

# CE BIOPHEN HEPARIN (LRT) Ref A221011 (4 x 7.5ml)



Measurement of heparin, and heparin like anticoagulants, using an anti-Xa chromogenic method, designed with ready to use liquid reagents  
For in vitro diagnostic use only

Last revision: 16/07/2010

### **INTENDED USE:**

The Biophen Heparin (LRT) kit is a chromogenic assay for measuring the concentration of heparin, and heparin like anticoagulants, in human citrated plasma using automatic or manual method. This assay is characterized by that all the reagents are in the liquid presentation.

### **CLINICAL BACKGROUND:**

Heparin and heparin like anticoagulants are currently used for curative or preventive indications. Measuring the heparin concentration in patients' plasma allows monitoring the therapy and adjusting drug dosage.

### **TEST PRINCIPLE:**

Biophen Heparin (LRT) is a chromogenic anti-Xa method developed for measuring homogeneously heparin (UFH) and Low Molecular Weight Heparin (LMWH), using the same calibration curve, provided that the application used allows this superimposition.

Heparin is a sulphated polysaccharide with an high affinity for antithrombin (AT). When complexed with heparin, antithrombin exhibits a fast acting and potent inhibitory activity for coagulant serine esterases: IXa, Xa and thrombin. LMWH, and heparin analogues, such as Sodium Danaparoid, inhibit more efficiently Factor Xa than thrombin. Anti-Xa assays are then the methods of choice for measuring heparins and their analogues.

They are also useful for the determination of anti-Xa activity of Arixtra® (Fondaparinux), mediated by plasma AT.

Biophen Heparin (LRT) is a kinetics method based on the inhibition of a constant amount of factor Xa, by the tested heparin (or other anti-Xa substance) in presence of endogenous antithrombin, and hydrolysis of a Factor Xa specific chromogenic substrate (SXA-11), by the factor Xa in excess. pNA is then released from the substrate. The amount of pNA released is then a relation of the residual factor Xa activity. There is an inverse relationship between the concentration of heparin and color development, measured at 405 nm.

Heparin + AT → [AT Hep.]  
[AT Hep.] + [FXa (excess)] → [FXa-AT-Hep.] + [residual FXa]  
[FXa (residual)] + SXa-11 → Peptide + pNA

### **REAGENTS SUPPLIED:**

#### **R1: Reagent 1:**

Chromogenic substrate specific for factor Xa (SXA-11), liquid form.  
4 vials of 7.5ml.

#### **R2: Reagent 2:**

Bovine Factor Xa, liquid form.  
4 vials of 7.5ml.

#### **Note:**

- This assay was designed for minimizing the interference of anti-heparin substances in plasma, and especially that of PF4.
- Bovine Factor Xa was prepared from bovine plasma, which was tested for the absence of infectious agents, and collected from animals free from BSE. However, no test may totally exclude the absence of infectious agents. As any product of bovine origin, this factor Xa must be used with all the cautions required for handling a material potentially infectious.
- The bovine Factor Xa concentration is adjusted for each lot for providing the right reactivity in the assay.
- Sodium azide (<1g/L) is used as preservative, and may react with lead and copper plumbing to form highly explosive metal azides. Flush with large volumes of water when discarding into a sink.
- Reagents are not interchangeable from lot to lot. Use only reagents from a same kit lot for testing heparin.

### **REAGENTS REQUIRED BUT NOT PROVIDED:**

#### **Reagents:**

- Distilled water.
- Acetic acid (20%) or 2% citric acid (end point method).
- Physiological Saline (0.9% NaCl).
- Specific Plasma Calibrators with a known concentration of UFH, LMWH or Sodium Danaparoid, duly validated against an International Standard (NIBSC), or of Arixtra® (Fondaparinux).
- Specific Control plasmas for LMWH, UFH, Sodium Danaparoid® or Arixtra® (Fondaparinux).

### **Materials:**

- Spectrophotometer or automatic instrument for chromogenic assays.
- Stopwatch; Calibrated pipettes.

### **STORAGE CONDITIONS:**

Unopened reagents, must be stored at 2–8 °C, in their original packaging box. They are then stable until the expiration date printed on the label.

