

**COATEST® Heparin - 25 5539 63**

**Intended use of the kit**

For the photometric determination of heparin in plasma.

**Measurement principle**

- Heparin + AT (excess) → [Heparin · AT]
- [Heparin · AT] + FXa (excess) → [Heparin · AT · FXa] + FXa (remaining)
- S-2222  $\xrightarrow{\text{FXa}}$  Peptide + pNA

Heparin is analysed as a complex with Antithrombin (AT) present in the sample. The concentration of this complex is dependent on the availability of AT. In order to obtain a more constant concentration of AT, purified AT is added to the test plasma. FXa (in excess) is neutralized in proportion to the amount of heparin, which determines the amount of [Heparin · AT] complex. The remaining amount of FXa hydrolyses the chromogenic substrate S-2222 thus liberating the chromophoric group, pNA. The colour is then read photometrically at 405 nm.

**Reagents**

When kept at 2-8°C the sealed reagents are stable until expiry date printed on the label. Avoid contamination by microorganisms in opened vials.

- S-2222** **1 vial**  
Chromogenic substrate (Bz-Ile-Glu-(g-OR)-Gly-Arg-pNA-HCl) 15 mg with mannitol added as a bulking agent. Reconstitute with 20 mL sterile water to obtain a concentration of 1 mmol/L. The solution is stable for 6 months at 2-8°C.
- Factor Xa** **1 vial**  
Bovine Factor Xa 71 nkat. Reconstitute with 10 mL sterile water. The reconstituted Factor Xa is stable for 1 month at 2-8°C or 6 months at -20°C or below.
- Buffer, stock solution** **1 vial**  
Tris 0.5 mol/L, pH 8.4, 10 mL. An opened vial of stock solution is stable for 2 months at 2-8°C. Before use dilute accordingly: 1 volume of stock solution with 9 volumes of sterile water.
- Antithrombin** **1 vial**  
Lyophilized human Antithrombin, 10 IU. Reconstitute with 10 mL sterile water to obtain a concentration of 1 IU/mL. The reconstituted Antithrombin is stable for 1 month at 2-8°C or 6 months at -20°C or below.
- Normal Plasma (human)** **4 vials**  
Lyophilized plasma. Reconstitute with 1.00 mL sterile water. The reconstituted plasma is stable for two weeks at 2-8°C or 1 month at -20°C or below.

**PRECAUTION AND WARNINGS**

Each donor unit used in the preparation of human source reagent has been tested by FDA approved methods for the presence of Hepatitis B surface antigen and anti-bodies to HIV 1 and 2 and Hepatitis C and found to be negative. However, since no test can completely rule out the presence of these blood borned diseases, the handling and disposal of human source reagents from this product should be made with care.<sup>8</sup>

Hazard class: **none**  
Hazard statements: **none**  
Precautionary statements: **none**

This product is for *in vitro* diagnostic use.  
**Reagents not provided**

- Sterile water
- Acetic acid 20% or citric acid 2%
- NaCl 0.9% (saline)
- Heparin

**Material required but not provided**

- Photometer, 405 nm
- Heating device, 37°C ± 0.2°C
- Calibrated pipettes
- Plastic test tubes
- Semi-micro cuvettes
- Mixer
- Stopwatch
- Centrifuge, 2000 x g

**COATEST® Heparin - 25 5539 63**

**Verwendungszweck**

Zur Messung von Heparin im Plasma.

**Messprinzip**

- Heparin + AT (Überschuß) → [Heparin · AT]
- [Heparin · AT] + FXa (Überschuß) → [Heparin · AT · FXa] + FXa (Rest)
- S-2222  $\xrightarrow{\text{FXa}}$  Peptid + pNA

Heparin wird als Komplex mit dem in der Probe vorhandenen Antithrombin bestimmt. Die Bildung dieses Komplexes ist abhängig von der Verfügbarkeit einer ausreichenden Menge an Antithrombin (AT), weswegen dem Testplasma gereinigtes AT zugefügt wird. Der im Überschuß zugegebene Faktor Xa wird proportional zum vorhandenen [Heparin · AT] Komplex neutralisiert. Der restliche Faktor Xa spaltet vom chromogenen Substrat S-2222 die chromophore Gruppe pNA ab. Die bei 405 nm gemessene pNA Freisetzung ist umgekehrt proportional zum Heparin Gehalt der Probe.

