

# BIOPHEN™ HEPARIN Anti-IIa (kinetics)

REF 221020

Dosage de l'héparine, et de ses analogues, en milieu purifié, par méthode cinétique/compétitive chromogénique anti-IIa

POUR LA RECHERCHE UNIQUEMENT.

NE PAS UTILISER DANS LES PROCÉDURES DE DIAGNOSTIC.



www.hyphen-biomed.com

155, rue d'Eragny  
95000 NEUVILLE SUR OISE  
FRANCE  
Tel. : +33 (0)1 34 40 65 10  
Fax : +33 (0)1 34 48 72 36  
info@hyphen-biomed.com

Dernière révision 07-2020

## UTILISATION:

Le coffret BIOPHEN™ HEPARIN Anti-IIa (kinetics) est une méthode cinétique chromogénique anti-IIa proposée pour la détermination de la concentration d'héparine, et de ses analogues, de 0 à 6 UI/ml, en méthode manuelle ou automatisée. Cette méthode est proposée pour tester l'héparine en milieu purifié. **ELLE N'EST PAS APPROPRIÉE POUR TESTER DU PLASMA.** Ce coffret est à usage de recherche uniquement et ne doit pas être utilisé pour le diagnostic ou le traitement du patient.

## PRINCIPE DU TEST:

Le coffret BIOPHEN™ HEPARIN Anti-IIa (kinetics) est basé sur une méthode cinétique/compétitive chromogénique anti-IIa, développée pour mesurer les héparines non fractionnées (HNF) en milieu purifié.

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 ses analogues, comme le Danaparoiide® Sodique, inhibent plus fortement le Facteur Xa que la Thrombine. Les dosages anti-IIa sont les méthodes de choix pour la mesure de l'activité anti-thrombine des larges molécules d'héparine.

La méthode BIOPHEN™ HEPARIN Anti-IIa (kinetics) est un dosage cinétique/compétitif, basé sur l'inhibition d'une quantité constante et en excès de Thrombine (IIa), par l'héparine à doser, en présence d'antithrombine exogène, et l'hydrolyse simultanée d'un substrat chromogène spécifique de la Thrombine, par la Thrombine résiduelle, qui clive 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)] + IIa-Subs. → Peptide + pNA

## REACTIFS:

**R1** Antithrombine humaine (AT III), lyophilisée:

2 flacons (chaque flacon est à reconstituer par 5 mL d'eau distillée).

**R2** Substrat chromogénique spécifique de la Thrombine, lyophilisé en présence de mannitol.

2 flacons (chaque flacon est à reconstituer par 10 mL d'eau distillée).

**R3** Thrombine humaine, lyophilisée:

2 flacons (chaque flacon est à reconstituer par 10 mL d'eau distillée).

**R4** Tampon réactionnel (Tris-NaCl-Na<sub>2</sub>EDTA pH 8.40), contenant 1% d'Albumine Sérique Bovine (BSA).

2 flacons d'environ 20 ml, prêts à l'emploi.

### Note:

• Chaque poche de plasma humain, utilisée dans la préparation de la thrombine et de l'antithrombine purifiées, provient d'un donneur sain. Pour chaque plasma utilisé, la présence de l'antigène HBs, des anticorps anti-VIH1, anti-VIH2 et anti-VHC a été recherchée, au moyen de méthodes homologuées, et a été trouvée négative. Néanmoins, aucun test ne permet d'exclure totalement la présence d'agents infectieux. C'est pourquoi ces produits doivent être manipulés et éliminés avec toutes les précautions requises pour l'utilisation de produits potentiellement infectieux.

• Le plasma bovin utilisé pour la préparation de la BSA a été testé par des méthodes enregistrées et est certifié exempt de maladies infectieuses, notamment de l'encéphalopathie spongiforme bovine. Toutefois, aucune méthode ne permettant d'exclure totalement le risque d'agent pathogène, ces produits doivent être manipulés avec toutes les précautions requises pour l'utilisation de produits potentiellement infectés.

• La concentration de thrombine et antithrombine humaines est ajustée pour chaque lot de manière à obtenir la réactivité optimale dans le dosage.

## CONSERVATION:

Les réactifs non encore utilisés doivent être conservés à 2-8 °C, dans leur coffret d'origine. Ils sont alors stables jusqu'à la date d'expiration indiquée sur l'étiquette.

## PREPARATION ET STABILITE DES REACTIFS:

### R1 Antithrombine humaine (AT III)

Reconstituer chaque flacon par exactement 5 mL d'eau distillée. Bien agiter lors de la reconstitution (vortex) jusqu'à totale dissolution du contenu. Laisser stabiliser la solution à température ambiante (18-25°C) pendant 30 minutes, en agitant de temps en temps.

Bien homogénéiser avant toute utilisation.

