

Sandra Aspaas Müller og Ellisiv Nyhamar

Sammenhengen mellom anti-FXa-aktiviteten i plasma og konsentrasjonen av legemidler som hemmer FXa

The relationship between the anti-FXa activity in plasma and the concentration of medication which inhibits FXa

Bacheloroppgave i Bioingeniørfag

Veileder: Kari Bratberg, Arne Åsberg og Kristin Gabestad

Sandra Aspaas Müller og Ellisiv Nyhamar

Sammenhengen mellom anti-FXa-aktiviteten i plasma og konsentrasjonen av legemidler som hemmer FXa

The relationship between the anti-FXa activity in plasma and the concentration of medication which inhibits FXa

Bacheloroppgave i Bioingeniørfag

Veileder: Kari Bratberg, Arne Åsberg og Kristin Gabestad Nørsett
Mai 2019


Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet
Fakultet for naturvitenskap
Institutt for bioingeniørfag

Forord

Dette prosjektet er den avsluttende delen av bachelorgraden i bioingeniørfag ved Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet. Bacheloroppgaven ble gitt av Kari Bratberg (faglig veileder) og Arne Åsberg (medisinsk veileder) ved Avdeling for medisinsk biokjemi ved St. Olavs hospital. Praktisk laboratoriearbeid ble utført ved Avdeling for medisinsk biokjemi. Prøveopparbeidelsen ble utført ved Avdeling for klinisk farmakologi.

Vi vil først takke Kari Bratberg, fagansvarlig bioingeniør, og Arne Åsberg, overlege ved Avdeling for medisinsk biokjemi. Kari har gitt oss meget god praktisk og faglig veiledning og disponert sin arbeidstid for praktisk laboratoriearbeid. Arne har assistert med bearbeidelse av resultatene og statistisk og medisinsk kompetanse. Det rettes også en stor takk til Kristin Gabestad Nørsett, førstelektor ved Institutt for bioingeniørfag og prosessveileder for bacheloroppgaven. Kristin har gitt oss mye av sin tid til veiledning under skriveprosessen. Hun har også lest gjennom og kommentert rapporten underveis. Forfatterne vil også rette en takk til Astrid Dahn, fagansvarlig bioingeniør ved Avdeling for klinisk farmakologi ved St. Olavs hospital. Astrid ga også av sin tid og forsynte oss med utstyr til fremstilling av legemiddelstamløsninger til oppgaven. Til slutt vil forfatterne takke de frivillige givene som donerte plasma til dette prosjektet.


Navn, sted, dato


Trondheim, 15.05.19

Sandra A. Müller

Trondheim, 15.05.19

Navn, sted, dato


Trondheim 15/05-19

Ellisiv Nyhamar

Trondheim, 15.05.19

Sammendrag

De siste årene har bruken av nye direkte orale antikoagulerende (DOAK) legemidler økt betraktelig til forebygging av *in vivo*-koagulasjon. Rivaroksaban, apiksaban og edoksaban er tre av dem. Ved akutt økt blødningsrisiko er det ønskelig å kunne utrede blødningsfare hos disse pasientene. St. Olavs hospital ønsker å etablere en øyeblikkelig-hjelp analyse som kan brukes i disse tilfellene.

De mest brukte koagulasjonsanalysene, som aktivert partiell tromboplastintid (APTT) og protrombintid-internasjonalt normalisert ratio (PT-INR), egner seg ikke til bestemmelse av blødningsfare ved bruk av DOAK-medikamenter. Anti-FXa-aktivitetsanalyse kan imidlertid benyttes for å undersøke koagulasjonsevne hos pasienter som tar DOAK-legemidler. Ved St. Olavs hospital benyttes en metode for å bestemme anti-FXa-aktivitet kun hos pasienter som behandles med heparin. Hensikten med prosjektet var å utrede om denne heparinkalibrerte metoden for anti-FXa-aktivitet også kan benyttes for pasienter som mottar behandling med rivaroksaban, apiksaban og edoksaban.

Plasma fra fire friske, frivillige givere ble tilsatt kjente konsentrasjoner av de tre ulike legemidlene. Hver stamløsning ble så fortynnet til fortynningsrekker som dekket hele måleområdet til analysen. Hver av disse fortynningene ble analysert tre ganger for anti-FXa-aktivitet på ACL Top 750 LAS-instrumentet.

Resultatene viste at anti-FXa-aktivitet steg ved økt konsentrasjon av DOAK-legemidlene. Det ble brukt en polynom trendlinje som beste tilpasning til forholdet. Statistisk analyse av parallellene og den inter-individuelle variasjonen mellom giverne konkluderte med at presisjon og riktighet var god, og avvikene ikke var medisinsk signifikante.

Dette forsøket viste at metoden for anti-FXa-aktivitet, som St. Olavs hospital bruker til utredning av pasienter som behandles med heparin, også kan benyttes med høy grad av pålitelighet ved bestemmelse av akutt blødningsfare hos pasienter som bruker DOAK-legemidler.

Abstract

In recent years the use of direct oral anticoagulants (DOACs) has increased substantially. Rivaroxaban, apixaban and edoxaban are three of them. In cases of acute increased risk of bleeding (heavy bleeding, emergency operations or suspicions of overdose) the ability to assess the risk of bleeding is medically significant. St. Olav's Hospital has a wish to establish an analytic method useful in these circumstances.

The most widely used coagulation assays such as APTT and PT-INR are not suitable for determining the risk of substantial bleeding in patients who use DOACs. The anti-FXa activity, however, is reliable also in these patients. At St. Olav's Hospital the anti-FXa activity is only used to determine risk of bleeding in patients treated with heparin. This project aims to evaluate if this heparin-calibrated method can be used in patients taking rivaroxaban, apixaban and edoxaban too.

Controlled concentrations of the three DOACs were added to plasma from four healthy volunteers. Each solution was then diluted with more plasma to create a series of dilutions, which together covered the whole measurement range of the assay. The anti-FXa activity of each dilution was measured three times using the ACL Top 750 LAS instrument.

The results show that the anti-FXa activity increases as the DOACs' concentrations increase. The relationship was not linear, and a polynomial trend line was therefore used as the best approximation to the relationship. Statistical analysis of the different parallels and inter-individual variation between the plasma donors concluded that the precision and accuracy was satisfactory, and the deviations were not medically significant.

The conclusion for this project showed that the method for measuring anti-FXa activity currently in use at St. Olav's Hospital for patients treated with heparin is also reliable in determining acute risk of bleeding in patients taking DOACs.

Innholdsfortegnelse

Forord	i
Sammendrag	ii
Abstract	iii
Forkortelser	vi
Innledning.....	1
1.1 Koagulasjonssystemet	1
1.2 Koagulasjonsfaktor X	2
1.3 Faktor Xa-hemmende legemidler	3
1.3.1 Hvorfor hemme faktor Xa?	3
1.3.2 Rivaroksaban, apiksaban og edoksaban.....	3
1.3.3 Midler som reverserer effekten av FXa-hemmere	5
1.4 Hvordan kvantifisere blødningsrisiko?.....	5
1.5 Problemstilling.....	6
Materiale og metode.....	7
2.1 Prinsipp for analyse av anti-FXa-aktivitet.....	7
2.2 Materiale (prøvemateriale, kalibrator, kontroll, reagenser, utstyr).....	7
2.2.1 Prøvemateriale	7
2.2.2 Kalibrator, kontroll, reagenser og utstyr	8
2.3 Fremgangsmåte for måling av anti-FXa-aktivitet	8
2.3.1 Kontroll av reagens	9
2.3.2 Analysering av prøver.....	9
2.3.3 Statistisk bearbeiding	9
Resultater.....	10
3.1 Resultat fra målinger av anti-FXa-aktivitet i plasma med rivaroksaban	10
3.2 Resultat fra målinger av anti-FXa-aktivitet i plasma med apiksaban.....	12
3.3 Resultat fra målinger av anti-FXa-aktivitet i plasma med edoksaban.....	14

3.4 Krav til kontroll av reagens	16
3.5 Vurdering av paralleller.....	17
3.6 Repeterbarhet over tid	22
Diskusjon og konklusjon.....	26
4.1 Diskusjon av resultater fra analyse av anti-FXa-aktivitet.....	26
4.1.1 Drøfting av metodevalg	26
4.1.2 Statistisk vurdering av anti-FXa-aktivitet-metodens egnethet.....	27
4.1.3 Vurdering av kontrollresultatene fra anti-FXa-analysen	29
4.1.4 Mulig videreføring av prosjektet	30
4.2 Konklusjon.....	30
Referanser.....	31
Vedlegg	34
6.1 Vedlegg 1: Oppgaveskrivet fra AMB.....	34
6.2 Vedlegg 2: Reagensvedlegg HemosIL Liquid anti-Xa.....	37
6.3 Vedlegg 3: Internt notat, «Sammenhengen mellom anti-Xa-aktivitet og konsentrasjon av Xa-hemmere», St. Olavs hospital, AMB.....	40
6.4 Vedlegg 4: Prosedyre for anti-FXa-aktivitetsanalyse ved St. Olavs hospital, AMB	45
6.5 Vedlegg 5: Kalibratorvedlegg HemosIL Heparin Calibrators.....	51
6.6 Vedlegg 6: Kontrollvedlegg HemosIL LMW Heparin Controls.....	52
6.7 Vedlegg 7: Kontrollvedlegg HemosIL UF Heparin Controls	53
6.8 Vedlegg 8: Utvalg av instrumentutskriftene fra anti-FXa-aktivitetsanalyse	54
6.9 Vedlegg 9: Kontrollgrenser for anti-FXa-aktivitetsanalyse ved St. Olavs hospital, AMB	56
6.10 Vedlegg 10: Resultater fra anti-FXa-aktivitetsanalyse av kontrollmateriale	57
6.11 Vedlegg 11: Kvalitetskontrollregler for anti-FXa-aktivitet ved St. Olavs hospital, AMB	61

Forkortelser

% CV	Variasjonskoeffisient i prosent
ACN	Acetonitril
AKF	Avdeling for klinisk farmakologi
AMB	Avdeling for medisinsk biokjemi
APTT	Aktivert partiell tromboplastintid
ATIII	Antitrombin III
DOAK	Direkte orale antikoagulerende
FII, FV, FVII, FVIII, FIX, FX, FXI, FXII, FXIII	Faktor II, V, VII, VIII, IX, X, XI, XII, XIII
FVa, FVIIa, FVIIIa, FIXa, FXa, FXIIa	Aktivert faktor V, VII, VIII, IX, X, XII
IU/mL	Internasjonal enhet pr. milliliter
KI	Konfidensintervall
LAS	Laboratory Automation System
nM	nanomol/liter
PT-INR	Protrombintid-internasjonalt normalisert ratio
TF	Tissue factor
TFPI	Tissue factor pathway inhibitor
TRC	Toronto Research Chemicals
vWF	Von Willebrands faktor
Ø-hjelp	Øyeblikkelig hjelp

Innledning

1.1 Koagulasjonssystemet

Koagulasjonssystemet er et komplekst system som er en del av hemostasen. Det stopper blødning ved skadestedet mens det opprettholder normal blodsirkulasjon i resten av kroppen [1]. Hemostasen inndeles i flere trinn. Det første trinnet, den primære hemostasen, omfatter trombocytene og deres evne til adhesjon, aktivering, sekresjon og aggregering som til slutt danner en plateplugg [2]. Det andre trinnet, den sekundære hemostasen, kan igjen inndeles i flere elementer: det ytre, det indre og det kombinerte koagulasjonssystem. Systemet består av en kaskade av serinproteaser som fører til spalting av løselig fibrinogen til fibrin ved hjelp av trombin. Kryssbinding av fibrin danner et uløselig nettverk av fibrintråder ved skadestedet. Det tredje trinnet i hemostasen er fibrinolyse. Dette bidrar til å forhindre koagulasjon i normale blodkar ved feilaktig aktivering av koagulasjonssystemet. Fibrinolysen løser også opp fibrinnettverket under tilhelingsprosessen av en karskade [1].

Det ytre koagulasjonssystemet aktiveres ved eksponering av tissue factor (TF)-uttrykkende celler i blodet eller ved skade på karveggen som blottlegger TF i vevet. TF uttrykkes i vevets fibroblaster og glatte muskelceller [3]. TF og aktivert faktor VII (FVIIa) danner et ekstrinsisk tenase-kompleks i en reaksjon som er avhengig av kalsium. Dette aktiverer faktor IX (FIX) og faktor X (FX). FIXa aktiverer også FX dersom kofaktoren aktivert faktor VIII (FVIIIa) er til stede. Aktiverte trombocytter uttrykker bindingssteder for FVIIIa. FVIII sirkulerer i blodet i kompleks med von Willebrands faktor (vWF). Faktor II (FII) løsriver FVIII fra vWF, slik at det er tilgjengelig i sin aktive form. Deretter bindes FIXa til FVIIIa og katalyserer dermed omdanning av FX til FXa [2]. Når det først er aktivert, vil FXa virke som en enzymkomponent i protrombinase [1].

Det indre koagulasjonssystemet foregår parallelt med det ytre systemet. En trombinaktivering av faktor XII (FXII) initieres av FXIIa, et plasmaprotein, en serinprotease og faktor XI (FXI). Resultatet blir aktivering av FXI, som i likhet med FVIIa videre aktiverer FIX [3].

Siden intrinsisk tenase aktiverer FX ved en ratio som er 50-100 ganger større enn ekstrinsisk tenase, spiller det en kritisk rolle i amplifiseringen av FXa og tilhørende trombingenerasjon. Derfor er intrinsisk tenase kritisk i reproduksjonen av koagulasjonskaskaden [2].

I det kombinerte koagulasjonssystemet vil FXa, sammen med kofaktor faktor V (FV), vevsfosfolipider, platefosfolipider og kalsium, danne et protrombinase-kompleks. Dette enzymkomplekset omdanner protrombin til trombin, som videre spalter sirkulerende fibrinogen til uløselig fibrin og aktiverer faktor XIII (FXIII). Denne faktoren kryssbinder fibrinpolymere inkorporert i platepluggen. Det har nå blitt dannet et fibrinnettverk som stabiliserer platepluggen [3].

1.2 Koagulasjonsfaktor X

Faktor X er en vitamin K-avhengig serinprotease som er en del av kroppens koagulasjonssystem. Proteinet har en molekylvekt på 59 kDa, syntetiseres i leveren og sirkulerer i plasma som et molekyl bestående av to karbonkjeder bundet sammen av en disulfidbinding [4, 5]. Når kalsiumioner er til stede, vil FXa danne et fosfolipidbundet kompleks med en kofaktor, FVa. Dette kalles protrombinase-komplekset og aktiverer protrombin mer effektivt enn hva fri FXa gjør alene. Aktiveringen av protrombin foregår ved hydrolysering av to peptidbindinger. I tillegg kan FXa aktivere FV og FVIII, og FVII. Dermed deltar faktoren i positiv feedback som amplifiserer clot-prosessen [6].

For å oppnå effektiv binding av FX/FXa til membraner, kreves det at fosfatidylserin eksponeres på den ytre overflaten. Dette skjer når vesikler frigjøres fra aktiverte trombocytter. Fosfatidylserin forflyttes til den ytre overflaten av en fosfolipid-scramlase når trombocytene aktiveres. Slik reguleres binding av FX/FXa til bestemte celletyper ut fra deres funksjonelle tilstand [6].

Fri faktor Xa kan raskt inhiberes av serineprotease-inhibitorer i blodomløpet som følge av spalting av at en del av inhibitoren blir eksponert. Spaltingen fører til dannelsen av et kovalent-bundet kompleks og inhibering av enzymatisk aktivitet. Andre naturlige inhibitorer av FXa inkluderer tissue factor pathway inhibitor (TFPI) [6].

1.3 Faktor Xa-hemmende legemidler

1.3.1 Hvorfor hemme faktor Xa?

Enkelte sykdommer og kirurgi gir økt risiko for trombosedannelse [2, 7]. Eksempler på slike tilstander er personer med venetromber eller atrieflimmer [8]. Dette medfører et behov for stoffer ut over de naturlige inhibitorene til koagulasjonskaskaden. Slike medikamenter brukes for å forebygge blant annet lungeemboli og hjerneslag i utsatte pasientgrupper [9].

Det finnes flere legemidler på markedet som hemmer koagulasjonen, både direkte og indirekte. Inntil nylig har bruk av indirekte antikoagulerende midler vært mest utbredt, fordi disse var de eneste på markedet. Warfarin er det mest brukte indirekte antikoagulerende legemidlet. Dette legemidlet krever hyppige terapikontroller. En av fordelene ved direkte antikoagulerende legemidler er at de ikke krever slike kontroller. Dette kan gjøre behandling med direkte orale antikoagulerende (DOAK) medikamenter kostnadseffektivt, selv med høyere kostnad på dagsdoser enn warfarin. Andre fordeler ved DOAK-midler sammenliknet med warfarin er at effekten deres i liten grad påvirkes av andre legemidler og matvarer [10]. Pasienter med atrieflimmer som tar direkte FXa-hemmende stoffer har også påvist lavere risiko for hjerneslag, blødning og død enn pasienter som tar warfarin [11]. Rivaroksaban, apiksaban og edoksaban utgjør tre av de mest brukte DOAK-midlene [12, 13].

1.3.2 Rivaroksaban, apiksaban og edoksaban

Rivaroksaban er et lite organisk molekyl med molar masse 435,882 g/mol [14]. Dette molekylet er en konkurrerende inhibitor; det binder seg direkte til både fritt og klot-bundet FXa og hindrer dermed faktorens katalytiske aktivitet. Dette inhiberer dannelsen av protrombinase-komplekset som er nødvendig for å omdanne FII til FIIa. Fordi ett aktivt FXa-molekyl kan bidra til dannelsen av over 1000 molekyler FIIa, er inhibering av denne faktoren en effektiv måte å dempe amplifiseringen av trombindannelse i koagulasjonskaskaden.

Rivaroksabans virkningsmekanisme er ikke avhengig av ATIII, [7, 9, 15] i motsetning til andre antikoagulerende legemidler på markedet (f.eks. heparin) [16].

Inntak av rivaroksaban er oralt med én daglig dose. Dette skiller legemidlet fra de ofte brukte behandlingene med ufraksjonert og lavmolekylært heparin, som tilføres intravenøst. Den biologiske tilgjengeligheten til oralt administrert rivaroksaban er 80%. Høyeste plasmakonsentrasjon nås 2-3 timer etter inntak. Opptaket forbedres hvis legemidlet tas sammen med et måltid. Halveringstiden til medikamentet er avhengig av bl.a. alder, nyre- og leverfunksjon. I friske, unge personer er plasmakonsentrasjonen halvert innen 5 til 9 timer, i eldre personer er halveringstiden mellom 11 og 13 timer. Warfarin har en mye lenger halveringstid på ca. 40 timer, noe som gjør effekten av glemte doser eller doser tatt til litt feil tidspunkt relativt lav. For rivaroksaban betyr halveringstiden at dosering til riktig tid er viktig for å forsikre seg om tilstrekkelig effekt [10]. Omtrent en tredjedel av legemidlet skilles ut av nyrene uforandret. Resten brytes ned til inaktive metabolitter i leveren, hvorav halvparten utskilles gjennom nyrene og resten i avføring.

Apiksaban er i likhet med rivaroksaban et relativt lite molekyl, med molar masse på 459,457 g/mol [11]. Dette molekylet binder også FXa direkte i både fri og klot-bundet form, og har dermed samme virkningsmekanisme som rivaroksaban også dette legemiddelet inntas oralt, men krever to daglige doser. Ved oral administrasjon har apiksaban 50% biologisk tilgjengelighet, med høyeste plasmakonsentrasjon etter 3-4 timer. Halveringstiden er omtrent 12 timer, hvor 27% utskilles uforandret gjennom nyrene og resten brytes ned i leveren til metabolitter som utskilles i avføringen [2].

Edoksaban er også et relativt lite molekyl, med molar masse på 548,06 g/mol. Molekylet har samme virkningsmekanisme som rivaroksaban og apiksaban, og også dette tas oralt [17]. Den biologiske tilgjengeligheten er på 62%, med høyeste plasmakonsentrasjon etter 1-2 timer. Halveringstiden til edoksaban er 10-14 timer, hvor omtrent halvparten utskilles uforandret gjennom nyrene og resten brytes ned i leveren og utskilles i avføringen som metabolitter [2, 12, 18, 19].

1.3.3 Midler som reverserer effekten av FXa-hemmere

I noen tilfeller kan det være nødvendig å reversere FXa-hemmerenes effekt. Dette kan være akutte blødninger, forberedelse til operasjon eller annen behandling som medfører økt blødningsrisiko [20]. Det finnes flere slike reverserende midler. Ett av disse stoffene er andexanet alfa [2]. Stoffet består av en rekombinant variant av FXa som ikke er aktiv som katalysator for koagulasjonskaskaden. Denne inaktive varianten av FXa har sterkere affinitet for FXa-hemmerene enn vanlig FXa, og konkurrerer derfor med aktiv FXa i binding med FXa-hemmeren. Dette gir flere ubundne aktive FXa-molekyler som kan bidra til koagulasjonen [21]. Andexanet alfa virker som reverserende middel mot både rivaroksaban, apiksaban og edoksaban [2].

Ciraparantag er et annet reverserende middel mot FXa-inhibitorer. Dette er et lite, syntetisk molekyl som binder blant annet rivaroksaban, apiksaban og edoksaban, slik at deres antikoagulerende effekt inhiberes. Ciraparantag er fortsatt under utvikling [2].

Ulempene med reverserende midler mot direkte FXa-hemmere er at de er svært kostbare [22], og med få alternativer på markedet [10]. Det er derfor ønskelig å kunne vurdere blødningsrisiko for pasienter som tar rivaroksaban, apiksaban eller edoksaban i akutte situasjoner, slik at bruken av reverserende midler blir så begrenset som mulig. Per dags dato har St. Olavs hospital ingen rutineanalyse for vurdering av akutt blødningsrisiko hos pasienter som tar rivaroksaban, apiksaban eller edoksaban, og sykehuset vil gjerne etablere en slik analyse (Vedlegg 1).

1.4 Hvordan kvantifisere blødningsrisiko?

Publisert dokumentasjon om blødningsrisiko ved behandling med FXa-hemmere er basert på konsentrasjonen av legemidlene [23], men dette er ikke en analyse som kan innføres som Ø-hjelp-analyse. Grunnen til dette er at Avdeling for klinisk farmakologi (AKF), som utfører disse analysene, ikke har døgnåpent. I tillegg utfører avdelingen kun slike analyser to ganger i uken og gir ut svarene påfølgende dag [24].

Tradisjonelle koagulasjonsanalyser som protrombintid-internasjonalt normalisert ratio (PT-INR) og aktivert partiell tromboplastintid (APTT), egner seg ikke ved bestemmelse av effekt av direkte reversible FXa-inhibitorer. Dette er raske og billige analyser som er tilgjengelig i mange laboratorier og egner seg godt til beregning av effekt for indirekte antikoagulerende midler som warfarin, men ved bruk av DOAK-midler er PT-INR og APTT ikke sensitive nok til å gi pålitelige resultater [25]. Grunnen til dette er at koagulasjonsfaktorene gir uregelmessige svar, fordi deres anti-FXa-aktivitet påvirkes i ulik grad ved screening- og koagulasjonstester, avhengig av oppbygning av reagenser og type koagulometer [26-29].

I tillegg kan en del kliniske tilstander påvirke klot-dannelse, for eksempel leversykdom, medfødt faktordefekt eller tilstedeværelse av antifosfolipid-antistoffer [30]. Konsentrasjoner av de ulike koagulasjonsfaktorene kan måles falskt for lave avhengig av type og restkonsentrasjon av DOAK i korrelasjon med prøvetakingstidspunkt og inntak av medikament [31]. I tillegg kan tilførende medikament påvirke analyseresultatet. For eksempel kan rivaroksaban føre til falskt for høy ATIII-aktivitet (tidsavhengig) når en FX-basert analyse benyttes [32].

