



BIOPHEN™ Heparin LRT

REF 221011 R1 R2 4 x 7,5 mL

REF 221013 R1 R2 3 x 3 mL

REF 221015 R1 R2 4 x 5 mL

Méthode chromogène anti-Xa pour le dosage de l'Héparine et de ses analogues, et des inhibiteurs directs du FXa, avec réactifs liquides prêts à l'emploi.

Français, dernière révision : 04-2023

UTILISATION:

Le coffret BIOPHEN™ Heparin LRT est une méthode chromogène anti-Xa pour la détermination quantitative *in vitro* de l'héparine et de ses analogues, dans le plasma humain citraté, en utilisant une méthode manuelle ou automatisée. Cette méthode convient pour le dosage du Rivaroxaban, de l'Apixaban et de l'Edoxaban, inhibiteurs directs du Facteur Xa (FXa). Cette méthode convient également pour le dosage de l'activité anti-Xa de l'Arixtra® (Fondaparinux) et de l'Orgaran® (Danaparoiide Sodique), inhibiteurs indirects dont l'activité est médiée par l'antithrombine (AT) plasmatique. Les réactifs sont sous forme liquide prête à l'emploi (LRT, Liquid reagent Technology).

RESUME ET EXPLICATION:

Technique :

L'héparine est un polysaccharide sulfaté, de forte affinité pour l'antithrombine (AT). Complexé à l'héparine, l'AT devient un inhibiteur rapide et puissant des sérines estérases de la coagulation : IXa, Xa, XIa, XIIa et thrombine^{1,2}. Les Héparines de Bas Poids Moléculaire (HBPM), et les analogues de l'héparine, tels que le Danaparoiide Sodique, inhibent plus efficacement le FXa que la thrombine. Les dosages anti-Xa sont donc des méthodes de choix pour mesurer les héparines et leurs analogues^{2,9}. Le BIOPHEN™ Heparin LRT est une méthode chromogène anti-Xa développée pour déterminer de façon homogène héparines non fractionnées (HNF) et HBPM, en utilisant une courbe de calibration unique. Cette méthode est aussi utile pour la détermination de l'activité anti-Xa de l'Orgaran® (Danaparoiide Sodique) et de l'Arixtra® (Fondaparinux), inhibiteurs indirects dont l'activité est médiée par l'AT plasmatique, et pour la détermination des inhibiteurs anti-Xa directs (Rivaroxaban, Apixaban et Edoxaban), en utilisant des étalonnages spécifiques.

Clinique :

Les anticoagulants de type héparines (HNF et HBPM) sont actuellement utilisés à titre curatif ou préventif. Un traitement anticoagulant alternatif (Orgaran® et Arixtra®) peut être utilisé dans des cas spécifiques. La mesure de la concentration de ces médicaments dans le plasma des patients permet le suivi thérapeutique et l'ajustement du dosage du médicament.

Le Rivaroxaban, l'Apixaban et l'Edoxaban sont des anticoagulants oraux directs (DOACs) utilisés pour les mêmes indications. Bien que le dosage chez les patients traités ne soit pas nécessaire, la mesure dans le plasma humain peut s'avérer utile dans certains cas, en particulier en cas de chirurgie d'urgence ou de suspicion de surdosage (risque hémorragique).

PRINCIPE:

La méthode BIOPHEN™ Heparin LRT est un dosage chromogène en une étape basé sur l'inhibition d'une quantité constante et en excès de FXa, par l'héparine (ou autre substance anti-Xa) à doser, en présence d'AT endogène. Le FXa résiduel hydrolyse un substrat chromogène spécifique (SXA-11) libérant la paranitroaniline (pNA)³. La quantité de pNA libérée (mesurée par l'absorbance à 405 nm) est inversement proportionnelle à la concentration d'héparine (ou autre substance anti-Xa) présente dans le milieu réactionnel.

Héparine et analogues:

Héparine + AT → [AT Hep.]

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

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

Rivaroxaban / Apixaban / Edoxaban (DiXal)

[DiXal] + [FXa (excès)] → [FXa-DiXal] + [FXa résiduel]

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

REACTIFS:

R1 Réactif 1 : Substrat chromogène spécifique du Facteur Xa (SXA-11), sous forme liquide. Contient du Proclin.

R2 Réactif 2 : Facteur Xa bovin, sous forme liquide. Contient de la BSA, du sulfate de Dextran⁴ et de faibles quantités d'azide de sodium (0,9 g/L).

REF 221011 → R1 R2 4 flacons de 7,5 mL.

REF 221013 → R1 R2 3 flacons de 3 mL.