**Reagenzien**

Die verschlossenen Reagenzien sind bei 2-8°C bis zum aufgedruckten Verfalldatum haltbar. Eine Kontamination mit Mikroorganismen ist zu vermeiden.

- S-2222** **1 Flasche**  
15 mg chromogenes Substrat (Bz-Ile-Glu-(g-OR)-Gly-Arg-pNA) und Mannitol als Füllstoff. Mit 20,0 mL sterilem Wasser auf eine Konzentration von 1 mmol/l lösen. Das gelöste Substrat ist bei 2-8°C 6 Monate haltbar.
- Factor Xa** **1 Flasche**  
71 nkat lyophilisierter Faktor Xa vom Rind. Mit 10,0 mL sterilem Wasser lösen. Der gelöste Faktor Xa ist bei 2-8°C 1 Monat oder bei -20°C 6 Monate haltbar.
- Puffer, Konzentrat** **1 Flasche**  
Tris 0,5 mol/l, pH 8,4, 10 mL. Das geöffnete Pufferkonzentrat ist bei 2-8°C 2 Monate haltbar. Vor Verwendung 1 Volumen Puffer mit 9 Volumina sterilem Wasser verdünnen.
- Antithrombin** **1 Flasche**  
10 IE lyophilisiertes humanes Antithrombin. Das gelöste Antithrombin ist bei 2-8°C 1 Monat oder bei -20°C 6 Monate haltbar.
- Normal Plasma** **4 Flaschen**  
Lyophilisiertes humanes Plasma. Mit 1,0 mL sterilem Wasser lösen. Das gelöste Plasma ist bei 2-8°C 2 Wochen oder bei -20°C 1 Monat haltbar.

**ACHTUNG: INFECTIOSRISIKO**

Jede individuelle Blutspende, die zur Herstellung der Reagenzien verwendet wurde, ist mit FDA zugelassenen Methoden auf die Abwesenheit von Hepatitis B Oberflächenantigen und auf Antikörper gegen HIV 1 bzw. 2 und Hepatitis C überprüft. Unabhängig davon sollten alle, aus menschlichen Blut gewonnenen, Proben und Produkte, wie nicht völlig auszuschließender Gefährdung durch Krankheitsreger, als potentiell infektiös angesehen und mit angemessener Sorgfalt gehandhabt werden.<sup>8</sup>

Gefahrenklasse: **keine**  
Gefahrenhinweise: **keine**  
Sicherheitssätze: **keine**

Dieses Produkt ist nur für die *in vitro* Diagnostik geeignet.

**Zusätzlich benötigte Reagenzien**

- Steriles Wasser
- Essigsäure 20% oder Zitronensäure 2%
- NaCl 0,9%
- Heparin (als Standard)

**Zusätzlich benötigte Materialien**

- Photometer mit 405 nm Filter
- Inkubator 37°C ± 0,2°C
- Kalibrierte Pipetten
- Plastikröhrchen
- Halbmikroküvetten
- Vortex Mixer
- Stoppuhr
- Zentrifuge, 2000 x g

**Specimen collection**

Blood (9 volumes) is mixed with 0.1 mol/L sodium citrate (1 volume) and preferably cooled immediately on ice to minimize release of heparin antagonists from blood cells. Centrifuge at 2000 x g for 20 minutes at low temperature and as soon as possible after blood collection. The plasma is stable for 24 hours at 2-8°C or 6 months at -20°C or below.

**Quality Control**

Two levels of heparin controls, calibrated against International Standards, are recommended for a complete quality control program.<sup>9</sup> Each laboratory should establish its own mean and standard deviation and should establish a quality program to monitor laboratory testing. Controls should be analyzed at least once every 8 hour shift in accordance with good laboratory practice. Refer in Westgard et al for identification and resolution for out-of-control situations.<sup>10</sup>

**Procedure**

All conditions included in this package insert are referred to Microplate method and ACL 3000. Detailed instrument settings including instructions for preparation of the reagents for a variety of automated instruments are available on request from Chromogenix.

**Calibration**

A standard curve is required for each new lot of Coatest Heparin. For preparation of the standards, a heparin standard of known concentration must be used (not provided). Two standards (e.g. 0.1 and 0.7 IU/mL) must be included in each test run.

