

**BIOPHEN™ ANTI-IIa**  
**(2 Stages Heparin Assay)**

REF 220005

R1 R2 R3 2 x 1 mL

Méthode chromogène en deux temps pour le dosage de l'activité anti-IIa de l'Héparine sur plasma ou milieux purifiés, selon les recommandations des Pharmacopées (USP, EP).

**POUR LA RECHERCHE UNIQUEMENT.****NE PAS UTILISER DANS LES PROCEDURES DE DIAGNOSTIC.**

Français, dernière révision : 04-2021

**UTILISATION:**

Le coffret BIOPHEN™ ANTI-IIa (2 Stages Heparin Assay) est une méthode chromogène en 2 étapes pour mesurer l'activité des héparines (HNF ou HBPM), en méthode manuelle ou automatisée. Cette méthode est proposée uniquement pour tester l'héparine en plasma humain citraté, ou en solution purifiée.

**Ce coffret est à usage de recherche uniquement et ne doit pas être utilisé pour le diagnostic ou le traitement du patient.**

**RESUME ET EXPLICATION:****Technique :**

L'héparine est un mucopolysaccharide sulfaté naturel, de forte affinité pour l'antithrombine. Complexée à l'héparine, l'antithrombine devient un inhibiteur immédiat et puissant des sérines estérases de la coagulation : le IXa, le Xa et la thrombine. Les Héparines de Bas Poids Moléculaires (HBPM), et analogues, comme le Danaparoiide Sodique, inhibent plus fortement le Facteur Xa que la Thrombine, alors que l'Héparine Non Fractionnée (HNF) inhibe efficacement la thrombine et les autres serine estérases. Les dosages anti-IIa sont les méthodes de choix pour la mesure de l'activité anti-thrombine des larges molécules d'héparine<sup>1</sup>.

Ce test de dosage de l'héparine est une méthode chromogène anti-IIa en 2 étapes proposée pour mesurer précisément et de façon sensible la concentration d'héparine dans le plasma, ou en milieu purifié. L'échantillon testé doit être dilué avant utilisation dans le test.

La thrombine humaine purifiée utilisée dans le test est majoritairement présente sous forme  $\alpha$  (obtenue par activation directe de la Prothrombine (IIa), par l'héparine à doser, en présence d'antithrombine exogène (temps 1), puis l'hydrolyse d'un substrat chromogène spécifique (CS-01(38)), par la Thrombine résiduelle en excès (temps 2), qui clive ensuite le pNA de ce substrat. La quantité de pNA libérée (mesurée par l'absorbance à 405nm) est fonction de la quantité de Thrombine résiduelle. Elle est inversement proportionnelle à la concentration d'héparine présente dans le milieu réactionnel.

Cette méthode, utilisant la prédilution des réactifs Antithrombine et Thrombine en tampon spécifique (non fournis dans ce coffret), est conforme aux recommandations de la Pharmacopée des Etats-Unis (USP)<sup>2</sup> et de la Pharmacopée Européenne (EP)<sup>3</sup>.

**PRINCIPE:**

La méthode BIOPHEN™ ANTI-IIa (2 Stages Heparin Assay) est un dosage basé sur l'inhibition d'une quantité constante et en excès de Thrombine (IIa), par l'héparine à doser, en présence d'antithrombine exogène (temps 1), puis l'hydrolyse d'un substrat chromogène spécifique (CS-01(38)), par la Thrombine résiduelle en excès (temps 2), qui clive ensuite le pNA de ce substrat. La quantité de pNA libérée (mesurée par l'absorbance à 405nm) est fonction de la quantité de Thrombine résiduelle. Elle est inversement proportionnelle à la concentration d'héparine présente dans le milieu réactionnel.

Héparine + AT → [AT Hep.]

