

Comparison of Two Methods for Heparin Sensitivity; Activated Partial Thromboplastin Time Assay using *in vitro* Heparin-spiked Sample and Anti-Xa Assay using *in vivo* Heparin-treated Sample

Bon-Kyung Koo, Eui-Hoon Kwon, Kwang-Hyun Ryu, Jae-Won Yun, and Hee-Jin Kim

Department of Laboratory Medicine, Samsung Medical Center, Seoul 135-710, Korea

The monitoring of heparin therapy is using almost aPTT assay. This study is compare to estimating aPTT therapeutic range using *in vitro* heparin-spiked sample and aPTT therapeutic range using *in vivo* heparin-treated sample. Normal pooled plasma was collected from 20 healthy representative individuals. 11 concentration of heparinized plasmas from 0 U/mL to 1,0 U/mL at intervals of 0,1 U/mL made by addition of heparin to normal pooled plasma were measured aPTT. The aPTT therapeutic range was performed through correlation analysis between heparin level 0,2 to 0,4 U/mL and aPTT. 30 plasmas from patients on heparin therapy were measured aPTT and anti-Xa activity. The aPTT therapeutic range was performed through correlation analysis between anti-Xa activity 0,3 to 0,7 U/mL and aPTT. The aPTT therapeutic range corresponded by heparin level-vs-aPTT value regression analysis was 60,7 to 102,4 seconds. The aPTT therapeutic range corresponded by anti-Xa activity-vs-aPTT value regression analysis was 85,3 to 147,5 seconds. The validation of heparin sensitivity using *in-vitro* heparin sample was not considered. The establishing aPTT therapeutic range is recommended anti-Xa activity using *in-vivo* sample.

Key Words : Heparin sensitivity, Therapeutic range, Anti-Xa activity

서 론

표준 헤파린, 미분획 헤파린으로 불리는 헤파린은 혈전색전증의 주된 치료제로 사용되고 있으며, 분자량에 따라 미분획 헤파린(unfractionated heparin; UFH)과 저분자량 헤파린(low molecular weight heparin; LMWH)으로 분류된다.

헤파린 추적 관찰은 activated partial thromboplastin time

(aPTT) 검사에 국한되지 않고, thrombin time 관련 검사, protamine titration 검사, factor Xa inhibition 검사(anti-Xa 검사), activated clotting time 검사 등의 여러 가지 방법을 사용하고 있다(CAP, 2004). 국내에서 가장 널리 사용되는 추적 관찰은 aPTT 검사이다. aPTT 검사로 헤파린 추적 관찰할 경우 결과를 빨리 얻을 수 있고, 비용이 저렴하다는 장점이 있으나 결과 측면으로는 시약, 장비, 환자의 변화에 따라 차이가 나는 단점이 있다.

헤파린 민감도 평가는 새로운 장비를 사용하는 경우, 새로운 시약을 사용하는 경우, 새로운 로트번호로 많은 시약이 바뀐 경우, 정기적으로 검증하는 경우에 시행하여야 하며 헤파린으로 치료받고 있는 환자의 혈액을 채혈하여 사용하여야 한다. 또한 aPTT와 heparin activity 결과를 비교하여 헤파린의 치료범위에 해당하는 aPTT의 범위를 계산하는

Corresponding author: Koo, Bon-Kyung, Department of Laboratory Medicine, Samsung Medical Center, Seoul 135-710, Korea.
Tel: 02-3410-6463, 010-3198-6361
E-Mail: bonkyung.koo@samsung.com

Received : 7 NOV 2011
Return for modification : 26 NOV 2011
Accepted : 30 NOV 2011

방법과 새로운 로트번호와 이전 로트번호의 시약을 사용하여 측정된 aPTT 값을 비교하는 방법으로 평가하여야 한다 (CAP, 2004; CLSI, 2008).

본 연구에서는 체외에서 헤파린 혼합한 혈장을 사용한 aPTT 검사에서의 치료범위와 헤파린 치료중인 환자 혈장을 사용한 anti-Xa 검사에서 치료범위를 비교하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 체외에서 헤파린 혼합한 혈장(*in vitro* heparin-spiked plasma)을 사용한 aPTT 검사

검체는 당일 방문한 건강의학센터 수진자 중에서 백혈구수, 혈색소농도, 혈소판수, PT, aPTT, 섬유소원, 총단백, AST, ALT 검사에서 정상 결과를 보인 남자 10명, 여자 10명의 건강대조군 20명을 대상으로 당일 3.2% sodium citrate 용기에 채혈한 것을 3,500 rpm에서 10분간 원심침전한 후 혈소판결핍혈장을 분리하였다. 각각의 혈소판결핍혈장로부터 공동 수집된 정상혼주혈장(normal pooled plasma)를 사용하였다.