REF 221015 → R1 R2 4 flacons de 5 mL.

MISE EN GARDE ET AVERTISSEMENTS:

- Certains réactifs de ce coffret contiennent des produits d'origine animale. Ces réactifs d'origine biologique doivent être manipulés avec les précautions d'usage s'agissant de produits potentiellement infectieux.
- L'azide de sodium peut générer des composants explosifs au contact des canalisations en plomb ou en cuivre.
- 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.
- Ce dispositif de diagnostic *in vitro* est destiné à une utilisation professionnelle en laboratoire.

PREPARATION DES REACTIFS:

R1 R2 Réactif prêt à l'emploi, homogénéiser et charger directement sur l'automate en suivant les instructions du guide d'application.

Pour la méthode manuelle, laisser stabiliser pendant 30 min à température ambiante (18-25°C), homogénéiser avant utilisation.

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 La stabilité du réactif après ouverture, sous réserve de toute contamination ou d'évaporation, conservé fermé est de :

- 6 mois à 2-8°C.

HYPHEN BioMed

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

- 14 jours à température ambiante (18-25°C).
- Ne pas congeler.
- Stabilité à bord de l'automate : se référer à l'application spécifique.

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).
- Solution saline (0,9% NaCl).
- Optionnel : Tampon Tris-NaCl-EDTA, pH 7,85 (AR032A/K), tampon de dilution spécial réduisant les interférences à l'héparine dans les dosages d'inhibiteurs directs du FXa.
- Etalons et contrôles spécifiques avec titration connue, tels que :

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

	Rivaroxaban gamme standard / basse	Apixaban gamme standard / basse	Edoxaban gamme standard / basse
Etalons	222701 / 226001	226201 / 226101	226501 / 226401
Contrôles	224501 / 225101	225301 / 225201	225501 / 225401

Se référer également au guide d'application spécifique de l'automate utilisé.

Matériels:

- Spectrophotomètre, ou automates pour dosage chromogène.
- Chronomètre, Pipettes calibrées, tubes pour tests en plastique ou en verre silicé 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 Dipyrindamole), 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-A5¹⁰ pour plus d'informations concernant le prélèvement, la manipulation et la conservation).

Pour la conservation des plasmas, se référer aux références^{10, 11, 12, 13}.

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 (Méthode manuelle) :

1. Reconstituer les étalons et contrôles comme indiqué dans la notice spécifique.

2. Diluer les échantillons, étalons (afin de préparer la courbe de calibration) et contrôles dans la solution saline, comme décrit dans le tableau ci-dessous :

Produits	Référence Etalons	Référence Contrôles	Dilution dans la solution saline
HBPM	222001	223001 / 223801 / 224201 / 223701 / 224301 / 224401	1/2
HNF	222301	223101 / 224101 / 223901	1/2
Arixtra®	222501	224001	1/2
Orgaran®	222201	223501	1/2
Produits	Référence Etalons	Référence Contrôles	Dilution dans la solution saline ou AR032A/K
Rivaroxaban gamme standard	222701	224501	1/10
Rivaroxaban gamme basse	226001	225101	1/3
Apixaban gamme standard	226201	225301	1/15
Apixaban gamme basse	226101	225201	1/3
Edoxaban gamme standard	226501	225501	1/10
Edoxaban gamme basse	226401	225401	1/2

Réaliser la gamme de calibration et la tester rapidement avec les contrôles de qualité, pour une performance optimale. Les échantillons dilués doivent être testés rapidement, 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:

	Héparines Orgaran® Arixtra®		Rivaroxaban Apixaban Edoxaban
	Microplaque	Volume	Volume
Plasmas à tester, contrôles ou étalons dilués.	30 µL	100 µL	100 µL

R1	Substrat SXa-11 Préincubé à 37°C	75 µL	250 µL	250 µL
Mélanger et incubé à 37°C, pendant 2 minutes puis introduire :				
R2	Facteur Xa Préincubé à 37°C	75 µL	250 µL	250 µL
Mélanger et incubé à 37°C exactement :				
		60 sec	60 sec	120 sec
Arrêter la réaction en introduisant :				
	Acide citrique (2%)*	100 µL	350 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%), R2, R1, plasma 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.

