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.
4. 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.
5. "Etude des différents paramètres intervenant dans les variables préanalytiques (revue de la littérature)". Sang Thromb. Vaiss., **10**, 5-18, 1998.
6. BONEU B., POTRON G., GRUEL Y., NGUYEN P., AIACH M.:
"Utilisation des héparines en pratique médicale courante". Sang Thromb. Vaiss., **12**, 12-25, 2000.
7. DEPASSE F., GEROTZIAFAS G.T., BUSSON J., VAN DREDEN P., SAMAMA M.M.:
"Assessment of three chromogenic and one clotting assays for the measurement of synthetic pentasaccharide fondaparinux (Arixtra®) anti-Xa activity". J. Thromb. Haemostasis, **2**, 346-379, 2003.

Los cambios significativos son indicados por las líneas punteadas en el margen.