[AT Hep.] + [IIa (excès)] → [FIIa-AT-Hep.] + [FIIa résiduel]

[FIIa (résiduel)] + Substrat → Peptide + pNA

**REACTIFS:**

**R1** ATIII (h) : Antithrombine humaine (ATIII), flacon lyophilisé d'environ 1,25 UI/mL. Contient de la BSA.

**R2** Thrombine humaine purifiée, majoritairement sous forme  $\alpha$ , flacon lyophilisé d'environ 120 NIH (ou UI), ou environ 150 nkat (lorsque déterminé dans des conditions optimisées sur le substrat spécifique CS-01(38)).

**R3** Substrat chromogène spécifique de la Thrombine (CS-01(38)), flacon d'environ 6.25 mg, lyophilisé en présence de mannitol.

**R1 R2 R3 2 flacons de 1 mL.****MISE EN GARDE ET AVERTISSEMENTS:**

- Certains réactifs de ce coffret contiennent des produits d'origine humaine et animale. Lorsque du plasma humain a été utilisé dans la préparation de ces réactifs, la recherche de l'antigène HBs, des anticorps anti-HCV, anti-HIV 1 et anti-HIV 2 a été effectuée et trouvée négative. Cependant aucun test ne peut garantir de façon absolue l'absence de tout agent infectieux. Aussi, ces réactifs d'origine biologique doivent être manipulés avec les précautions d'usage s'agissant de produits potentiellement infectieux.
- L'élimination des déchets doit être effectuée conformément aux réglementations locales en vigueur.
- Utiliser uniquement les réactifs d'un même lot de coffret.
- Les études de vieillissement montrent que les réactifs peuvent être expédiés à température ambiante sans aucun dommage.
- L'activité coagulante de l' $\alpha$ -thrombine est élevée par rapport aux autres formes dégradées de thrombine, pour une même activité chromogène. Le NIH est une unité coagulante. La concentration de thrombine est ajustée exactement de lot à lot pour obtenir une réactivité et une linéarité optimisées pour le dosage.

- Ce dispositif *in vitro* est destiné à une utilisation professionnelle en laboratoire.

**PREPARATION DES REACTIFS:**

Retirer délicatement le bouchon de lyophilisation, pour s'affranchir de toute perte de produit à l'ouverture du flacon.

**R1 R2** Reconstituer chaque flacon avec exactement **1 mL d'eau distillée**.

Agiter vigoureusement jusqu'à dissolution complète, en évitant la formation de mousse, laisser stabiliser pendant 30 min à température ambiante (18-25°C) et homogénéiser.

Juste avant utilisation, diluer au **1/5** dans le tampon approprié selon l'Héparine à doser (voir tableau ci-dessous ou instructions du guide d'application, si tout le flacon est utilisé, ajouter **4 mL** de tampon au **1 mL** reconstitué).

**R3** Reconstituer chaque flacon avec exactement **1 mL d'eau distillée**.

Agiter vigoureusement jusqu'à dissolution complète, en évitant la formation de mousse, laisser stabiliser pendant 30 min à température ambiante (18-25°C) et homogénéiser.

Juste avant utilisation diluer au **1/5** (extemporanément pour la méthode manuelle) dans le tampon approprié selon l'Héparine à doser (voir tableau ci-dessous ou instructions du guide d'application, si tout le flacon est utilisé, ajouter **4 mL** de tampon spécifique au **1 mL** de substrat reconstitué).

Héparine mesurée	Dilution du réactif		Volume de tampon (pour 1 mL de réactif)		Tampon à utiliser	
	HBPM	HNF	HBPM	HNF	HBPM	HNF
<b>R1</b>	1/5	1/5	4mL	4mL	AR005L	AR030K
<b>R2</b>	1/5	1/5	4mL	4mL	AR005L	AR030K
<b>R3</b>	1/5	1/5	4mL	4mL	AR029K	eau distillée

**STOCKAGE ET STABILITE:**

Les réactifs non ouverts doivent être conservés à 2-8°C dans leur emballage d'origine. Ils sont alors utilisables jusqu'à la date de péremption imprimée sur le coffret.