Kromogene eller immunologiske analyser foretrekkes, fordi det er påvist at de gir et pålitelig bilde av koagulasjonsevnen til pasienter som behandles med rivaroksaban, apiksaban og edoksaban [33]. Ulempen med disse metodene er at de er kostbare og ikke like utbredt på medisinske laboratorier som analysene for monitorering av warfarinbehandling [10]. Ved St. Olavs hospital brukes kromogen aktivitetmåling av FXa som Ø-hjelps-analyse for pasienter som behandles med heparin [34]. Det er ikke spesifikke Ø-hjelps-analyser for aktivitetmåling av FXa hos pasienter som tar rivaroksaban, apiksaban og edoksaban. Sykehuset ønsker at dette prosjektet utreder bruk av denne metoden også hos pasienter som mottar DOAK-midler.

1.5 Problemstilling

Kan anti-FXa-aktivitet brukes som rutineanalyse ved Ø-hjelp-utredning av blødningsrisiko på prøver av pasienter som tar rivaroksaban, apiksaban eller edoksaban?

Materiale og metode

2.1 Prinsipp for analyse av anti-FXa-aktivitet

Måling av anti-FXa-aktivitet gjøres ved hjelp av en direkte kromogen analyse. Først tilsettes prøvematerialet et overskudd av FXa. FXa-hemmere i prøvematerialet vil binde en mengde FXa proporsjonal med konsentrasjonen til legemiddelet. Gjenværende FXa blir så kvantifisert ved tilsats av et syntetisk kromogent substrat som hydrolyseres av fritt FXa. Ett av de resulterende stoffene er fargestoffet paranitroanilin. Dette kvantifiseres kinetisk gjennom fotometrisk analyse ved 405 nm og er omvendt proporsjonal med konsentrasjonen til FXa-hemmeren i prøvematerialet (Vedlegg 2) [18].

2.2 Materiale (prøvemateriale, kalibrator, kontroll, reagenser, utstyr)

2.2.1 Prøvemateriale

Det ble brukt plasma fra fire friske frivillige (giver 1-4). Til sammenlikning ble det brukt resultater fra et internt prosjekt ved Avdeling for medisinsk biokjemi (AMB) utført høsten 2018 med en giver (giver 5) (Vedlegg 3). 9 mL citratrør ble brukt, slik at forholdet ble 1 del 0,1 M Na-citrat + 9 deler blod. Citratblod ble sentrifugert ved 2200 G i 15 minutter ved romtemperatur. Plasma ble avpipettert med ca. 1 cm restvolum for å unngå kontaminering av trombocytter. Materialet er holdbart i 4 timer usentrifugert. Avpipettert plasma er holdbart i -20 °C fryser i 2 uker.

Avpipettert prøvemateriale ble alikvotert: ca. 30 mL i et 50 mL plastrør og 3 x 8 mL i 12 mL plastrør. De tre 12 mL rørene ble lagt rett i -80°C. 50 mL-røret ble fraktet til AKF, hvor legemiddelstamløsningene ble fremstilt.

Legemiddelbruksløsninger av rivaroksaban, apiksaban og edoksaban ble fremstilt på forhånd av Astrid Dahn ved AKF. Rivaroksabanbruksløsningen hadde konsentrasjon på 40 µM (Toronto Research Chemicals, Toronto, Canada). Apiksabanbruksløsningen hadde konsentrasjon på 50 µM (TRC). Edoksabanbruksløsningen hadde konsentrasjon på 50 µM (ALSACHIM, Illkirch-Graffenstaden, Frankrike). Alle bruksløsningene ble løst i acetonitril (ACN).

4 mL plasma ble pipettert i 5 mL målekolber. 50 μ L legemiddelbruksløsning ble tilsatt, og plasma ble fylt opp til streken. Stamløsningene ble overført til glassbeholdere og deretter fryst ved -80°C .

Rivaroksabanstamløsningene (400 nM) og en alikvot av det legemiddelfrie plasmaet fra hver giver ble tint ved å legge rørene i varmebad (37°C) i cirka 10 minutter. Når løsningene hadde tint, ble de lagt på vippe i ca. 2-3 minutter. Deretter ble 1000 μ L av stamløsningen blandet med 1000 μ L legemiddelfritt plasma til en 1:2 fortytning. Fortyningen ble gjentatt tre ganger til for sluttkonsentrasjoner på 200 nM, 100 nM, 50 nM og 25 nM (Vedlegg 1). En prøve med ufortynnet legemiddelstamløsning og en prøve legemiddelfritt plasma ble også inkludert i det endelige analyseoppsettet.

Apiksaban- og edoksabanstamløsningene (500 nM) ble tint og fortynt med samme fremgangsmåte som rivaroksabanstamløsningen (Vedlegg 1).

2.2.2 Kalibrator, kontroll, reagenser og utstyr

Det ble brukt HemosIL Heparin Calibrators (Instrumentation Laboratory, Bedford, MA) som kalibratormateriale. Kontrollene til analysen var HemosIL LMW Heparin Controls (Instrumentation Laboratory) og HemosIL UF Heparin Controls (Instrumentation Laboratory). HemosIL Liquid Anti-Xa ble benyttet som reagenser. Analysene ble utført på ACL Top 750 LAS (Laboratory Automation System) (Instrumentation Laboratory). For ytterligere informasjon angående reagens, prøvemateriale, kalibrator og kontroll, se henholdsvis vedlegg 2, vedlegg 4-7.

2.3 Fremgangsmåte for måling av anti-FXa-aktivitet

Analysen av anti-FXa-aktivitet ble utført på ACL Top 750 LAS. Kalibrering ble utført av fagbioingeniør for analysen.

2.3.1 Kontroll av reagens

Beholdere med kontroll-tørrstoff til HemosIL LMW Heparin Controls (Instrumentation Laboratory) og HemosIL UF Heparin Controls (Instrumentation Laboratory), ble tatt ut av kjølerom og satt på benk for å oppnå romtemperatur. Så ble tørrstoffet løst i 1000 µL vann og lagt på vippe. Dette ble utført av bioingeniøransvarlig. UF Heparin Control og LMW Heparin Control ble analysert i to nivå, høyt og lavt. UF Heparin Control-kontrollene ble analysert i to paralleller, etter prosedyren fra St. Olavs hospital. Dette ga til sammen 6 kontroll-analyser. Kontrollverdier ble vurdert opp mot avdelingens egne grenseverdier for kontrollen og godkjent av fagbioingeniør. Hvert flaskesett med reagens ble kontrollert som beskrevet over. Totalt ble 12 sett med reagens benyttet.

2.3.2 Analysering av prøver

Legemiddelstamløsningene og giverplasma ble tint etter at kontrollene ble godkjent. Den ferdig fortynnete analyserekken for hver giver ble analysert på instrumentet. Tre paralleller av hver prøve ble analysert. Alikvoter av de ufortynnete legemiddelstamløsningene og hver fortykning ble analysert samme dag som fortykningsrekkene ble satt opp.

2.3.3 Statistisk bearbeiding

Rådata ble bearbeidet ved beregning av gjennomsnitt og % CV (Microsoft Excel 2016 16.0.11601.20130, Microsoft Corporation, USA og Google Sheets 2019, Google LLC, USA). Resultatene ble fremstilt grafisk i figur 1-3 og 5-10 som et fit plot punktdiagram med kvadratisk estimering av 95% KI og trendlinje (Stata/MP 15.1, StataCorp LLC, USA). Standardavviket og 95% KI for standardavviket ble beregnet med «confidence interval of a SD»-kalkulator (Google Sheets og GraphPad 8, GraphPad Software Inc., USA). Figur 4 fremstiller dette i et linjediagram (Google Sheets). Sammenlikning av de fire plasmagiverne ble utført ved hjelp av Friedman-test hvor P-verdi <0,05 vurderes som statistisk signifikant (MedCalc19.03, MedCalc Software, Belgia).

Resultater

AMB ved St. Olavs hospital har en metode for kvantifisering av anti-FXa-aktivitet for pasienter som behandles med heparin. Hensikten med dette prosjektet var å undersøke om denne metoden også kan benyttes for pasienter som behandles med rivaroksaban, apiksaban og edoksaban. Fortynninger av DOAK-legemiddelstamløsninger og legemiddelfritt plasma fra fire ulike givere ble analysert på ACL Top 750 LAS for å utrede metodens egnethet.

Analysen viser at økt konsentrasjon DOAK-legemidler gir økt anti-FXa-aktivitet. Resultatene er oppgitt i IU/mL, som er den standardiserte benevnningen for anti-FXa-aktivitet. Resultater med verdi lavere enn 0,1 IU/mL gis ut som <0,1 IU/mL og verdier høyere enn 2,0 gis som >2,0 IU/mL fordi måleområdet er 0,1-2,0 IU/mL (Vedlegg 3).

3.1 Resultat fra målinger av anti-FXa-aktivitet i plasma med rivaroksaban

Hensikten med legemiddelundersøkelsen var å utrede om den heparin-tilpassede anti-FXa-aktivitet-metoden også kan benyttes for pasienter som behandles med rivaroksaban. Fortynninger av DOAK-legemiddelstamløsningen og legemiddelfritt plasma fra fire ulike givere ble analysert på ACL Top 750 LAS for å utrede metodens egnethet. Analysen viser at anti-FXa-aktivitet øker polynomialt med økt rivaroksabankonsentrasjon.

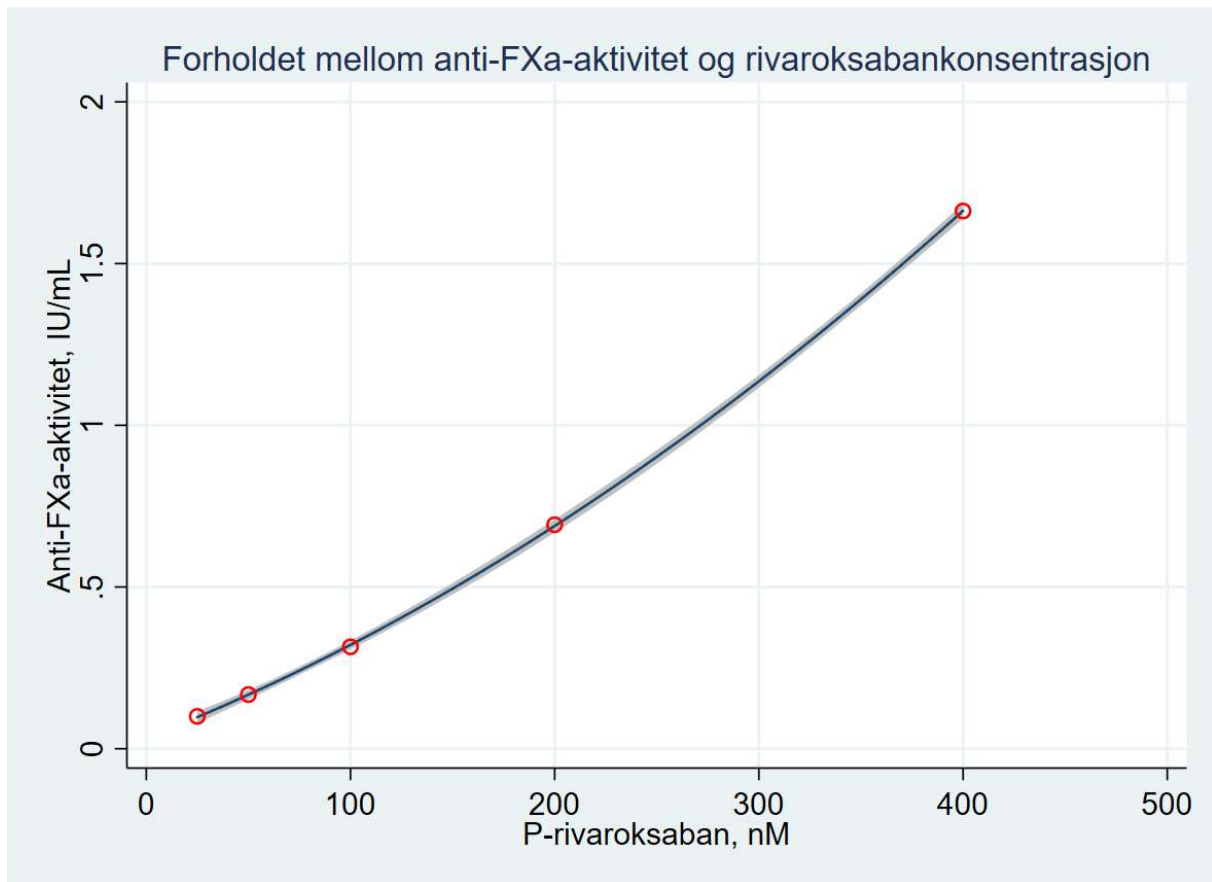
Tabell 1 viser resultatene fra anti FXa-aktivitetsanalyse av plasmaløsning ved ulike fortynninger med rivaroksaban. Et utvalg av rådataene fra instrumentutskriftene finnes i vedlegg 8. Legemiddelfritt plasma fra alle fire givere ble også analysert sammen med rivaroksabanløsningene. Disse viser neglisjerbar anti-FXa-aktivitet (under måleområdet). Det er også beregnet gjennomsnitt og % CV mellom de tre parallellene.

Tabell 1: Tabellen viser avlest anti-FXa-aktivitet i IU/mL i tre paralleller for fortynningsrekkene med rivaroksaban og legemiddelfritt plasma fra de fire ulike givene. Prøvene ble analysert på ACL Top 750 LAS. Det er også beregnet gjennomsnitt og % CV.

Prøve ID	Anti-FXa-aktivitet (IU/mL)			Beregnete verdier	
	Parallell 1	Parallell 2	Parallell 3	Gjennomsnitt	% CV
P1 Legemiddelfritt	<0,10	<0,10	<0,10		
P1 400 nM	1,67	1,66	1,61	1,65	1,95
P1 200 nM	0,68	0,66	0,65	0,66	2,30
P1 100 nM	0,30	0,30	0,30	0,30	0,00
P1 50 nM	0,15	0,16	0,17	0,16	6,25
P1 25 nM	0,11	0,09	0,08	0,09	16,37
P2 Legemiddelfritt	<0,10	<0,10	<0,10		
P2 400 nM	1,64	1,69	1,71	1,68	2,15
P2 200 nM	0,73	0,71	0,70	0,71	2,14
P2 100 nM	0,32	0,31	0,32	0,32	1,82
P2 50 nM	0,16	0,16	0,17	0,16	3,53
P2 25 nM	0,09	0,11	0,10	0,10	10,00
P3 Legemiddelfritt	<0,10	<0,10	<0,10		
P3 400 nM	1,67	1,67	1,61	1,65	2,10
P3 200 nM	0,73	0,69	0,67	0,70	4,39
P3 100 nM	0,32	0,34	0,31	0,32	4,72
P3 50 nM	0,18	0,18	0,16	0,17	6,66
P3 25 nM	0,13	0,09	0,11	0,11	18,18
P4 Legemiddelfritt	<0,10	<0,10	<0,10		
P4 400 nM	1,60	1,68	1,73	1,67	3,93
P4 200 nM	0,67	0,71	0,71	0,70	3,31
P4 100 nM	0,33	0,31	0,32	0,32	3,13
P4 50 nM	0,20	0,18	0,17	0,18	8,33
P4 25 nM	0,10	0,11	0,09	0,10	10,00

Figur 1 viser forholdet mellom rivaroksabankonsentrasjon i plasmaløsningen og den målte anti-FXa-aktiviteten. Den plottede anti-FXa-aktiviteten ved hver konsentrasjon er gjennomsnittet av resultatene fra alle fire givere. Forholdet er nesten lineært, da doblet konsentrasjon gir omtrent doblet aktivitet. Det er likevel brukt en polynom trendlinje for å gi

best tilpasning av resultatene. 95% KI for trendlinjen er markert som et grått felt rundt linjen. Korrelasjonen mellom punktene og den beregnede linjen er høy, og dette er derfor en god tilnærming av forholdet.



Figur 1: Grafisk fremstilling av forandring i anti-FXa-aktivitet ved økende rivaroksabankonsentrasjon. Den plottede anti-FXa-aktiviteten ved hver konsentrasjon er gjennomsnittet av resultatene fra alle fire givere.

3.2 Resultat fra målinger av anti-FXa-aktivitet i plasma med apiksaban

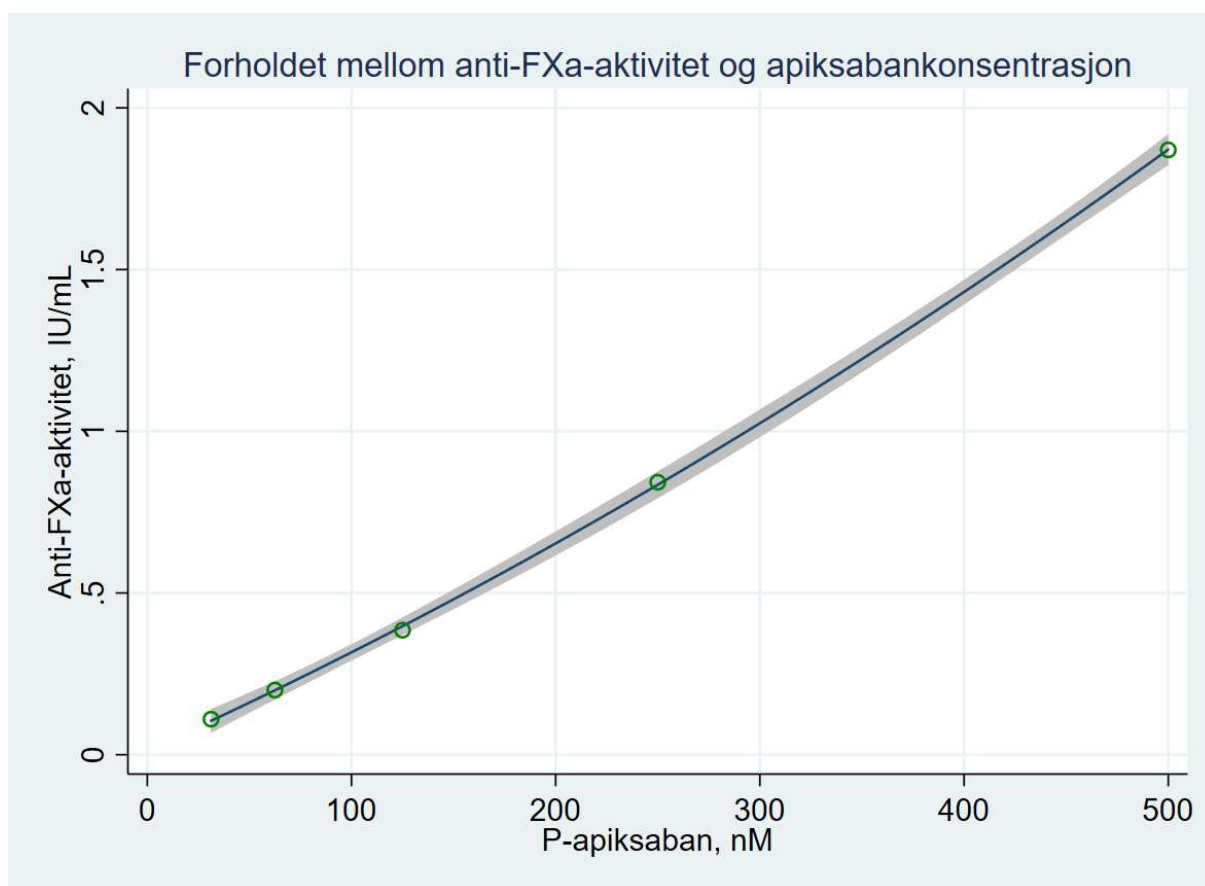
Formålet med denne undersøkelsen var å utrede om den heparin-tilpassede anti-FXa-aktivitet-metoden også kan benyttes for pasienter som behandles med apiksaban. Fortynninger av DOAK-legemiddelstamløsningen og legemiddelfritt plasma fra fire ulike givere ble analysert på ACL Top 750 LAS for å utrede metodens egnethet. Analysen viser at anti-FXa-aktivitet øker polynomialt med økt apiksabankonsentrasjon.

Tabell 2 viser resultatene fra anti FXa-aktivitetsanalyse av plasmaløsning med apiksaban i ulike fortynninger. Et utvalg av rådataene fra instrumentutskriftene finnes i vedlegg 8. Det er også beregnet gjennomsnitt og % CV mellom de tre parallellene.

Tabell 2: Tabellen viser avlest anti-FXa-aktivitet i IU/mL i tre paralleller for fortynningsrekkene med apiksaban fra de fire ulike giverne. Prøvene ble analysert på ACL Top 750 LAS. Det er også beregnet gjennomsnitt og % CV.

Prøve ID	Anti-FXa aktivitet (IU/mL)			Beregnete verdier	
	Parallell 1	Parallell 2	Parallell 3	Gjennomsnitt	% CV
P1 500 nM	1,89	1,97	1,88	1,91	2,58
P1 250 nM	0,81	0,86	0,88	0,85	4,24
P1 125 nM	0,41	0,39	0,39	0,40	2,91
P1 62,5 nM	0,21	0,23	0,21	0,22	5,33
P1 31,25 nM	0,10	0,13	0,11	0,11	13,48
P2 500 nM	1,81	1,85	1,94	1,87	3,57
P2 250 nM	0,86	0,84	0,87	0,86	1,78
P2 125 nM	0,40	0,38	0,40	0,39	2,94
P2 62,5 nM	0,22	0,20	0,20	0,21	5,59
P2 31,25 nM	0,11	0,11	0,12	0,11	5,09
P3 500 nM	1,80	1,85	1,76	1,80	2,50
P3 250 nM	0,85	0,80	0,80	0,82	3,53
P3 125 nM	0,37	0,38	0,37	0,37	1,55
P3 62,5 nM	0,19	0,19	0,17	0,18	6,30
P3 31,25 nM	0,10	0,10	0,12	0,11	10,83
P4 500 nM	1,90	1,83	1,96	1,90	3,43
P4 250 nM	0,84	0,83	0,86	0,84	1,81
P4 125 nM	0,39	0,39	0,37	0,38	3,01
P4 62,5 nM	0,22	0,18	0,18	0,19	11,95
P4 31,25 nM	0,10	0,12	0,11	0,11	9,09

Figur 2 viser forholdet mellom anti-FXa-aktivitet og apiksabankonsentrasjon. Samme fremgangsmåte for fremstilling av figuren ble brukt som i figur 1. Korrelasjonen mellom punktene og den beregnede linjen er høy, og dette er derfor en god tilnærming av forholdet.



Figur 2: Grafisk fremstilling av forandring i anti-FXa-aktivitet ved økende apiksabankonsentrasjon. Den plottede anti-FXa-aktiviteten ved hver konsentrasjon er gjennomsnittet av resultatene fra alle fire givere.

3.3 Resultat fra målinger av anti-FXa-aktivitet i plasma med edoksaban

Hensikten med denne legemiddelundersøkelsen var å utrede om den heparin-tilpassede anti-FXa-aktivitet-metoden også kan benyttes for pasienter som behandles med edoksaban.