본원에서 사용 중인 헤파린나트륨 주사액(heparin sodium injection 1,000 U/mL, 중외제약, 한국)으로 정상혼주혈장에 0 U/mL부터 1.0 U/mL까지 0.1 U/mL씩 헤파린을 첨가하여 그 농도를 상승시켜 11개의 검체를 준비하였다. 1,000 U/mL 헤파린을 100 U/mL 헤파린 용액으로 만들기 위해 헤파린 10 μ L과 생리식염수 90 μ L를 혼합시켜서 1:10 비율로 희석하였다. 100 U/mL 헤파린 농도를 1 U/mL 헤파린 농도를 갖는 heparinized plasma로 만들기 위해 100 U/mL 헤파린용액 1 μ L과 정상혼주혈장 99 μ L를 혼합시켰다. 정확한 헤파린 농도를 얻기 위한 희석 절차, 검체량 부족 문제가 생기지 않기 위해 1 U/mL heparinized plasma는 최소한 3 mL 필요하였다. 앞서 만든 100 U/mL 헤파린용액 30 μ L과 2,970 μ L 정상혼주혈장을 혼합시켜서 1:100 비율로 희석하였다(Table 1).

aPTT 검사는 4시간 이내에 수행되었으며 STA-R EVOLUTION(Diagnostica Stago, Asnieres, France) 자동응고분석기를 사용하였다. 시약은 STA-R EVOLUTION과 같은 제

Table 1. Mixture ratio of heparinized plasma and normal pooled plasma

Heparin leve (U/mL)	Heparinized plasma (μ L)	Normal pooled plasma (μ L)
0	0	500
0.1	50	450
0.2	100	400
0.3	150	350
0.4	200	300
0.5	250	250
0.6	300	200
0.7	350	150
0.8	400	100
0.9	450	50
1.0	500	0

조사의 제품으로 STA-PTT AUTOMATE, 0.025 M 염화칼슘인 STA-CaCl₂, 관리물질인 STA-COAG CONTROL, 표준혈장인 COAG NORM이 사용되었다. aPTT 검사의 측정원리는 clotting 방법이며 aPTT 분석측정범위를 180초에서 500초로 연장시켜서 11개의 농도에 대하여 각각 2번씩 측정하였다. 헤파린 농도와 aPTT 값의 상관관계는 소프트웨어 MedCalc 11.6.1 (MedCalc software, Mariakerke, Belgium)를 사용하여 x축에 헤파린 농도와 y축에 aPTT 값으로 선형회귀분석을 구하였다. aPTT 평균값의 1.5-2.5배에 해당하는 aPTT의 치료범위와 헤파린 농도를 구하였고, 헤파린 농도 0.2-0.4 U/mL에 해당하는 aPTT의 치료범위와 aPTT ratio를 구하였다.

2. 헤파린 치료중인 환자 혈장(*in vivo* heparin-treated plasma)을 사용한 anti-Xa 검사

2011년 4월 19일부터 6월 3일에 aPTT 검사가 의뢰된 병동 검체 중에 당일 헤파린 치료를 받고 있는 환자 15인 이상 30개 검체를 대상으로 하였다. 환자는 뇌경색 환자, 심장판막 대치수술 환자, 혈관내 혈전색전증 환자, 허혈성 심질환 환자 등으로 이들은 모두 경구 항응고제 치료를 받고 있지 않았으며, 간질환 등의 aPTT 값에 영향을 미칠 수 있는 다른 질병이 없는 환자이었다. 검체는 당일 3.2% sodium

citrate 용기에 채혈한 것을 3,500 rpm에서 10분간 원심침전 후 혈소판결핍혈장을 분리하였다.

Anti-Xa 검사는 4시간 이내에 수행되었으며 STA-R EVOLUTION (Diagnostica Stago) 자동응고분석기를 사용하였다. 시약은 STA-R EVOLUTION과 같은 제조사의 제품으로 STA-STACLOT HEPARIN, 완충액인 STA-OWREN-KOLLER, 검량물질인 STA-HEPANORM H, 관리물질인 STA-HEPARIN CONTROL이 사용되었다. Anti-Xa 검사의 측정원리는 clotting 방법이었다. Anti-Xa 활성도와 aPTT 값과 상관 관계는 통계 소프트웨어 MedCalc 11.6.1(MedCalc software, Mariakerke, Belgium)을 사용하여 x축에 anti-Xa 활성도와 y축에 aPTT 값으로 선형회귀분석을 구하였다. Anti-Xa 활성도 0.3-0.7 U/mL에 해당하는 aPTT의 치료범위를 구하였다.

