

Anti-factor-Xa-activiteitbepaling voor verschillende heparines, heparinoïde en pentasaccharide

E. J. van den DOOL¹, Y.M.C. HENSKENS² en A.K. STROOBANTS¹

Therapiecontrole voor de preventie of behandeling van trombose met laagmoleculairgewichtheparine (LMWH) wordt bij complicaties en/of in uitzonderlijke klinische omstandigheden uitgevoerd en gebeurt door middel van de bepaling van de plasma-anti-factor-Xa-activiteit (anti-Xa). Voor de bepaling van de anti-Xa-activiteit in plasma zijn verschillende testkits en kalibratieplasma's commercieel verkrijgbaar. Door gebruik te maken van deze kalibratieplasma's, die geen onderscheid maken tussen de verschillende LMWH, worden er resultaten verkregen die geen juiste weerspiegeling zijn van de therapie. Als er gebruik gemaakt wordt van een heparinespecifieke kalibratiecurve dan kunnen de verschillen tussen de resultaten van verschillende LMWH op een niveau van 0,5 U/ml plasma-anti-Xa-activiteit oplopen tot 0,3 U/ml, wat aangeeft dat het gebruik van aparte ijklijnen nodig is voor correcte analyse van de anti-Xa-activiteit. Daarnaast kan er voor monitoring van therapie met een pentasaccharide of een heparinoïde een anti-Xa-bepaling op een vergelijkbare manier in een klinisch-chemisch laboratorium geïntroduceerd worden.

Trefwoorden: anti-Xa activiteit; LMWH; heparinoïde; pentasaccharide

Laagmoleculairgewichtheparines (LMWH), ongefractioneerde heparine (UFH), heparinoïde en pentasacchariden zijn de laatste jaren breed ingezet in de behandeling van een groot scala van trombotische aandoeningen. De controle van de therapie met LMWH wordt bij complicaties en/of in uitzonderlijke klinische omstandigheden uitgevoerd via de bepaling van de anti-factor-Xa-activiteit (anti-Xa). Elders in dit tijdschrift wordt dieper ingegaan op de verschillende soorten heparines, heparinoïde en pentasacchariden, hun werking en klinische toepassingen (1).

Voor de bepaling van de anti-Xa-activiteit in plasma zijn er verschillende testkits op de markt ten behoeve van analyses die al dan niet geautomatiseerd uitvoerbaar zijn. Voor de kalibratie van deze bepaling zijn er commerciële plasma's verkrijgbaar. Volgens de fabri-

Laboratorium voor Algemene Klinische Chemie, Academisch Medisch Centrum¹ en Hematologisch Laboratorium, Academisch Ziekenhuis Maastricht²

Correspondentie: E. J. van den Dool, AMC, Postbus 22660, 1100 DD Amsterdam

E-mail: e.j.vandendool@amc.nl

kanten kunnen dezelfde kalibratieplasma's gebruikt worden voor de verschillende LMWH. Er worden in de praktijk echter op deze manier resultaten verkregen die geen juiste weerspiegeling zijn van de therapie. In dit artikel worden heparinespecifieke kalibratiecurves gepresenteerd die discrepanties tussen de anti-Xa-resultaten van verschillende LMWH laten zien. Daarnaast wordt er een anti-Xa-bepaling beschreven die op eenzelfde manier als voor de LMWH gebruikt kan worden voor de monitoring van therapie met een pentasaccharide of een heparinoïde.

De analysemethode

De in het plasma aanwezige heparine (LMWH, UFH, heparinoïde dan wel pentasaccharide) zal na toevoeging van een overmaat factor Xa een gedeelte van deze factor remmen (figuur 1). Het niet-geremde deel van de overmaat factor Xa kan een chromogeen substraat, specifiek voor factor Xa, splitsen in een tripeptide en een para-nitroaniline (pNa)-groep. Het vrijkomende pNa geeft een kleur die een absorptie heeft bij 405 nm. De snelheid van de absorptietoename bij 405 nm wordt automatisch geregistreerd en uitgedrukt in OD/min (optische dichtheid/minuut). Deze OD-verandering per minuut is omgekeerd evenredig met de concentratie heparine, uitgedrukt in anti-Xa U/ml, die aanwezig is in het plasma.