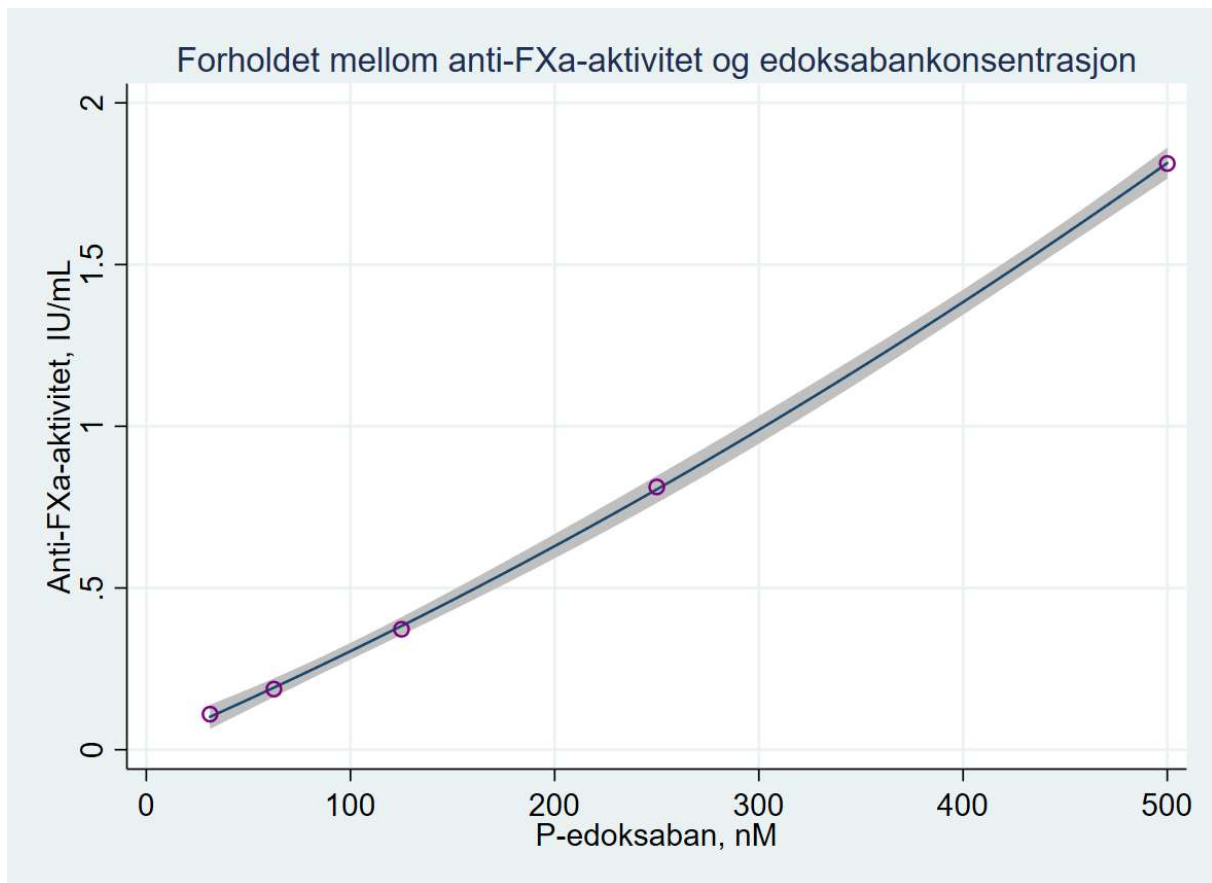
Fortynninger av DOAK-legemiddelstamløsningen og legemiddelfritt plasma fra fire ulike givere ble analysert på ACL Top 750 LAS for å utrede metodens egnethet. Analysen viser at anti-FXa-aktivitet øker polynomialt med økt edoksabankonsentrasjon.

Tabell 3 viser resultatene fra anti FXa-aktivitetsanalyse av plasmaløsning med edoksaban i ulike fortynninger. Et utvalg av rådataene fra instrumentutskriftene finnes i vedlegg 8. Det er også beregnet gjennomsnitt og % CV mellom de tre parallellene.

Tabell 3: Tabellen viser avlest anti-FXa-aktivitet i IU/mL i tre paralleller for fortynningsrekkene med edoksaban fra de fire ulike giverne. Prøvene ble analysert på ACL Top 750 LAS. Det er også beregnet gjennomsnitt og % CV.

Prøve ID	Anti-FXa aktivitet (IU/mL)			Beregnete verdier	
	Parallell 1	Parallell 2	Parallell 3	Gjennomsnitt	% CV
P1 500 nM	1,89	1,80	1,83	1,84	2,49
P1 250 nM	0,83	0,80	0,83	0,82	2,11
P1 125 nM	0,39	0,37	0,37	0,38	3,07
P1 62,5 nM	0,18	0,20	0,19	0,19	5,26
P1 31,25 nM	0,13	0,10	0,11	0,11	13,48
P2 500 nM	1,89	1,86	1,85	1,87	1,12
P2 250 nM	0,85	0,77	0,81	0,81	4,94
P2 125 nM	0,36	0,35	0,36	0,36	1,62
P2 62,5 nM	0,20	0,18	0,18	0,19	6,19
P2 31,25 nM	0,13	0,10	0,11	0,11	13,48
P3 500 nM	1,79	1,78	1,68	1,75	3,48
P3 250 nM	0,77	0,85	0,80	0,81	5,01
P3 125 nM	0,39	0,36	0,35	0,37	5,68
P3 62,5 nM	0,18	0,18	0,17	0,18	3,27
P3 31,25 nM	0,10	0,10	0,09	0,10	5,97
P4 500 nM	1,88	1,81	1,69	1,79	5,36
P4 250 nM	0,79	0,85	0,79	0,81	4,28
P4 125 nM	0,37	0,39	0,37	0,38	3,07
P4 62,5 nM	0,20	0,20	0,17	0,19	9,12
P4 31,25 nM	0,13	0,10	0,12	0,12	13,09

Figur 3 viser forholdet mellom anti-FXa-aktivitet og edoksabankonsentrasjon. Samme fremgangsmåte for fremstilling av figuren ble brukt som i figur 1 og 2. Korrelasjonen mellom punktene og den beregnede linjen er høy, og dette er derfor en god tilnærming av forholdet.



Figur 3: Grafisk fremstilling av forandring i anti-FXa-aktivitet ved økende edoksabankonsentrasjon. Den plottede anti-FXa-aktiviteten ved hver konsentrasjon er gjennomsnittet av resultatene fra alle fire givere.

3.4 Krav til kontroll av reagens

Analysens riktighet vurderes ved hjelp av kontrollmateriale med kjent konsentrasjon. To kontroller i to nivå ble analysert og vurdert av fagansvarlig bioingeniør. Kontrollkravene utgjør grunnlaget for vurderingen av kontrollenes riktighet.

Instrumentation Laboratory oppgir forventede % CV og sanne verdier i reagensvedlegget, men anbefaler at hvert laboratorium utvikler sine egne grenser ved analyse på sine instrumenter. Grensene for analyser på ACL Top 750 LAS i bruk ved St. Olavs hospital finnes i vedlegg 9. Verdiene for kontrollene brukt i denne oppgaven er gjengitt i tabell 4.

Tabell 4: UF Heparin Controls og LMW Heparin Controls oppgitte krav for anti-FXa-aktivitetsanalyse ved St. Olavs hospital.

Kontrollnavn	Tillatt % CV	Sann verdi (gjennomsnitt)	Grenseverdier
UF H Low	7,0	0,39	0,31-0,47
UF H High	4,0	0,66	0,57-0,75
LMW Low	3,0	0,66	0,58-0,74
LMW High	2,0	1,52	1,37-1,67

Kontrollene ble analysert i henhold til avdelingens eksisterende metode. LMW Heparin Control ble kun kjørt en gang og det ble analysert to paralleller av UF Heparin Control. Kontrollresultatene i vedlegg 10 ligger innenfor oppgitte grenseverdier som vist i tabell 4 (grenseverdier). Beregnet % CV for de ulike kontrollene er lavere enn presisjonskravet som er satt for analysene (Vedlegg 11). Dermed er analysens presisjon innenfor godkjente krav.

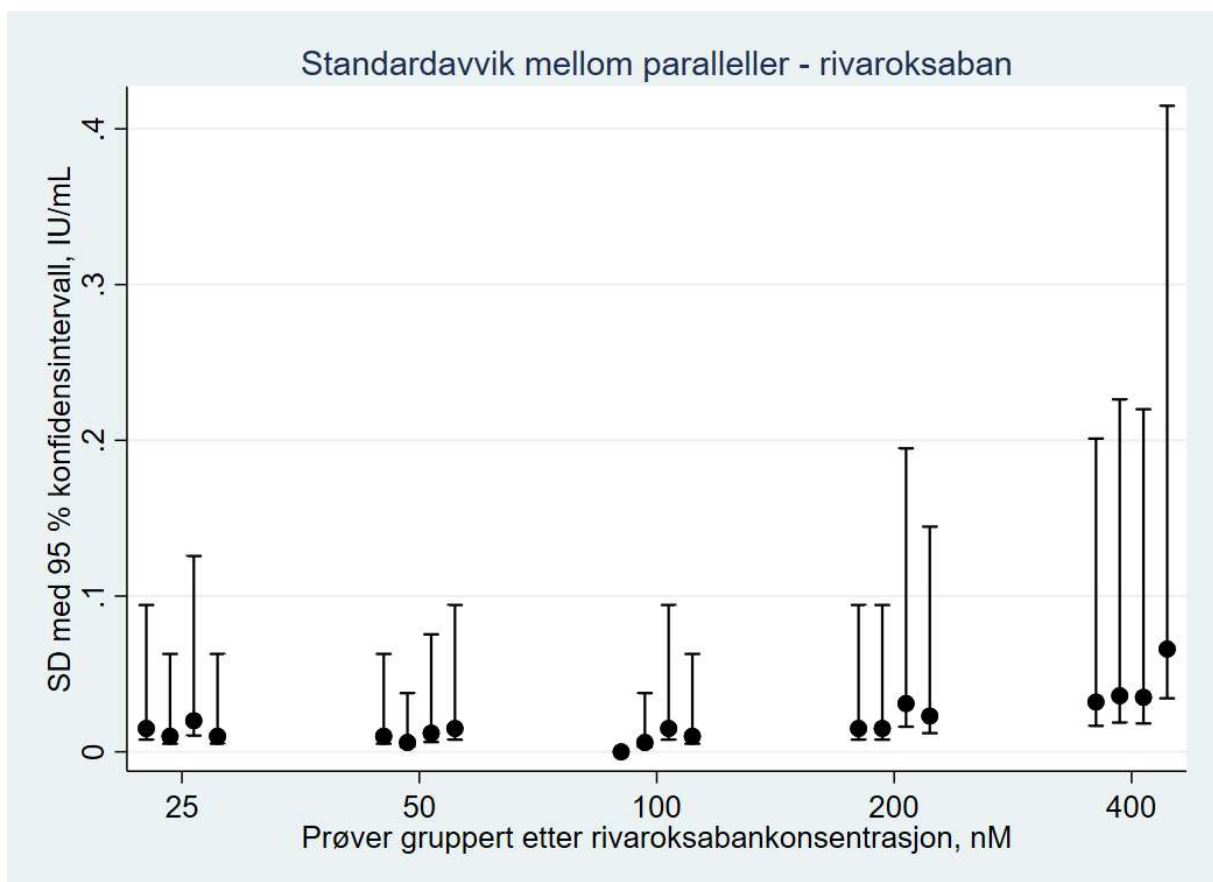
Til å vurdere kontrollene over tid, har AMB utarbeidet egne kontrollregler i samarbeid med fagansvarlig lege. Disse reglene utarbeides når en ny lot tas i bruk. Konsentrasjon for hvert kontrollnivå, tilhørende standardavvik og % CV beregnes, og grenseverdier for kontrollene bestemmes. Det forventes en liten forandring, da hver lot vil variere. I tillegg er anti-FXa-analyser kompliserte og analyseres veldig sjelden. Dermed er det få prøver til analysering og grenser for standardavvik og % CV påvirkes. En vurdering utføres hver tredje måned, der man blant annet ser på om de ulike målingene følger en trend. Dersom beregnede verdier avviker betydelig fra tidligere, vil tiltak bli utført i samarbeid med fagansvarlig lege.

3.5 Vurdering av paralleller

Parallellene fra anti-FXa-aktivitetsanalysen av de ulike fortyningene av legemiddelstamløsningene, ble sammenliknet for å vurdere analysens presisjon. Sammenhengen mellom parallellene ble vurdert både ved repeterbarhet og inter-individuell variasjon. Repeterbarheten ble kontrollert ved å analysere tre paralleller av hver plasmagiver for hver konsentrasjon av DOAK-midler. Den inter-individuelle variasjonen ble undersøkt ved bruk av plasma fra fire ulike givere for hvert legemiddel.

For å kvantifisere repeterbarheten ble % CV, standardavviket og 95% KI for standardavviket brukt. Analyseresultatene for rivaroksaban ble brukt som et representativt eksempel ved vurdering av standardavviket, da samme trender ble observert for apiksaban og edoksaban. % CV øker ved lavere konsentrasjon, da samme absoluttfeil utgjør høyere % avvik for lavere verdier (tabell 1-3).

Standardavviket og øvre og nedre grense for 95% KI for standardavviket er illustrert i figur 4. Giver 1 er plassert lengst til venstre ved hver konsentrasjon. Diagrammet viser at standardavviket, og dermed 95% KI, er størst ved høye konsentrasjoner. Konsentrasjonene i midten av utvalget har lavest standardavvik, før det stiger litt ved de laveste konsentrasjonene.



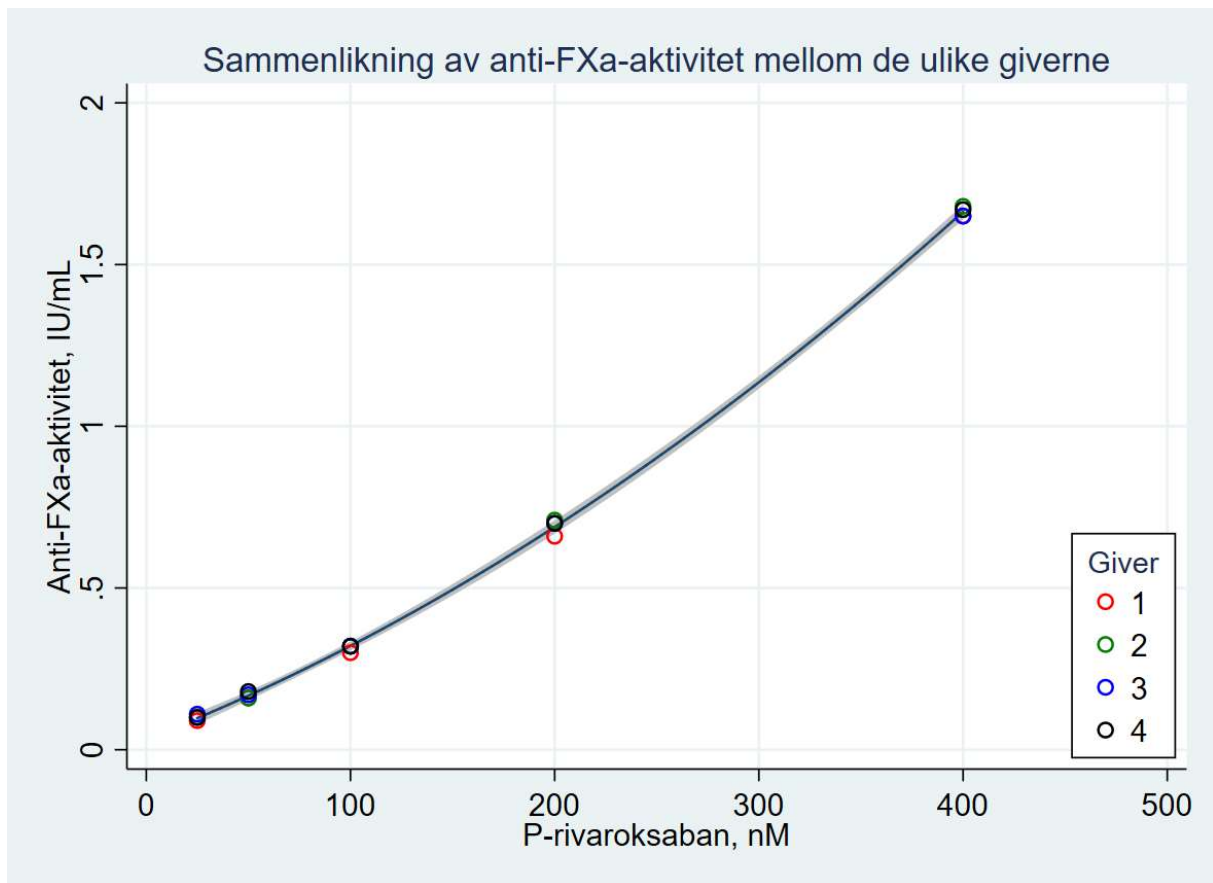
Figur 4: Grafisk fremstilling av standardavviket mellom parallellene til de fire givene fra analyse av rivaroksaban. Giver 1 lengst til venstre ved hver konsentrasjon. Øvre og nedre grense til 95% KI for standardavviket indikeres ved vertikale linjer.

For å kvantifisere signifikansen til de inter-individuelle forskjellene ble Friedman-test brukt. Resultatene fra denne analysen er oppgitt i tabell 5. P-verdier hvor $P < 0,05$ ansees som statistisk signifikant, men dette betyr ikke nødvendigvis at forskjellen er klinisk signifikant. Ved statistisk analyse ble det oppnådd signifikante P-verdier for målinger av rivaroksaban og apiksaban (merket i grønt i tabell 5). Ved analysering av giverplasma tilsatt rivaroksaban, skilte P1 seg ut fra resten. Når det gjaldt apiksaban, var flere givere signifikant ulike hverandre. Edoksaban hadde en høyere P-verdi, og ulikhetene her er derfor ikke statistisk signifikante.

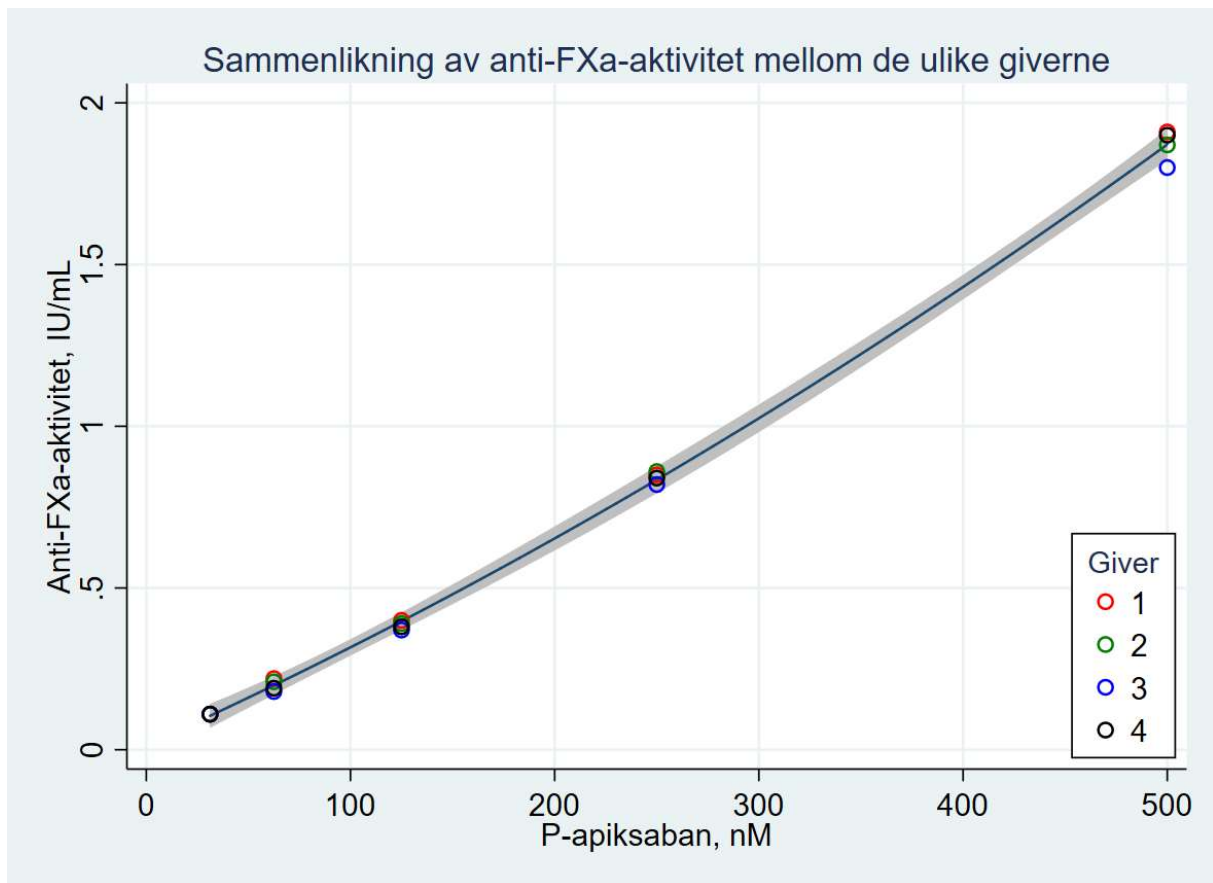
Tabell 5: Resultater fra Friedman-test av inter-individuell variasjon med statistisk signifikante P-verdier merket i grønt.

	Rivaroksaban	Apiksaban	Edoksaban
P-verdi	0,02085	0,00381	0,05051
Variabel	Forskjellig fra variabel nr.		
P1	P2, P3, P4	P3, P4	-
P2	P1	P3	P3, P4
P3	P1	P1, P2	P2
P4	P1	P1	P2

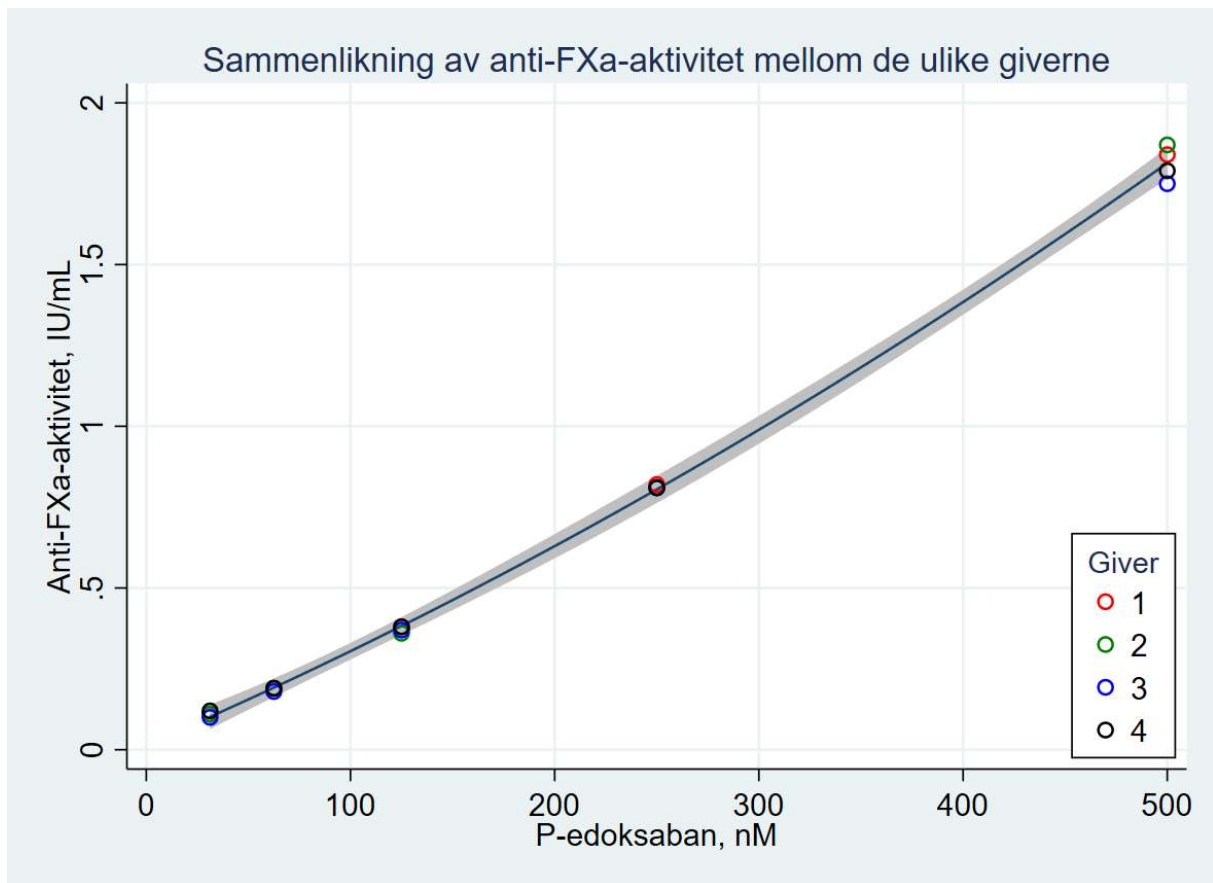
I figur 5, 6 og 7 er forskjellen i anti-FXa-aktivitet mellom de fire givene for alle tre legemidler fremstilt grafisk. Trendlinjen representerer gjennomsnittet av de fire givene. Den visuelt observerte inter-individuelle forskjellen er svært liten for alle legemidlene.