La stabilité de l'antithrombine reconstituée, conservée dans son flacon d'origine, et sous réserve de toute contamination ou évaporation, est de :

- 15 jours à 2-8°C.
- 3 jours à température ambiante (18-25°C).
- 6 mois congelée à -20°C ou moins.

### R2 Substrat chromogène spécifique de la Thrombine.

Reconstituer chaque flacon par exactement 10 mL d'eau distillée. Bien agiter lors de la reconstitution (vortex) jusqu'à totale dissolution du contenu. Laisser stabiliser la solution à température ambiante (18-25°C) pendant 30 minutes, en agitant de temps en temps.

Bien homogénéiser avant toute utilisation.

La stabilité du substrat reconstitué, conservé dans son flacon d'origine, et sous réserve de toute contamination ou évaporation, est de :

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

### R3 Thrombine humaine

Reconstituer chaque flacon par exactement 10 mL d'eau distillée. Bien agiter lors de la reconstitution (vortex) jusqu'à totale dissolution du contenu. Laisser stabiliser la solution à température ambiante (18-25°C) pendant 30 minutes, en agitant de temps en temps.

Bien homogénéiser avant toute utilisation.

La stabilité de la thrombine reconstituée, conservée dans son flacon d'origine, et sous réserve de toute contamination ou évaporation, est de :

- 15 jours à 2-8°C.
- 3 jours à température ambiante (18-25°C).
- 6 mois congelée à -20°C ou moins.

### R4 Tampon réactionnel à pH 8.40

Flacon d'environ 20 ml prêt à l'emploi.

Stabilité après ouverture dans le flacon d'origine :

- 1 mois à 2-8°C.
- 7 jours à température ambiante (18-25°C).

sous réserve de contamination extérieure.

## Précautions :

Pour assurer une bonne stabilité des réactifs, refermer les flacons après usage avec leurs bouchons respectifs.

Manipuler les réactifs avec les précautions d'usage afin d'éviter toute contamination. Si le substrat jaunit, ceci indique la présence d'une contamination. Il doit être rejeté et un nouveau flacon doit être utilisé.

### Note:

- Les flacons **R1**, **R2** et **R3** sont lyophilisés sous vide. Retirer délicatement le bouchon de lyophilisation, pour s'affranchir de toute perte du produit à l'ouverture du flacon.
- Suivant la méthode automatique utilisée, les réactifs peuvent être reconstitués avec des volumes différents de ceux indiqués. Dans tous les cas, les rapports respectifs de chaque réactif, préconisés dans la méthode manuelle (concentration finale dans le milieu réactionnel et volume total), doivent être respectés.
- Utiliser uniquement les réactifs d'un même lot de coffrets. Ne pas mélanger les réactifs de différents lots de coffrets pour réaliser un dosage. Les réactifs sont optimisés pour chaque lot de coffrets.

## REACTIFS NECESSAIRES MAIS NON FOURNIS:

### Réactifs:

- Eau distillée.

- Acide acétique (20%) ou 2% acide citrique (méthode en point final).
- Sérum physiologique (9g/L NaCl), et sérum physiologique contenant 1% de BSA (et/ou 1% de PEG6000).
- Matériel de référence pour héparine (USP, Standards Internationaux du NIBSC, références internes...); alternativement calibrateurs et contrôles HNF lyophilisés en milieu purifié du commerce, titrés en activité anti-IIa.

#### Matériels:

- Spectrophotomètre ou automates pour dosages chromogéniques.
- Chronomètre.
- Pipettes calibrées

#### ETALONNAGE :

En utilisant le matériel de référence Héparine, préparer une courbe d'étalonnage d'Héparine en sérum physiologique (NaCl 9g/L) contenant 1% de BSA, comme suit :

Héparine (IU/ml):	0.0	0.5	1.0	2.0	4.0	6.0
-------------------	-----	-----	-----	-----	-----	-----

#### PROCEDURE :

Le coffret BIOPHEN™ HEPARIN Anti-IIa (kinetics) 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 évaluée 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 pour l'héparine.

#### Méthode manuelle:

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

	Microplaque	Tube plastique
Référence ou solution d'héparine testée.	20 µl	100 µl
<b>R1</b> Antithrombine (200 µg/ml)	20 µl	100 µl
<b>R4</b> Tampon réactionnel	100 µl	500 µl
<b>R2</b> Substrat Thrombine	40 µl	200 µl
Mélanger et incubé à 37°C, pendant 2-3 minutes puis introduire :		
<b>R3</b> Thrombine humaine Préincubée à 37°C	40 µl	200 µl
Mélanger et incubé à 37°C pendant exactement,	5 minutes.	5 minutes.
Arrêter la réaction en introduisant :		
Acide citrique (20g/L)	80 µl	400 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 (20g/l), thrombine, substrat thrombine, tampon, antithrombine et solution héparinée.