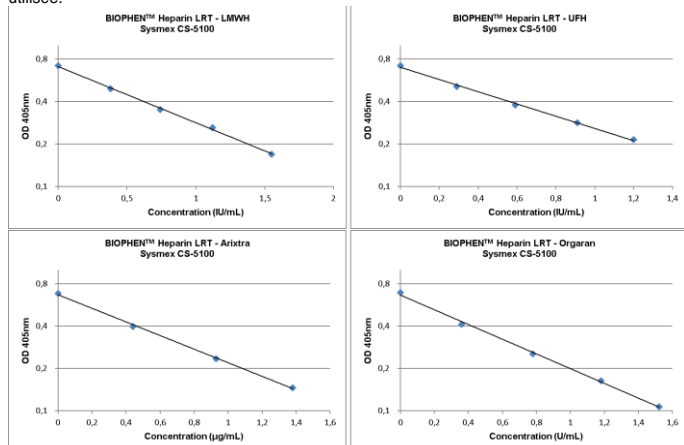
Le dosage du Rivaroxaban, de l'Apixaban et de l'Edoxaban (gamme standard) peut être réalisé par méthode cinétique en mesurant le changement d'absorption entre 10 et 35 secondes après l'addition du FXa (soit DDO405). Dans ce cas il n'est pas nécessaire de soustraire le blanc échantillon, ni d'arrêter la réaction.

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.

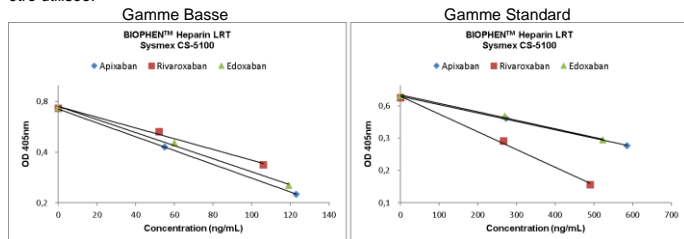
CALIBRATION:

Le test BIOPHEN™ Heparin LRT peut être calibré pour le dosage de différents analytes anti-Xa : Héparines et analogues, Rivaroxaban, Apixaban, Edoxaban. Les kits contenant des étalons plasmatiques spécifiques à ces analytes et couvrant la zone de calibration sont disponibles chez HYPHEN BioMed (Voir paragraphe REACTIFS ET MATERIEL REQUIS MAIS NON FOURNIS) et peuvent être utilisés pour générer la courbe de calibration spécifique de l'analyte testé.

Héparine, Arixtra®, Orgaran® : 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.



Apixaban / Rivaroxaban / Edoxaban : 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 étalon, en portant en ordonnées la DO à 405 nm et en abscisses la concentration :
 - Rivaroxaban gamme basse, Edoxaban gamme standard, Arixtra®, Orgaran®, HNF et HBPM, utiliser une échelle Lin-Log (concentration – DO).
 - Rivaroxaban gamme standard, Apixaban et Edoxaban gamme basse, utiliser une échelle Lin-Lin (concentration – DO).
- Quand la méthode cinétique est utilisée, utiliser les DDO 405 au lieu des DO 405.
- La concentration d'héparine (ou autre molécule anti-Xa) dans l'échantillon à doser est déduite directement de la courbe de calibration, si 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 sont exprimés en Unités Internationales par mL (UI/mL) pour l'héparine, en UI/mL pour l'Orgaran®, en µg/mL pour l'Arixtra® ou en ng/mL pour le Rivaroxaban, l'Apixaban et l'Edoxaban.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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 de protocole en apportant de l'AT exogène. Un taux élevé d'AT (> 150%) est susceptible d'interférer dans le dosage.
- Un échantillon fortement concentré peut être dilué dans un pool de plasmas normaux.
- Une sous estimation de la concentration en héparine et une résistance à l'héparine ont été rapportées chez certains patients présentant une amyloïdose⁵.
- Lors de l'utilisation d'une courbe unique (HNF et HBPM), bien s'assurer que l'instrument et l'application utilisés permettent une superposition acceptable entre les calibrations HNF et HBPM.
- En cas d'administration de l'andexanet alfa comme antidote, il est signalé que les tests d'activité anti-FXa disponibles sur le marché ne sont pas adaptés à la mesure de l'activité anti-FXa^{14,15}. Lors de ces tests, l'inhibiteur du FXa se dissocie de l'andexanet alfa. Des niveaux d'activité anti-FXa élevés sont ainsi détectés de façon erronée et, par conséquent, une sous-estimation substantielle de l'activité de réversion de l'andexanet alfa. Les données utilisant le test BIOPHEN™ Heparin LRT n'ont pas été établies.