Figur 5: Grafisk fremstilling av forandring i anti-FXa-aktivitet mellom de ulike giverne ved økende rivaroksabankonsentrasjon.



Figur 6: Grafisk fremstilling av forandring i anti-FXa-aktivitet mellom de ulike giverne ved økende apiksabankonsentrasjon.

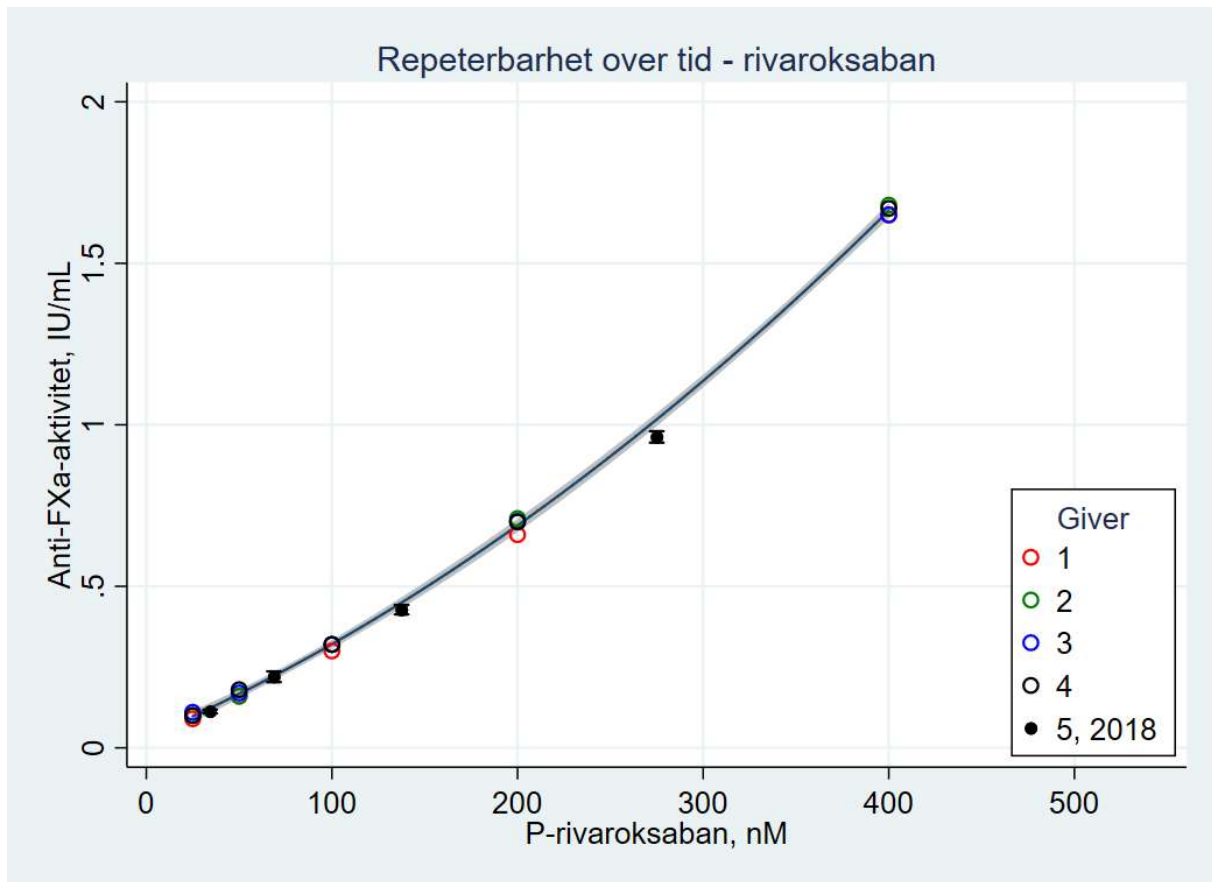


Figur 7: Grafisk fremstilling av forandring i anti-FXa-aktivitet mellom de ulike giverne ved økende edoksabankonsentrasjon.

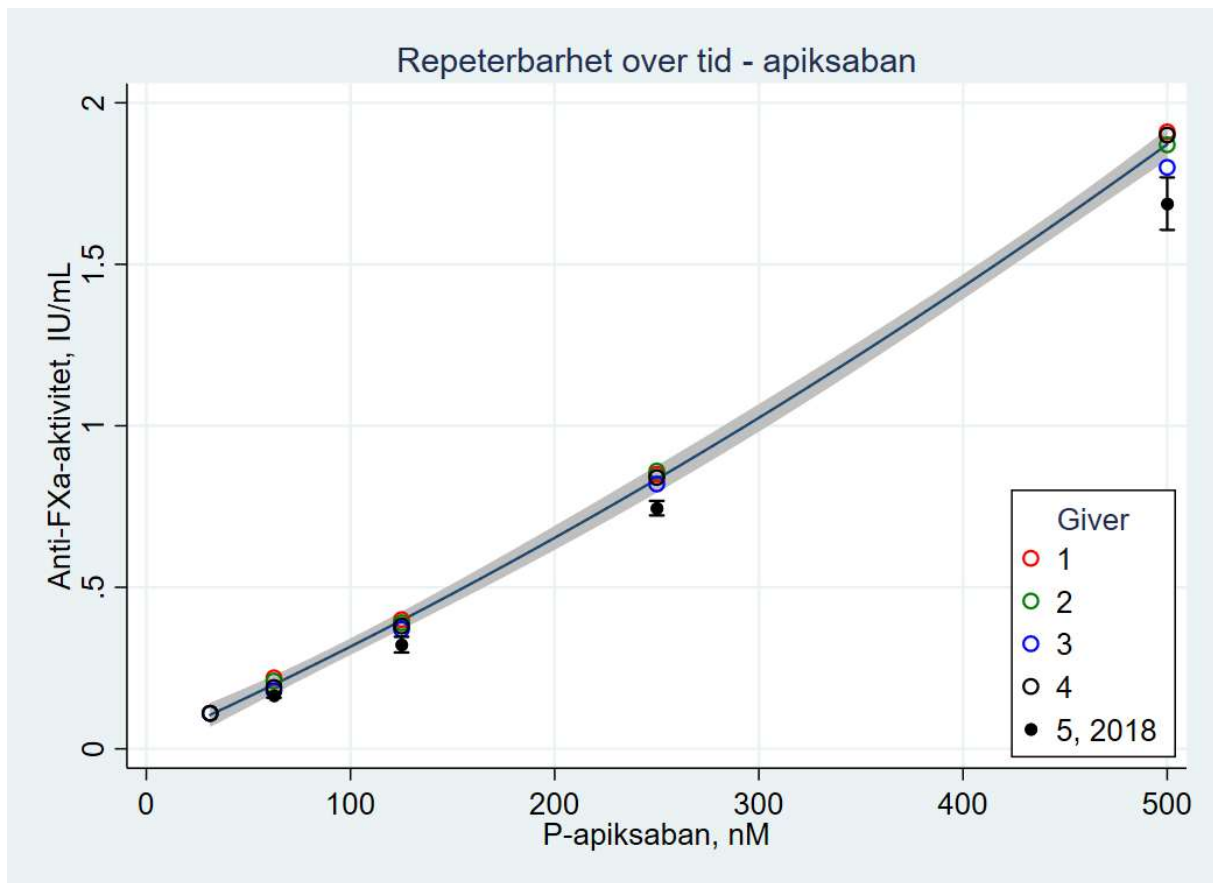
3.6 Repeterbarhet over tid

Repeterbarheten sier noe om analysens stabilitet og pålitelighet over tid. Resultater fra ulike år og forskjellige reagens-lot ble vurdert. Figur 8, 9 og 10 viser anti-FXa-aktivitet hos giver 1-5 ved ulike legemiddelkonsentrasjoner. Analyse av giver 1-4 ble utført til dette prosjektet i 2019. Resultatene fra giver 5 (Vedlegg 3) stammer fra et internt prosjekt utført ved St. Olavs hospital i 2018. Det ble benyttet ulike konsentrasjoner ved analyse av giver 5 for rivaroksaban og edoksaban, men resultatene kan sammenlignes grafisk. Figurene viser at anti-FXa-aktivitet ble målt lavere ved tilsvarende konsentrasjon i 2018 enn i 2019.

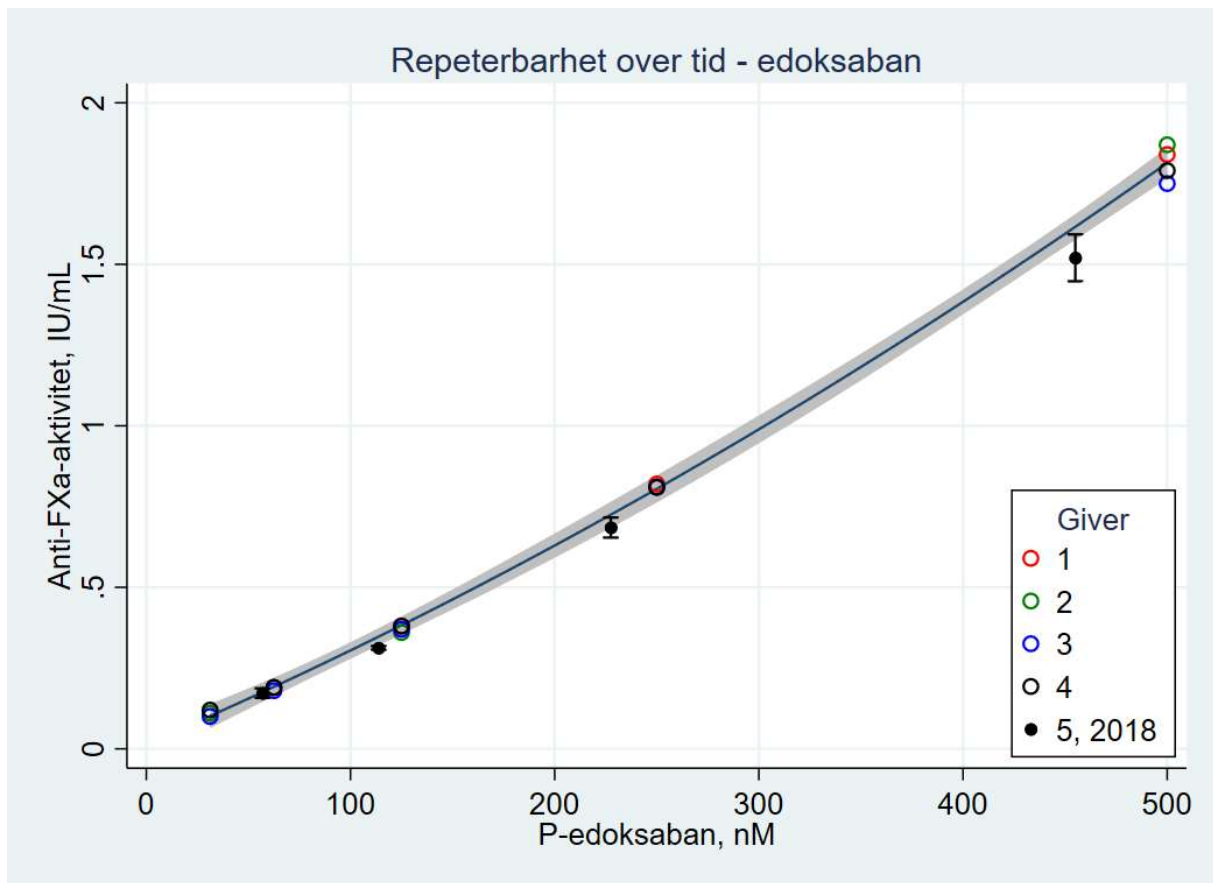
I figur 8 overlapper ikke 90% KI for giver 5 ved ca. 275 nM med 95% KI for giver 1-4. I figur 9 ligger tre av punktene for giver 5 nedenfor KI for giver 1-4. I figur 10 overlapper 90 %KI for giver 5 med 95% KI for giver 1-4, men alle punktene ligger i underkant av trendlinjen.



Figur 8: Grafisk fremstilling av anti-FXa-aktivitet ved ulike konsentrasjoner av rivaroksaban med prøver fra giver 1-5.



Figur 9: Grafisk fremstilling av anti-FXa-aktivitet ved ulike konsentrasjoner av apiksaban med prøver fra giver 1-5.



Figur 10: Grafisk fremstilling av anti-FXa-aktivitet ved ulike konsentrasjoner av edoksaban med prøver fra giver 1-5.

Diskusjon og konklusjon

4.1 Diskusjon av resultater fra analyse av anti-FXa-aktivitet

Ettersom det kommer flere DOAK-legemidler på markedet, er det viktig å utrede om aktuelle metoder med tilhørende kalibrator, kontroller og reagens kan benyttes for dem. DOAK-legemidlene som denne oppgaven omhandler, virker ved å inhibere FXa. Dette fører til en redusert trombinmengde i koagulasjonskaskaden [35]. Normalt er ikke kontroll av DOAK-legemidlers effekt nødvendig. I spesielle tilfeller som store blødninger, operasjon eller ved mistanke om forgiftning, er det imidlertid ønskelig med en Ø-hjelp-analyse for vurdering av blødningsrisiko hos pasienter som tar DOAK-midler (Vedlegg 1).

4.1.1 Drøfting av metodevalg

Valg av metode vurderes ut fra eksisterende kunnskap om heparinkalibrert anti-FXa-analyse og DOAK-legemidler. Resultatene viser at økt konsentrasjon av antikoagulerende medikamenter gir en økt anti-FXa-aktivitet. Metoden som ble benyttet til bestemmelse av anti-FXa-aktivitet i denne oppgaven, er tilpasset pasienter som får heparinbehandling. Heparin har en annen virkningsmekanisme enn rivaroksaban, apiksaban og edoksaban ved at heparin virker indirekte via ATIII [16]. Reagensene brukt til anti-FXa-analysen på St. Olavs hospital er egnet for analyse av anti-FXa-aktivitet i citratplasma som inneholder DOAK-legemidler (Vedlegg 2).

Ved universitetssykehuset i Oslo brukes en egen kontroll og kalibrator til anti-FXa-aktivitetsanalyse av hvert legemiddel [36]. Dette er også metoden reagensvedlegget (Vedlegg 2) tar utgangspunkt i. Kontrollene og kalibratorene til hvert legemiddel er dyre, og har kort holdbarhet. De kan heller ikke fryses. St. Olavs hospital ønsker derfor å bruke metoden med kalibrator og kontroll for plasma som inneholder heparin. Tidligere forsøk har vist at metoden for måling av heparin ved bruk av enten UFH eller LMWH kalibreringer kan brukes til å påvise tilstedeværelse av DOAK-medikamenter, men man må ta forbehold ved bruk av denne metoden til estimering av legemiddelkonsentrasjon [37].

En *in vivo* studie av DOAK-legemidlers påvirkning på anti-FXa-aktiviteten viste at forventet aktivitet var mellom 0,00 og 3,65 IU/mL for rivaroksaban, og mellom 0,02 og 3,18 IU/mL for apiksaban [38]. Da analysen i bruk ved St. Olavs hospital har måleområde mellom 0,10 og 2,00 IU/mL, kan noen prøver fra pasienter som regelmessig tar disse medikamentene, trenge fortykning før deres anti-FXa-aktivitet kan bestemmes nøyaktig (Vedlegg 4). DOAK-legemidler i påvisbare konsentrasjoner vil utgjøre en risiko i de situasjonene der anti-FXa-aktivitet er ønsket som Ø-hjelp-analyse. Anti-FXa-aktivitet over deteksjonsgrensen for analysen indikerer signifikant konsentrasjon av DOAK-medikamenter hos pasienten. Anti-FXa-aktivitet under måleområdet ($<0,1$ IU/mL) vil med høy grad av sikkerhet utelukke signifikant påvirkning fra eventuelle DOAK-legemidler pasienten har inntatt. Ved behov for en øyeblikkelig vurdering av blødningsrisiko, er formålet å raskt avgjøre om pasienten risikerer et stort blodtap eller ikke. Da vil ikke nøyaktig DOAK-legemiddel-konsentrasjon være relevant for å fortsatt ha klinisk nytteverdi. Resultater $>2,00$ IU/mL vil med høy sikkerhet indikere en stor grad av påvirkning på pasientens blødningsrisiko fra medikamentet [37].

4.1.2 Statistisk vurdering av anti-FXa-aktivitet-metodens egnethet

Ulike statistiske verktøy ble benyttet for å vurdere anti-FXa-aktivitet-metodens egnethet til utredning av blødningsrisiko hos pasienter som tar DOAK-legemidler. Forholdet mellom anti-FXa-aktivitet og konsentrasjonen av medikamentene er ikke lineært, og det ble derfor brukt en polynom trendlinje som tilpasning til kurven. Innen-serie-presisjon, reproduserbarhet og inter-individuell variasjon ble vurdert. Metodens presisjon og reproduserbarhet er rimelig god. Den medisinske veilederen vurderte den inter-individuelle variasjonen som ikke klinisk signifikant.

Behovet for bruk av en polynom trendlinje betyr at forholdet mellom anti-FXa-aktivitet og konsentrasjon av DOAK-legemidler ikke er lineært. Med en polynom trendlinje blir korrelasjonen høy nok til å si at linjen er en god tilpasning til resultatene.

I det interne notatet fra St. Olavs hospital (Vedlegg 3) ble fire paralleller for hver konsentrasjon analysert. Det ble etter dette forsøket bestemt at tre paralleller var nok til å gi en

rimelig god indikasjon på analysens presisjon, med minimale kostnader. Derfor ble det kun målt tre paralleller i dette forsøket. Presisjonskravene (Vedlegg 11) til avdelingen er tilpasset 20 paralleller, og % CV fra analysering av de tre parallellene er derfor ikke sammenliknbare med disse kravene. Derfor ble det beregnet standardavvik mellom parallellene og 95% KI for standardavvikene, fremstilt i figur 4. Denne viser at verdiene i midten av måleområdet har lavest variasjon. Dette indikerer at målinger av anti-FXa -aktivitet er mest pålitelige og stabile i midten av måleområdet. Presisjonen til analysen som ble utført i forbindelse med dette prosjektet ble vurdert av faglig ansvarlig bioingeniør som rimelig god innenfor analysens måleområde.

Friedman-testen avgjorde at den inter-individuelle variasjonen er statistisk signifikant med P-verdi $<0,05$ for både rivaroksaban og apiksaban (tabell 5). Den medisinske veilederen for dette prosjektet konkluderte imidlertid med at denne variasjonen ikke var det minste medisinsk signifikant. Den inter-individuelle variasjonen kan derfor sees bort ifra for denne analysen. Edoksaban har hverken statistisk eller medisinsk signifikant variasjon mellom givene.

Anti-FXa-aktivitetsanalysens repeterbarhet over tid ble vurdert ved sammenlikning av resultater fra det interne notatet utført i 2018 (Vedlegg 3) med resultatene oppnådd i dette prosjektet. Dette er fremstilt grafisk i figur 8-10. Figurene viser at 90% KI for enkelte punkter fra 2018-resultatene ikke overlapper med 95% KI for trendlinjen til 2019-resultatene. Disse avvikene kan ikke forklares kun ved inter-individuell variasjon mellom givene. Bytte av reagens- eller kalibrator-lot kan ha innvirkning på måling av anti-FXa-aktivitet. Forsøkene ble utført av ulike personer med mulig annen arbeidsmåte ved forskjellige konsentrasjoner. Prøvene fra 2018 ble også lagret over lenger tid enn prøvene til dette prosjektet. Holdbarheten til plasma til anti-FXa-aktivitet er ikke godt undersøkt over 2 uker i $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Vedlegg 4), men prøvene til 2018-forsøket ble lagret i over 5 måneder (Vedlegg 3). Det kan derfor ikke avgjøres med sikkerhet hvor stabil analysen er over tid, og det bør gjøres videre forsøk for å bestemme dette om ønsket. Forskjellen som observeres i figur 8-10 er imidlertid liten nok til å vurderes som medisinsk ubetydelig, uansett årsak.

4.1.3 Vurdering av kontrollresultatene fra anti-FXa-analysen

Kontrollmateriale med kjent konsentrasjon ble benyttet for å vurdere analysens riktighet. Analysen av anti-FXa-aktivitet ble kontrollert ved bruk av to ulike kontroller i to nivå hver; UF Heparin (low/high) Control og LMW Heparin (low/high) Control. Disse ble vurdert av fagansvarlig bioingeniør. Kontrollkravene i delkapittel 3.4 utgjør grunnlaget for vurderingen av kontrollenes riktighet.

Kontrollresultatene som ble registrert var innenfor godkjente grenseverdier (tabell 4) og ga beregnede % CV verdier innenfor presisjonskravet (Vedlegg 11). I kontrollkortet til UF Heparin Low Control (Vedlegg 7) observeres det en jevn fordeling av verdier i området mellom 0 og $-1SD$. Det observeres at resultatene fra UF Heparin High Control (Vedlegg 7) fordeler seg både over og under 0 i området $\pm 1SD$ i kontrollkortet. Dette tyder på god presisjon og riktighet ved at verdiene havner nær konsentrasjonene for nivå 1 og 2 (Vedlegg 11).

Kontrollkortet til LMW Heparin Low Control (Vedlegg 6) viste en større fordeling av analyseresultatene. Skalering på instrumentutskriften (Vedlegg 10) førte til at enkelte kontrollresultater ikke er vist på kontrollkort. Det samme ble observert i figuren til LMW Heparin High Control, hvor flertallet av målingene ikke vises, som betyr at de avviker mer enn $\pm 3SD$ fra konsentrasjon i nivå 1 og 2 (Vedlegg 11). Samlet % CV for begge kontrollene ble godkjent av fagansvarlig bioingeniør.

AMB utførte en utskifting av reagens-lot og kalibrator-lot før disse analysene ble utført. Verdiene som brukes til målverdier av kontrollene er de samme som ved forrige lot. Det er verdt å bemerke at konsentrasjonen til kontrollene kan variere mellom hver lot, så målverdiene er ikke nødvendigvis helt sann verdi. Derfor kan kontrollkortene være misvisende, og fagansvarlig bioingeniør bør vurdere analysens riktighet. Fagansvarlig bioingeniør for anti-FXa-aktivitetsanalysen godkjente kontrollresultatene til dette prosjektet.

4.1.4 Mulig videreføring av prosjektet

En begrensning ved denne oppgaven er at det kun ble brukt plasma som var tilsatt legemiddelløsninger *in vitro*. Disse plasmagiverne bruker ikke DOAK-legemidler til vanlig. Denne metoden er en godt etablert fremgangsmåte, men vil ikke direkte angi tilstand *in vivo* [39]. Den vil likevel gi et innblikk i relativ sensitivitet mellom legemiddelkonsentrasjon og anti-FXa-aktivitet [37]. Det forventes at *in vitro*-tilstanden godt representerer tilstanden *in vivo*, da metabolittene til de tre DOAK-legemidlene er påvist inaktive [2]. Ved ny analyse kan det vurderes å inkludere prøver fra personer som tar disse legemidlene, slik at man får direkte oversikt over *in vivo*-situasjonen. Det ville vært ønskelig å inkludere *in vivo*-prøver fra pasienter som tar DOAK-legemidler også i denne rapporten, men det ble ikke gjort fordi prøvene ikke var tilgjengelige for analysering innen fristen for oppgaveinnlevering.

4.2 Konklusjon

Pasienter som behandles med de FXa-hemmende legemidlene rivaroksaban, apiksaban og edoksaban trenger ikke å gå til regelmessige terapikontroller, men ved akutt økt blødningsrisiko er det ønskelig å kunne utrede blødningsfare. De mest brukte koagulasjonsanalysene, som APTT og PT-INR, egner seg ikke til bestemmelse av blødningsfare hos disse pasientene [25]. Anti-FXa-aktivitetsanalyse kan imidlertid benyttes for å undersøke koagulasjonsevne hos pasienter som tar DOAK-legemidler [33]. Ved St. Olavs hospital benyttes en metode for å bestemme anti-FXa-aktivitet hos pasienter som behandles med heparin.

Hensikten med dette prosjektet var å utrede om denne heparinkalibrerte metoden for anti-FXa-aktivitet også kan benyttes for pasienter som mottar behandling med rivaroksaban, apiksaban og edoksaban. Resultatene viste at denne metoden kan benyttes med høy grad av pålitelighet for å bestemme akutt blødningsfare hos disse pasientene. Det bør imidlertid forbehold ved bruk av denne metoden med hensyn til nøyaktig bestemmelse av legemiddelkonsentrasjon.

