



BIOPHEN Heparin 6

REF 221006

R1 R2 4 x 6 mL



HYPHEN BioMed

155 rue d'Eragny, 95000 Neuville-sur-Oise, France

Tél : +33 (0)1 34 40 65 10

Fax : +33 (0)1 34 48 72 36

www.hyphen-biomed.com

info@hyphen-biomed.com

Dosage de l'Héparine, et de ses analogues,
par méthode chromogène anti-Xa.

Français, dernière révision : 04-2021

UTILISATION :

Le coffret BIOPHEN Heparin 6 est une méthode chromogène pour le dosage de l'héparine, et de ses analogues, dans le plasma humain citraté, en utilisant une méthode anti-Xa, manuelle ou automatisée.

RESUME ET EXPLICATION :

L'héparine et ses analogues sont couramment utilisés pour des indications préventives ou curatives. La mesure de l'héparinémie dans un plasma humain permet le suivi et l'adaptation du traitement.

Le coffret BIOPHEN Heparin 6 est basé sur une méthode chromogène anti-Xa, développée pour déterminer de façon homogène les héparines non fractionnées (HNF) ou les héparines de bas poids moléculaire (HBPM), en utilisant une courbe de calibration unique de HBPM.

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, le XIa, le XIIa et la thrombine^{1,2}. Les Héparines de bas poids moléculaires (HBPM), et ses analogues, comme le Danaparoïde Sodique, inhibent plus fortement le Facteur Xa que la Thrombine. Les dosages anti-Xa sont les méthodes de choix pour la mesure des héparines et de ses analogues.

Ils sont également utiles pour le dosage de l'activité anti-Xa de l'Orgaran® (sodium danaparoïde) et de l'Arixtra® (Fondaparinux), inhibiteur indirect dont l'activité est médiée par l'AT plasmatique.

PRINCIPE :

La méthode BIOPHEN Heparin 6 est une méthode cinétique, basée sur l'inhibition d'une quantité constante et en excès de Facteur Xa, par l'héparine (ou autre substance anti-Xa) à doser en présence de l'antithrombine endogène. Le Facteur Xa résiduel hydrolyse un substrat chromogène spécifique (SXa-11) libérant la paranitroaniline (pNA)³. La quantité de pNA libérée (mesurée par Absorbance à 405 nm) est inversement proportionnelle à la concentration d'héparine (ou autre substance anti-Xa) présente dans le milieu réactionnel.

Héparine + AT → AT Hep.]

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

[FXa (résiduel)] + SXa-11 → Peptide + pNA

REACTIFS :

Le volume de reconstitution des réactifs est susceptible de varier suivant l'automate utilisé. Se reporter au guide d'application spécifique pour chaque automate.

R1 Réactif 1: Substrat chromogène spécifique du Facteur Xa (SXa-11), lyophilisé en présence de mannitol.

4 flacons de 6mL (environ 15 mg/flacon).

R2 Réactif 2: Facteur Xa bovin, lyophilisé. Contient du sulfate de Dextran⁴.

4 flacons de 6mL (environ 15 µg/flacon).

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 coffret ayant le même numéro de lot. 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 précaution 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.
- 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.
- Le plasma bovin utilisé pour la préparation du Facteur Xa bovin et de la BSA a été testé par des méthodes enregistrées et est certifié exempt de maladies infectieuses, notamment de l'encéphalopathie spongiforme bovine.
- La concentration de Facteur Xa est ajustée si nécessaire pour chaque lot afin d'obtenir la réactivité et linéarité optimales pour le dosage.
- Faire un blanc plasma si le plasma est icterique, lipémique, hémolysé ou présente une coloration différente des plasmas étalons usuels.
- Quand la méthode cinétique est utilisée, utiliser les ΔDO 405 au lieu des DO 405.
- Pour usage de diagnostic *in vitro*.

R2 H373 : Peut endommager les organes en cas d'exposition prolongée ou répétée.

PREPARATION ET STABILITE DES REACTIFS :

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

Le volume de reconstitution des réactifs est susceptible de varier suivant l'automate utilisé. Se reporter au guide d'application spécifique pour chaque automate.

Pour la méthode manuelle :

R1 Réactif 1: Substrat chromogène spécifique du Facteur Xa (SXa-11).

Reconstituer chaque flacon avec exactement **6 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. Homogénéiser le réactif avant chaque utilisation.

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

- **3 mois** à 2-8°C.
- **7 jours** à température ambiante (18-25 °C).
- **Ne pas congeler.**

R2 Réactif 2: Facteur Xa bovin.

Reconstituer chaque flacon avec exactement **6 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. Homogénéiser le réactif avant chaque utilisation.

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

- **3 mois** à 2-8°C.
- **7 jours** à température ambiante (18-25 °C).
- **Ne pas congeler.**

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.
- 20% d'acide acétique ou 2% d'acide citrique (méthode en point final)
- Solution saline (0,9% NaCl).
- Calibrateurs et contrôles spécifiques avec titration connue, validés contre le Standard International (NIBSC) correspondant, lorsque celui-ci est disponible tels que :

	HNF	HBPM	Orgaran®	Arixtra®
Etalons	222301	222001	222201	222501
Contrôles	223101	223001		
	224101	223801		
	223901	224201	223501	224001
		223701		
		224301		
		224401		

Matériels:

- Spectrophotomètre ou automates pour dosage chromogéniques.
- Tubes plastiques ou microplaques ; Chronomètre ; Pipettes calibrées.

