



BIOPHEN™ ANTI-Xa (2 Stages Heparin Assay)

Ref 221005

(R1, R2, R3 : 2 x 1 mL)

Méthode chromogène anti-Xa en deux temps pour le dosage de l'activité 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-Xa (2 Stages Heparin Assay) est une méthode chromogène en 2 étapes pour mesurer l'activité de l'héparine (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 :

L'héparine est un mucopolysaccharide sulfaté naturel, de forte affinité pour l'antithrombine. Complexée à l'héparine qui catalyse son action, 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 Danaparone Sodique, inhibent plus fortement le Facteur Xa que la Thrombine, alors que l'Héparine Non Fractionnée (HNF) inhibe efficacement la thrombine et les autres sérine estérases. Le pentasaccharide (Arixtra®) inhibe plus spécifiquement le Facteur Xa.

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

Cette méthode, utilisant la pré-dilution des réactifs Antithrombine et Facteur Xa en tampon spécifique (non fournis dans ce coffret), est conforme aux recommandations de la Pharmacopée des Etats-Unis (USP)⁴ et de la Pharmacopée Européenne (EP)⁵.

PRINCIPE :

Le coffret BIOPHEN™ ANTI-Xa (2 Stages Heparin Assay) est une méthode chromogène anti-Xa, développée pour mesurer les Héparines Non Fractionnées (HNF), ou de Bas Poids Moléculaires (HBPM), en plasma humain citraté, ou en solution purifiée, pour leur activité anti-Xa.

La méthode BIOPHEN™ ANTI-Xa (2 Stages Heparin Assay) est un dosage basé sur l'inhibition d'une quantité constante et en excès de Facteur Xa (FXa), par l'héparine à doser, en présence d'antithrombine exogène (temps 1), puis l'hydrolyse d'un substrat chromogène spécifique du Xa (CS11(65)), par le Xa résiduel (temps 2), qui clive le pNA de ce substrat. La quantité de pNA libérée (mesurée par l'absorbance à 405nm) est fonction de la quantité de Facteur Xa résiduelle. Elle est inversement proportionnelle à la concentration d'héparine présente dans le milieu réactionnel.

Heparine + AT → [AT Hep.]

[AT Hep.] + [Xa (excès)] → [FXa-AT-Hep.] + [FXa résiduel]

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

REACTIFS :

R1 : Réactif 1 : ATIII (h)

Antithrombine humaine (ATIII), flacon lyophilisé d'environ 5 UI/mL. Contient de la BSA.
2 flacons de 1 mL.

R2 : Réactif 2 : FXa (b)

Facteur Xa bovin purifié, flacon lyophilisé d'environ 40 µg (ou environ 90nkats, lorsque déterminé dans des conditions optimisées sur le substrat spécifique CS-11(22)). La concentration de Facteur Xa est ajustée exactement de lot à lot pour obtenir une réactivité et une linéarité optimisées pour le dosage.
2 flacons de 1 mL.

R3 : Réactif 3 : Substrat chromogène spécifique du Facteur Xa

Substrat chromogène spécifique du Facteur Xa (CS-11(65)), flacon d'environ 4 mg (environ 6 µmol), lyophilisé en présence de mannitol.
2 flacons de 1 mL.

MISE EN GARDE ET AVERTISSEMENTS :

- Tout produit d'origine biologique doit être manipulé avec toutes les précautions nécessaires, et considéré comme étant potentiellement infectieux.
- Si le substrat devient jaune, cela indique une contamination. Le flacon doit être jeté et un nouveau utilisé.
- L'élimination des déchets doit être effectuée conformément aux réglementations locales en vigueur.
- Utiliser uniquement les réactifs d'un même lot de coffret. Ne pas mélanger les réactifs de différents lots de coffrets pour réaliser un dosage, ils sont optimisés pour chaque lot de coffrets.
- Les réactifs doivent être manipulés avec précautions afin d'éviter toute contamination lors de leur utilisation. Eviter autant que possible toute évaporation des réactifs lors de leur utilisation, en limitant la surface d'échange liquide-air. L'évaporation réduit la stabilité du réactif à bord de l'automate.
- Le plasma humain utilisé pour la préparation de l'antithrombine humaine a été testé par des méthodes enregistrées et est certifié exempt d'anticorps VIH, de Hbs Ag et d'anticorps VHC. Le plasma bovin utilisé pour la préparation de la BSA et du Facteur Xa a été testé par des méthodes enregistrées et est certifié exempt de maladies infectieuses, notamment de l'encéphalopathie spongiforme bovine.
- Pour conserver la stabilité des réactifs, refermer les flacons après chaque utilisation avec leurs bouchons respectifs.
- Les études de vieillissement, réalisées à 30°C pendant 3 semaines, montrent que les réactifs peuvent être expédiés à température ambiante pendant une période courte, sans aucun dommage.
- Faire un blanc plasma si le plasma est icterique, lipémique, hémolysé ou présente une coloration différente des plasmas étalons.
- Quand la méthode cinétique est utilisée, utiliser les ΔDO 405 au lieu des DO 405.
- Les concentrations de Facteur Xa et d'antithrombine sont ajustées si nécessaire pour chaque lot de manière à obtenir la réactivité optimale dans le dosage.
- Pour usage *in vitro*.