- Preparation of standards  
Use a two-step procedure for dilution of heparin:  
1: Dilute with saline to obtain 10 IU/mL  
2: Make a 100-fold dilution with buffer to obtain 0.1 IU/mL  
The 0.1 IU/mL heparin solution is further diluted according to the table below to obtain different standard concentrations.

Heparin IU/ml plasma	Heparin dilution 0.1 IU/mL $\mu\text{L}$	Buffer working solution $\mu\text{L}$	Human Normal Plasma $\mu\text{L}$	AT $\mu\text{L}$
0.1	100	700	100	100
0.3	300	500	100	100
0.5	500	300	100	100
0.7	700	100	100	100

b)

**Dilution of samples**

Test plasma (kept on ice)	100 $\mu\text{L}$
Antithrombin	100 $\mu\text{L}$
Buffer, working solution	800 $\mu\text{L}$
Mix well	

c) Assay

Add in a plastic tube	Sample	Sample blank
Diluted test plasma or standard	200 $\mu\text{L}$	200 $\mu\text{L}$
Incubate at 37°C (3-4 minutes)		
FXa (20-25°C)	100 $\mu\text{L}$	
Mix and incubate at 37°C for 30 sec		
S-2222 (37°C)	200 $\mu\text{L}$	
Mix and incubate at 37°C for exactly 3 min		
Acetic acid 20% or citric acid 2% 300 $\mu\text{L}$	300 $\mu\text{L}$	
Water		300 $\mu\text{L}$
Mix		

Transfer the content to a semi-micro cuvette and read the absorbance of the sample and the sample blank at 405 nm. The colour is stable for at least 4 hours

**NOTE:** The assay can also be performed in the initial rate mode. Dilute S-2222 with 10 mL sterile water to obtain a concentration of 2 mmol/L. Care should be taken to keep the reaction conditions described above, implicating e.g. proportional volume changes when called for.

**Probensammlung**

9 Teile Blut werden mit 1 Teil 0,1 mol/l Natriumcitrat gemischt und, um die Freisetzung von Heparinantagonisten zu verhindern, vorzugsweise sofort im Eisbad gekühlt. Das Blutsobald wie möglich bei niedriger Temperatur 20 Minuten mit 2000 x g zentrifugieren. Haltbarkeit des Plasmas: 24 Stunden bei 2-8°C oder 6 Monate bei -20°C. Bitte behandeln Sie das Probenmaterial als potentiell infektiös.

**Qualitätskontrolle**

Für ein vollständiges Programm zur Qualitätskontrolle wird empfohlen, Heparinkontrollen, kalibriert gegen Internationale Standards, mit zwei unterschiedlichen Werten einzusetzen.<sup>9</sup> Jedes Labor sollte seine eigenen Mittelwerte und Standardabweichungen festlegen und über ein Programm zur Qualitätskontrolle zur Überwachung von Labortests verfügen. Die Kontrollen sollten entsprechend der "good laboratory practice" mindestens alle acht Stunden gemessen werden. In Westgard et al. finden Sie Hinweise zur Identifizierung und Beseitigung von Fehlerquellen.<sup>10</sup>

**Testdurchführung**

Alle Angaben in diesem Insert beziehen sich auf die Mikrotiterplatten, Manuelle Methode und ACL 3000. Spezielle Automatenadaptionen sind auf Anfrage bei Chromogenix erhältlich.

**Kalibrierung**

Bei jeder neue Charge Coatest Heparin muß eine Standardkurve erstellt werden. Für die Standardverdünnungen wird ein Heparinpräparat (nicht im Kit enthalten) mit bekannter Konzentration, gemäß unten stehender Angabe verdünnt. Bei jedem Testansatz sollten zwei Kontrollen mitgeführt werden (z.B. 0,1 und 0,7 IE/mL).

- Herstellung der Standardverdünnungen  
Die Heparinausgangslösung wird in zwei Schritten verdünnt.  
1. Heparinpräparat mit isotoner Kochsalzlösung auf eine Konzentration von 10 IE/mL verdünnen.  
2. Diese Verdünnung mit Puffer 100-fach auf eine Konzentration von 0,1 IE/mL verdünnen.  
Der Standard mit 0,1 IE/mL wird anschließend gemäß folgender Tabelle verdünnt:

Heparin IE/mL Plasma	Heparin-standard 0,1 IE/mL $\mu\text{L}$	Puffer Arbeits-lösung $\mu\text{L}$	Humanes Normal Plasma $\mu\text{L}$	AT $\mu\text{L}$
0,1	100	700	100	100
0,3	300	500	100	100
0,5	500	300	100	100
0,7	700	100	100	100

b)