결 과

1. aPTT 검사에서의 헤파린 치료범위 산정

0부터 0.1 U씩 헤파린 농도를 높여서 만든 11개의 검체에 aPTT 측정해서 얻은 결과이었다(Table 2). 헤파린 농도와 aPTT 값과의 선형회귀분석을 통해서 상관식은 $y=251.7x+12.53$ 이었고, 상관계수는 $r^2=0.974$ 로 우수하였

Table 2. aPTT and aPTT ratio according to heparin level

Heparin level (U/mL)	aPTT (sec)	aPTT ratio
0.0	35.1	1.0
0.1	43.8	1.2
0.2	60.7	1.7
0.3	82.6	2.4
0.4	102.4	2.9
0.5	123.0	3.5
0.6	146.6	4.2
0.7	177.4	5.1
0.8	218.9	6.2
0.9	247.8	7.1
1.0	284.0	8.1

다(Fig. 1). 정상인 aPTT 평균값의 1.5-2.5배에 해당하는 aPTT의 헤파린 치료범위는 52.7-87.8초이고, 이에 해당하는 헤파린 농도는 0.16-0.30 U/mL이었다. 회귀직선과 헤파린 농도 0.2-0.4 U/mL에 해당하는 aPTT의 치료범위는 60.7-102.4초이고, 이에 해당하는 aPTT ratio는 1.7-2.9이었다.

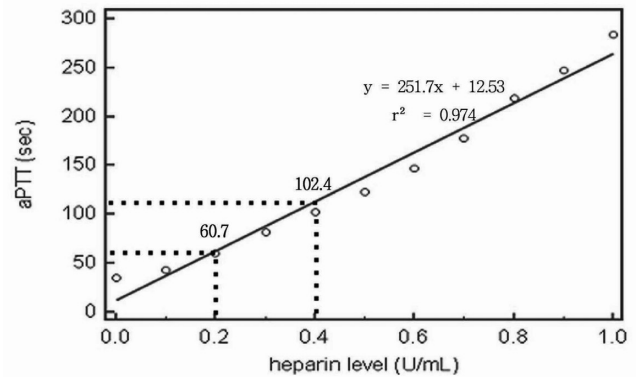


Fig. 1. Regression analysis for activated thromboplastin time vs heparin level

2. Anti-Xa 검사에서의 헤파린 치료범위 산정

헤파린 치료중인 30개의 검체에 aPTT와 anti-Xa 활성도 측정해서 얻은 결과이었다(Table 3). aPTT와 anti-Xa 활성도와의 선형회귀분석을 통해서 상관계수가 $r^2=0.596$ 으로 나왔으며(Fig. 2), aPTT 값과 anti-Xa 활성도의 상관식은 $y=155.6x+38.64$ 이었다. Anti-Xa 활성도 0.3-0.7 U/mL에 해당하는 aPTT의 치료범위는 85.3-147.5초이었다.

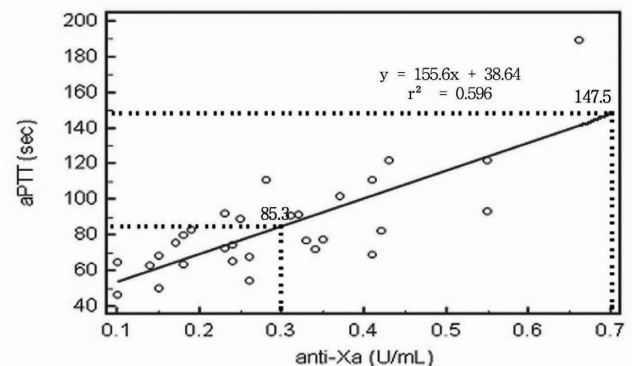


Fig. 2. Regression analysis for activated thromboplastin time vs anti-Xa activity

Table 3. Comparison of activated thromboplastin time and anti-Xa activity

Test	aPTT (sec)	anti-Xa activity (U/mL)
1	46.6	0.10
2	80.2	0.18
3	91.7	0.32
4	91.1	0.31
5	82.7	0.42
6	69.1	0.41
7	68.1	0.26
8	63.6	0.18
9	77.4	0.33
10	122.2	0.43
11	111.1	0.28
12	102.3	0.37
13	122.3	0.55
14	82.9	0.19
15	189.8	0.66
16	92.1	0.23
17	74.8	0.24
18	72.5	0.34
19	64.8	0.10
20	111.4	0.41
21	93.5	0.55
22	65.7	0.24
23	50.3	0.15
24	73.1	0.23
25	89.2	0.25
26	63.3	0.14
27	76.0	0.17
28	68.8	0.15
29	77.8	0.35
30	54.6	0.26

고찰

헤파린은 개인마다 항응고 효과가 다양하여 적절한 추적 관찰이 필요한 것으로 알려져 있다(Hirsh 등, 1976). aPTT로 헤파린 추적 관찰의 치료범위는 Basu 등(1972)에 의해 정상인 aPTT 평균값의 1.5-2.5 ratio로 설정하였고, 이것이 보편적으로 사용되어지고 있다. Chiu 등(1977)은 protamine titration 방법으로 헤파린 농도 0.2-0.4 U/mL 범위가 제시하였고, Hull 등(1990)은 anti-Xa 활성도에 의한 0.3-0.7 U/mL가 gold standard로 제시하였다. 이후 여러 연구자에 의하면 제조사 aPTT 시약마다 헤파린에 대한 민감도가 다양하기 때문에 공통된 치료범위를 적용하는 것은 문제가 있음이 지속적으로 보고되었다(Brill-Edwards 등, 1993).