### **PREPARATION AND STABILITY OF REAGENTS:**

Note: Refer to each specific instrument adaptation.

#### **REAGENT 1: Factor Xa specific chromogenic substrate SXa-11**

(brown vial).

Ready to use.

Let to homogenize for 30 minutes at room temperature (18-25 °C), before use.

Homogenize before each use.

Stability of the substrate, open and kept in its original vial, and provided that any contamination or evaporation is avoided during use:

- 6 months at 2-8°C.
- 14 days at room temperature (18-25°C).
- Do not freeze.

#### **REAGENT 2: Factor Xa**

(Clear vial)

Ready to use.

Let to homogenize for 30 minutes at room temperature (18-25 °C), before use.

Homogenize before each use.

Stability of FXa, open and kept in its original vial, and provided that any contamination or evaporation is avoided during use:

- 6 months at 2-8°C.
- 14 days at room temperature (18-25°C).
- Do not freeze.

**Cautions:** In order to improve stability, reagents must be closed with their original screw cap following each use. Reagents must be handled with care, in order to avoid any contamination during use. If the substrate becomes yellow, this indicates presence of a contaminant. It must be rejected, and a new vial must be used. Incubating the reconstituted vials allows stabilising the reagents, and obtaining a homogeneous reactivity.

#### **Note:**

- According to the automated method used: in any case, the established reactive ratios (respective reagent concentrations in the reactive milieu) between factor Xa and its substrate must be strictly respected.
- Use only reagents from kits with a same lot number. Do not use reagents from kits with different lots when running the assay. Reagents R1 and R2 are optimized for each lot of kits.

### **PREPARATION OF PLASMA:**

Blood (9 volumes) must be collected on 0.109 M citrate anticoagulant (1 volume), with great care, in order to avoid activation and PF4 release. Sampling must be performed through a net venipuncture, and the first drops must be discarded. Specific collection tubes for heparin testing, such as the CTAD (Citrate, Theophylline, Adenosine and Dipyridamole) tubes, can be used. They improve specimen stability.

- Within 1 hour, blood must be centrifuged at 3,000 g for 20 min at 18°C or below, and plasma decanted into a plastic tube, using a plastic pipette.
- Storage of plasma:
  - Up to 2 hours at 20°C
  - Up to 1 month frozen at –20°C or below (before use, thaw for 15 min. in a water bath at 37°C).

Refer to NCCLS/CLSI document H21-A2 for further instructions on specimen collection, handling and storage.



6560 Gove Court • Mason, OH 45040

Phone: 513.770.1991

Toll Free: 866.783.3797

Fax: 513.573.9241

Email: info@aniara.com

www.aniara.com

D.750.02/BI/1011

### TEST PROCEDURE:

The Biophen Heparin (LRT) kit is specifically designed for Kinetics methods, automated on instruments, and can also be used for end point methods. Adaptations on automates are available upon request. The assay is performed at 37°C and the color developed is measured at 405 nm.

Whatever the method used, the assay must be performed according to the scheme reported for the manual method in order to keep an homogeneous reactivity to UFH and LMWH.

#### Manual method:

Into the microwell or the test tube, incubated at 37°C, introduce:

	Microwell	Test Tube
Undiluted plasma	15 µl	50 µl
Physiological saline	15 µl	50 µl
R1: Substrate SXa-11 Preincubated at 37°C	75 µl	250 µl
Mix and incubate at 37°C, for 2 minutes then introduce:		
R2 : Factor Xa Preincubated at 37°C	75 µl	250 µl
Mix and incubate at 37°C for exactly,	60 sec.	60 sec.
Then stop the reaction by introducing		
Citric Acid (20g/L)	100 µl	350 µl
Mix and measure the absorbance at 405nm against the corresponding blank.		

The yellow color is stable for 2 hours.

The sample blank is obtained by mixing the reagents in the reverse order from that of the test i.e.: Citric acid (20g/l), substrate SXa-11, undiluted plasma, physiological saline, factor Xa.

Measure the absorbance at 405 nm. The sample blank value must be deduced from the absorbance measured for the corresponding assay.

#### Automated methods:

Adaptations to the various analysers are available upon request. Refer to each specific adaptation and specific cautions for each instrument.