**R1 R2 R3** La stabilité du réactif après reconstitution, sous réserve de toute contamination ou d'évaporation, conservé fermé est de :

- 15 jours** à 2-8°C.
- 4 jours** à température ambiante (18-25°C).
- 6 mois** congelé à -20°C ou moins\*
- Stabilité à bord de l'automate : se référer à l'application spécifique.**

\*Décongeler une seule fois le plus rapidement possible à 37°C et utiliser immédiatement.

La stabilité des réactifs dilués doit être vérifiée dans les conditions de travail du laboratoire utilisateur.

Si le substrat devient jaune, cela indique une contamination. Le flacon doit être jeté et un nouveau utilisé.

**REACTIFS ET MATERIELS REQUIS MAIS NON FOURNIS:****Réactifs:**

- Eau distillée.
- Acide acétique à 20% ou acide citrique à 2% (méthode en point final).
- Tampons spécifiques tels que :

Nom du produit	Référence
Tris-EDTA-NaCl-PEG, pH 8.40	AR030K
Tris-NaCl-BSA, pH7.40	AR005L
Tris-NaCl, pH 7.40	AR028K
Tris-EDTA-NaCl, pH 8.40	AR029K

- Etalons et contrôles avec titration connue pour l'héparine à doser.
- Pour le dosage en plasma, il est possible d'utiliser les étalons et contrôles suivant :

Nom du produit	Référence
BIOPHEN™ UFH Control Plasma*	223101-RUO
BIOPHEN™ UFH Calibrator*	222301-RUO

\* plasmas titrés en activité anti-Xa.

- Matériel de référence international, conforme à la pharmacopée utilisée ou interne, spécifique de l'héparine à doser.

### Matériels:

- Spectrophotomètre, ou automates pour dosage chromogène.
- Chronomètre, Pipettes calibrées, tubes en plastique ou microplaque.

### PRELEVEMENTS ET PREPARATION DES ECHANTILLONS:

Le sang (9 volumes) doit être collecté sur l'anticoagulant citrate trisodique (1 volume) (0,109M, 3,2%) avec précautions, par ponction veineuse franche. Des tubes de collecte spécifiques pour les essais de l'héparine non fractionnée, tels que les tubes CTAD (Citrate, Théophylline, Adénosine et Dipyridamole), peuvent être utilisés. Le premier tube doit être éliminé.

La préparation et la conservation des échantillons doivent être réalisées selon les recommandations locales en vigueur (pour les Etats-Unis, se référer aux recommandations du CLSI H21-A5<sup>4</sup> pour plus d'informations concernant le prélèvement, la manipulation et la conservation).

Pour la conservation des plasmas, se référer aux références<sup>5,6</sup>.

### PROCEDURE:

Le coffret peut être utilisé en méthode cinétique, automatisée, ou en méthode manuelle (point final). Le test est réalisé à 37°C et l'intensité de la coloration est mesurée à 405nm.

Pour une méthode automatisée, les guides d'applications sont disponibles sur demande. Se référer aux guides d'application et aux précautions spécifiques pour chaque automate.

### Méthode de dosage:

1. Reconstituer les étalons et les contrôles (même matrice que les échantillons) comme indiqué dans les notices spécifiques. Les étalons doivent être dilués dans du tampon spécifique selon l'héparine à mesurer comme décrit dans le tableau ci-dessous afin d'effectuer la gamme de calibration :

Concentration HBPM (UI/mL)	0.135	0.25	0.50	0.75	1.00
Solution HBPM à 1UI/mL	135µL	250µL	500µL	750µL	1mL
Tampon Spécifique	865µL	750µL	500µL	250µL	-

Concentration HNF (UI/mL)	0.135	0.25	0.50	0.75	1.00
Solution HNF à 1UI/mL	135µL	250µL	500µL	750µL	1mL
Tampon Spécifique	865µL	750µL	500µL	250µL	-

	Dilution		Tampon spécifique	
	HBPM	HNF	HBPM	HNF
Etalons	1/25	1/25	AR005L (EP) ou AR028K (USP)	AR030K

Pour le plasma, il est possible d'utiliser des étalons disponibles (ex : BIOPHEN™ UFH Calibrator 222301-RUO).

