

BIOPHEN HEPARIN ANTI-IIa (kinetics)

Ref : A221020

Kinetics/competitive method for the measurement of heparin, and heparin like anticoagulants, in buffer, using an anti-IIa chromogenic assay

For in vitro research use only (RUO)

INTENDED USE:

This Heparin Anti-IIa method is a kinetics/competitive chromogenic assay for measuring the concentration of heparin, and heparin like anticoagulants, using an automatic or a manual technique, on heparin concentration ranges from 0.0 to 6.0 IU/ml. This method is to be used only for testing heparin in buffer, or purified systems. **IT IS NOT APPROPRIATE FOR PLASMA.**

TEST PRINCIPLE:

The Heparin Anti-IIa method is a kinetics/competitive chromogenic anti-IIa assay developed for measuring heparin (UFH), in buffers or purified milieu.

Heparin is a sulphated polysaccharide with a high affinity for antithrombin. 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-IIa assays are then the right methods for measuring the anti-thrombin activity of large heparin molecules.

The Heparin Anti-IIa method is a kinetics/competitive method based on the inhibition of a constant amount of Thrombin (IIa), by the tested heparin in presence of exogenous antithrombin, and the simultaneous hydrolysis of a Thrombin specific chromogenic substrate, by remaining active Thrombin. pNA is then released from the substrate. The amount of pNA released is then a relation of the residual Thrombin activity. There is an inverse relationship between the concentration of heparin and color development, measured at 405 nm.

Heparin + AT → [AT Hep.]
[AT Hep.] + [IIa (excess)] → [FIIa-AT-Hep.] + [residual FIIa]
[FIIa (residual)] + IIa-Subs. → Peptide + pNA

REAGENTS SUPPLIED:

The Heparin Anti-IIa kit contains 2 vials of a specific Thrombin substrate, 2 vials of human Antithrombin (AT III), 2 vials of Human Thrombin, and 2 vials of assay reaction buffer.

Reagent 1 (R1):

Human Antithrombin (AT III), lyophilised:
2 vials (each vial to be restored with 5 mL of distilled water).

Reagent 2 (R2):

Chromogenic substrate specific for Thrombin, lyophilized in presence of mannitol.
2 vials (each vial to be restored with 10 mL of distilled water).

Reagent 3 (R3):

Human Thrombin, Lyophilised:
2 vials (each vial to be restored with 10 mL of distilled water).

Reagent 4 (R4):

Assay reaction buffer (Tris-NaCl-Na₂EDTA at pH 8.40), containing 1% BSA. 2 vials of about 20 ml, ready to use.

Note:

- The Human plasma used for the purification of Thrombin and Antithrombin was tested and found negative for HIV antibodies, HBs Ag and HVC antibodies. However, no assay may warrant the total absence of infectious agents. Any product of human origin must then be handled with all the required cautions, as being potentially infectious.
- BSA 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 BSA must be used with all the cautions required for handling a material potentially infectious.
- The Human Thrombin and Antithrombin concentrations are adjusted for each lot for providing the right reactivity in the assay,



Manufactured By: HYPHEN BioMed

Last revision: 15/05/2009

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:

REAGENT 1: Human Antithrombin (AT III)

Reconstitute each vial with exactly 5 mL of distilled water. Shake thoroughly until complete dissolution of the content (vortex). Let to homogenize for 30 minutes at room temperature (18-25 °C), while shaking the vial from time to time. Homogenize the content before each use.

Stability of restored ATIII, provided any contamination or evaporation is avoided, kept in its original vial:

- 15 days at 2-8°C.
- 3 days at room temperature (18-25°C).
- 6 months frozen at -20°C or below.

REAGENT 2: THROMBIN SPECIFIC CHROMOGENIC SUBSTRATE

Reconstitute each vial with exactly 10 mL of distilled water. Shake thoroughly until complete dissolution of the content (vortex). Let to homogenize for 30 minutes at room temperature (18-25 °C), while shaking the vial from time to time. Homogenize the content before each use. Stability of restored substrate, provided any contamination or evaporation is avoided, kept in its original vial:

- 15 days at 2-8°C.
- 3 days at room temperature (18-25°C).
- 6 months frozen at -20°C or below.