Referanser

1. Gale, A.J., *Continuing education course #2: current understanding of hemostasis*. Toxicol Pathol, 2011. **39**(1): p. 273-80.
2. Hoffman, R., *Hematology: Basic Principles and Practice*. 7 ed. 2017, Philadelphia, PA: Elsevier. 2374.
3. Palta, S., R. Saroa, and A. Palta, *Overview of the coagulation system*. Indian J Anaesth, 2014. **58**(5): p. 515-23.
4. Venkateswarlu, D., et al., *Structure and Dynamics of Zymogen Human Blood Coagulation Factor X*. Biophysical Journal, 2002. **82**(3): p. 1190-1206.
5. Chatterjee, T., et al., *Inherited Factor X (Stuart-Prower Factor) deficiency and its management*. Med J Armed Forces India, 2015. **71**(Suppl 1): p. S184-6.
6. Brown, M.A., Stenberg, Leisa M., Stenflo, Johan, Rawlings, Neil D., Salvesen, Guy, *Chapter 642 - Coagulation Factor Xa*, in *Handbook of Proteolytic Enzymes (Third Edition)*. 2013, Academic Press. p. 2908-2915.
7. Imberti, D., C. Dall'Asta, and M.G. Pierfranceschi, *Oral factor Xa inhibitors for thromboprophylaxis in major orthopedic surgery: a review*. Intern Emerg Med, 2009. **4**(6): p. 471-7.
8. Bookstaver, D.A., et al., *Comparison of Anti-Xa Activity in Patients Receiving Apixaban or Rivaroxaban*. Ann Pharmacother, 2018. **52**(3): p. 251-256.
9. Stevenson, M., et al., *Rivaroxaban for the prevention of venous thromboembolism: a single technology appraisal*. Health Technol Assess, 2009. **13 Suppl 3**: p. 43-8.
10. Bauer, K.A., *Pros and cons of new oral anticoagulants*. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2013. **2013**: p. 464-70.
11. Granger, C.B., et al., *Apixaban versus warfarin in patients with atrial fibrillation*. N Engl J Med, 2011. **365**(11): p. 981-92.
12. Yeh, C.H., K. Hogg, and J.I. Weitz, *Overview of the new oral anticoagulants: opportunities and challenges*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2015. **35**(5): p. 1056-65.
13. Levy, J.H., *Discontinuation and Management of Direct-Acting Anticoagulants for Emergency Procedures*. Am J Med, 2016. **129**(11s): p. S47-s53.
14. Piccini, J.P., et al., *Rivaroxaban, an oral direct factor Xa inhibitor*. Expert Opin Investig Drugs, 2008. **17**(6): p. 925-37.

15. Cabral, K.P., *Pharmacology of the new target-specific oral anticoagulants*. J Thromb Thrombolysis, 2013. **36**(2): p. 133-40.
16. Jin, L., et al., *The anticoagulant activation of antithrombin by heparin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(26): p. 14683-8.
17. Parasrampur, D.A. and K.E. Truitt, *Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Edoxaban, a Non-Vitamin K Antagonist Oral Anticoagulant that Inhibits Clotting Factor Xa*. Clin Pharmacokinet, 2016. **55**(6): p. 641-55.
18. Ogata, K., et al., *Clinical safety, tolerability, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of the novel factor Xa inhibitor edoxaban in healthy volunteers*. J Clin Pharmacol, 2010. **50**(7): p. 743-53.
19. Turpie, A.G., *New oral anticoagulants in atrial fibrillation*. Eur Heart J, 2008. **29**(2): p. 155-65.
20. *Andexanet alfa*. [Online web page] 2016 4.3.2019; Available from: <https://www.sps.nhs.uk/medicines/andexanet-alfa/>.
21. Legemiddelverk, S., *Andexanet alfa til reversering av faktor Xa-hemmer-induserte blødninger*, in *Metodevarsel LM nr 007 2017*. 2017, Folkehelseinstituttet: MedNytt.
22. Yip, S.W. and Y.C. Chan, *Antidotes for patients taking novel oral anti-coagulants*. World J Emerg Med, 2015. **6**(4): p. 311-2.
23. Douxfils, J., et al., *Laboratory testing in patients treated with direct oral anticoagulants: a practical guide for clinicians*. J Thromb Haemost, 2018. **16**(2): p. 209-219.
24. Hospital, A.f.k.f.v.S.O. *Serumkonsentrasjonsmåling av direktevirkende perorale antikoagulantia (DOAK)*. 2017 26.03.19 [cited 2019 27.03.19]; Available from: <https://stolav.no/fag-og-forskning/lab/serumkonsentrasjonsmaaling-av-direktevirkende-perorale-antikoagulantia-doak>.
25. Frost, C., et al., *Apixaban, an oral, direct factor Xa inhibitor: single dose safety, pharmacokinetics, pharmacodynamics and food effect in healthy subjects*. British Journal of Clinical Pharmacology, 2013. **75**(2): p. 476-487.
26. Tripodi, A., *Interference of new oral anticoagulants with frequently used coagulation tests*, in *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*. 2012. p. 1501.
27. Douxfils, J., et al., *Assessment of the impact of rivaroxaban on coagulation assays: Laboratory recommendations for the monitoring of rivaroxaban and review of the literature*. Thrombosis Research, 2012. **130**(6): p. 956-966.

28. Douxfils, J., et al., *Impact of apixaban on routine and specific coagulation assays: a practical laboratory guide*. Thromb Haemost, 2013. **110**(08): p. 283-294.
29. Douxfils, J., et al., *Non-VKA Oral Anticoagulants: Accurate Measurement of Plasma Drug Concentrations*. Biomed Res Int, 2015. **2015**: p. 345138.
30. Testa, S., et al., *Poor comparability of coagulation screening test with specific measurement in patients receiving direct oral anticoagulants: results from a multicenter/multiplatform study*. Journal of Thrombosis and Haemostasis, 2016. **14**(11): p. 2194-2201.
31. Mani, H., *Interpretation of coagulation test results under direct oral anticoagulants*. International Journal of Laboratory Hematology, 2014. **36**(3): p. 261-268.
32. Mani, H., et al., *Ex vivo effects of low-dose rivaroxaban on specific coagulation assays and coagulation factor activities in patients under real life conditions*. Thromb Haemost, 2013. **109**(1): p. 127-36.
33. Favaloro, E.J. and G. Lippi, *Laboratory Testing in the Era of Direct or Non-Vitamin K Antagonist Oral Anticoagulants: A Practical Guide to Measuring Their Activity and Avoiding Diagnostic Errors*. Semin Thromb Hemost, 2015. **41**(02): p. 208-227.
34. *Analysér medisinsk biokjemi og immunologi, St. Olavs Hospital, Trondheim*. Available from:
http://data.stolav.no/labhandboker/Medisinsk_biokjemi/ask/TestFinder.html.
35. Schwarb, H. and D.A. Tsakiris, *New Direct Oral Anticoagulants (DOAC) and Their Use Today*. Dent J (Basel), 2016. **4**(1).
36. Heier, S., *DOAK-interferens på koagulasjonsanalyser*, BFI, Editor. 2017. p. 41.
37. Gosselin, R., R.P. Grant, and D.M. Adcock, *Comparison of the effect of the anti-Xa direct oral anticoagulants apixaban, edoxaban, and rivaroxaban on coagulation assays*. International Journal of Laboratory Hematology, 2016. **38**(5): p. 505-513.
38. Ikeda, K. and H. Tachibana, *Clinical implication of monitoring rivaroxaban and apixaban by using anti-factor Xa assay in patients with non-valvular atrial fibrillation*. J Arrhythm, 2016. **32**(1): p. 42-50.
39. Gouin-Thibault, I., et al., *Assessment of apixaban plasma levels by laboratory tests: suitability of three anti-Xa assays*. Thromb Haemost, 2014. **112**(02): p. 240-248.

Vedlegg

6.1 Vedlegg 1: Oppgaveskrivet fra AMB

Sammenhengen mellom anti-Xa-aktiviteten i plasma og konsentrasjonen av legemidler som hemmer faktor Xa

Aktivert faktor X (Xa), sammen med faktor Va, katalyserer omdanning av protrombin til trombin, som i sin tur katalyserer omdanning av fibrinogen til fibrin. I senere år har vi fått 3 antikoagulerende legemidler som virker ved direkte hemming av faktor Xa: Rivaroksaban, apiksaban og edoksaban. Disse legemidlene brukes av pasienter med venetromber for å hindre lungeemboli, og av pasienter med atrieflimmer for å hindre hjerneslag. Sammenliknet med warfarin (Marevan) har Xa-hemmerne den fordel at behandlingen ikke trenger monitorering med laboratorieprøver. Imidlertid er dagsdosene av Xa-hemmere langt dyrere enn warfarin, og «motgiften» er ekstremt dyr. Stundom kommer brukere av Xa-hemmere i den situasjonen at de må opereres eller må ha annen behandling som medfører økt blødningsrisiko. I slike akutte situasjoner kan behandlende lege trenge en laboratorieprøve for vurdering av blødningsrisiko, enten en konsentrasjonsmåling eller en måling av anti-Xa-aktivitet. Det meste vi har av dokumentasjon om blødningsrisiko ved behandling av Xa-hemmere er basert på konsentrasjonen av legemidlene [1], men i motsetning til måling av anti-Xa-aktivitet er konsentrasjonsmålinger ikke en øyeblikkelig-hjelp-analyse. Derfor er det av stor interesse å etablere sammenhengen mellom anti-Xa-aktivitet målt med sykehusets rutinemetode og konsentrasjonen av Xa-hemmerne. Denne sammenhengen er ulik for ulike anti-Xa-metoder.

Opgaven består i å undersøke anti-Xa-aktivitet i ulike fortyninger av Xa-hemmere i citratplasma fra minst 4 ulike givere. Stampløsning av legemiddel i citratplasma tillages i farmakologisk avdeling. Resultatene bør framstilles som en responskurve for hvert legemiddel (anti-Xa-aktivitet langs y-aksen og konsentrasjon langs x-aksen) med angivelse av usikkerheten i sammenhengen.

Veiledere: Kari Bratberg (biongeniør-faglig) og Arne Åsberg (medisinsk-faglig).

Referanser

1. Douxfils J, Ageno W, Samama CM, Lessire S, Ten Cate H, Verhamme P, Dogné JM, Mullier F. Laboratory testing in patients treated with direct oral anticoagulants: a practical guide for clinicians. *J Thromb Haemost* 2018;16:209-219.

Studenter:

Ellisiv Nyhamar ellisivn@ntnu.no

Sandra Aspaas Müller sandramu@ntnu.no

Veileder NTNU:

Kristin Gabestad Nørsett kristin.norsett@ntnu.no

Veiledere St. Olav:

Kari Bratberg kari.bratberg@stolav.no (bioingeniør-faglig)

Arne Åsberg arne.aasberg@stolav.no (medisinsk-faglig)

Marthe Wedø Aune marthe.wedo.aune@stolav.no (Seksjonsleder, seksjon Hematologi)

Kontaktperson AKF for tillaging av stamløsninger:

Astrid Dahn astrid.dahn@stolav.no

Beskrivelse

- Det tas blodprøver av 4 personer. Bruk gjerne studenter. Prøvene er anonyme.
Prøvene skal tas på 3,5 mL Natriumcitrat-rør (blå kork). Det må tas nok antall glass til tillaging av stamløsninger, fortynningsrekke og analysering av legemiddelfritt plasma.
Tillaging av stamløsninger AKF: minimum 17 mL plasma.
Legemiddelfritt plasma til analyse av 0-prøve: minimum 1 mL plasma.
Legemiddelfritt plasma til bruk i fortynningsrekke: minimum 5 mL plasma.
- Plasma til stamløsninger leveres AKF etter nærmere avtale. Det må leveres så raskt som mulig etter prøvetaking. AKF fryser stamløsningene etter tillaging, og studentene henter stamløsningene etter nærmere avtale. Det er viktig at de holder seg frosset hele tiden.
Stamløsningene plasseres i -80 C° fryser ved AMB inntil de skal brukes.
- Legemiddelfritt plasma plasseres i -80 C° fryser ved AMB inntil det skal brukes.
- Stamløsninger av de 3 legemidlene lages av AKF (Farmakologisk avdeling, St. Olavs hospital) på følgende måte: Fra legemiddelfritt citratplasma tilsettes en kjent mengde legemiddel:
Rivaroksaban 400 nmol/L
Apiksaban 500 nmol/L
Edoksaban 500 nmol/L.
- For hvert legemiddel lages en fortynningsrekke ved å blande 1,000 mL stamløsning og 1,000 mL legemiddelfritt citratplasma, hvoretter 1,000 mL fortynnet løsning blandes med 1,000 mL legemiddelfritt citratplasma, og så videre. Etter 4 fortynninger har man fått en rekke der laveste konsentrasjon er $0,5^4 = 0,0625$ av stamløsningen.
Nøyaktig konsentrasjon noteres. Alle løsninger, inkludert stamløsningen, analyseres 3 ganger med anti-Xa-metoden. Til sammen blir det $3 \times 3 \times 5 = 45$ resultater, siden det er 3 legemidler.
I tillegg kommer 3 resultater fra analyse av det legemiddelfrie plasma.

Fortynningsrekke:

Rivaroksaban		
Ufortynnet		400 nmol/L
1:2	0,5	200 nmol/L
1:4	0,25	100 nmol/L
1:8	0,125	50 nmol/L
1:16	0,0625	25 nmol/L

Apiksaban		
Ufortynnet		500 nmol/L
1:2	0,5	250 nmol/L
1:4	0,25	125 nmol/L
1:8	0,125	62,5 nmol/L
1:16	0,0625	31,25 nmol/L

Edoksaban		
Ufortynnet		500 nmol/L
1:2	0,5	250 nmol/L
1:4	0,25	125 nmol/L
1:8	0,125	62,5 nmol/L
1:16	0,0625	31,25 nmol/L

$$C_1 V_1 = C_2 V_2$$

$$V_1 = \frac{C_2 V_2}{C_1}$$

$$C_1 = 50 \mu\text{M}$$

$$V_2 = 5 \text{ mL}$$

$$C_2 = \frac{500 \text{ nM}}{1000}$$

$$V_1 = \frac{0,5 \cdot 5}{50} = 0,05 \text{ mL} = 0,5 \mu\text{M}$$

Statistisk bearbeidelse

- Sammenhengen mellom konsentrasjon og aktivitet skal vurderes grafisk og med høvelige regresjonsmodeller. Upresisjon kvantiteres med variansanalyse.

Litteratur

Bookstaver DA, Sparks K, Pybus BS, Davis DK, Marcsisin SR, Sousa JC. Comparison of Anti-Xa Activity in Patients Receiving Apixaban or Rivaroxaban. Ann Pharmacother 2018;52:251-256.

6.2 Vedlegg 2: Reagensvedlegg HemosIL Liquid anti-Xa

HemosIL®

Liquid Anti-Xa - 0020302601

Intended use

Automated chromogenic assay for the quantitative determination of unfractionated heparin (UFH) and low molecular weight heparin (LMWH) activity in human citrated plasma on IL Coagulation Systems, (ACL TOP[®] Family, ACL ELITE[®]/ELITE PRO/8/9/10000 and ACL Futura/ACL Advance) when used in conjunction with HemosIL Heparin Calibrators.

This assay is also intended for the measurement of direct FXa inhibitor concentrations (e.g. Rivaroxaban, Apixaban) in human citrated plasma on ACL TOP Family systems when used in conjunction with HemosIL Rivaroxaban Calibrators (for Rivaroxaban testing) and HemosIL Apixaban Calibrators (for Apixaban testing).

Summary and principle

Heparin is the most frequently used antithrombotic drug. The biological activity of this sulphated glycosaminoglycan resides in its ability to accelerate (up to 2000-fold) the inhibitory effect of antithrombin on coagulation proteases. In recent years, it has been shown that LMWH, besides being as useful therapeutically as UFH, also has a longer half-life. Rivaroxaban and Apixaban are oral anticoagulants that directly inhibit Factor Xa. Due to their direct mechanism of action, rapid onset and predictable effect, routine monitoring of Rivaroxaban and Apixaban is not required.¹ The Liquid Anti-Xa kit is a one stage chromogenic assay based on a synthetic chromogenic substrate and on Factor Xa inactivation. Heparin levels in patient plasma are measured automatically on IL coagulation systems when this assay is calibrated with HemosIL Heparin Calibrators. Rivaroxaban levels in patient plasma are measured automatically on ACL TOP Family Systems when this assay is calibrated with the HemosIL Rivaroxaban Calibrators. Apixaban levels in patient plasma are measured automatically on ACL TOP Family Systems when this assay is calibrated with the HemosIL Apixaban Calibrators.

Heparin is analyzed as a complex with antithrombin present in the sample. The concentration of this complex is dependent on the availability of the patient's endogenous antithrombin. When the Heparin – antithrombin complex is formed, two competing reactions take place. Rivaroxaban and Apixaban directly inhibits Factor Xa activity independent of the antithrombin present.

1. Factor Xa is neutralized by heparin-antithrombin complex or directly by Rivaroxaban and Apixaban.
2. Residual Factor Xa is quantified with a synthetic chromogenic substrate. The paranitroaniline released is monitored kinetically at 405 nm and is inversely proportional to the heparin² or Rivaroxaban or Apixaban level in the sample.

In order to reduce the influence from heparin antagonists, such as platelet factor 4 (PF4), dextran sulfate is included in the reaction mixture.

Composition

The Anti-Xa kit consists of:

- E** Factor Xa reagent (Cat. No. 0020302610): 5 x 2.5 mL vial of a liquid preparation containing purified bovine Factor Xa (approximately 5.5 nkat/mL), Tris-Buffer, EDTA, dextran sulfate, sodium chloride and bovine serum albumin.
- S** Chromogenic substrate (Cat. No. 0020302620): 5 x 3 mL vial of liquid chromogenic substrate S-2732 (approximately 1.2 mg/mL) and bulking agent.

PRECAUTIONS AND WARNINGS:

The FXa Reagent contains bovine material. All donor animals were sourced from BSE-free herds. The cattle received ante- and post mortem health inspection by a veterinarian, and they were apparently free from infectious and contagious material. However, the material should be treated as potentially infectious.

Factor Xa reagent



Danger

Hazard class: Resp. Sens. 1, H334

Hazard statements: H334: May cause allergy or asthma symptoms or breathing difficulties if inhaled.

Precautionary statements: P261: Avoid breathing vapors/ spray. P284: [In case of inadequate ventilation] wear respiratory protection. P304 + P340: IF INHALED: Remove person to fresh air and keep comfortable for breathing. P342 + P311: If experiencing respiratory symptoms: Call a POISON CENTER/doctor. P501: Dispose of contents/container in accordance with local/regional/national/international regulation.

Supplemental hazard information: Contains Factor Xa. Up to 2.8% of the mixture consists of component of unknown acute toxicity (oral, dermal, inhalation) for the human health and for the aquatic environment.

Chromogenic substrate

Hazard class: none

Hazard statements: none

Precautionary statements: none

Supplemental hazard information: none

This product is For *in vitro* Diagnostic Use.

Preparation

Chromogenic substrate: Invert to mix before use.

Factor Xa reagent: Invert to mix before use.

Reagent storage and stability

Unopened reagents are stable until the expiration date shown on the vial when stored at 2-8°C.



Chromogenic substrate – Opened reagent is stable: 1 month at 2-8°C or 7 days at 15° -25°C on-board the ACL TOP Family, 3 days on-board the ACL ELITE/ELITE PRO/8/9/10000 and 4 days on-board the ACL Futura/ACL Advance Systems in the original vial.

Factor Xa reagent - Opened reagent is stable: 1 month at 2-8°C or 7 days at 15° -25°C on-board the ACL TOP Family, 3 days on-board the ACL ELITE/ELITE PRO/8/9/10000 and 4 days on-board the ACL Futura/ACL Advance Systems in the original vial.



For optimal stability remove reagents from the system and store them at 2-8°C in the original vial. Low relative humidity is associated with increased evaporation of uncapped reagents, which may decrease onboard stability. For optimum on-board stability, laboratory temperature and humidity should be controlled.

Instrument/test procedures

Refer to the appropriate IL instrument's Operator's Manual or contact your local representative for the complete assay procedure instructions.

Specimen collection and preparation

Nine parts of freshly drawn venous blood are collected into one part 3.2% Trisodium citrate. Refer to CLSI Document H21-A5 for further instructions on specimen collection, handling and storage.³

Additional reagent and control plasmas

The following are not supplied with the kit and must be purchased separately.

	Product Cat No.		Product Cat No.
Heparin Calibrators	0020300600	Apixaban Calibrators	0020014200
LMW Heparin Controls	0020300200	Apixaban Controls	0020014300
UF Heparin Controls	0020300300	Cleaning solution	0009831700
Rivaroxaban Calibrators	0020013600	Cleaning agent	0009832700
Rivaroxaban Controls	0020013700		

Quality control

Two levels of controls are recommended for a complete quality control program.⁴ LMW, and UF Heparin controls are designed for use with this assay when calibrated with the Heparin Calibrators. Rivaroxaban Controls are designed for use with this assay when calibrated with Rivaroxaban Calibrators. Apixaban Controls are designed for use with this assay when calibrated with Apixaban Calibrators.

Each laboratory should establish its own mean and standard deviation and should establish a quality control program to monitor laboratory testing. Controls should be analyzed at least once every 8 hour shift in accordance with good laboratory practice. Refer to the instrument's Operator's Manual for additional information. Refer to Westgard *et al* for identification and resolution for out-of-control situations.⁵

Results

Heparin results are reported in IU/mL when calibrated with HemosIL Heparin Calibrators. Rivaroxaban results are reported in ng/mL when calibrated with Rivaroxaban Calibrators. Apixaban results are reported in ng/mL when calibrated with Apixaban Calibrators.

Limitations/interfering substances

Heparin results on the ACL TOP Family, ACL ELITE/ELITE PRO/8/9/10000 and ACL Futura/ACL Advance Systems are not affected by hemoglobin up to 300 mg/dL, bilirubin up to 20 mg/dL and triglycerides up to 800 mg/dL. Rivaroxaban results on the ACL TOP Family are not affected by hemoglobin up to 550 mg/dL, bilirubin up to 40 mg/dL and triglycerides up to 1151 mg/dL. Apixaban results on the ACL TOP Family are not affected by hemoglobin up to 300 mg/dL, bilirubin up to 25 mg/dL and triglycerides up to 1156 mg/dL.

Expected values

To obtain an optimal effect with minimum risk of bleeding or thromboembolic complications the heparin activity should be in the range recommended by the heparin manufacturer.⁶ Routine monitoring of Rivaroxaban and Apixaban is not required.

Performance characteristics

Heparin Precision

For Heparin, within run and total (run - to - run and day - to - day) precision was assessed over multiple runs using the two levels of both UFH and LMWH Controls.

ACL TOP Family	Mean (IU/mL)	CV% (Within run)	CV% (Total)
UFH Low	0.41	2.4	3.3
UFH High	0.68	1.0	1.6
LMWH Low	0.55	3.5	4.5
LMWH High	1.35	1.9	2.5
ACL ELITE/ELITE PRO/8/9/10000	Mean (IU/mL)	CV% (Within run)	CV% (Total)
UFH Low	0.39	4.0	6.7
UFH High	0.69	1.0	3.7
LMWH Low	0.49	5.5	5.7
LMWH High	1.31	3.3	4.0



ENGLISH - Insert revision 03/2016



ACL Futura/ACL Advance	Mean (IU/mL)	CV% (Within run)	CV% (Total)
UFH Low	0.41	4.4	4.4
UFH High	0.69	1.3	1.7
LMWH Low	0.56	2.5	3.5
LMWH High	1.37	1.1	1.6

Rivaroxaban / Apixaban Precision

For Rivaroxaban and Apixaban, precision was assessed on representative members of the ACL TOP Family (ACL TOP 700, ACL TOP 500 CTS, and ACL TOP 300 CTS). Precision was evaluated in accordance with CLSI EP05-A3⁷, for 20 days, with 2 runs per day and 2 replicates per run for each sample level (n=80/instrument/lot), using 3 lots of Liquid Anti-Xa and Rivaroxaban Calibrators with plasma samples containing varying concentrations of Rivaroxaban were used for the Rivaroxaban precision studies. 3 lots of Liquid Anti-Xa and Apixaban Calibrators with plasma samples containing varying concentrations of Apixaban were used for the Apixaban precision studies. Test data from a representative instrument, reagent and plasma lot is included below.