Pour une performance optimale du dosage, réaliser la gamme de calibration juste avant le dosage.

2. Diluer les échantillons et les contrôles dans du tampon spécifique comme décrit dans le tableau ci-dessous :

Echantillons	Référence	Dilution	Tampon
LMWH Control plasma	n.a.	1/25	AR005L (EP) ou AR028K (USP)
BIOPHEN™ UFH Control plasma	223101-RUO	1/25	AR030K
Echantillons HBPM	n.a.	1/25	AR005L (EP) ou AR028K (USP)
Echantillons HNF	n.a.	1/25	AR030K

Réaliser la gamme de calibration et la tester avec les contrôles de qualité. Les échantillons dilués doivent être testés dans 2 heures, s'ils sont conservés à température ambiante (18-25°C). Les concentrations exactes des étalons et des contrôles sont indiquées pour chaque lot sur le papillon fourni avec le coffret.

3. Introduire dans les puits d'une microplaque ou dans un tube plastique incubé à 37°C:

	Microplaque	Tube
Echantillon, contrôle ou étalon dilués.	40 µL	200 µL
<b>R1</b> Antithrombine Préincubé à 37°C	40 µL	200 µL
Mélanger et incubé à 37°C, pendant 2 minutes puis introduire :		
<b>R2</b> Thrombine humaine Préincubé à 37°C	40 µL	200 µL
Mélanger et incubé à 37°C, pendant exactement 2 minutes puis introduire :		
<b>R3</b> Substrat préincubé à 37°C	40 µL	200 µL
Mélanger et incubé à 37°C exactement :		
	2 min	90 sec
Arrêter la réaction en introduisant :		
Acide citrique (2%)*	80 µL	400 µL
Mélanger et mesurer la densité optique à 405nm contre le blanc correspondant.		

\*Ou acide acétique (20%). La couleur jaune est stable pendant 2 heures.

Le blanc échantillon est obtenu par mélange des réactifs dans l'ordre inverse à celui du test : Acide Citrique (2%), **R3**, **R2**, **R1**, échantillon dilué

Mesurer la densité optique à 405 nm. La valeur du blanc mesurée doit être soustraite de l'absorbance mesurée pour le test correspondant. Faire un blanc plasma si l'échantillon est icterique, lipémique, hémolysé ou présente une coloration différente des plasmas étalons.

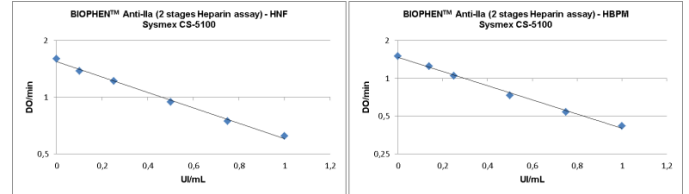
Si un volume réactionnel différent de celui indiqué ci-dessus est requis pour la méthode utilisée, le rapport des volumes doit être strictement respecté afin de

garantir les performances du dosage. L'utilisateur est responsable de la validation des modifications et de leur impact sur tous les résultats.

### CALIBRATION:

Le test BIOPHEN™ ANTI-IIa (2 Stages Heparin Assay) peut être calibré pour le dosage de HBPM, HNF et leurs analogues. Les coffrets d'étalons et contrôles spécifiques couvrant la zone de test dynamique est disponible chez HYPHEN BioMed (Voir paragraphe REACTIFS ET MATERIEL REQUIS MAIS NON FOURNIS) et peuvent être utilisés pour générer la courbe de calibration.