REAGENT 3: Human Thrombin

Reconstitute each vial with exactly 10 mL of distilled water. Shake thoroughly until complete dissolution of the content (vortex). Let to homogenize for 30 minutes at room temperature (18-25 °C), while shaking the vial from time to time. Homogenize the content before each use. Stability of restored Thrombin, provided any contamination or evaporation is avoided, kept in its original vial:

- 15 days at 2-8°C.
- 3 days at room temperature (18-25°C).
- 6 months frozen at -20°C or below.

REAGENT 4: Assay Reaction Buffer at pH 8.40

Ready to use vial of 20 ml.

Stability of opened original vial:

- 1 month at 2-8°C.
- 7 days at room temperature (18-25°C).

Provided that no contamination of buffer occurs.

Cautions:

In order to improve stability, reagents must be closed with their original stoppers and screw caps 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.

Note:

- The lyophilized vials (Reagents 1, 2 and 3) are closed under vacuum. Remove carefully the stopper, in order to avoid any lost of powder when opening the vials.
- According to the automated method used, the reagents can be reconstituted with volumes different from those recommended. In any case, the established reactive ratios (respective reagent concentrations in the reactive milieu) between thrombin 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 are optimized for each lot of kits.

D.750.02/BI/1020



8560 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

REAGENTS REQUIRED BUT NOT PROVIDED:

Reagents:

- Distilled water.
- Acetic acid (20%) or 2% citric acid (end point method).
- Physiological Saline (9 g/L NaCl), and physiological saline containing 1% BSA (and/or 1% PEG6000).
- Heparin Reference Material (USP, International Standards from NIBSC, Internal References, etc...); alternatively commercially available lyophilized sets of UFH calibrators and controls in purified milieu, titrated for anti IIa activity.

Materials:

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

Calibration curve:

Using the Heparin reference material, prepare a calibration curve of Heparin in physiological saline (9 g/L NaCl) containing 1 % BSA, as follows:

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

TEST PROCEDURE:

The Heparin Anti-IIa (kinetics) assay is specifically designed for Kinetics/competitive methods, automated on instruments, or used manually with end point methods.

The assay is performed at 37°C and the color developed is measured at 405 nm.

Whether 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 Heparin.

Manual method:

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

	Microwell	Test Tube
Reference or tested Heparin solution.	20 µl	100 µl
Antithrombin (200 µg/ml)	20 µl	100 µl
Assay Reaction Buffer	100 µl	500 µl
Thrombin Substrate	40 µl	200 µl
Mix and incubate at 37°C, for 2-3 minutes then introduce:		
Human Thrombin Preincubated at 37°C	40 µl	200 µl
Mix and incubate at 37°C for exactly,	5 minutes.	5 minutes.
Then stop the reaction by introducing		
Citric Acid (20g/L)	80 µl	400 µl
Mix and measure the absorbance at 405nm against the corresponding blank.		

The yellow color is stable for 2 hours.

The sample blank, when required, is obtained by mixing the reagents in the opposite order from that of the test i.e.: Citric acid (20g/l), Thrombin, Thrombin substrate, reaction buffer, Antithrombin and heparin solution. 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 (STA-R, etc...) are available upon request. Reconstitution volumes are susceptible to vary according to the automate used. Refer to each specific adaptation and specific cautions for each instrument.

Note: Unless an adaptation is duly validated, if higher or lower reactive volumes are required for the method used, the same respective proportions for each reagent concentration, and for the overall reactive volume, must be strictly respected, in order to keep an homogeneous reactivity.

QUALITY CONTROL:

Use of quality controls allows validating the homogeneous reactivity of the assay to UFH, from run to run, when using a same lot of reagents.

Note: 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.

RESULTS:

For the manual end point method, using a lin-log graph paper, plot the heparin concentrations (0.0 to 6.0 IU/ml) on abscissa (Lin), and the corresponding A405 on ordinates (Log). Alternatively, statistics software can be used for establishing the dose response calibration curve. A semi-log inverse linear relationship is obtained between heparin concentrations and Absorbances (A405).

Draw the calibration curve obtained.