VALEURS ATTENDUES:

Les médicaments anti-Xa sont absents du plasma normal. Pour une efficacité optimale des traitements, minimisant les risques thromboemboliques et hémorragiques, le taux d'héparine mesuré doit se situer dans la zone thérapeutique définie par chaque fabricant pour l'indication concernée^{7,8,11}.
La zone normale, la zone thérapeutique et la zone de risque hémorragique (en fonction du médicament) doivent être définies conformément aux recommandations locales en vigueur.

PERFORMANCES:

- La limite basse et la zone de mesure dépendent du système analytique utilisé.**
- Pour la gamme standard, la zone de calibration va d'environ 0 à 600 ng/mL de Rivaroxaban/Edoxaban/Apixaban.
- Pour la gamme basse, la zone de calibration va d'environ 0 à 100 ng/mL de Rivaroxaban et d'environ 0 à 120 ng/mL d'Apixaban/Edoxaban.
- La zone de calibration va d'environ 0 à 1,50 UI/mL de HNF, 0 à 1,75 UI/mL de HBPM, 0 à 1,60 µg/mL d'Arixtra® et 0 à 1,75 UI/mL d'Orgaran®.
- La réaction enzymatique est rapide, et permet ainsi d'obtenir une sensibilité optimale pour ce dosage.
- Les études de performances ont été réalisées en interne sur CS-series. Les performances ont été évaluées avec les contrôles du laboratoire sur au minimum 10 séries et au moins une répétition pour chaque niveau de contrôle. Les résultats suivants sont obtenus :

Echantillon	n	Intra essai			Inter essais			
		Moy.	CV%	SD	N	Moy.	CV %	SD
HNF niveau 1	10	0,19 IU/mL	2,8	0,01	20	0,20 IU/mL	5,7	0,01
HNF niveau 2	10	0,56 IU/mL	0,9	0,01	20	0,57 IU/mL	1,3	0,01
HBPM niveau 3	10	0,78 IU/mL	1,0	0,01	20	0,80 IU/mL	1,1	0,01
HBPM niveau 4	10	1,22 IU/mL	0,6	0,01	20	1,18 IU/mL	1,2	0,02
Rivaroxaban	30	317 ng/mL	0,9	2,80	20	310 ng/mL	1,2	3,60
Rivaroxaban Low	30	81 ng/mL	0,7	0,54	22	85 ng/mL	4,1	3,51
Apixaban	30	207 ng/mL	1,2	2,53	20	212 ng/mL	2,6	5,58
Apixaban Low	30	85 ng/mL	1,2	0,98	20	84 ng/mL	2,2	1,82
Edoxaban	40	314 ng/mL	0,9	2,82	120	306 ng/mL	1,5	4,68
Edoxaban Low	40	85 ng/mL	1,8	0,70	120	86 ng/mL	3,8	3,22
Orgaran®	10	1,00 U/mL	0,5	0,01	20	1,00 U/mL	0,9	0,01
Arixtra®	10	1,18 µg/mL	0,6	0,01	20	1,19 µg/mL	0,6	0,01

- Corrélation avec une autre méthode (LCMS :MS vs BIOPHEN™ Heparin LRT, Edoxaban) :
System CS-5100 : n = 144 y = 0,98x + 2,43 r = 0,998
- Pour les autres molécules, se référer également au guide d'application spécifique de l'automate utilisé.
- Interférences : Se référer au guide d'application spécifique de l'automate utilisé.

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).
- 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).
- Gray E. et al. Heparin and low-molecular-weight heparin. Thromb Haemost. (2008)
- CLSI Document H21-A5: "Collection, transport, and processing of blood specimens for testing plasma-based coagulation assays and molecular hemostasis assays: approved guideline". (2008).
- Douxflis J, et al. Non-VKA Oral Anticoagulants: Accurate Measurement of Plasma Drug. BioMed Research International. (2015).
- Mauge L and Alhenc-Gelas M. Stabilité pré-analytique des paramètres de la coagulation: revue des données disponibles. Ann Biol Clin. (2014)
- Birri N et al. Stability of low molecular weight heparin anti-factor Xa activity in citrated whole blood and plasma. Br J Haematol (2011).
- Commercial anti-FXa activity assays are unsuitable for measuring anti-FXa activity following administration of andexanet alfa. European Medicine Agency [Internet]. 2020 Jun [cited 2020 Jun 17]. Available from <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/dhpc/ondexxya-andexanet-alfacommercial-anti-fxa-activity-assays-are-unsuitable-measuring-anti-fxa>
- Tomoda H. et al. Andexanet Alfa for Bleeding with Factor Xa Inhibitors. NEngl J Med. (2019).

SYMBLES:

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

R1 H317 : Peut provoquer une allergie cutanée.

Changements par rapport à la précédente version.