Brill-Edwards 등(1993)은 protamine titration 방법으로 헤파린 농도 0.2-0.4 U/mL는 anti-Xa 활성도로 0.3-0.7 U/mL로 대치될 수 있다고 제시하였다. 국내에서도 김 등(2000)이 aPTT 시약이 바뀌면 치료범위를 달리 설정되어야 한다는 보고가 있었다. 2004년 CAP (college of american pathologists)에서도 aPTT 시약이 제조사마다 헤파린 활성도에 대한 민감도가 다르기 때문에 anti-Xa 검사로 적정 aPTT 값을 재평가할 것을 권고하고 있다(CAP, 2004; CLSI, 2008).

본 연구에서 체외에서 헤파린 혼합한 정상혼주혈장을 사용한 aPTT 검사에서의 헤파린 치료범위와 헤파린 치료중인 환자 혈장을 사용한 anti-Xa 검사에서의 적정치료범위는 차이를 보였다. 체외에서 헤파린 혼합한 정상혼주혈장을 사용한 검사에서는 헤파린 농도와 aPTT 값과의 상관계수는 $r^2=0.974$ 이었고, 헤파린 농도 0.2-0.4 U/mL에 해당하는 aPTT의 치료범위는 60.7-102.4초이었다. 헤파린 치료중인 환자 혈장을 사용한 검사에서는 anti-Xa 활성도 0.3-0.7 U/mL와 aPTT 값의 상관계수는 $r^2=0.596$ 이었으며 이는 기존 문헌과 큰 차이가 없게 나왔다(Brill-Edwards 등, 1998; 김 등, 2000; CAP, 2004). 또한 anti-Xa 활성도 0.3-0.7 U/mL에 해당하는 aPTT의 치료범위는 85.3-147.5초이었다.

결론적으로 체외에서 헤파린 혼합한 정상혼주혈장을 사용한 aPTT 검사에서의 헤파린 치료범위 제공은 헤파린 결합 단백질의 차이로 인해 부정확한 결과를 얻을 수 있어 바람

직하지 않다. 현실적 여건으로 인해 aPTT 검사가 널리 사용되고 있지만, 헤파린 치료중인 환자 혈장을 사용하여 헤파린의 항응고 효과를 직접적으로 반영하는 anti-Xa 검사로 치료범위를 제공이 하는 것이 필요하다고 생각된다.

참고문헌

1. Basu D, Gallus A, Hirsh J, Cade J. A Prospective study of the value of monitoring heparin treatment with the activated partial thromboplastin time. *N Engl J Med.* 1972, 287:324-327.
2. Brill-Edwards P, Ginsberg JS, Johnston M, Hirsh J. Establishing a therapeutic range for heparin therapy. *Ann Intern Med.* 1993, 119:104-109.
3. CAP. How to validate heparin sensitivity of the aPTT. CAP today 2004. College of american pathologists. Northfield, Illinois.
4. Chiu HM, Hirsh J, Yung WL, Regoeci E, Gent M. Relationship between the anticoagulant and antithrombotic effects of heparin in experimental venous thrombosis. *Blood.* 1977, 49:171-184.
5. CLSI. One-stage prothrombin time test and activated partial thromboplastin time test; approved guideline—second edition. CLSI document H47-A2. 2008. Clinical and laboratory standards institute, Wayne, Pennsylvania.
6. Hirsh J, van Aken WG, Gallus AS, Dollery CT, Cade JF, Yung WL. Heparin kinetics in venous thrombosis and pulmonary embolism. *Circulation.* 1976, 53:691-695.
7. Hull RD, Raskob GE, Rosenbloom D, Panju AA, Brill-Edwards P, Ginsberg JS, Hirsh J, Martin GJ, Green D. Heparin for 5 days as compared with 10 days in the initial treatment of proximal venous thrombosis. *N Engl J Med.* 1990, 322,1260-1264.
8. 김희진, 조한익, 이동순. 헤파린 치료에 있어 activated partial thromboplastin time 시약이 바뀌면 적정 치료범위가 변하는가? *대한내과학회지.* 2000, 59;505-510.