#### Note:

- If higher or lower reactive volumes than those indicated here above are required for the method used, the same respective proportions between reagent concentrations and volumes used, must be adhered to, in order to maintain the assay performances.
- Run a sample blank in presence of highly lipemic, icteric or haemolysed plasmas, or if the plasmas has a "colour" different from the usual one.

### CALIBRATION:

Biophen Heparin (LRT), offering an homogeneous reactivity to UFH and LMWH, the assay can then be calibrated with the **Biophen Heparin calibrator (#A222001)** for measuring UFH or LMWH (5 concentrations from 0 to 1.6 IU/mL).

For measuring Orgaran® (Sodium Danaparoid), a specific calibrator must be used, **Biophen Orgaran® calibrator (#A22201)** (5 concentrations from 0 to 1.6 IU/mL).

For measuring Arixtra® (Fondaparinux), a specific calibrator must be used, **Biophen Arixtra® calibrator (#A222501)** (4 concentrations from 0 to about 1.5 µg/mL). When a specific calibrator for UFH is required, **Biophen UFH calibrator (#A222301)** is available.

### QUALITY CONTROL:

Use of suitable quality control plasmas allows validating the calibration curve, as well as the homogeneous reactivity of the BIOPHEN Heparin (LRT) assay to UFH and LMWH, from run to run, when using a same lot of reagents. Various types of controls are available:

**Biophen UFH Control** (low range) for UFH (#A223101).

**Biophen LMWH Control** (high range) for LMWH (#A223001).

**Biophen Orgaran® Control** (control for Sodium Danaparoid (Orgaran®)) (#A223501).

**Biophen Arixtra® Control** (control for Fondaparinux (Arixtra®)) (#A224001).

### LIMITATIONS OF THE PROCEDURE:

- Blood activation, during specimen collection and plasma preparation, may release platelet factor 4, which can inhibit heparin.
- No significant interference on heparin determination is observed for bilirubin concentrations <0.1 mg/ml, haemoglobin concentrations <2 mg/ml and triglycerides concentrations <1.25mg/ml added to plasma. High levels of haemoglobin or of triglycerides may affect the results. In order to get the full assay performances, the working instructions must be carefully observed.
- If the AT concentration in the tested plasma is <50%, heparin can be underestimated as the result of lack of AT. Arixtra® anti-Xa activity being mediated by AT, Arixtra® can also be underestimated as the result of a lack of AT. A variant protocol, with an exogenous source of AT, must then be used. Associating AT determination in patient's plasma can also be useful.
- High ATIII concentrations (> 150%) could interfere with the assay and mimic presence of low amounts of heparin.
- Underestimation of heparin concentration and heparin resistance has been reported in some patients with amyloidosis (6).
- When a unique curve is used (LMWH/UFH), check that the instrument and adaptation used allow a good superimposition of LMWH and UFH calibrations, in the exact test conditions.

- In order to get the optimal assay performances, comply strictly to the procedural instructions.

### RESULTS:

The heparin (or other assayed anti-Xa substance) concentration in the tested specimen is directly deduced from the calibration curve. Results are expressed in anti-Xa International Units/mL (IU/mL), or in µg/mL for Arixtra®.

Using a semi-logarithmic scale:

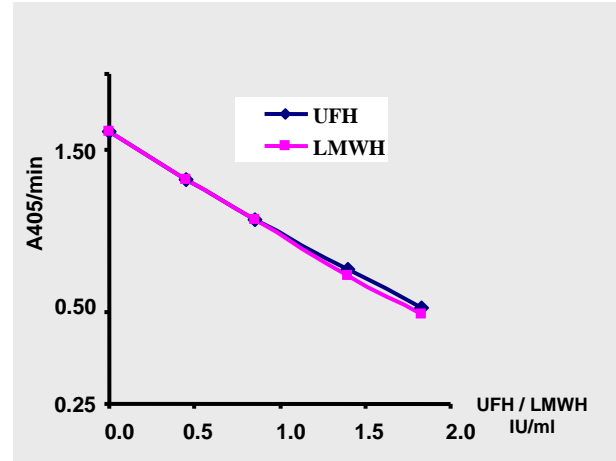
The assay is linear up to 1.0 IU/mL anti-Xa for HNF.