PRELEVEMENTS :

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

Echantillons :

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

Prélèvement :

Le sang (9 volumes) doit être collecté sur du citrate trisodique (1 vol) (0.109M) avec précautions par ponction veineuse franche, afin d'éviter toute activation et libération du facteur 4 plaquettaire. 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.

Centrifugation :

Lors de la surveillance d'un traitement par l'héparine non fractionnée, 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 afin 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 :

- 2 heures à température ambiante (18-25°C)
- 1 mois à -20°C.
- 18 mois à -70°C⁵.

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

PROCEDURE :

Le coffret BIOPHEN Heparin 6 est utilisé en méthode cinétique, automatisée, et peut être également utilisé en méthode manuelle, en « point final ». Le test est réalisé à 37°C et l'intensité de la coloration est mesurée à 405nm.

Selon la méthode utilisée, le test doit être réalisé en se conformant strictement au protocole décrit pour la méthode manuelle, afin d'obtenir une réactivité homogène entre les HNF et les HBPM.

Méthode automatisée :

Les applications sont disponibles sur demande. **Se reporter à l'application spécifique et aux précautions indiquées pour chaque automate.**

Méthode manuelle:

Dans les puits d'une microplaque ou dans un tube plastique incubé à 37°C, introduire:

	Microplaque	Tube plastique
Plasma non dilué	12 µL	30 µL
Eau distillée	36 µL	90 µL
[R1] Substrat Sxa-11 Préincubé à 37°C	80 µL	200 µL
Mélanger et incubé à 37°C, pendant 2-5 minutes puis introduire :		
[R2] Facteur Xa Préincubé à 37°C	80 µL	200 µL
Mélanger et incubé à 37°C pendant exactement,	90 sec.	120 sec.
Arrêter la réaction en introduisant :		
Acide citrique (2%) ou acide acétique (20%)*	100 µL	500 µL
Mélanger et mesurer la densité optique à 405nm contre le blanc correspondant.		

*La couleur jaune obtenue est stable pendant 2 heures.

Le blanc échantillon est obtenu par mélange des réactifs dans l'ordre inverse de celui du test : Acide Citrique (2%), facteur Xa, substrat Sxa-11, eau distillée, plasma non dilué.

Mesurer la densité optique à 405 nm. La valeur du blanc mesurée doit être soustraite de l'absorbance obtenue 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 :

Les coffrets d'étalons spécifiques couvrant la zone de test dynamique sont disponibles chez HYPHEN BioMed (Voir paragraphe REACTIFS ET MATERIEL REQUIS MAIS NON FOURNIS) et peuvent être utilisés pour générer la courbe de calibration.

Le dosage BIOPHEN Heparin 6 permettant d'obtenir une réactivité homogène pour les HNF et les HBPM, un étalonnage unique, réalisé avec le **BIOPHEN Heparin Calibrator (#222001)**, peut être utilisé pour les dosages de HNF et de HBPM (5 concentrations allant de 0 à 1,45 UI/mL au minimum).

Le **BIOPHEN Orgaran® Calibrator (# 222201)** doit être utilisé pour les dosages de Danaparoiide de Sodium (Orgaran®) (5 concentrations allant de 0 à 1,45 UI/mL au minimum).

Le **BIOPHEN Arixtra® Calibrator (# 222501)** doit être utilisé pour les dosages d'Arixtra® (Fondaparinux) (4 concentrations allant de 0 à environ 1,35 µg/mL au minimum).

Si un étalon spécifique pour les HNF est toutefois nécessaire, le **BIOPHEN UFH Calibrator (#222301)** (5 concentrations allant de 0 à 1.15 UI/mL au minimum) est disponible.

En utilisant une échelle semi-logarithmique:

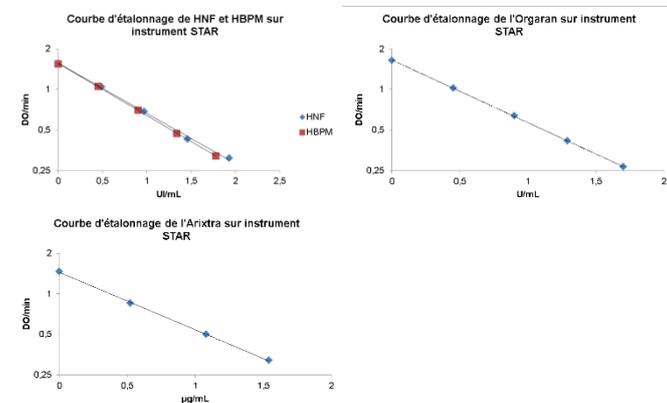
La courbe est linéaire jusqu'à 1,50 UI/mL anti-Xa pour HNF.

La courbe est linéaire jusqu'à 2,00 UI/mL anti-Xa pour HBPM.