De anti-Xa-bepaling in de praktijk

In de afgelopen jaren is er op het Laboratorium voor Algemene Klinische Chemie van het AMC ervaring opgedaan met de bepaling van anti-Xa-activiteit in patiëntenplasma's. Er is gebruik gemaakt van de Rotachrom[®] heparine kit van Roche Diagnostics Nederland/STAGO en de STA-R[®] c.q. STA-R Evolution[®] analyser van Roche Diagnostics Nederland /STAGO.

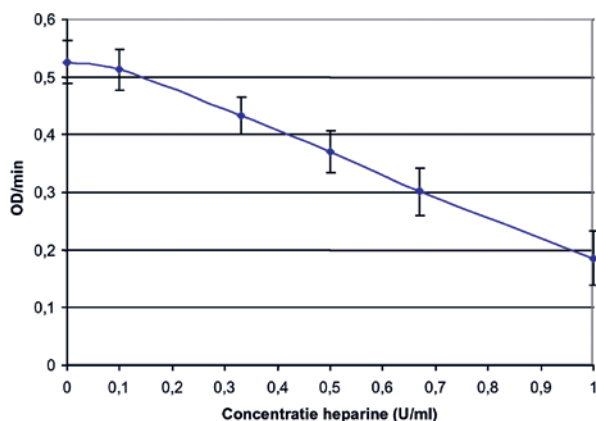
- 1. Remming van een deel van het aanwezige factor Xa door het heparineconcentratie-afhankelijk gevormde [Heparine-AT]-complex:

[Heparine-AT]-complex + factor Xa (vaste overmaat) →
[Heparine-AT-FXa]-complex + factor Xa (rest)

- 2. Hydrolyse van het substraat door het resterende factor Xa:

Substraat CBS 52.4 → factor Xa
tripeptide + pNa

Figuur 1. Reactieschema van de anti-Xa-activiteitbepaling.

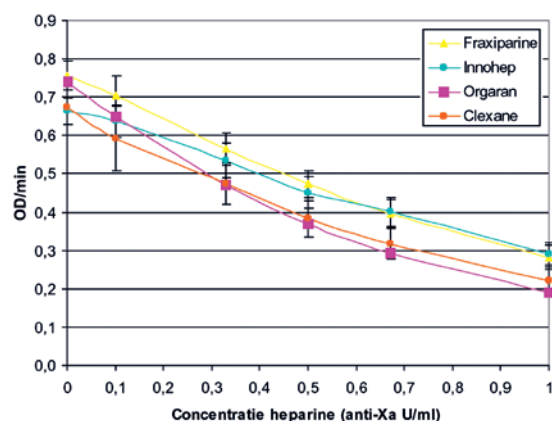


Figuur 2. Voorbeeld van een 6-puntskalibratielijne voor de anti-Xa-bepaling met ongefractioneerd heparine.

Uitgaande van het standaardprotocol is voor de kalibratie van deze bepaling een kalibratieplasma voorhanden, STA[®]-Hepanorm[®] H (UFH) of STA[®]-Calibrator HBPM/LMWH met een vastgestelde anti-Xa-activiteit (kitbijsluiter Rotachrom[®] Heparine, bepalingprotocol STA-R[®], STA-R Evolution[®]). Uit eerdere evaluaties van de anti-Xa-activiteitsbepaling is de ervaring dat verschillende LMWH een verschillende anti-Xa-activiteit hebben. Ondanks dat er in de werkvoorschriften van de commerciële test uitgegaan wordt van één kalibratielijne voor de verschillende LMWH, is er tijdens de evaluatie van de nieuw op te zetten bepaling op de STA-R Evolution een aangepaste kalibratieprocedure geïntroduceerd. Uitgaande van het standaardprotocol voor LMWH en UFH is de kalibratie van deze bepaling uitgevoerd met het introduceren van twee standaarden. De eerste standaard is een normaal poolplasma met een anti-Xa-activiteit van 0,0 U/ml dat verkregen is door citraatplasma van minimaal 100 gezonde vrijwilligers te mengen, te aliquoteren en maximaal 1 jaar bij -80 °C te bewaren. Het andere standaardplasma heeft een activiteit die overeenkomt met een activiteit van 1,0 U/ml anti-Xa-activiteit in het geval van LMWH en gecombineerde anti-Xa- en anti-IIa-activiteit in het geval van UFH. Dit standaardplasma wordt verkregen door hetzelfde poolplasma te spiken met een heparine (UFH of LMWH) zoals dit bij de ziekenhuisapotheek verkrijgbaar is en vergelijkbaar is met datgene dat de patiënt krijgt toegediend. Uit deze twee standaarden worden door de STA-R Evolution[®] vier extra kalibratiepunten verkregen door verdunningen te maken met een concentratie van 0,1 U/ml, 0,33 U/ml, 0,5 U/ml en 0,67 U/ml. Na bepaling van de optische dichtheid