PREPARATION ET STABILITE DES REACTIFS :

Les flacons sont lyophilisés sous vide. Retirer délicatement le bouchon de lyophilisation des réactifs lyophilisés, pour s'affranchir de toute perte de produit à l'ouverture du flacon.

R1 : Réactif 1 : ATIII (h)

Reconstituer chaque flacon avec exactement **1 mL d'eau distillée**, agiter vigoureusement jusqu'à dissolution complète. Laisser stabiliser pendant 30 min à température ambiante (18-25°C) en agitant de temps en temps.

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

Homogénéiser le réactif avant chaque utilisation.

La stabilité du réactif après reconstitution, sous réserve de toute contamination ou d'évaporation, conservé dans son flacon d'origine est de :

- 15 jours** à 2-8°C.
- 7 jours** à température ambiante (18-25°C).
- 2 mois** congelé à -20°C ou moins*

R2 : Réactif 2 : FXa (b)

Reconstituer chaque flacon avec exactement **1 mL d'eau distillée**, agiter vigoureusement jusqu'à dissolution complète. Laisser stabiliser pendant 30 min à température ambiante (18-25°C) en agitant de temps en temps.

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

Homogénéiser le réactif avant chaque utilisation.

La stabilité du réactif après reconstitution, sous réserve de toute contamination ou d'évaporation, conservé dans son flacon d'origine est de :

- 15 jours** à 2-8°C.
- 7 jours** à température ambiante (18-25°C).
- 2 mois** congelé à -20°C ou moins*

R3 : Réactif 3 : Substrat chromogène spécifique du Facteur Xa

Reconstituer chaque flacon avec exactement **1 mL d'eau distillée**, agiter vigoureusement jusqu'à dissolution complète. Laisser stabiliser pendant 30 min à température ambiante (18-25°C) en agitant de temps en temps.

Juste avant utilisation, diluer au **1/5** extemporanément dans le tampon approprié (voir tableau ci-dessous, si tout le flacon est utilisé, ajouter **4 mL** de tampon spécifique au **1 mL** de substrat reconstitué).

Homogénéiser le réactif avant chaque utilisation.

La stabilité du réactif après reconstitution, sous réserve de toute contamination ou d'évaporation, conservé dans son flacon d'origine est de :

- 2 mois** à 2-8°C.
- 7 jours** à température ambiante (18-25°C).
- 2 mois** congelé à -20°C ou moins*.

*Décongeler une seule fois le plus rapidement possible à 37°C en adaptant la durée d'incubation au volume de réactif. La stabilité du réactif décongelé doit être vérifiée dans les conditions de travail du laboratoire.

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

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

CONDITIONS DE STOCKAGE :

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.

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 LMWH Control Plasma	223001-RUO
BIOPHEN LMWH Control Low	223701-RUO
BIOPHEN Heparin Calibrator	222001-RUO
BIOPHEN UFH Calibrator	222301-RUO

- 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:

La préparation et la conservation des échantillons doivent être réalisées selon les recommandations locales en vigueur.

Echantillons:

- Plasma humain obtenu à partir de sang anticoagulé (citrate trisodique).

Prélèvement:

Le sang (9 volumes) doit être collecté sur l'anticoagulant citrate trisodique (1 volume) (0.109M) avec précautions, par ponction veineuse franche. Des tubes de collecte spécifiques pour les essais de l'héparine non fractionnée, tels que les tubes CTAD (Citrates, Théophylline, Adénosine et Dipyridamole), peuvent être utilisés. Le premier tube doit être éliminé.

Centrifugation:

En raison de la possible neutralisation de l'héparine par le facteur 4 plaquettaire, le délai avant la centrifugation ne doit pas excéder 1 heure à température ambiante pour les échantillons prélevés sur tubes citrate de sodium et 4 heures pour des tubes CTAD.

Utiliser une méthode validée au sein du laboratoire permettant d'obtenir un plasma pauvre en plaquettes, par exemple un minimum de 15 minutes à 2500g à température ambiante (18-25°C), et le plasma doit décanter dans un tube plastique.

Conservation du plasma^{6,7}:

- 4 heures à température ambiante (18-25°C)
- 1 mois à -20°C.
- 18 mois à -70°C.

Les échantillons de plasma congelés doivent être décongelés rapidement à 37°C, puis agités vigoureusement et testés immédiatement. Resuspendre tout précipité en agitant vigoureusement immédiatement après décongélation et avant utilisation.

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.