**Probenverdünnung**

Testplasma (auf Eis)	100 $\mu\text{L}$
Antithrombin	100 $\mu\text{L}$
Puffer Arbeitslösung	800 $\mu\text{L}$

c) Testansatz

In Plastikröhrchen pipettieren	Probe	Leerwert
Verdünntes Testplasma oder Standard	200 $\mu\text{L}$	200 $\mu\text{L}$
Bei 37°C 3-4 Minuten inkubieren		
Faktor Xa (20-25°C)	100 $\mu\text{L}$	
Mischen und bei 37°C 30 Sekunden inkubieren		
S-2222 (37°C)	200 $\mu\text{L}$	
Mischen und bei 37°C genau 3 Minuten inkubieren		
Essigsäure 20% oder Zitronensäure 2%	300 $\mu\text{L}$	300 $\mu\text{L}$
Wasser		300 $\mu\text{L}$
Mischen		

Die Probenabsorption in einer Halbmikroküvette innerhalb von 4 Stunden bei 405 nm gegen den Probenleerwert messen.

**Anmerkung**

Die Farbentwicklung kann auch kinetisch gemessen werden. Dazu wird das Substrat S-2222 mit 10,0 mL sterilem Wasser auf eine Konzentration von 2 mmol/l gelöst und die oben angegebenen Reaktionsbedingungen einschließlich proportionaler Volumensänderungen genau eingehalten.

**Recogida de muestras**

La sangre (9 volúmenes) se mezcla con 0,1 mol/l de citrato sódico (1 volumen) y, preferentemente, se enfria inmediatamente en hielo para minimizar la liberación de antagonistas de heparina de las células sanguíneas. Centrifugar a 2000 x g durante 20 minutos a baja temperatura y lo más pronto posible tras la recogida de sangre. El plasma es estable durante 24 horas a 2-8°C o durante 6 meses a -20°C o menos.

**Control de calidad**

Se recomiendan dos niveles de control de heparina para, calibrada frente a patrones internacionales, un programa completo de control de calidad.<sup>9</sup> Cada laboratorio debe establecer su propia media y su desviación estándar, y debe adoptar un programa de control de calidad para vigilar las pruebas de laboratorio. Los controles deben analizarse por lo menos una vez en cada turno de ocho horas, de acuerdo con las buenas prácticas de laboratorio. Consultar a Westgard et al para la identificación y solución de las situaciones de pérdida de control.<sup>10</sup>

**Procedimiento**

Todos los comentarios incluidos en este inserto son referidos a las técnicas en microplacas y ACL 3000. Es posible solicitar a Chromogenix los ajustes detallados de los instrumentos y las instrucciones de preparación de los reactivos para diversos instrumentos automáticos.

**Calibración**

Se necesita una curva estándar para cada kit con nuevo número de lote de Coatest Heparina. Hay que utilizar un control de heparina de concentración conocida para la preparación de los controles (no suministrado). Se deben incluir dos controles (es decir, 0,1 y 0,7 UI/mL) cada vez que se realice la técnica.

- Preparación de los controles  
Seguir un procedimiento de dos etapas para la dilución de la heparina:  
1: Diluir con salino para obtener 10 UI/mL  
2: Efectuar una dilución de 100 veces con tampón para obtener 0,1 UI/mL  
La solución de heparina de 0,1 UI/mL se diluye a continuación según la tabla adjunta para obtener las diferentes concentraciones de control.

Plasma Heparina UI/mL	Dilución heparina 0,1 UI/mL $\mu\text{L}$	Tampón Solución de trabajo $\mu\text{L}$	Plasma Humano Normal $\mu\text{L}$	AT $\mu\text{L}$
0,1	100	700	100	100
0,3	300	500	100	100
0,5	500	300	100	100
0,7	700	100	100	100

b)