La courbe est linéaire jusqu'à 1,60 µg/mL anti-Xa pour Arixtra®.

La courbe est linéaire jusqu'à 1,75 UI/mL anti-Xa pour Orgaran®.

Les courbes d'étalonnage ci-dessous, obtenues avec les étalons HNF, HBPM, Arixtra® et Orgaran® sont indiquées à titre d'exemple seulement. Seule la courbe d'étalonnage générée pour la série de dosages en cours 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 d'étalonnage 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 :

- La concentration d'héparine (ou autre molécule) dans l'échantillon à doser est déduite directement de la courbe de d'étalonnage.
- Les résultats sont exprimés en Unités internationales d'activité anti-Xa par mL (UI/mL) pour les héparines, en µg/mL pour l'Arixtra® ou en UI/mL pour l'Orgaran®.
- Les résultats doivent être interprétés selon l'état clinique et biologique 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 plasma présentant un coagulum ou des signes de contamination doit être rejeté.
- L'activation du sang, durant le prélèvement et la préparation du plasma, peut être source de libération de Facteur 4 plaquettaire (PF4). Le PF4 est un inhibiteur de l'héparine. L'optimisation du dosage a été réalisée de façon à minimiser toute interférence de molécules anti-héparine présentes dans le plasma et particulièrement celle du PF4.
- Aucun effet significatif sur le dosage des héparines n'est observé pour des taux de bilirubine < 0,1 mg/mL, d'hémoglobine < 2 mg/mL et de triglycérides < 1,25 mg/mL ajoutés aux plasmas. De fortes concentrations d'hémoglobine et de triglycérides peuvent fausser les résultats.
- Si la concentration d'AT dans le plasma testé est < 50%, la concentration des héparines, de l'Arixtra® ou de l'Orgaran® peut être sous-estimée par défaut d'AT (le déficit en AT est à confirmer par un dosage d'AT). Utiliser alors une variante en apportant de l'AT exogène. Un taux élevé d'AT (> 150%) est susceptible d'interférer dans le dosage. Un taux élevé d'AT (> 150%) est susceptible d'interférer dans le dosage, en mimant la présence de faibles quantités d'héparine.
- Une sous estimation de la concentration en héparine et une résistance à l'héparine ont été rapportées chez certains patients présentant une amyloïdose®.

VALEURS ATTENDUES :

Pour une efficacité optimale des traitements par l'héparine, minimisant les risques thromboemboliques et hémorragiques, le taux d'héparine mesuré doit se situer dans la zone thérapeutique définie par le fabricant pour l'indication concernée^{7,8,9}.

Les résultats doivent être interprétés selon l'état clinique et biologique du patient.

PERFORMANCES :

Le seuil de détection est de 0,05 UI/mL pour les héparines (ou environ 0,05 µg/mL pour l'Arixtra® et 0,05 UI/mL pour l'Orgaran®)

Exemple de performances obtenues avec des plasmas surchargés en HNF, HBPM, ou Arixtra®

Echantillons	Intra-essai CV (%) ACL-7000 (IL)	n	Inter-essais CV% ACL-7000 (IL)	n
HNF niveau 1 (0,38 UI/mL)	2,1	15	2,0	20
HNF niveau 2 (0,74 UI/mL)	1,0	15	2,3	20
HBPM niveau 3 (0,88 UI/mL)	0,9	15	1,5	20
HBPM niveau 4 (1,32 UI/mL)	0,5	15	1,6	20
HBPM niveau 1 (0,25 UI/mL)	2,3	15	1,9	20
HBPM niveau 2 (0,50 UI/mL)	1,4	15	2,1	20

Echantillons	Intra-essai CV(%) ACL-7000 (IL)	n	Inter-essais CV% (STA-R (Stago) / ACL-7000 / Manuel)	n
Arixtra® niveau 1 (0,44 µg/mL)	3,5	20	4,4	9
Arixtra® niveau 2 (1,18 µg/mL)	2,1	20	3,0	9

REFERENCES :

- Hemker HC and Beguin S. The mode of action of heparin In-vitro and in-vivo. Adv Exp Med Biol (1992).
- Leslie B et al. Investigation of the anticoagulant mechanism of a covalent antithrombin-heparin complex J Biol Chem (2000).
- Marlowe CK et al. Design synthesis and structure activity relationship of a series of arginine aldehydes factor Xa inhibitors. Part 1: structure based on the (D)-Arg-Gly-Arg tripeptide sequence. Bioorg Med Chem Lett (2000).
- 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 Hemost (1987).
- Woodhams B et al. Stability of coagulation proteins in frozen plasma. Blood Coag Fibrinolysis. (2001).
- Christiansen J and Lindqvist B. Heparin resistance in amyloidosis. Acta Med Scand (1967).
- Holm HA et al. Heparin assays and bleeding complication in deep venous thrombosis with particular reference retroperitoneal bleeding. Thromb Haemost (1985).
- Shannon M et al. Treatment of venous thromboembolism. Thromb Haemost (1999).
- Castellone DD and Van Cott EM. Laboratory monitoring of new anticoagulants. Am.J.Hematol (2010).

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.