Les courbes de calibration ci-dessous, sont indiquées à titre d'exemple uniquement. La courbe de calibration générée pour la série de dosages doit être utilisée.



### CONTRÔLE QUALITE:

L'utilisation de contrôles de qualité permet de valider la conformité de la méthode ainsi que l'homogénéité des dosages entre les différents essais pour un même lot de réactifs.

Inclure des contrôles qualité dans chaque série, selon les bonnes pratiques de laboratoire, afin de valider le test. Une nouvelle courbe de calibration doit être établie, de préférence, pour chaque série d'essai, et au moins pour chaque nouveau lot de réactif ou après chaque maintenance de l'automate, ou quand les valeurs des contrôles de qualité sont mesurées en dehors de la zone d'acceptation définie pour la méthode.

Chaque laboratoire doit établir les zones d'acceptation et vérifier les performances attendues dans son système analytique.

### RESULTATS:

- Pour la méthode manuelle, en point final, tracer la droite de calibration log-lin, en portant en ordonnées la DO à 450 nm (log) et en abscisses la concentration d'Héparine correspondante (UI/mL).
  - Quand la méthode cinétique est utilisée, utiliser les ΔDO 405 au lieu des DO 405.
  - La concentration d'Héparine (UI/mL) dans l'échantillon à doser est déduite directement de la courbe de calibration, lorsque la dilution standard est utilisée.
  - Si d'autres dilutions sont utilisées le taux obtenu doit être multiplié par le facteur de dilution complémentaire utilisé.
- Les résultats doivent être utilisés à des fins de recherche uniquement et ne sont pas utilisables pour le diagnostic ou le traitement du patient.

### LIMITATIONS:

- Pour obtenir les performances optimales du test et répondre aux spécifications, suivre scrupuleusement les instructions techniques validées par HYPHEN BioMed.
- Tout réactif présentant un aspect inhabituel ou des signes de contamination doit être rejeté.
- Tout échantillon suspect ou présentant des signes d'activation doit être rejeté.
- Si une zone de mesure plus large de l'héparine est nécessaire, la dilution standard du test (d=1/25) peut être ajustée en conséquence. Par exemple, utiliser une dilution 1/50 (soit d/2) pour une zone de mesure de 0 à 2 UI/mL, ou une dilution 1/100 (soit d/4) pour une zone de mesure de 0 à 4 UI/mL dans l'échantillon testé. Les concentrations d'héparine mesurées doivent alors être multipliées par le facteur de dilution utilisé.
- Les volumes et temps d'incubation ont été harmonisés pour un usage manuel ou automate facilité, mais sont conformes aux concentrations réactionnelles recommandées par la Pharmacopée.
- Le tampon de dilution pour protocole HBPM (AR028K) ne contient pas de molécule saturante conformément à la USP. Lors de dilution très importantes, l'ajout d'une molécule saturante (type BSA) est susceptible d'améliorer la robustesse des résultats.

### REFERENCES:

1. Van Putten J et al. Automated spectrophotometric heparin assays. Comparison of methods. Haemostasis, 14, 195-204, 1984.
2. USP40, effective May 1, 2017.
3. Ph. Eur., 9th Edition, effective January 1, 2017.
4. CLSI Document H21-A5: "Collection, transport, and processing of blood specimens for testing plasma-based coagulation assays and molecular hemostasis assays; approved guideline". 2008.
5. Mauge L. and Alhenc-Gelas M. Stabilité pré-analytique des paramètres de la coagulation: revue des données disponibles. Ann Biol Clin. 2014.
6. Woodhams B. et al. Stability of coagulation proteins in frozen plasma. Blood coagulation and Fibrinolysis. 2001.

### SYMBOLES:

Symboles utilisés et signes énumérés dans la norme ISO 15223-1, se référer au document Définition des symboles.

Changements par rapport à la précédente version.