Méthode automatisée:

Les applications sur les différents automates sont disponibles sur demande. **Se reporter à l'application spécifique et aux précautions spécifiques de 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)	0.09	0.25	0.50	0.75	1.00
Solution HBPM à 1UI/mL	90µL	250µL	500µL	750µL	1mL
Tampon Spécifique	910µL	750µL	500µL	250µL	-

Concentration HNF (UI/mL)	0.09	0.25	0.50	0.75	1.00
Solution HNF à 1UI/mL	90µL	250µL	500µL	750µL	1mL
Tampon Spécifique	910µL	750µL	500µL	250µL	-

	Dilution		Tampon spécifique	
	HBPM	HNF	HBPM	HNF
Etalons	1/15	1/15	AR005L (EP) ou AR028K (USP)	AR030K

Pour le plasma, il est possible d'utiliser des étalons disponibles (ex : BIOPHEN Heparin Calibrator 222001-RUO ou 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 spécifique
BIOPHEN LMWH Control Low	223701-RUO	1/15	AR005L (EP) ou AR028K (USP)
BIOPHEN UFH Control plasma	223101-RUO	1/15	AR030K
Echantillons HBPM	n.a	1/15	AR005L (EP) ou AR028K (USP)
Echantillons HNF	n.a	1/15	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	Volume
Echantillon, contrôle ou étalon dilués.	40 µL	200 µL
R1: Antithrombine Préincubé à 37°C	40 µL	200 µL
Mélanger et incubé à 37°C, pendant 2 minutes puis introduire:		
R2: FXa Préincubé à 37°C	40 µL	200 µL
Mélanger et incubé à 37°C, pendant exactement 2 minutes puis introduire:		
R3: 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 405 nm 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

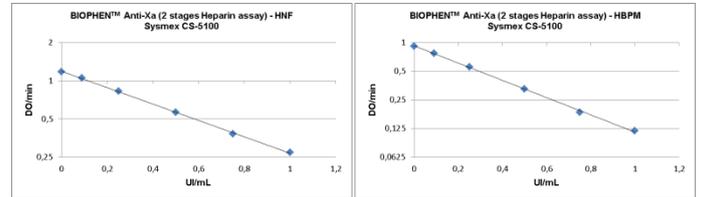
Mesurer la densité optique à 405 nm. La valeur du blanc mesurée doit être soustraite de l'absorbance mesurée pour le test correspondant.

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 BIOPHENTM ANTI-Xa (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 sur CS-series ci-dessous sont indiquées à titre d'exemple uniquement. La courbe de calibration générée pour la série de dosages doit être utilisée.



CONTROLE 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 sur papier semi-logarithmique la droite de calibration, en portant en ordonnées la DO à 405 nm (log) et en abscisses la concentration d'Héparine correspondante (UI/mL).
- La concentration d'Héparine dans l'échantillon à doser est déduite directement de la courbe de calibration.
- Les résultats sont exprimés en UI/mL.
- Multiplier la concentration mesurée par le facteur de dilution utilisé (par ex. x 15 pour le plasma).

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. Il est de la responsabilité du laboratoire de valider toutes les modifications apportées à ces instructions d'utilisation.
- Tout réactif présentant un aspect inhabituel ou des signes de contamination doit être rejeté.
- Tout prélèvement suspect ou présentant des signes d'activation doit être rejeté.
- Tout plasma présentant un coagulum ou des signes de contamination doit être rejeté.
- Si une zone de mesure plus large de l'héparine est nécessaire, la dilution standard du test (d=1/15) peut être ajustée en conséquence. Par exemple, utiliser une dilution 1/30 (soit d/2) pour une zone de mesure de 0 à 2 UI/mL dans l'échantillon testé. Les concentrations d'héparine mesurées doivent alors être multipliées par le facteur de dilution utilisé.
- Le mode de calibration Lin-Log est recommandé par la Pharmacopée, mais un mode de calibration Lin-Lin peut améliorer la linéarité pour l'HNF.
- 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. Lyon SG, et al., Modification of an Amidolytic Heparin Assay to Express Protein-Bound Heparin and to Correct for the effect of Antithrombin III concentration. *Thromb Haemost*, 58(3), 884-887. 1987.
2. Beeck H et al, Measurement of antithrombin activity by thrombin-based and factor Xa-based chromogenic assays. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 11(2), 127-135, 2000.
3. Holmer et al, Studies of the Mechanism of the Rate-Enhancing Effect of Heparin on the Thrombin-Antithrombin III Reaction. *Eur. J. Biochem.*, 93, 1-5, 1979.
4. USP40, effective May 1, 2017.
5. Ph. Eur., 9th Edition, effective January 1, 2017.
6. Woodhams B. et al. Stability of coagulation proteins in frozen plasma. *Blood coagulation and Fibrinolysis*, 2001.
7. Mauge L. and Alhenc-Gelas M. Stabilité pré-analytique des paramètres de la coagulation: revue des données disponibles. *Ann Biol Clin*. 2014.

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.