The assay is linear up to 2.0 IU/mL anti-Xa for LMWH.

The assay is linear up to 1.5 µg/mL anti-Xa for Arixtra®.

### EXAMPLE OF CALIBRATION CURVE:

The calibration curves herebelow, obtained with UFH or LMWH on STAR instrument, are indicated as an example only. The calibration curve generated for the series of measures performed must be used.



### QUALITY CONTROL:

The calibration curve is acceptable when the concentrations measured for controls are within the acceptance range.

#### Note:

Include at least one quality control (at different levels) in each series, in order to validate it. A new calibration curve must be carried out for each new batch of reagents, after an important maintenance of the instrument, or if measured values are not in compliance with the one expected.

Each laboratory can define its own acceptance range, according to the protocols and instruments used.

### SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS:

- The enzymatic reaction is rapid, and allows obtaining a high sensitivity for this heparin assay.
- The detection threshold is of 0.05 IU/mL (or about 0.05 µg/ml).
- Example of reproducibility data obtained with plasmas supplemented with UFH, LMWH, using the STA-R instrument (Diagnostica Stago):

Sample	Intra Assay CV%	N	Inter Assay CV%	N
UFH Level 1 (0.21 IU/mL)	8.6	10	8.8	10
UFH Level 2 (0.47 IU/mL)	2.8	10	2.1	10
LMWH Level 3 (0.77 IU/mL)	2.5	10	1.7	10
LMWH Level 4 (1.18 IU/mL)	1.4	10	3.1	8

- The BIOPHEN Heparin LRT assay shows good correlation for heparins assay with BIOPHEN Heparin performed on STA-R instrument :

$$n = 98 \quad Y = 0.985X - 0.031 \quad r^2 = 0.991$$

### EXPECTED VALUES:

For obtaining the right efficacy along with the lowest bleeding risk, heparin dosage must be within the therapeutic range recommended by each drug manufacturer, and for each specific indication.

### REFERENCES:

1. Hemker HC, Beguin S. The mode of action of heparin In-vitro and in-vivo. In: heparin and platelet polysaccharides Plenum Press, New York 221-230 (1992).
2. Holm H A et al. Heparin assays and bleeding complication in deep venous thrombosis with particular reference retroperitoneal bleeding. Thromb Haemostasis 53: 278-281 (1985).
3. Shannon M, Hirsh B and J. Treatment of venous thromboembolism. Thromb Haemostasis vol 82 (2): 870-877 (1999).
4. Leslie B et al. Investigation of the anticoagulant mechanism of a covalent antithrombin-heparin complex J Biol Chem 52 (273): 34730-34736 (1999).
5. Charles K M 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. Bioorganics Med chem Letter 10 (2000): 13-16 (1999).
6. Christiansen J, Lindqvist B. Heparin resistance in amyloidosis. Acta Med Scand, 181(6) : 723-4, 1967.
7. Laboratory monitoring of new anticoagulants", Donna D.Castellone, and Elizabeth M.VanCott, Am.J.Hematol.85:185-187,2010.

# CE BIOPHEN HEPARIN (LRT) Ref A221011 (4 x 7,5ml)

Dosage de l'Héparine, et de ses analogues, par méthode chromogénique anti Xa, avec réactifs liquides prêts à l'emploi

Pour diagnostic in vitro exclusivement



Fabricant: HYPHEN BioMed

Dernière révision : 16/07/2010

## UTILISATION :

Le coffret Biophen Heparin (LRT) est une méthode chromogénique proposée pour la détermination de l'héparine, et de ses analogues, dans le plasma humain citraté, en utilisant une méthode anti-Xa, manuelle ou automatisée. L'ensemble des réactifs est sous forme liquide prête à l'emploi.

## INTERET CLINIQUE :

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.

## PRINCIPE :

Le coffret Biophen Heparin (LRT) est basé sur une méthode chromogénique 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, à condition que l'adaptation employée permette cette superposition.

L'héparine est un mucopolysaccharide sulfaté naturel, de forte affinité pour l'antithrombine (AT). 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-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'Arixtra® (Fondaparinux), inhibiteur indirect dont l'activité est médiée par l'AT plasmatique.