ACL TOP Family	Mean (ng/mL)	CV% (Within run)	CV% (Total)
Rivaroxaban Low Control	79.2	1.9	4.4
Rivaroxaban High Control	298.6	0.8	2.2
Apixaban Low Control	79.6	2.3	4.0
Apixaban High Control	322.3	1.4	1.9

Correlation:

System	Analyte	Slope	Intercept	r	Reference method
ACL ELITE/ELITE PRO/8/9/10000	Heparin	0.894	0.057	0.907	HemosIL Heparin
ACL Futura/ACL Advance	Heparin	1.067	0.006	0.946	HemosIL Heparin
ACL TOP Family	Heparin	0.946	0.055	0.958	HemosIL Heparin
ACL TOP Family	Rivaroxaban	0.927	-23.05	0.988	BIOPHEN DiXal (Direct Xa Inhibitors)
ACL TOP Family	Apixaban	1.014	-0.61	0.996	BIOPHEN DiXal (Direct Xa Inhibitors)

The precision and correlation results were obtained using specific lots of reagent and controls.

In field site studies using samples from patients undergoing heparin therapy, the following data were obtained using a specific lot of Liquid Anti-Xa reagents:

System	Analyte	Slope	Intercept	r	Reference method
ACL ELITE/ELITE PRO/8/9/10000	Heparin	1.032	0.039	0.949	HemosIL Heparin
ACL Futura/ACL Advance	Heparin	1.007	-0.002	0.957	HemosIL Heparin
ACL TOP Family	Heparin	0.952	0.095	0.978	HemosIL Heparin

A field site study using samples from patients treated with Rivaroxaban and Apixaban were completed on a representative member of the ACL TOP Family using the HemosIL Liquid Anti-Xa kit and the Biophen DiXal kit. Summary of the method comparison is shown below.

System	Analyte	Slope	Intercept	r	Reference method
ACL TOP Family	Rivaroxaban	0.99	-27.63	0.97	BIOPHEN DiXal (Direct Xa Inhibitors)
ACL TOP Family	Apixaban	1.06	-2.53	0.997	BIOPHEN DiXal (Direct Xa Inhibitors)

Detection limit:

System	Analyte	Detection limit
ACL ELITE/ELITE PRO/8/9/10000	Heparin	0.04 IU/mL
ACL Futura/ACL Advance	Heparin	0.02 IU/mL
ACL TOP Family	Heparin	0.04 IU/mL
ACL TOP Family	Rivaroxaban	10 ng/mL
ACL TOP Family	Apixaban	6 ng/mL

Linearity:

System	Analyte	Linearity range
ACL ELITE/ELITE PRO/8/9/10000	Heparin	Up to - 2.0 IU/mL
ACL Futura/ACL Advance	Heparin	Up to - 2.0 IU/mL
ACL TOP Family	Heparin	Up to - 2.0 IU/mL
ACL TOP Family	Rivaroxaban	20 ng/mL – 1000 ng/mL
ACL TOP Family	Apixaban	15 ng/mL – 1000 ng/mL

6.3 Vedlegg 3: Internt notat, «Sammenhengen mellom anti-Xa-aktivitet og konsentrasjon av Xa-hemmere», St. Olavs hospital, AMB

Internt notat

Seksjonene medisin og generell biokjemi
Avdeling for medisinsk biokjemi
St. Olavs hospital

Skrevet av: Arne Åsberg
Dato: 8. oktober 2018

Sammenhengen mellom anti-Xa-aktivitet og konsentrasjon av Xa-hemmere

Bakgrunn

Vurdere om anti-Xa-aktivitetsmålinger kan brukes i en akutsituasjon til å vurdere blødningsrisiko hos pasienter som bruker Xa-hemmer.

Metoder

Stamløsninger av rivaroksaban, apiksaban og edoksaban ble tillaget ved Farmakologisk avdeling, St. Olavs hospital, 19. april 2018, basert på legemiddelfritt citratplasma fra én giver. Konsentrasjonene i stamløsningene var henholdsvis 2200,0 nmol/L, 2000,0 nmol/L og 1820,0 nmol/L. Stamløsningene ble oppbevart ved -20°C til de ble brukt 2. oktober 2018. For hvert legemiddel ble det den dagen laget en fortynningsrekke i citratplasma fra samme giver, med fortynningsfaktor 0,5, 0,25, 0,125, 0,0625, 0,03125 og 0,015625. I alle prøver ble anti-Xa-aktivitet målt 4 ganger med vår rutinemetode, Liquid Anti-Xa HemosIL® med ACL Top 750 LAS.

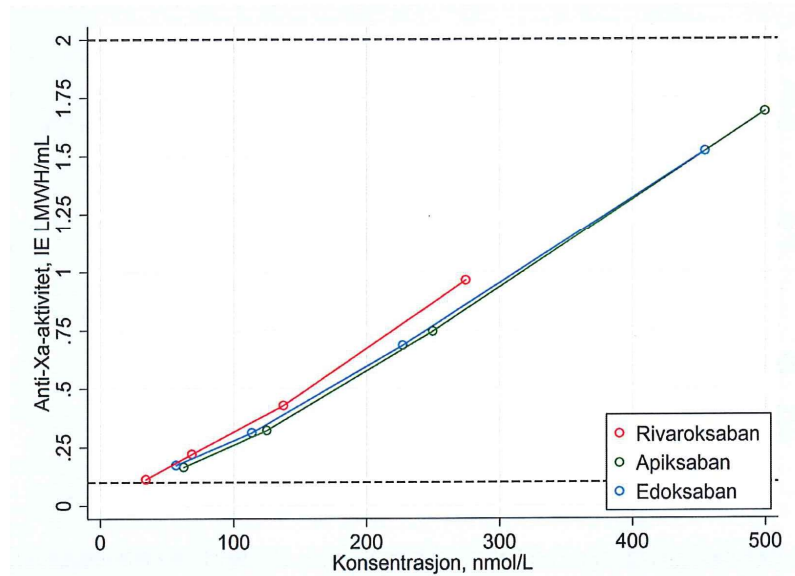
Resultater

Alle måleresultater framgår av tabell 1 i tillegget.

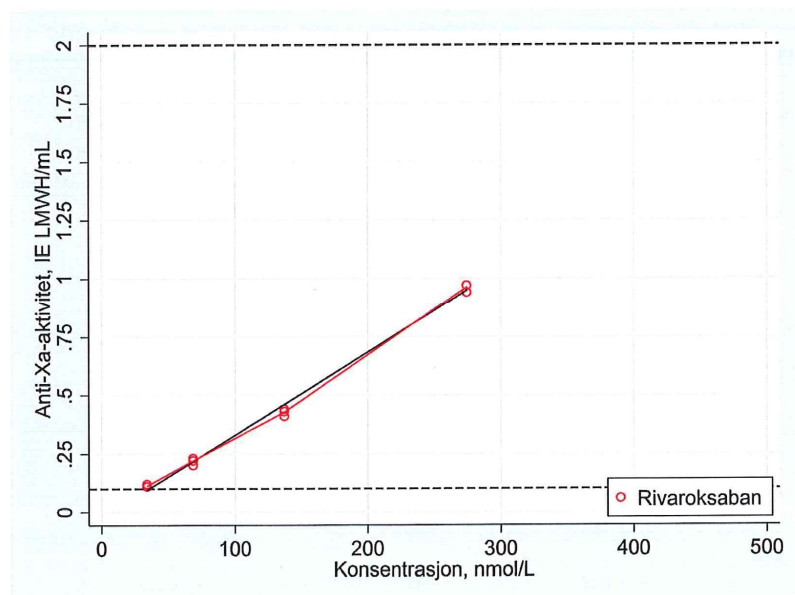
Presisjon (repeterbarhet, n=4)

Legemiddel	Konsentrasjon (nmol/L)	CV (%)
Laveste konsentrasjon		
Rivaroksaban	34	4,4
Apiksaban	63	3,5
Edoksaban	57	7,3
Høyeste konsentrasjon		
Rivaroksaban	275	1,6
Apiksaban	500	4,1
Edoksaban	455	4,1

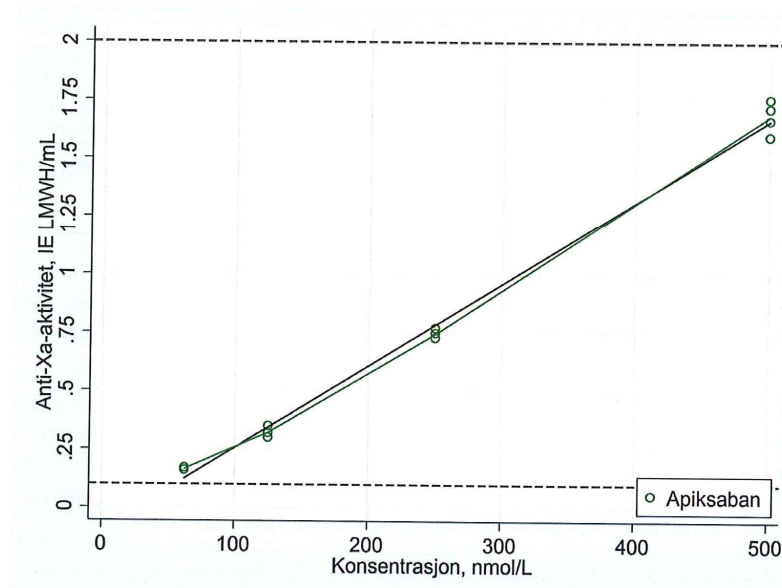
Sammenhengen mellom anti-Xa-aktivitet og konsentrasjon framgår av figur 1-4. I hver figur er måleområdet, 0,1-2 IE lavmolekylært heparin (LMWH)/mL, angitt med stiplede linjer.



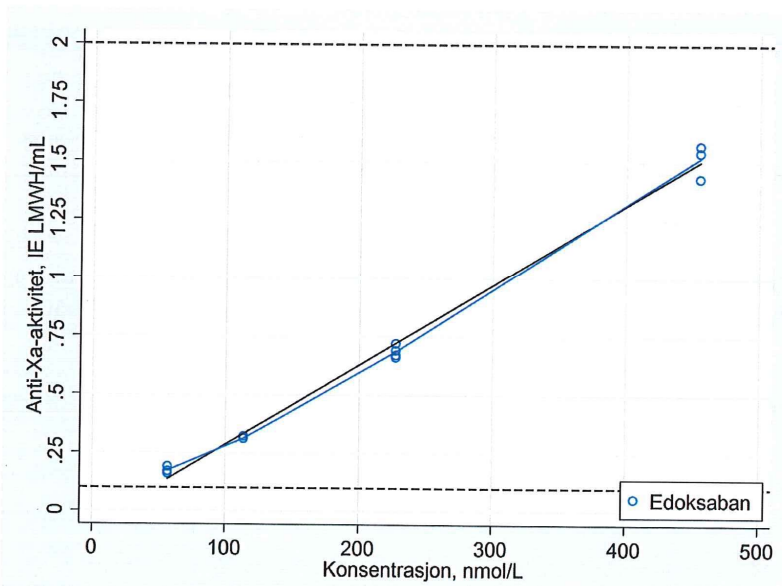
Figur 1 Sammenhengen mellom anti-Xa-aktivitet og konsentrasjon for rivaroksaban, apiksaban og edoksaban. Punktene viser gjennomsnittaktivitet av 4 repeterte målinger, forbundet med rette linjer



Figur 2 Sammenhengen mellom anti-Xa-aktivitet og konsentrasjon for rivaroksaban. Hvert måleresultat er angitt med rødt symbol. Den røde linjen er en lowess-linje, mens den svarte linjen er en rettlinjert regresjonslinje. Begge er basert på gjennomsnittet av 4 repeterte målinger for hver konsentrasjon



Figur 3 Sammenhengen mellom anti-Xa-aktivitet og konsentrasjon for apixaban. Hvert måleresultat er angitt med grønt symbol. Den grønne linjen er en lowess-linje, mens den svarte linjen er en rettlinjert regresjonslinje. Begge er basert på gjennomsnittet av 4 repeterte målinger for hver konsentrasjon



Figur 4 Sammenhengen mellom anti-Xa-aktivitet og konsentrasjon for edoksaban. Hvert måleresultat er angitt med blått symbol. Den blå linjen er en lowess-linje, mens den svarte linjen er en rettlinjert regresjonslinje. Begge er basert på gjennomsnittet av 4 repeterte målinger for hver konsentrasjon

Vurdering

Analytisk presisjon, estimert på grunnlag av 4 repeterte målinger, er tilfredsstillende. Figur 1 tyder på at responskurvene for de tre legemidlene er temmelig like. Kurvene er ikke helt rettlinjete, de flater litt ut ved lave konsentrasjoner. Figur 2 viser at vi ikke var helt heldige med fortynningsrekken for rivaroksaban, siden anti-Xa-aktiviteten var over øvre grense for måleområdet ved konsentrasjon omkring 500 nmol/L.

Vår rutinemetode viser betydelig mindre anti-Xa-aktivitet svarende til en viss legemiddelkonsentrasjon enn STA-Liquid Anti-Xa-reagenset fra Stago [1], der en anti-Xa-aktivitet på 1,0 IE LMWH/mL sees ved henholdsvis 109 nmol/L rivaroksaban og 115 nmol/L apiksaban. Den aktiviteten sees ikke før legemiddelkonsentrasjonen kommer opp i omtrent 300 nmol/L med vår metode.

En grov vurdering av måleområdet for ufortynnede prøver synes å være 50-500 nmol/L med vår metode. Om dette er tilstrekkelig for avklaring av blødningsrisiko i en akutt klinisk situasjon, må diskuteres med Farmakologisk avdeling. I første rekke må vi få en vurdering av hvilken legemiddelkonsentrasjon (en grenseverdi) som gir tilstrekkelig lav risiko for blødning i definerte kliniske situasjoner.

En svakhet ved undersøkelsen er at holdbarheten av legemidlene i citrat-plasma ved -20°C ikke er sikkert kjent. Dette blir nærmere undersøkt ved Farmakologisk avdeling. En annen svakhet er at vi bare har undersøkt prøver basert på legemiddeltilsetning i citratplasma, og brukt plasma fra bare én giver. Imidlertid er kommersielle kalibratorene også basert på tilsetning av rent legemiddel til citratplasma, så metabolitter spiller antakelig liten eller ingen rolle. Matriks-problemer virker heller ikke sannsynlige.

Konklusjon

Resultatene må diskuteres med Farmakologisk avdeling, før vi kan anbefale rekvirenter å bruke denne anti-Xa-aktivitet-metoden til vurdering av blødningsrisiko.

Litteratur

1. Bookstaver DA, Sparks K, Pybus BS, Davis DK, Marcsisin SR, Sousa JC. Comparison of Anti-Xa Activity in Patients Receiving Apixaban or Rivaroxaban. *Ann Pharmacother* 2018;52:251-256.

Tillegg

Tabell 1 Anti-Xa-aktivitet målt i fortynningsrekker av legemiddelfritt citratplasma tilsatt rivaroksaban, apiksaban eller edoksaban. En prøve fra hver fortynning er målt 4 ganger

Konsentrasjon (nmol/L)	Anti-Xa-aktivitet (IE LMWH/mL)			
	Replikat 1	Replikat 2	Replikat 3	Replikat 4
Rivaroksaban				
2200	>2	>2	>2	>2
1100	>2	>2	>2	>2
550	>2	>2	>2	>2
275	0,97	0,94	0,97	0,97
138	0,43	0,41	0,44	0,43
69	0,20	0,23	0,23	0,22
34	0,12	0,11	0,11	0,11
Apiksaban				
2000	>2	>2	>2	>2
1000	>2	>2	>2	>2
500	1,76	1,67	1,72	1,60
250	0,75	0,73	0,73	0,77
125	0,35	0,32	0,30	0,32
63	0,16	0,17	0,17	0,16
31	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Edoksaban				
1820	>2	>2	>2	>2
910	>2	>2	>2	>2
455	1,54	1,54	1,43	1,57
228	0,66	0,69	0,67	0,72
114	0,32	0,31	0,31	0,31
57	0,16	0,19	0,17	0,17
28	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1

Fortynningsrekke Rivaroksaban Måling av Antifaktor Xa

	Replikat 1	Replikat 2	Replikat 3	Replikat 4
Ufortynnet stamløsning	>2,0	>2,0	>2,0	>2,0
1:2	0,5	>2,0	>2,0	>2,0
1:4	0,25	>2,0	>2,0	>2,0
1:8	0,125	0,97	0,94	0,97
1:16	0,0625	0,43	0,41	0,44
1:32	0,03125	0,20	0,23	0,23
1:64	0,015625	0,12	0,11	0,11

Fortynningsrekke Apiksaban Måling av Antifaktor Xa

	Replikat 1	Replikat 2	Replikat 3	Replikat 4
Ufortynnet stamløsning	>2,0	>2,0	>2,0	>2,0
1:2	0,5	>2,0	>2,0	>2,0
1:4	0,25	1,76	1,67	1,72
1:8	0,125	0,75	0,73	0,73
1:16	0,0625	0,35	0,32	0,30
1:32	0,03125	0,16	0,17	0,17
1:64	0,015625	<0,1	<0,1	<0,1

Fortynningsrekke Edoksaban Måling av Antifaktor Xa

	Replikat 1	Replikat 2	Replikat 3	Replikat 4
Ufortynnet stamløsning	>2,0	>2,0	>2,0	>2,0
1:2	0,5	>2,0	>2,0	>2,0
1:4	0,25	1,54	1,54	1,43
1:8	0,125	0,66	0,69	0,67
1:16	0,0625	0,32	0,31	0,31
1:32	0,03125	0,16	0,19	0,17
1:64	0,015625	<0,1	<0,1	0,10

Legemiddelfritt plasma	Replikat 1	Replikat 2	Replikat 3	Replikat 4
	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1

6.4 Vedlegg 4: Prosedyre for anti-FXa-aktivitetsanalyse ved St. Olavs hospital, AMB

Dokument «Antifaktor Xa, ACL Top 750 LAS, AMB», ID 20430 - EQS

Page 1 of 6

Antifaktor Xa, ACL Top 750 LAS, AMB

Forfatter: Kari Bratberg

Gyldig fra: 22.03.2018

Revisjon: 2.5

Godkjent av: Kristine Bodal Solem

Revisjonsfrist: 21.03.2020

ID: 20430

Klinisk nytte og betydning

Lavmolekylært heparin (LMWH) erstatter i økende grad ufraksjonert heparin (UH) som antitrombotisk preparat, fordi det i de fleste situasjoner har like god effekt og er enklere å administrere både for lege og pasient. LMWH påvirker sjeldnere trombocytene og deres funksjon enn det tradisjonelt heparin gjør. Begge preparater utøver sin viktigste effekt ved at de kompleksbindes til antitrombin og derved øker hemmingen av koagulasjonsfaktorene IIa og Xa. Mens ufraksjonert heparin kan monitoreres ved hjelp av APTT, påvirker LMWH APTT ubetydelig. I de fleste tilfeller er det ikke nødvendig å monitorere behandling med LMWH. Noen unntak finnes, og i slike tilfeller kan man bruke funksjonsanalyser for måling av anti-Xa-aktivitet i plasma. Denne aktiviteten er et uttrykk for den biologiske effekten av LMWH.¹⁾

Indikasjoner

Kontroll av behandling med fraksjonert (lavmolekylært) heparin (LMWH) ved mistanke om endret biodistribusjon, f.eks. hos gravide, barn og ved høy/lav kroppsmasseindeks, samt ved nyresvikt grad 4-5D (GFR < 30 mL/min), behandlingssvikt og ved langvarig behandling.

Kontroll av behandling med ufraksjonert heparin (UFH).¹⁰⁾

Prøvetakingsrutiner

Blodprøve tas 3 - 4 timer etter s.c. injeksjon av LMWH for bestemmelse av terapeutisk konsentrasjon. Til sammen bør 3-4 injeksjoner ha vært gitt før prøve tas til vurdering for å oppnå «steady-state». Ved spørsmål om akkumulering kan det være nyttig å ta prøve rett før ny injeksjon (trough-verdi).¹⁾

Tolkning

Resultatet må tolkes i henhold til hvilken type heparin pasienten har fått. Terapeutisk nivå er avhengig av indikasjon og type heparin benyttet, jfr. bl.a. Felleskatalogen. Resultatet kan være misvisende ved vitamin K-mangel og antitrombinmangel. Høye verdier sees også ved bruk av direkte faktor Xa-hemmere (rivaroksaban og apixaban), men analysen egner seg ikke til å vurdere plasmakonsentrasjonen av disse medikamentene.¹⁰⁾

Referanseområdet

Den registrerte Anti Xa-aktiviteten må vurderes i forhold til pasientens behandling og den ønskede antikoagulasjonseffekt.¹⁾

Veiledende terapeutisk område ved LMWH:

Behandling: Ved dosering 2 ganger per døgn bør plasmanivået ligge mellom 0,5-1,0 IE/mL 3-4 timer etter subkutan injeksjon. Ved 1 dosering per døgn skal analysering foretas ca. 4 timer etter subkutan injeksjon, og nivået skal ligge noe høyere (angitt litt ulikt i litteratur: 1,0-1,5/1,6/2,0 IE/mL).

Profylakse: Noe lavere nivå enn ved behandling, 0,2-0,4 IE/mL, men ved profylaktiske

doser/lavdose LMWH er det svært sjelden indisert å måle anti-Xa-aktivitet.¹⁾

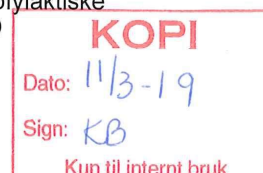
Aksjonsgrenser

Ingen aksjonsgrenser

Oppstartdato

Hematologisk laboratorium, Medisinsk avdeling / Seksjon Spesiell hematologi, AIT:

Metode	Analyseinstrument
--------	-------------------



Metode med kromogent substrat og antitrombin fra Kabivitrum / Chromogenix med standarder laget lokalt	ACL 300 januar 1991 – januar 1997
Metode med kromogent substrat og antitrombin og LMW-heparinstandard fra Chromogenix	ACL 300 januar 1997 – januar 2007
Metode med kromogent substrat og antitrombin fra Chromogenix	ACL 10.000 januar 2007 – 1. januar 2012

Seksjon Generell biokjemi, AMB:

Metode	Analyseinstrument
Metode med kromogent substrat fra Diagnostica STAGO. Hybrid metode for både UFH (ufraksjonert heparin) og LMWH (lavmolekylært heparin)	STA-R Evolution 02.01.12 – 04.10.15
Metode med kromogent substrat fra HemosIL. Hybrid metode for både UFH (ufraksjonert heparin) og LMWH (lavmolekylært heparin)	ACL Top 750 LAS f.o.m. 05.10.2015

Analyseprinsipp

Liquid Anti-Xa er en kromogen analyse basert på syntetisk kromogent substrat og Faktor Xa inaktivering. Heparinnivå i plasma måles automatisk på IL koagulasjonssystemer.

- 1.Heparin binder seg til antitrombin i plasma og nøytraliserer Faktor Xa
- 2.Kvantitering av resterende Faktor Xa ved hjelp av syntetisk kromogent substrat. Paranitroanilin frigjøres og måles kinetisk ved 405 nm og er omvendt proporsjonal med heparinkonsentrasjonen i plasma.²⁾

Analysemateriale

Citratplasma (1 del 0,1 mol/L Na-citrat + 9 deler blod)

Citratblod sentrifugeres ved 2000-2500 G i 15 min. ved ca. 18 °C. Plasma avpipetteres. La det stå igjen 1 cm plasma over blodlegemene for å unngå kontaminering av trombocytter.³⁾

Prøven leveres deretter umiddelbart til Koagulasjon, seksjon generell biokjemi, som avgjør om prøven skal analyseres eller fryses.