Tabel 1. Reproduceerbaarheid van de OD/min van de anti-Xa-bepaling

Concentratie (U/ml)	VC (%)
0,0	3,3
0,1	2,7
0,33	2,1
0,5	1,8
0,67	1,7
1,0	1,5



Figuur 3. De ijklijnen voor verschillende LMWH en heparinoïde (Orgaran).

(OD/min) bij 405 nm ontstaat zo een 6-puntskalibratielijne (zie figuur 2 voor ongefractioneerd heparine).

Reproduceerbaarheid

Voor het vaststellen van de binnenrunreproduceerbaarheid van de anti-Xa-bepaling met behulp van de Rotachrom[®]-kit op de STA-R Evolution[®] is gebruik gemaakt van patiëntenplasma's waarin vooraf een activiteit was gemeten van respectievelijk 0,3 U/ml en 0,75 U/ml. Daarna is 21 maal uit deze plasma's een activiteitsbepaling gedaan waarna de variatiecoëfficiënten van de anti-Xa-activiteit berekend werden. De resultaten hiervan zijn een VC van respectievelijk 4,0% en 7,0%.

De resultaten van de reproduceerbaarheid van de punten van de ijklijne (in OD/min) zijn weergegeven in tabel 1. Hier is de variatiecoëfficiënt van de standaardpunten in zes verschillende waarnemingen weergegeven, alle gebruik makend van hetzelfde lotnummer reagens.

Eigen ijklijne per heparine

Voor de verschillende LMWH zijn op de bovengenoemde manier ijklijnen geconstrueerd (figuur 3). Hieruit blijkt dat er aanzienlijke verschillen zijn in ijklijnen van Fraxiparine, Innohep en Clexane. Bij een gemeten activiteit van 0,5 U/ml (0,37 OD/min in figuur 3) voor Clexane kan dit voor de LMWH's Innohep en Fraxiparine 0,8 U/ml opleveren, hetgeen een aanzienlijk verschil van 0,3 anti-Xa U/ml is. Bij het instellen en volgen van de therapie met LMWH wordt er gestreefd naar een waarde afhankelijk van de indicatie tussen de 0,3 en 0,5 U/ml, wat aangeeft dat een afwijking in de uitslag van 0,3 U/ml in dit relevante gebied onevenredig groot en daarom onacceptabel is. Voor Fraxodi en Fragmin is gebleken dat dezelfde ijklijne gebruikt kan worden als de Fraxiparine ijklijne (resultaten niet weergegeven).

Anti-Xa-activiteit bij gebruik van heparinoïde en pentasaccharide

Ook voor het heparinoïde Orgaran (figuur 3) of het pentasaccharide Arixtra (figuur 4) is het mogelijk om op deze manier de anti-Xa-activiteit te bepalen. Ijklijnen kunnen op dezelfde manier geconstrueerd worden als voor de bovengenoemde heparines. Voor Arixtra

wordt de concentratie van 1,25 mg/l aangehouden in de hoogste standaard oplossing om in een goed meetbaar en klinisch relevant gebied te kunnen meten.

Conclusie

Uitgaande van dezelfde protocollen en testcondities geven de verschillende LMWH een duidelijk verschillende activiteit in de anti-Xa-assay. Dit heeft als gevolg dat het essentieel is voor de aanvragers van laboratoriumonderzoek om bij een aanvraag voor een anti-Xa-bepaling de gebruikte heparinesoort te vermelden. Het aanpassen van het standaardprotocol van de anti-Xa-activiteitsbepaling heeft een verbetering van de instelling van therapie tot gevolg gehad. Het is nu, met deze aanpassing op het standaardprotocol, ook mogelijk om de anti-Xa-activiteit van heparinoïde of pentasaccharide te bepalen.