La méthode Biophen Heparin (LRT) est un dosage cinétique, basé 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, et l'hydrolyse d'un substrat chromogène spécifique du Facteur Xa (Sxa-11), par le Facteur Xa résiduel, qui clive le pNA de ce substrat. La quantité de pNA libérée est fonction de la quantité de Facteur Xa résiduelle. Elle est inversement proportionnelle à la concentration d'héparine 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 :

**R1 : Réactif 1 :** Substrat chromogène spécifique du Facteur Xa (Sxa-11), sous forme liquide.

**4 flacons de 7,5ml.**

**R2 : Réactif 2 :** Facteur Xa bovin, sous forme liquide.

**4 flacons de 7,5ml.**

## Nota:

- 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.
- Le plasma bovin utilisé pour la préparation du Facteur Xa 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 du Facteur Xa est ajustée pour chaque lot de manière à obtenir la réactivité optimale dans le dosage.
- Les réactifs contiennent de faibles quantités d'azide de sodium (<1 g/l de NaN<sub>3</sub>), qui peuvent générer des composants explosifs au contact des canalisations en plomb ou en cuivre. Pour éviter ce risque, effectuer des lavages intensifs.
- Les réactifs ne sont pas interchangeables de lot à lot. Utiliser uniquement les réactifs d'un même lot pour réaliser le dosage.**

## REACTIFS NECESSAIRES MAIS NON FOURNIS :

### Réactifs:

- Eau distillée.
- Acide acétique (20%) ou 2% acide citrique (méthode en point final).
- Sérum physiologique (0.9% NaCl).
- Plasmas de calibration spécifiques à taux connus de HNF, HBPM ou Danaparoiide® de Sodium, étalonnés par rapport au Standard International (NIBSC), ou d'Arixtra® (Fondaparinux).
- Plasmas contrôles spécifiques HBPM, HNF, Danaparoiide® de Sodium, ou d'Arixtra® (Fondaparinux).

## Matériels :

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

## 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 :

**Nota : Se reporter à l'adaptation spécifique pour chaque automate.**

## REACTIF 1 Substrat chromogène spécifique du Facteur Xa (Sxa-11).

(Flacon brun). Prêt à l'emploi Laisser stabiliser la solution à température ambiante (18-25°C) pendant 30 minutes, avant utilisation.

Homogénéiser avant chaque utilisation.

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

- 6 mois à 2-8°C.
- 14 jours à température ambiante (18-25°C).
- Ne pas congeler.

## REACTIF 2 : Facteur Xa bovin

(Flacon clair). Prêt à l'emploi Laisser stabiliser la solution à température ambiante (18-25°C) pendant 30 minutes, avant utilisation.

Homogénéiser avant chaque utilisation.

La stabilité du FXa déjà ouvert, conservé dans son flacon d'origine et sous réserve de contamination ou d'évaporation, est de :

- 6 mois à 2-8°C.
- 14 jours à température ambiante (18-25°C).
- Ne pas congeler.

**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. La stabilisation des flacons à température ambiante avant utilisation permet d'obtenir une réactivité homogène.

## Nota:

- Suivant la méthode automatique utilisée, sauf validation spécifique, les rapports respectifs de chaque réactif, R1 et R2, 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 R1 et R2 sont optimisés pour chaque lot de coffrets.

## PREPARATION DES PLASMAS :

Le sang (9 volumes) doit être collecté sur du citrate trisodique 0.109M (1 vol.) par ponction veineuse franche en évitant toute activation. Rejeter les premières gouttes de sang. Centrifuger, dans l'heure qui suit, le prélèvement 20 minutes à 3000g, à une température inférieure ou égale à 18°C. Le plasma citraté doit être décanté dans un tube plastique. Des tubes à prélèvement spécifiques pour le dosage de l'héparine, comme les tubes CTAD (Citrate, Theophylline, Adénosine et Dipyridamole), peuvent être utilisés. Ils améliorent la stabilité du prélèvement.

## Conservation du plasma :

- 2 heures à 20°C
- 1 mois congelé à -20°C ou moins (avant utilisation, décongeler le plasma pendant 15 min. dans un bain marie à 37°C).

Note : se référer aux recommandations du GEHT ou du NCCLS/CLSI pour toute instruction complémentaire sur la collecte, le traitement et le stockage des échantillons.