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

#### Méthode automatisée :

Des adaptations sur les divers automates présents sur le marché (STA-R, etc...) sont disponibles sur demande. Le volume de reconstitution des réactifs est susceptible de varier suivant l'instrument utilisé. Se reporter à l'adaptation spécifique et aux précautions indiquées pour chaque automate.

**Nota:** Suivant les méthodes, sauf adaptation dûment validée, si des volumes plus ou moins importants doivent être utilisés, respecter très exactement le rapport des volumes et des concentrations des différents réactifs constituant le milieu réactionnel, de façon à conserver une réactivité homogène.

#### CONTRÔLE DE QUALITE :

L'utilisation de contrôles de qualité permet de valider la courbe d'étalonnage et la réactivité homogène du dosage pour les HNF, dans les différentes séries, pour un même lot de réactifs.

**Nota:** Une nouvelle courbe d'étalonnage doit être effectuée à chaque changement de lot de réactifs, après toute maintenance importante d'un analyseur, et lorsque les résultats des Contrôles de Qualité ne sont pas dans les valeurs annoncées pour la méthode. Chaque laboratoire peut établir son propre domaine d'acceptation, en fonction des protocoles et des instruments utilisés.

#### RESULTATS:

Pour la méthode manuelle, en point final, tracer la droite étalon en coordonnées Lin-Log, en portant en ordonnées la DO à 405nm (Log) et en abscisses les concentrations d'Héparine (0 à 6 UI/ml) correspondantes (Lin).

Alternativement, un logiciel spécifique peut être utilisé pour établir la courbe dose réponse. Une relation semi-log inverse est obtenue entre les concentrations d'héparine et les valeurs d'absorbance (DO à A405nm). Tracer la courbe d'étalonnage obtenue.

Calculer la valeur du "r<sup>2</sup>". La calibration est acceptable si :

$$r^2 \geq 0.98$$

Habituellement, les valeurs de DO à 405nm obtenues sont de l'ordre d'environ 2,0 (2,00 ± 0,20) pour la concentration 0 UI/ml d'Héparine, à environ 0,80 (0,80 ± 0,20) pour la concentration 6 UI/ml d'Héparine en méthode manuelle en tube. A titre indicatif, en méthode microplaque, on attend environ 1,50 (1,50 ± 0,20) pour la concentration 0 UI/ml d'Héparine, à environ 0,60 (0,60 ± 0,20) pour la concentration 6 UI/ml d'Héparine

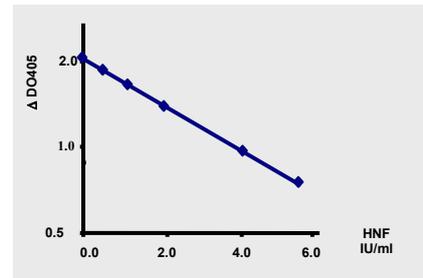
Les DO405 obtenues peuvent varier selon le type d'instrument et l'adaptation utilisés.

Déduire la concentration d'Héparine de l'échantillon testé par lecture directe sur la courbe de calibration réalisée (concentration correspondant à la valeur de DO à 405nm mesurée), ou en utilisant le logiciel.

**Les résultats obtenus doivent être utilisés à des fins de recherche uniquement et ne sont pas utilisables pour le diagnostic ou le traitement du patient.**

#### EXEMPLE DE COURBE D'ETALONNAGE OBTENUE:

La courbe d'étalonnage ci-dessous est indiquée à titre d'exemple seulement, en méthode manuelle (tube). Seule la courbe d'étalonnage générée pour la série de dosages en cours doit être utilisée.



#### CARACTERISTIQUES:

Cette méthode cinétique/compétitive est basée sur l'action inhibitrice simultanée de l'ATIII (en excès) complexée à l'héparine (facteur limitant) sur la thrombine, et la protéolyse du substrat spécifique de la thrombine, par la thrombine résiduelle.

La concentration du substrat est ajustée afin d'obtenir une zone de mesure de 0.0 à 6.0 UI/ml d'héparine.

Cette approche permet de tester des concentrations d'héparine en solution jusqu'à 6.0 UI/ml, sans nécessiter d'étape de dilution supplémentaire.

#### LIMITE DE DETECTION:

≤ 0.20 UI/ml

#### APPLICATIONS:

Dosage de l'activité spécifique anti-IIa de l'héparine et de ses analogues, en milieu purifié, par méthode cinétique/compétitive.

#### REFERENCES:

1. Leslie B et al. Investigation of the anticoagulant mechanism of a covalent antithrombin-heparin complex J Biol Chem 52 (273): 34730-34736 (1999).

#### 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.