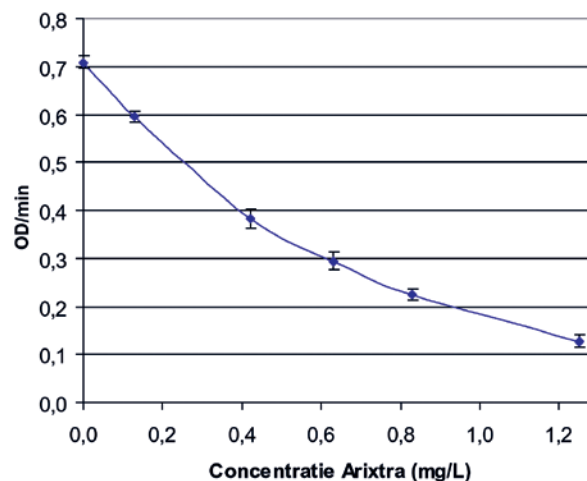
Referentie

1. Henskens YMC, Stroobants AK, Dool EJ van den, Hamulyak K, Besselaar AMHP van den. Therapiemonitoring van antistollingsbehandeling. *Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk* 2008; 33: 238-243.

Summary

Dool EJ van der, Henskens YMC, Stroobants AK. Determination of Anti-factorXa activity for several heparines, heparinoid and pentasaccharide. *Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk* 2008; 33: 244-246.

Therapy to prevent or treat thrombosis with Low Molecular Weight Heparin (LMWH) is monitored using an anti-factor Xa activity assay in case of complications or in specific clinical



Figuur 4. De ijklijn voor een pentasaccharide (Arixtra).

circumstances. For the measurement of anti-Xa activity in plasma, several kits and calibration plasma's are commercially available. When using the calibration plasma's, which do not discriminate between the different LMWH, the results do not lead to a correct interpretation of the effect of therapy. When using heparin specific calibration curves, the differences of the results using different LMWH can be up to 0.3 U/ml at a level of 0.5 U/ml anti-Xa plasma activity. This suggests that separate calibration curves are necessary for the correct analysis of the anti-Xa activity. An anti-Xa assay can be performed in the same way for the monitoring of therapy with pentasaccharide or heparinoid.

Keywords: anti-Xa activity; LMWH; heparinoid; pentasaccharide

Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk 2008; 33: 246-250

Heparine-geïnduceerde trombocytopenie: een wolf in schaapskleren

C.M. HACKENG¹ en E.M. van WIJK²

Heparine-geïnduceerde trombocytopenie (HIT) is een conditie met paradoxaal een hoog risico op trombotische complicaties. In dit artikel wordt het mechanisme achter HIT besproken. Van klinische HIT wordt gesproken wanneer na de start van heparine het trombocytenaantal daalt tot < 100 G/l of < 50 % van de startwaarde en een andere reden voor de trombocytopenie uitgesloten is. Er worden drie types HIT onderscheiden: 'typical onset', 'rapid onset' en 'delayed onset'. Een aantal laboratoriumtesten is beschikbaar voor het aantonen van HIT-antilichamen. De meeste testen zijn echter tijdrovend en/of hebben een lage spe-

cificiteit. Voor snelle uitsluiting van HIT lijkt de gel-agglutinatiesneltest geschikt.

Heparine-geïnduceerde trombocytopenie (HIT) is een voorbijgaande protrombotische toestand geïnitieerd door heparines. HIT kenmerkt zich door trombocytopenie ten gevolge van antilichaam-gemedieerde plaatjesactivatie. De specificiteit van HIT-antilichamen is gericht tegen neo-epitopen op plaatjesfactor-4(PF4)-heparinecomplexen. Hoewel PF4-heparine-antilichamen veelvuldig voorkomen na heparinegebruik heeft slechts een klein deel een HIT tot gevolg. Bij een verdenking op HIT is haast echter geboden en dient op een alternatief antistolbeleid overgegaan te worden. Een HIT met trombose (HITT) heeft namelijk een hoog risico op morbiditeit en mortaliteit. Klinisch-chemische laboratoria kunnen een bijdrage leveren in het juist inschatten van de waarschijnlijkheid van een HIT.

Klinisch Chemisch Laboratorium, St Antonius Ziekenhuis, Nieuwegein en Mesos Medisch Centrum, Utrecht¹; Klinisch Chemisch en Hematologisch Laboratorium, TweeStedenziekenhuis en Elisabeth ziekenhuis, Tilburg²

E-mail: c.hackeng@antoniushuis.net