D.750.01/BI/1011



6560 Gove Court · Mason, OH 45040

Phone: 513.770.1991

Toll Free: 866.783.3797

Fax: 513.573.9241

Email: info@aniara.com

www.aniara.com

## PROCEDURE :

Le coffret Biophen Heparin (LRT) est utilisé en méthode cinétique, automatisée, et peut être également utilisé en méthode manuelle, en « point final ». Les adaptations sur automates sont disponibles sur demande. 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 entre les HNF et les HBPM.

### Méthode manuelle :

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

	Microplaque	Tube plastique
Plasma non dilué	15 µl	50 µl
Sérum physiologique	15 µl	50 µl
R1: Substrat Sxa-11	75 µl	250 µl
Préincubé à 37°C		
Mélanger et incubé à 37°C, pendant 2 minutes puis introduire :		
R2 : Facteur Xa	75 µl	250 µl
Préincubé à 37°C		
Mélanger et incubé à 37°C pendant exactement,	60 sec.	60 sec.
Arrêter la réaction en introduisant :		
Acide citrique (20g/L)	100 µl	350 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), substrat Sxa-11, plasma non dilué, sérum physiologique, facteur Xa.

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

### Méthode automatisée :

Les adaptations sur les divers automates présents sur le marché sont disponibles sur demande. **Se reporter à l'adaptation spécifique et aux précautions indiquées pour chaque automate.**

#### Nota:

- Suivant les méthodes, 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.
- Faire un blanc plasma si le plasma est icterique, lipémique, hémolysé ou présente une coloration différente des plasmas étalons.

## ETALONNAGE :

Le réactif BIOPHEN Heparin (LRT), permettant d'obtenir une réactivité homogène pour les HNF et les HBPM, un étalonnage unique, réalisé avec le **BIOPHEN Heparin Calibrator (#A222001)**, peut être utilisé pour les dosages de HNF et de HBPM (5 concentrations allant de 0 à 1.6 IU/ml).

Le **Biophen Orgaran® Calibrator (# A222201)** doit être utilisé pour les dosages de Danaparoiide de Sodium (Orgaran®) (5 concentrations allant de 0 à 1.6 IU/mL).

Le **Biophen Arixtra® Calibrator (# A222501)** doit être utilisé pour les dosages d'Arixtra® (Fondaparinux) (4 concentrations allant de 0 à environ 1.5 µg/ml).

Si un calibrateur spécifique pour les HNF est toutefois nécessaire, le **Biophen UFH Calibrator (#A222301)** est disponible.

## CONTRÔLE DE QUALITE :

L'utilisation de plasmas de contrôle adaptés permet de valider la courbe d'étalonnage et la réactivité homogène du dosage, pour les HNF et les HBPM, dans les différentes séries, pour un même lot de réactifs. Différentes sortes de plasmas de contrôle sont disponibles :

**Biophen UFH Control:** (zone basse) pour les HNF (#A223101).

**Biophen HBPM Control:** (zone élevée) pour les HBPM (#A223001).

**Biophen Orgaran® Control:** (pour le Danaparoiide de Sodium (Orgaran®) (# A223501).

**Biophen Arixtra® Control:** (pour le Fondaparinux (Arixtra®)) (# A224001).

## LIMITES DU DOSAGE :

- 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.
- 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 au plasma. 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 d'héparine peut être sous-estimée par défaut d'AT. L'activité de l'Arixtra étant médiée par l'AT, la concentration d'Arixtra® peut être sous-estimée par défaut d'AT. Utiliser alors une variante en apportant de l'AT exogène. Un dosage d'AT peut également être utile.
- 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.
- Lors de l'utilisation d'une courbe unique (HNF et HBPM), bien s'assurer que l'instrument et l'adaptation utilisés permettent une superposition acceptable des calibrations HNF et HBPM.