Holdbarhet:

Usentrifugert / ikke avpipettert prøve 4 timer³⁾

Avpipettert plasma i fryser -20 °C: 2 uker³⁾

Prøver mottatt på tørris skal stå i – 80 °C i minst 1 døgn før analysering.

Analyseinstrument

ACL Top 750 LAS

Utstyr

Standard utstyr for ACL Top 750 LAS

Reagenser

HemosIL Liquid Anti-Xa ²⁾

Chromogenic substrate 5 x 3 mL

Faktor Xa reagent 4 x 2,5 mL

Leverandørens art.nr.: 20302600

Innhold: Chromogenic substrate inneholder kromogent substrat S-2732 (ca. 1,2 mg/L) og fyllstoff. Faktor Xa reagent inneholder rensset bovint faktor Xa (ca. 5,5 nkat/mL), TRIS-buffer, EDTA, dextran sulfat, kalsiumklorid og bovint serum albumin.

Oppbevaring: 2-8 °C

Holdbarhet: Uåpnet reagens til utløpsdato.

Holdbarhet på instrumentet: 7 dager

Holdbarhet åpnet 2-8 °C: 1 måned

Produsent: Instrumentation Laboratory

Leverandør: Mediq Norge AS

Tilberedning: Reagensene er ferdig løst. Romtempereres ca. 15 minutter og blandes før bruk.

Plassering på instrumentet: Chromogenic substrate i reagensrack i posisjon R1-R3
Faktor Xa reagent i reagensrack i posisjon R4-R6

Reagenshåndtering: Når et nytt flaskesett tas i bruk noteres dato for når det er tatt i bruk på flaskene. Reagensene skal ikke stå på instrumentet, men oppbevares i kjøleskap med kork (ikke parafilm) når de ikke er i bruk.

Kalibratører

HemosIL Heparin Calibrators, 3+3 x 1 mL ⁴⁾

Leverandørens art.nr.: 20300600

Innhold: Calibrator 1 inneholder lypholisert humant plasma uten heparin, buffer og stabilisator.
Calibrator 2 inneholder lypholisert humant plasma med heparin, buffer og stabilisator.
Calibrator 3 inneholder lypholisert humant plasma med heparin, buffer og stabilisator.

Oppbevaring: Frysetørret 2 - 8 °C.

Holdbarhet: Til utløpsdato

Holdbarhet på instrumentet: 24 timer

Produsent: Instrumentation Laboratory

Leverandør: Mediq Norge AS

Tilberedning: La kalibratorene stå i romtemperatur i minimum 15 minutter før de løses i 1,0 mL rensset vann type 2.

La stå på benken i minimum 30 minutter og bland før bruk. Kan blandes på vippe. Må ikke ristes.

Plassering på instrumentet: I diluentrack i posisjon D1-D2

Sporbarhet: WHO internasjonale standarder for LMW og UF Heparin. ⁴⁾
Den 5. international WHO Standard 97/578 for UF heparin and den 2. international WHO Standard 01/608 for LMW heparin. ⁵⁾

Kalibrering

Se prosedyre  [ACL Top 750 LAS. Oppstart, bruk og vedlikehold. AMB](#)

Kontrollmateriale

HemosIL LMW Heparin Controls

5 x 1 mL ⁶⁾

Leverandørens art.nr.: 20300200

HemosIL UF Heparin Controls

5 x 1 mL ⁷⁾

Leverandørens art.nr.: 20300300

Oppbevaring: Frysetørret 2-8 °C

Holdbarhet: Til utløpsdato

Holdbarhet løst kontroll: I originalflaske 2-8 °C; 48 timer ^{6,7)}

Produsent: Instrumentation Laboratory

Leverandør: Mediq Norge AS

Tilberedning: La kontrollene stå i romtemperatur i minimum 15 min. før de løses i 1,0 mL rensset vann type 2. La stå på benken i minimum 30 minutter og bland før bruk. Kan blandes på vippe.

Plassering på instrumentet: I diluentrack i posisjon D1-D2

Tas ut av instrumentet og settes i kjøleskap etter bruk. Skriv på dato.

Analysering av kontroller: Bestilles via «QC Statistics»

Kontroller analyseres 1 gang pr. døgn dersom det er prøver.

UF Heparin Controls analyseres i duplikat.

Rapportering av kontrollresultater: Kontrollene rapporteres automatisk til QM.

Utførelse

Frosne plasmaprøver tines i vannbad, + 37 °C, i 10-15 minutter umiddelbart før analyse. ³⁾

På instrumentet:

10 µL plasma pipetteres i kuvetten med prøvenål og inkuberes i 20 – 60 sek.

100 µL Anti Chromogenic substrat pipetteres med reagensnål 1 og inkuberes i 60 – 180 sek.

75 µL Anti Factor Xa reagens pipetteres med reagensnål 2 og inkuberes i 20 – 21 sek.

Absorbansendringen måles ved 405 nm og er omvendt proporsjonal med heparinkonsentrasjonen i plasma.

⁸⁾

Måleområde

Avlesningsområde

0,04 – 2,0 IU/mL ⁸⁾

Måleområde

0,1 – 2,0 IU/mL.

Måleområdet er bestemt ved vurdering av dokumentasjon fra leverandør, metodesammenligning med STA-R, analyse av eksterne kvalitetskontroller og egne data for analytisk presisjon.

Resultater lavere enn 0,1 IU/mL gis ut som < 0,1 IU/mL

Resultater høyere enn 2,0 IU/mL gis ut som > 2,0 IU/mL

Analytisk kvalitet

Tillatt totalfeil

LMWH: 20 % for begge nivå.

UFH: Nivå 1: 30 %, Nivå 2: 25 %

Tillatt totalfeil er basert på medisinsk skjønnsmessig vurdering og de terapeutiske anbefalingene.

Kontrollregel ⁹⁾

HemosIL LMW Heparin Controls

Nivå 1 (0,61 IU/mL) 1_{4s}, (N=1) Analytisk CV: 3 %

Nivå 2 (1,50 IU/mL) 1_{5s}, (N=1) Analytisk CV: 2 %

En kontroll i 2 nivå

HemosIL UF Heparin Controls

Nivå 1 (0,40 IU/mL) 1_{3s}, (N=2) Analytisk CV: 7 %

Nivå 2 (0,67 IU/mL) 1_{3,5s}, (N=2) Analytisk CV: 4 %

2 kontroller i 2 nivå

Analytisk presisjon

Repeterbarhet

ACL Top 1

LMW Nivå 0,6 IU/mL CV: 1,54 % (N=20)

LMW Nivå 1,5 IU/mL CV: 2,03 % (N=20)

UF Nivå 0,4 IU/mL CV: 3,13 % (N=20)

UF Nivå 0,7 IU/mL CV: 2,03 % (N=20)

ACL Top 2

LMW Nivå 0,6 IU/mL CV: 1,38 % (N=20)

LMW Nivå 1,5 IU/mL CV: 2,26 % (N=20)

UF Nivå 0,4 IU/mL CV: 2,36 % (N=20)

UF Nivå 0,7 IU/mL CV: 1,39 % (N=20)

Reproduserbarhet

ACL Top 1

LMW Nivå 0,6 IU/mL CV: 3,1 % N=14

LMW Nivå 1,5 IU/mL CV: 2,8 % N=15

UF Nivå 0,3 IU/mL CV: 7,4 % N=27

UF Nivå 0,6 IU/mL CV: 3,0 % N=26

ACL Top 2

LMW Nivå 0,6 IU/mL CV: 4,0 % N=37

LMW Nivå 1,5 IU/mL CV: 2,4 % N=37

UF Nivå 0,3 IU/mL CV: 7,6 % N=66

UF Nivå 0,6 IU/mL CV: 4,3 % N=67

Reproduserbarhet baserer seg på analysering av kontrollmateriale i perioden 20.09.17 – 08.03.18

Feilkilder

- Dette påvirker ikke analysen ²⁾:
 - Hemoglobin < 300 mg/dL
 - Triglyserider < 800 mg/dL
 - Bilirubin < 20 mg/dL

Preanalytiske forhold kan påvirke analysen.

Litteratur

1. Nasjonal brukerhåndbok i medisinsk biokjemi (www.brugerhandboken.no) 05.11.15
2. Pakningsvedlegg HemosIL Anti-Xa, 11-2011

3. CLSI H21-A5 Collection, Transport and Processing of Blood Specimens for testing Plasma-Based Coagulation Assays and Molecular Hemostasis Assays; Approved Guideline - Fifth Edition, Vol. 28 No. 5
4. Pakningsvedlegg HemosIL Heparin Calibrators, 03-2013
5. Dokumentasjon fra leverandør: 510 (k) Substantial Equivalence Determination, Decision Summery. (Dokumentasjonen er ikke datert)
6. Pakningsvedlegg HemosIL LMW Heparin Controls, 05-2012
7. Pakningsvedlegg HemosIL UF Heparin Controls, 05-2012
8. Applikasjon for HemosIL Liquid Anti-Xa på ACL Top 750 LAS.
9. Kontrollregler Antifaktor Xa, etablert 13.07.15
10. Elektronisk brukerhåndbok, Avd. for medisinsk biokjemi, St. Olavs Hospital (<http://www.stolav.no/Om-oss/Avdelinger/Medisinsk-biokjemi>)

6.5 Vedlegg 5: Kalibratorvedlegg HemosIL Heparin Calibrators

Hemosil®

Heparin Calibrators - 0020300600

Intended use

For the calibration of the Hemosil Liquid Anti-Xa assay on IL Coagulation Systems, (ACL TOP® Family, ACL TOP Family 50 Series† and ACL Elite®/Elite Pro).

Summary and principle

Heparin is the most frequently used antithrombotic drug. The biological activity of this sulphated glycosaminoglycan resides in its ability to accelerate (up to 2000-fold) the inhibitory effect of antithrombin on coagulation proteases. In recent years, it has been shown that LMWH, besides being as useful therapeutically as UFH, also has a longer half-life.

Tri-level lyophilized calibrators prepared from human citrated plasma by means of a dedicated process at three different heparin concentrations: 0, 0.8 and 2.0 IU/ml, and are traceable to the WHO International Standards for LMW and UF heparin.

Composition

The Heparin calibrator kit consists of:

- 1 Calibrator 1: (Cat. No. 0020300630): 3 x 1ml vials of a lyophilized human plasma containing buffer and stabilizers.
- 2 Calibrator 2: (Cat. No. 0020300610): 3 x 1ml vials of a lyophilized human plasma containing heparin, buffer and stabilizers.
- 3 Calibrator 3: (Cat. No. 0020300620): 3 x 1ml vials of a lyophilized human plasma containing heparin, buffer and stabilizers.

PRECAUTIONS AND WARNINGS:

The material in this product was tested with FDA approved methods and found nonreactive for Hepatitis B surface Antigen (HBsAg), Anti-HCV and HIV antibodies. Handle as if potentially infectious.¹

Hazard class: None

Hazard statements: None

Precautionary statements: None

Supplemental hazard information:

≈ 100% of the mixture consists of component of unknown acute toxicity (oral, dermal, inhalation) for the human health and unknown hazard to the aquatic environment.

All animal products should be treated as potentially infectious.

This product is For *in vitro* Diagnostic Use.

Preparation

Dissolve the contents of each vial with 1.0 mL of CLSI Type CLR water or equivalent². Replace the stopper and keep calibrator at 15-25°C for 30 minutes. Make sure of the complete reconstitution of the calibrator. Gently swirl and invert to mix before use. Do not shake. Avoid foam formation.

Reagent storage and stability

Unopened reagents are stable until the expiration date shown on the vial when stored at 2-8°C. Stability after reconstitution: 24 hours at 15-25°C on-board the ACL TOP Family, ACL TOP Family 50 Series† and ACL Elite®/Elite Pro Systems, or 48 hours at 2-8°C in the original vial.

For optimal stability remove reagents from the system and store them at 2-8°C in the original vial.

ENGLISH - Insert revision 06/2018



Instrument/test procedures

After reconstitution, the Heparin Calibrator should be handled in the same manner as fresh citrated plasma.

Refer to the instrument's Operator's Manual for the complete assay procedure instructions according to the specific tests required.

Please Note: The Hemosil Heparin Calibrator values are programmed into the Liquid Anti-Xa parameters for the ACL TOP Family, ACL TOP Family 50 Series† and ACL Elite®/Elite Pro.

Calibrator	Heparin Concentration
Heparin Calibrator 1	0 IU/mL
Heparin Calibrator 2	0.8 IU/mL
Heparin Calibrator 3	2.0 IU/mL

Traceability of calibrator materials

The heparin calibrators are prepared by means of a dedicated process and are traceable to the WHO International Standards for LMW and UF Heparin. The three levels of calibrators are prepared with different heparin concentrations.

Additional reagent and control plasmas

The following are not supplied with the kit and must be purchased separately.

Product	Cat. No.
Liquid Anti-Xa	0020302600
Liquid Anti-Xa	0020302601*
LMW Heparin Controls	0020300200
UF Heparin Controls	0020300300

*Not available in all countries

Limitations

This product is designed for the calibration of the Hemosil Liquid Anti-Xa assays. The Calibrator is subjected to the limitations of the assay system. Deviations may indicate possible problems with one or more components in the test system.

† ACL TOP Family 50 Series = ACL TOP 350 CTS; ACL TOP 550 CTS; ACL TOP 750; ACL TOP 750 CTS; ACL TOP 750 LAS

6.6 Vedlegg 6: Kontrollvedlegg HemosIL LMW Heparin Controls



LMW Heparin Controls - 00203002200



ENGLISH - Insert revision 06/2018

Intended use

For the quality control of the HemosIL Liquid Anti-Xa assay when testing for low molecular weight heparin (LMW) on IL Coagulation Systems, (ACL TOP® Family, ACL TOP Family 50 Series[†] and ACL Elite®/Elite Pro).

Summary and principle

Heparin is the most frequently used antithrombotic drug. The biological activity of this sulphated glycosaminoglycan resides in its ability to accelerate (up to 2000-fold) the inhibitory effect of antithrombin on coagulation proteases. In recent years, it has been shown that LMWH, besides being as useful therapeutically as UFH, also has a longer half-life.

The LMW Heparin Controls are prepared from human citrated plasma by means of a dedicated process at two different LMW Heparin concentrations.

Low LMW Heparin Control: Assayed control intended for the assessment of precision and accuracy of the assay at the low concentration of LMW Heparin.

High LMW Heparin Control: Assayed control intended for the assessment of precision and accuracy of the assay at the high concentration of LMW Heparin.

Use of both controls is recommended for a complete quality control program.

Composition

The LMW Heparin kit consists of:

☐ **Low LMW Heparin Control** (Cat. No. 0020300220): 5 x 1ml vials of a lyophilized human plasma containing low molecular weight (LMW) heparin, buffers and stabilizers.

☐ **High LMW Heparin Control** (Cat. No. 0020300210): 5 x 1ml vials of a lyophilized human plasma containing low molecular weight (LMW) heparin, buffer and stabilizers.

PRECAUTIONS AND WARNINGS:

The material in this product was tested with FDA approved methods and found nonreactive for Hepatitis B surface Antigen (HBsAg), Anti-HCV and HIV antibodies. Handle as if potentially infectious.¹

Hazard class: None

Hazard statements: None

Precautionary statements: None

Supplemental hazard information:

≈ 100% of the mixture consists of component of unknown acute toxicity (oral, dermal, inhalation) for the human health and unknown hazard to the aquatic environment.

All animal products should be treated as potentially infectious.

This product is For *in vitro* Diagnostic Use.

Preparation

Dissolve the contents of each vial with 1.0 mL of CLSI Type CLR water or equivalent². Replace the stopper and keep control at 15-25°C for 30 minutes. Make sure of the complete reconstitution of the control. Gently swirl and invert to mix before use. Do not shake. Avoid foam formation.

Reagent storage and stability

Unopened controls are stable until the expiration date shown on the vial when stored at 2-8°C.

Stability after reconstitution: 48 hours at 2-8°C in the original vial or 24 hours at 15-25°C on-board the ACL TOP Family, ACL TOP Family 50 Series[†] and ACL Elite®/Elite Pro Systems.

For optimal stability remove control from the system and store it at 2-8°C in the original vial.

Instrument/test procedures

After reconstitution the LMW Heparin Controls should be handled in the same manner as fresh citrated plasma.

Additional reagent and control plasmas

The following are not supplied with the kit and must be purchased separately.

	Product Cat. No.
Liquid Anti-Xa	0020302600
Liquid Anti-Xa	0020302601*
Heparin Calibrators	0020300600
UF Heparin Control	0020300300

* Not available in all countries

Traceability of control materials

Each lot of LMW Heparin Control is traceable to the International WHO Standard for LMW Heparin.

Limitations

These products are designed as controls for monitoring the performance of HemosIL Liquid Anti-Xa when testing for low molecular weight heparin. These controls are subjected to the limitations of the assay system. Deviations may indicate possible problems with one or more components in the test system.

Performance characteristics/expected values

Refer to the Liquid Anti-Xa reagent insert for performance characteristics. The Low and High LMW Heparin Controls activity ranges were determined over multiple runs on IL Coagulation Systems using a specific lot of Liquid Anti-Xa reagents. The mean of the control range determined in each laboratory may vary due to the lot of reagent used.

Due to differences in reagents and instrumentation, each laboratory should establish its own Target Value and Acceptance Range (mean and standard deviation). However, any properly functioning coagulation system should yield mean values within the Acceptance Range on the package insert.

[†] ACL TOP Family 50 Series = ACL TOP 350 CTS; ACL TOP 550 CTS; ACL TOP 750; ACL TOP 750 CTS; ACL TOP 750 LAS

6.7 Vedlegg 7: Kontrollvedlegg HemosIL UF Heparin Controls



UF Heparin Controls - 0020300300

ENGLISH - Insert revision 06/2018



Intended use

For the quality control of the HemosIL Liquid Anti-Xa assay when testing for unfractionated heparin (UFH) on IL Coagulation Systems (ACL TOP® Family, ACL TOP Family 50 Series† and ACL Elite®/Elite Pro).

Summary and principle

Heparin is the most frequently used antithrombotic drug. The biological activity of this sulphated glycosaminoglycan resides in its ability to accelerate (up to 2000-fold) the inhibitory effect of antithrombin on coagulation proteases.

The UF Heparin Controls are prepared from human citrated plasma by means of a dedicated process at two different UF heparin concentrations.

Low UF Heparin Control: Assayed control intended for the assessment of precision and accuracy of the assay at the low concentration of UF Heparin.

High UF Heparin Control: Assayed control intended for the assessment of precision and accuracy of the assay at the high concentration of UF Heparin.

Use of both controls is recommended for a complete quality control program.

Composition

The UF Heparin kit consists of:

Low UF Heparin Control (Cat. No. 0020300320): 5 x 1ml vials of a lyophilized human plasma containing unfractionated (UF) heparin, buffers and stabilizers.

High UF Heparin Control (Cat. No. 0020300310): 5 x 1ml vials of a lyophilized human plasma containing unfractionated (UF) heparin, buffers and stabilizers.

PRECAUTIONS AND WARNINGS:

The material in this product was tested with FDA approved methods and found nonreactive for Hepatitis B surface Antigen (HBsAg), Anti-HCV and HIV antibodies. Handle as if potentially infectious.¹

Hazard class: None

Hazard statements: None

Precautionary statements: None

Supplemental hazard information:

≈ 100% of the mixture consists of component of unknown acute toxicity (oral, dermal, inhalation) for the human health and unknown hazard to the aquatic environment.

All animal products should be treated as potentially infectious.

This product is For *in vitro* Diagnostic Use.

Preparation

Dissolve the contents of each vial with 1.0 mL of CLSI Type CLP water or equivalent². Replace the stopper and keep control at 15-25°C for 30 minutes.

Make sure of the complete reconstitution of the control. Gently swirl and invert to mix before use. Do not shake. Avoid foam formation.

Reagent storage and stability

Unopened controls are stable until the expiration date shown on the vial when stored at 2-8°C.

Stability after reconstitution: 48 hours at 2-8°C in the original vial or 24 hours at 15-25°C on-board the ACL TOP Family, ACL TOP Family 50 Series† and ACL Elite/Elite Pro Systems.

For optimal stability remove control from the system and store it at 2-8°C in the original vial.

Instrument/test procedures

After reconstitution the UF Heparin Controls should be handled in the same manner as fresh citrated plasma.

Additional reagent and control plasmas

The following are not supplied with the kit and must be purchased separately.

	Product Cat. No.
Liquid Anti-Xa	0020302600
Liquid Anti-Xa	0020302601*
Heparin Calibrators	0020300600
LMW Heparin Controls	0020300200

*Not available in all countries

Traceability of control materials

Each lot of the UF Heparin Control plasma is traceable to the International WHO Standard for UF heparin.

Limitations

These products are designed as controls for monitoring the performance of HemosIL Liquid Anti-Xa when testing for unfractionated heparin.

These controls are subjected to the limitations of the assay system. Deviations may indicate possible problems with one or more components in the test system.

Performance characteristics/expected values

Refer to the Liquid Anti-Xa reagent insert for performance characteristics.

The Low and High UF Heparin Controls activity ranges were determined over multiple runs on IL Coagulation Systems using a specific lot of Liquid Anti-Xa reagents. The mean of the control range determined in each laboratory may vary due to the lot of reagent used.

Due to differences in reagents and instrumentation, each laboratory should establish its own Target Value and Acceptance Range (mean and standard deviation). However, any properly functioning coagulation system should yield mean values within the Acceptance Range on the package insert.