Calculate the "r²" value. Calibration is acceptable if:

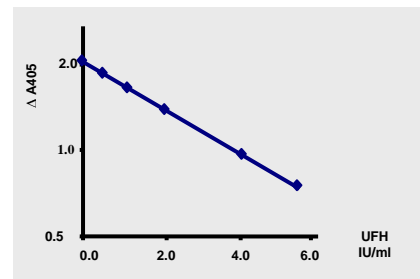
$$r^2 \geq 0.98$$

Usually, when using the manual test tube method, the A405 values range from about 2.00 (2.00 ± 0.20) for the 0.0 IU/ml Heparin concentration, to about 0.80 (0.80 ± 0.20) for the 6.0 IU/ml Heparin concentration. Indicatively, for the microplate method, A405 is expected from about 1.50 (1.50 ± 0.20) for the 0.0 IU/ml Heparin concentration, to about 0.60 (0.60 ± 0.20) for the 6.0 IU/ml Heparin concentration. A405 values can differ according to the instrument application used.

Deduce the heparin concentration for the tested specimen directly from the calibration curve (concentration corresponding to the measured A405), or by using the software.

EXAMPLE OF CALIBRATION CURVE:

The calibration curves herebelow, obtained with UFH, is indicated as an example only, using the manual test tube method. Only the calibration curve generated for the series of measures performed must be used.



CHARACTERISTICS:

This kinetics method is based on the simultaneous inhibitory action of ATIII (in excess) complexed with heparin (limiting factor), which inhibits thrombin, and proteolysis of the specific thrombin substrate by residual thrombin.

The substrate concentration is adjusted in order to allow the obtaining of a dynamic range from 0.0 to 6.0 IU/ml heparin concentration.

This approach permits testing heparin concentrations up to 6.0 IU/ml in the tested solution without requiring any further dilution step.

ASSAY DETECTION LIMIT:

≤ 0.20 IU/ml

APPLICATIONS:

Measurement of the specific anti-IIa activity of heparin and heparin like anticoagulants, in purified milieu, using a kinetics / competitive assay.

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

BIOPHEN HEPARIN ANTI-IIa (kinetics)

Ref : A221020

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

A usage de recherche in vitro exclusivement (RUO)

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.**

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.

Heparine + AT → [AT Hep.]

[AT Hep.] + [IIa (exces)] → [FIIa-AT-Hep.] + [FIIa résiduel]

[FIIa (résiduel)] + IIa-Subs. → Peptide + pNA

REACTIFS:

Reactif 1 (R1):

Antithrombine humaine (AT III), lyophilisée:

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

Reactif 2 (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).

Reactif 3 (R3):

Thrombine humaine, lyophilisée:

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

Reactif 4 (R4):

Tampon réactionnel (Tris-NaCl-Na₂EDTA 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.

ANIARA

Fabricant: HYPHEN BioMed

Dernière révision: 15/05/2009

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:

REACTIF 1: 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.

REACTIF 2: 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.

REACTIF 3: 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.

REACTIF 4: 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.

D.750.01/BI/1020

ANIARA

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

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
Antithrombine (200 µg/ml)	20 µl	100 µl
Tampon réactionnel	100 µl	500 µl
Substrat Thrombine	40 µl	200 µl
Mélanger et incuber à 37°C, pendant 2-3 minutes puis introduire :		
Thrombine humaine Préincubée à 37°C	40 µl	200 µl
Mélanger et incuber 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 dument 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 "r²". La calibration est acceptable si :

$$r^2 \geq 0.98$$

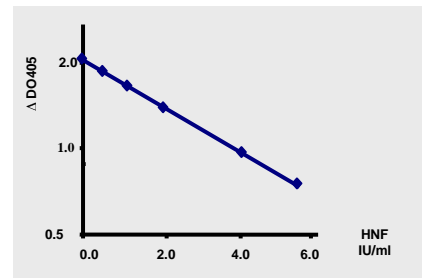
Habituellement, les valeurs de DO à 405nm obtenues sont de l'ordre d'environ 2,0 (2,00 ± 0,20) pour la concentration 0 UI/ml d'Héparine, à environ 0,80 (0,80 ± 0,20) pour la concentration 6 UI/ml d'Héparine en méthode manuelle en tube. A titre indicatif, en méthode microplaque, on attend environ 1,50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

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