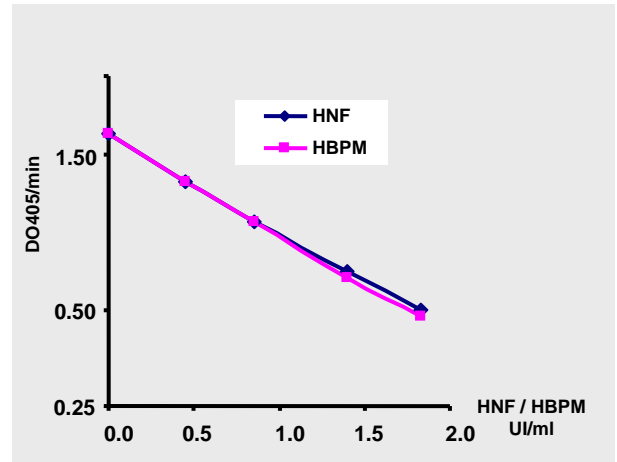
- Pour obtenir les performances optimales du coffret, suivre scrupuleusement les instructions techniques.

## RESULTATS :

La concentration d'héparine (ou autre molécule) dans l'échantillon à doser est déduite directement de la courbe d'étalonnage. Les résultats sont exprimés en Unités internationales d'activité anti-Xa par mL (UI/mL), ou en µg/ml pour l'Arixtra®. En utilisant une échelle semi-logarithmique, le test est linéaire jusqu'à 1.0 UI/mL anti-Xa pour les HNF et 2.0 UI/mL anti-Xa pour les HBPM, et jusqu'à 1.5µg/ml pour l'Arixtra®.

## EXEMPLE DE COURBE D'ETALONNAGE :

Les courbes d'étalonnage ci-dessous, obtenues avec les calibrateurs HNF ou HBPM sur STA-R (Diagnostica Stago), sont indiquées à titre d'exemple seulement. Seule la courbe d'étalonnage générée pour la série de dosages en cours doit être utilisée.



## CONTROLE DE QUALITE :

La courbe d'étalonnage est valide lorsque les concentrations obtenues pour les contrôles entrent dans la zone d'acceptation.

**Nota:** Au moins un contrôle de qualité (à différents niveaux) doit être inclus dans chaque série de dosages, afin de la valider. Une nouvelle courbe d'étalonnage doit être effectuée à chaque changement de lot du réactif, après toute maintenance importante de l'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.

## PERFORMANCES ET CARACTERISTIQUES :

- La réaction enzymatique est rapide, et permet ainsi d'obtenir une sensibilité optimale pour le dosage de l'héparine.
- Le seuil de détection est de 0.05 UI/mL (ou environ 0.05 µg/ml).
- Exemple de reproductibilité obtenue avec des plasmas surchargés en HNF, HBPM, sur STA-R (Diagnostica Stago).

Echantillons	Intra Essai CV (%)	N	Inter Essais CV%	N
HNF niveau 1 (0.21 UI/ml)	8.6	10	8.8	10
HNF niveau 2 (0.47 UI/ml)	2.8	10	2.1	10
HBPM niveau 3 (0.77 UI/ml)	2.5	10	1.7	10
HBPM niveau 4 (1.18 UI/ml)	1.4	10	3.1	8

- Le dosage des héparines avec Biophen Heparin LRT présente une bonne corrélation avec le dosage Biophen Heparin, réalisé sur STAR :  
 $n = 98$   $Y = 0.985 X - 0.031$   $r^2 = 0.991$

## 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.

## REFERENCES :

- Hemker HC, Beguin S. The mode of action of heparin In-vitro and in-vivo. In: heparin and platelet polysaccharides Plenum Press, New York 221-230 (1992).
- Holm H A et al. Heparin assays and bleeding complication in deep venous thrombosis with particular reference retroperitoneal bleeding. Thromb Haemostasis 53: 278-281 (1985).
- Shannon M, Hirsh B and J. Treatment of venous thromboembolism. Thromb Haemostasis vol 82 (2): 870-877 (1999).
- Leslie B et al. Investigation of the anticoagulant mechanism of a covalent antithrombin-heparin complex J Biol Chem 52 (273): 34730-34736 (1999).
- Charles K M 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. Bioorganics Med chem Letter 10 (2000): 13-16 (1999).
- Christiansen J, Lindqvist B. Heparin resistance in amyloidosis. Acta Med Scand, 181(6) : 723-4, 1967.
- Laboratory monitoring of new anticoagulants", Donna D.Castellone, and Elizabeth M.VanCott, Am.J.Hematol.85:185-187,2010.