† ACL TOP Family 50 Series = ACL TOP 350 CTS, ACL TOP 550 CTS, ACL TOP 750; ACL TOP 750 CTS; ACL TOP 750 LAS

6.8 Vedlegg 8: Utvalg av instrumentutskriftene fra anti-FXa-aktivitetsanalyse

09.04.2019 10:52:34

Sample Result Report

Instrument Model	ACL TOP 750 LAS		
Serial Number	14110001		
Sample ID:	2-API-1:16	First Name:	Rack ID: 09
Sample Type:	Patient	Last Name:	Position ID: 5

Test Code	Results	Type	Rerun	Rerun Needed	Flag	Completed Date & Time	Validated
Anti-Xa	1027,41 mAbs/min 0,11 IU/mL				ME	09.04.2019 10:06:16	Not validated
Anti-Xa	1029,41 mAbs/min 0,11 IU/mL				ME	09.04.2019 10:01:33	Not validated
Anti-Xa	1025,21 mAbs/min 0,12 IU/mL				ME	09.04.2019 09:57:13	Not validated

Sample ID:	2-API-1:8	First Name:	Rack ID: 09
Sample Type:	Patient	Last Name:	Position ID: 4

Test Code	Results	Type	Rerun	Rerun Needed	Flag	Completed Date & Time	Validated
Anti-Xa	945,55 mAbs/min 0,22 IU/mL				ME	09.04.2019 10:05:54	Not validated
Anti-Xa	953,87 mAbs/min 0,20 IU/mL				ME	09.04.2019 10:01:12	Not validated
Anti-Xa	954,73 mAbs/min 0,20 IU/mL				ME	09.04.2019 09:56:51	Not validated

Sample ID:	2-api-1:4	First Name:	Rack ID: 09
Sample Type:	Patient	Last Name:	Position ID: 3

Test Code	Results	Type	Rerun	Rerun Needed	Flag	Completed Date & Time	Validated
Anti-Xa	818,92 mAbs/min 0,40 IU/mL				ME	09.04.2019 10:05:32	Not validated
Anti-Xa	832,42 mAbs/min 0,38 IU/mL				ME	09.04.2019 10:00:49	Not validated
Anti-Xa	819,60 mAbs/min 0,40 IU/mL				ME	09.04.2019 09:56:29	Not validated

Sample ID:	2-API-1:2	First Name:	Rack ID: 09
Sample Type:	Patient	Last Name:	Position ID: 2

Test Code	Results	Type	Rerun	Rerun Needed	Flag	Completed Date & Time	Validated
Anti-Xa	576,71 mAbs/min 0,86 IU/mL				ME	09.04.2019 10:05:10	Not validated
Anti-Xa	583,37 mAbs/min 0,84 IU/mL				ME	09.04.2019 10:00:03	Not validated
Anti-Xa	569,59 mAbs/min 0,87 IU/mL				ME	09.04.2019 09:56:07	Not validated

09.04.2019 10:52:34

Sample Result Report

Instrument Model	ACL TOP 750 LAS		
Serial Number	14110001		
Sample ID:	2-API-U	First Name:	Rack ID: 09
Sample Type:	Patient	Last Name:	Position ID: 1

Test Code	Results	Type	Rerun	Rerun Needed	Flag	Completed Date & Time	Validated
Anti-Xa	294,61 mAbs/min 1,81 IU/mL				<u>ME</u>	09.04.2019 10:04:49	Not validated
Anti-Xa	286,62 mAbs/min 1,85 IU/mL				<u>ME</u>	09.04.2019 09:59:18	Not validated
Anti-Xa	271,23 mAbs/min 1,94 IU/mL				<u>ME</u>	09.04.2019 09:55:45	Not validated

6.9 Vedlegg 9: Kontrollgrenser for anti-FXa-aktivitetsanalyse ved St. Olavs hospital, AMB

Stoppgrenser F.o.m. mandag 8/4

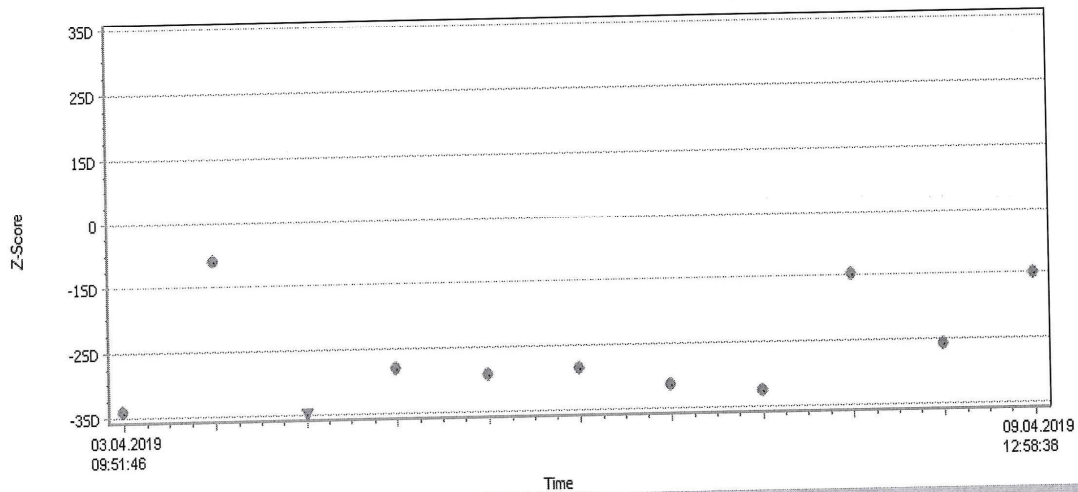
ACL Top 750 LAS		Nivå	SD	CV	Ktr.regel	Mean	Stoppgrenser		
PT-INR	NKP	1,0	0,018		1,7	5,0	1,03	0,94	1,12
	OKP	2,7	0,079		2,7	2,5	2,91	2,71	3,11
APTT	NKP	30	0,724		2,0	4,0	36,2	33,3	39,1
	OKP	50	1,018		2,0	4,0	50,9	46,8	55,0
Fibrinogen	NKP	2,3	0,154		6,0	2,5	2,56	2,18	2,94
	OKP	1,3	0,078		6,0	2,5	1,3	1,11	1,50
Antitrombin	NKP	95	3,880		4,0	2,5	97	87,3	106,7
	OKP	50	1,800		4,0	2,5	45	40,5	49,5
D-dimer	NKP	0,7	0,026		4,0	4,0	0,64	0,54	0,74
	OKP	1,6	0,068		4,0	4,0	1,69	1,42	1,96
Protein S	Normal C. Assayed	100	3,876		4,0	3,5	96,9	83,3	110,5
	Special Test 2	26	1,092		4,0	3,5	27,3	23,5	31,1
Protein C	Normal C. Assayed	100	1,910		2,0	6	95,5	84,0	107,0
	Special Test 2	25	1,052		4,0	2,5	26,3	23,7	28,9
Antifaktor Xa	LMW Hep Low Control	0,61	0,020		3,0	4	0,66	0,58	0,74
	LMW Hep High Control	1,50	0,030		2,0	5	1,52	1,37	1,67
	UF Hep Low Control	0,40	0,027		7,0	3	0,39	0,31	0,47
	UF Hep High Control	0,67	0,026		4,0	3,5	0,66	0,57	0,75

6.10 Vedlegg 10: Resultater fra anti-FXa-aktivitetsanalyse av kontrollmateriale

09.04.2019 13:47:54

QC Statistic Report

Instrument Model	ACL TOP 750 LAS		
Serial Number	14110001		
Test Code:	Anti-Xa	Data Interval:	03.04.2019 - 09.04.2019
QC Material:	LMW Hep Low Control		
Target:		Statistic:	
Mean:		Mean:	0,62
SD:		SD:	0,02
Unit:	IU/mL	CV:	2,84
		N:	11
		Omitted:	0
		Total Data:	11



No:	Completed D&T:	Result:	SD Value:	Unit:	QC Status:	Errors:	Omitted:	Lot ID:	Ordered by	Comment:
1	03.04.2019 09:51:46	0,60	-2,94	IU/mL		Yes	No	N1274638	mael	
2	03.04.2019 10:01:46	0,65	-0,62	IU/mL		Yes	No	N1274638	mael	
3	03.04.2019 12:46:44	0,59	-3,28	IU/mL		Yes	No	N1274638	kabrat	
4	03.04.2019 12:59:17	0,61	-2,33	IU/mL		Yes	No	N1274638	kabrat	
5	09.04.2019 08:35:00	0,61	-2,43	IU/mL		Yes	No	N1274638	Toes	
6	09.04.2019 08:47:33	0,61	-2,39	IU/mL		Yes	No	N1274638	Toes	
7	09.04.2019 09:13:53	0,61	-2,65	IU/mL		Yes	No	N1274638	Toes	
8	09.04.2019 09:25:30	0,60	-2,77	IU/mL		Yes	No	N1274638	Toes	
9	09.04.2019 11:47:31	0,64	-0,99	IU/mL		Yes	No	N1274638	Toes	
10	09.04.2019 12:00:38	0,62	-2,10	IU/mL		Yes	No	N1274638	Toes	
11	09.04.2019 12:58:38	0,64	-1,01	IU/mL		Yes	No	N1274638	Toes	

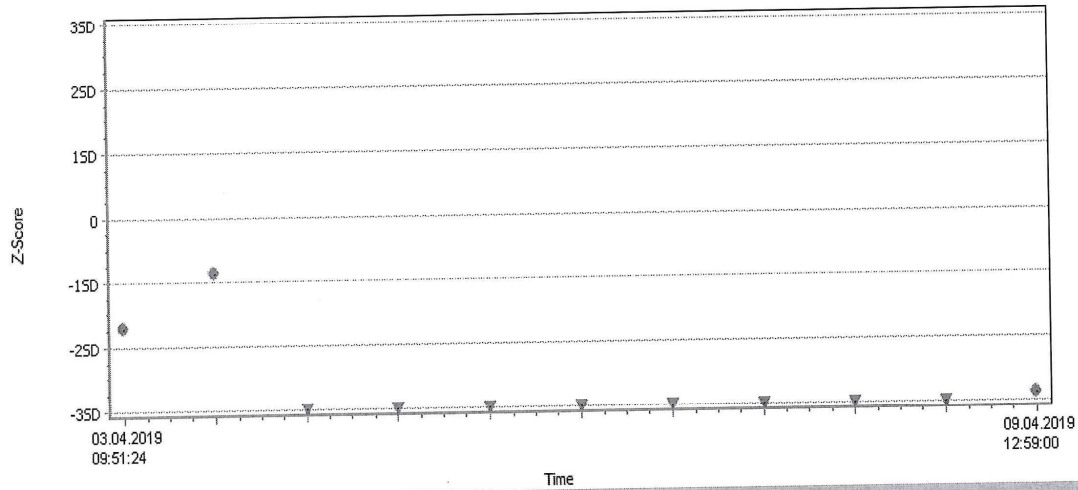
09.04.2019 13:47:50

QC Statistic Report

Instrument Model: ACL TOP 750 LAS
Serial Number: 14110001

Test Code: Anti-Xa
QC Material: LMW Hep High Control
Data Interval: 03.04.2019 - 09.04.2019

Target:	Statistic:
Mean:	Mean: 1,43
SD:	SD: 0,02
Unit: IU/mL	CV: 1,72
	N: 11
	Omitted: 0
	Total Data: 11



No:	Completed D&T:	Result:	SD Value:	Unit:	QC Status:	Errors:	Omitted:	Lot ID:	Ordered by	Comment:
1	03.04.2019 09:51:24	1,47	-1,71	IU/mL	Yes	No	N1274625	mael		
2	03.04.2019 10:02:07	1,49	-0,87	IU/mL	Yes	No	N1274625	mael		
3	03.04.2019 12:47:06	1,43	-3,14	IU/mL	Yes	No	N1274625	kabrat		
4	03.04.2019 12:59:39	1,42	-3,24	IU/mL	Yes	No	N1274625	kabrat		
5	09.04.2019 08:34:38	1,42	-3,44	IU/mL	Yes	No	N1274625	Toes		
6	09.04.2019 08:47:10	1,42	-3,31	IU/mL	Yes	No	N1274625	Toes		
7	09.04.2019 09:14:15	1,41	-3,53	IU/mL	Yes	No	N1274625	Toes		
8	09.04.2019 09:25:08	1,42	-3,18	IU/mL	Yes	No	N1274625	Toes		
9	09.04.2019 11:47:09	1,42	-3,24	IU/mL	Yes	No	N1274625	Toes		
10	09.04.2019 11:59:55	1,43	-3,09	IU/mL	Yes	No	N1274625	Toes		
11	09.04.2019 12:59:00	1,43	-2,89	IU/mL	Yes	No	N1274625	Toes		

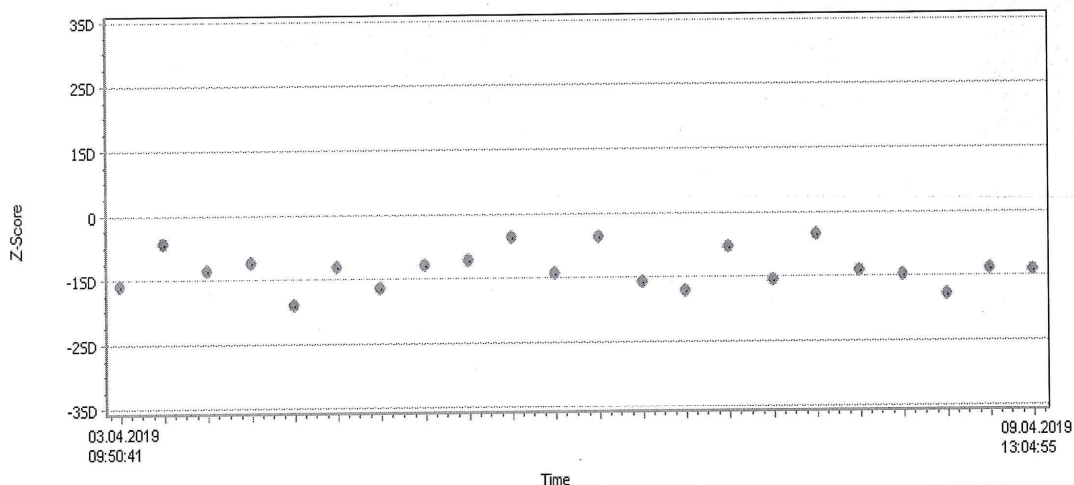
09.04.2019 13:48:05

QC Statistic Report

Instrument Model ACL TOP 750 LAS
 Serial Number 14110001

Test Code: Anti-Xa
 QC Material: UF Hep Low Control Data Interval: 03.04.2019 - 09.04.2019

Target:	Statistic:
Mean:	Mean: 0,36 N: 22
SD:	SD: 0,01 Omitted: 0
Unit: IU/mL	CV: 2,48 Total Data: 22

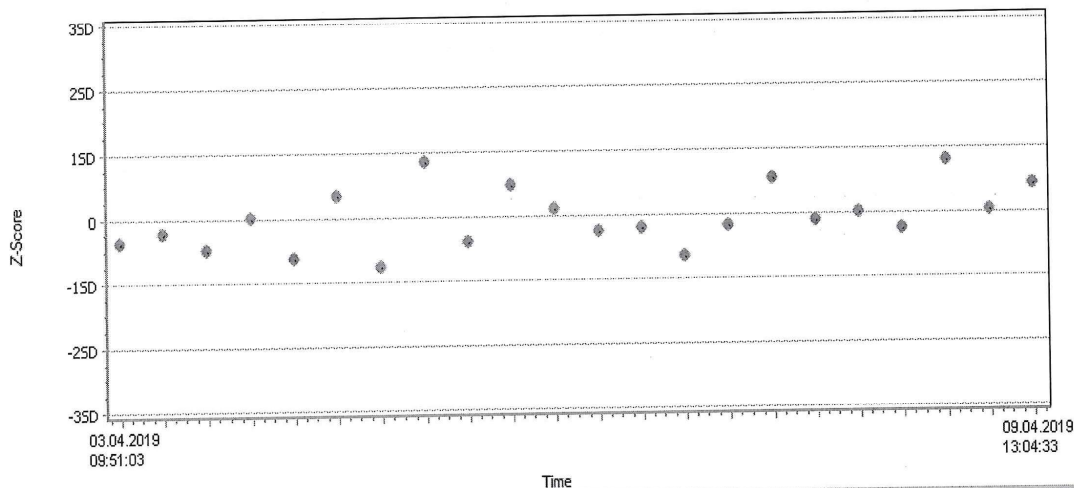


No:	Completed D&T:	Result:	SD Value:	Unit:	QC Status:	Errors:	Omitted:	Lot ID:	Ordered by	Comment:
1	03.04.2019 09:50:41	0,36	-1,12	IU/mL		Yes	No	N0386558	mael	
2	03.04.2019 09:57:09	0,38	-0,46	IU/mL		Yes	No	N0386558	mael	
3	03.04.2019 10:02:51	0,36	-0,88	IU/mL		Yes	No	N0386558	mael	
4	03.04.2019 10:54:59	0,37	-0,76	IU/mL		Yes	No	N0386558	mael	
5	03.04.2019 12:47:49	0,35	-1,43	IU/mL		Yes	No	N0386558	kabrat	
6	03.04.2019 12:52:42	0,37	-0,83	IU/mL		Yes	No	N0386558	kabrat	
7	03.04.2019 13:00:23	0,36	-1,16	IU/mL		Yes	No	N0386558	kabrat	
8	03.04.2019 13:04:36	0,37	-0,80	IU/mL		Yes	No	N0386558	kabrat	
9	09.04.2019 08:33:36	0,37	-0,74	IU/mL		Yes	No	N0386558	Toes	
10	09.04.2019 08:39:39	0,38	-0,39	IU/mL		Yes	No	N0386558	Toes	
11	09.04.2019 08:46:26	0,36	-0,95	IU/mL		Yes	No	N0386558	Toes	
12	09.04.2019 08:50:55	0,38	-0,39	IU/mL		Yes	No	N0386558	Toes	
13	09.04.2019 09:14:58	0,36	-1,08	IU/mL		Yes	No	N0386558	Toes	
14	09.04.2019 09:20:17	0,35	-1,22	IU/mL		Yes	No	N0386558	Toes	
15	09.04.2019 09:24:23	0,37	-0,56	IU/mL		Yes	No	N0386558	Toes	
16	09.04.2019 09:29:46	0,36	-1,06	IU/mL		Yes	No	N0386558	Toes	
17	09.04.2019 11:46:26	0,38	-0,36	IU/mL		Yes	No	N0386558	Toes	
18	09.04.2019 11:52:29	0,36	-0,93	IU/mL		Yes	No	N0386558	Toes	
19	09.04.2019 11:59:12	0,36	-1,00	IU/mL		Yes	No	N0386558	Toes	
20	09.04.2019 12:03:00	0,35	-1,31	IU/mL		Yes	No	N0386558	Toes	
21	09.04.2019 13:00:14	0,36	-0,90	IU/mL		Yes	No	N0386558	Toes	
22	09.04.2019 13:04:55	0,36	-0,93	IU/mL		Yes	No	N0386558	Toes	

09.04.2019 13:48:00

QC Statistic Report

Instrument Model	ACL TOP 750 LAS		
Serial Number	14110001		
Test Code:	Anti-Xa	Data Interval:	03.04.2019 - 09.04.2019
QC Material:	UF Hep High Control		
Target:		Statistic:	
Mean:		Mean:	0,66
SD:		SD:	0,01
Unit:	IU/mL	CV:	2,08
		N:	22
		Omitted:	0
		Total Data:	22



No:	Completed D&T:	Result:	SD Value:	Unit:	QC Status:	Errors:	Omitted:	Lot ID:	Ordered by	Comment:
1	03.04.2019 09:51:03	0,65	-0,40	IU/mL		Yes	No	N0386557	mael	
2	03.04.2019 09:57:31	0,65	-0,25	IU/mL		Yes	No	N0386557	mael	
3	03.04.2019 10:02:29	0,65	-0,49	IU/mL		Yes	No	N0386557	mael	
4	03.04.2019 10:54:37	0,66	-0,01	IU/mL		Yes	No	N0386557	mael	
5	03.04.2019 12:47:27	0,64	-0,65	IU/mL		Yes	No	N0386557	kabrat	
6	03.04.2019 12:52:20	0,67	0,32	IU/mL		Yes	No	N0386557	kabrat	
7	03.04.2019 13:00:01	0,64	-0,78	IU/mL		Yes	No	N0386557	kabrat	
8	03.04.2019 13:04:13	0,69	0,84	IU/mL		Yes	No	N0386557	kabrat	
9	09.04.2019 08:34:17	0,65	-0,42	IU/mL		Yes	No	N0386557	Toes	
10	09.04.2019 08:40:01	0,67	0,46	IU/mL		Yes	No	N0386557	Toes	
11	09.04.2019 08:46:48	0,66	0,08	IU/mL		Yes	No	N0386557	Toes	
12	09.04.2019 08:51:17	0,65	-0,28	IU/mL		Yes	No	N0386557	Toes	
13	09.04.2019 09:14:37	0,65	-0,21	IU/mL		Yes	No	N0386557	Toes	
14	09.04.2019 09:19:55	0,64	-0,67	IU/mL		Yes	No	N0386557	Toes	
15	09.04.2019 09:24:46	0,65	-0,20	IU/mL		Yes	No	N0386557	Toes	
16	09.04.2019 09:29:25	0,68	0,52	IU/mL		Yes	No	N0386557	Toes	
17	09.04.2019 11:46:48	0,66	-0,12	IU/mL		Yes	No	N0386557	Toes	
18	09.04.2019 11:52:51	0,66	-0,02	IU/mL		Yes	No	N0386557	Toes	
19	09.04.2019 11:59:33	0,65	-0,27	IU/mL		Yes	No	N0386557	Toes	
20	09.04.2019 12:02:38	0,68	0,77	IU/mL		Yes	No	N0386557	Toes	
21	09.04.2019 12:59:51	0,66	0,00	IU/mL		Yes	No	N0386557	Toes	
22	09.04.2019 13:04:33	0,67	0,41	IU/mL		Yes	No	N0386557	Toes	

6.11 Vedlegg 11: Kvalitetskontrollregler for anti-FXa-aktivitet ved St. Olavs hospital, AMB

Valg av kvalitetskontrollregel (ver. 1.4)

Analyse **Antifaktor Xa**
Instrument eller metode **ACL Top 750 LAS**

Nivå 1

Konsentrasjon	0,61 IU/mL	
Stabil upresisjon (%)	3	1,00 s
Stabil uriktighet (%)		0,00 s
Tillatt totalfeil (%)	20	6,67 s
Kritisk systematisk feil		5,02 s
Antall kontroller (N)	1	
Kontrollgrenser (+/- antall s)	4	
Alarm hvis minst 1 kontrollverdi er utenfor kontrollgrensene		
Sannsynlighet for alarm ved		
Ingen systematisk feil	0,0001	
Kritisk systematisk feil	0,8453	

Nivå 2

Konsentrasjon	1,5 IU/mL	
Stabil upresisjon (%)	2	1,00 s
Stabil uriktighet (%)		0,00 s
Tillatt totalfeil (%)	20	10,00 s
Kritisk systematisk feil		8,35 s
Antall kontroller (N)	1	
Kontrollgrenser (+/- antall s)	5	
Alarm hvis minst 1 kontrollverdi er utenfor kontrollgrensene		
Sannsynlighet for alarm ved		
Ingen systematisk feil	0,0000	
Kritisk systematisk feil	0,9996	

Samlet sannsynlighet for alarm ved samme systematiske feil i begge nivå

Ingen systematisk feil	0,0001
Kritisk systematisk feil	0,9999

De kalkulerede sannsynligheter er eksakt riktige bare hvis kontrollene er uavhengige statistisk sett, og ellers er de noe høyere enn de reelle sannsynligheter

Begrunnelse for kontrollregel 1 4 s, N=1 i nivå 1 (0,61 IU/mL) og 1 5s, N=1 i nivå 2 (1,5 IU/mL). En kontroll i to nivå. Tillatt totalfeil er basert på medisinsk skjønnsmessig vurdering og de terapeutiske anbefalingene. Kontrollregel er valgt for å oppdage systematiske feil. Hver av de 2 kontrollreglene har god styrke til å påvise kritiske, systematiske feil (minst 85 %) samtidig som sannsynligheten for alarm ved ingen systematisk feil er meget lav (mindre enn 0,1 %). Slik analysen er designet antar vi at en eventuell systematisk feil vi gi samme prosentvise systematiske feil i begge nivå.

13/7-15
K. Sotene

Seksjonsleder

Asbjørn W. W. W.

Seksjonslege

[Signature]

Valg av kvalitetskontrollregel (ver. 1.4)

Analyse **Ufraksjonert heparin**
Instrument eller metode **ACL Top 750 LAS**

Nivå 1

Konsentrasjon	0,40 IU/mL UFH	
Stabil upresisjon (%)	7	1,00 s
Stabil uriktighet (%)		0,00 s
Tillatt totalfeil (%)	30	4,29 s
Kritisk systematisk feil		2,64 s
Antall kontroller (N)	2	
Kontrollgrenser (+/- antall s)	3	

Alarm hvis minst 1 kontrollverdi er utenfor kontrollgrensene

Sannsynlighet for alarm ved

Ingen systematisk feil	0,0054
Kritisk systematisk feil	0,5876

Nivå 2

Konsentrasjon	0,67 IU/mL UFH	
Stabil upresisjon (%)	4	1,00 s
Stabil uriktighet (%)		0,00 s
Tillatt totalfeil (%)	25	6,25 s
Kritisk systematisk feil		4,60 s
Antall kontroller (N)	2	
Kontrollgrenser (+/- antall s)	3,5	

Alarm hvis minst 1 kontrollverdi er utenfor kontrollgrensene

Sannsynlighet for alarm ved

Ingen systematisk feil	0,0009
Kritisk systematisk feil	0,9816

Samlet sannsynlighet for alarm ved samme systematiske feil i begge nivå

Ingen systematisk feil	0,0063
Kritisk systematisk feil	0,9924

De kalkuleerte sannsynligheter er eksakt riktige bare hvis kontrollene er uavhengige statistisk sett, og ellers er de noe høyere enn de reelle sannsynligheter

Begrunnelse for kontrollregel 1 3 s, N=2 i nivå 1 (0,40 IU/mL UFH) og 1 3,5s, N=2 i nivå 2 (0,67 IU/mL UFH). To kontroller i to nivå. Tillatt totalfeil er basert på medisinsk skjønnsmessig vurdering og de terapeutiske anbefalingene. Kontrollregel er valgt for å oppdage systematiske feil. Hver av de 2 kontrollreglene har god nok styrke til å påvise kritiske, systematiske feil samtidig som samlet sannsynligheten for alarm ved ingen systematisk feil er (mindre enn 1 %). Slik analysen er designet antar vi at en eventuell systematisk feil vi gi samme prosentvise systematiske feil i begge nivå.

13/7-15
K. Sørensen

Seksjonsleder Åshild Wolden
Seksjonslege [Signature]