**Dilución de las muestras**

Plasma muestra (preservada en hielo)	100 $\mu\text{L}$
Antitrombina	100 $\mu\text{L}$
Tampón, solución de trabajo	800 $\mu\text{L}$
Mezclar bien	

c) Técnica

Añadir en un tubo de plástico	Muestra	Blanco de muestra
Plasma muestra diluido o control	200 $\mu\text{L}$	200 $\mu\text{L}$
Incubar a 37°C (3-4 min)		
FXa (20-25°C)	100 $\mu\text{L}$	
Mezclar e incubar a 37°C durante 30 seg		
S-2222 (37°C)	200 $\mu\text{L}$	
Mezclar e incubar a 37°C durante 3 min exactamente		
Acido acético al 20% o ácido cítrico al 2%	300 $\mu\text{L}$	300 $\mu\text{L}$
Agua		300 $\mu\text{L}$
Mezclar		

Transferir el contenido a una semi-microcubeta y leer la absorbancia de la muestra y el blanco de muestra a 405 nm. El color es estable al menos durante 4 horas.

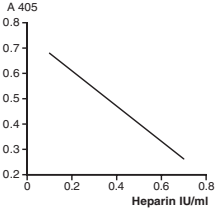
**NOTA:** La técnica también se puede llevar a cabo en el modo de tasa inicial. Diluir el S-2222 con 10 mL de agua destilada para obtener una concentración de 2 mmol/L. Las condiciones de reacción descritas anteriormente deben observarse con cuidado, lo cual implica los cambios proporcionales de volumen cuando sean necesarios.

**ENGLISH - Insert revision 02/2015**

**Results**

Subtract the respective blank activities for the standards from their absorbances (A) at 405 nm. Plot the corrected A for the standards against their concentrations of heparin on a linear graph paper. Read the heparin value for the corresponding A for the unknown sample from the standard curve after due correction for the sample blank activities.

**Standard Curve**



**Limitations of the procedure**

In some pathological states, plasma alone may hydrolyze the chromogenic substrate S- 2222. This interference can be determined by substituting FXa with an equal volume of buffer.

**Expected results**

To obtain an optimal effect with minimum risk of bleeding or thromboembolic complications the heparin activity should be in the range recommended by the manufacturer.

**Performance Characteristics**

**Precision**

Coefficient of variation (CV) between series is 2.6% and within series 2.3% at the 0.7 IU/mL level.

**Detection Limit**

The assay allows detection of 0.05 IU/mL of heparin.

**Measuring Range**

At heparin concentrations above 0.7 IU/mL, dilute the sample 1:5 with Human Normal Plasma. Multiply the obtained result by 5. Accurate blood sampling and plasma treatment is a prerequisite for valid determination of heparin levels below 0.2 IU/mL.

**Sensitivity: System**

ACL 3000  $\Delta$ Abs per 1IU/mL of Heparin activity 6.2 Abs

**Accuracy**

When comparing the Coatest Heparin assay with Activated Partial Thromboplastin Time (APTT) assay, in patients undergoing heparin therapy (N=25) and heparin administration in healthy volunteers (N=40), the correlation coefficient obtained were 0.90 and 0.91 respectively.

**Specificity**

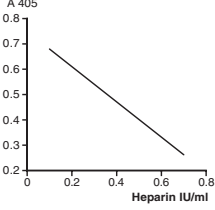
No drug interference has been reported. The present method is less sensitive to heparin antagonists (platelet factor 4) than APTT and thrombin time methods. Teien et al. (2) found the present method insensitive to FDP levels in pathological plasmas.

**DEUTSCH - Beipackzettel Version 02/2015**

**Berechnung und resultate**

Die Leerwertabsorption der Standards von deren Absorption (A) abziehen. Diese korrigierten Absorptionen werden gegen die Heparinkonzentration der Standards auf Millimeterpapier aufgetragen. Die Heparinkonzentration der Proben in IE/mL wird anhand der Probenabsorption (abzüglich der Leerwertabsorption) von dieser Standardkurve abgelesen.

**Standardkurve**



Um eine optimale Wirkung mit minimalem Blutungsrisiko oder Thrombo-embolischer Komplikationen zu erreichen sind die vom Heparinhersteller empfohlenen Aktivitätsbereiche einzuhalten.

**Untere nachweisgrenze**

Die Nachweisgrenze des Tests ist 0,05 IE/mL.

**Linearität**

Bei Heparinkonzentrationen über 0,7 IE/mL, wird die Probe 1:5 mit Normalplasma verdünnt und der so erhaltene Wert mit 5 multipliziert. Eine korrekte Probenabnahme und Handhabung ist bei Plasmen mit einer Heparinkonzentration unter 0,2 IE/mL besonders wichtig.

**Sensitivität: System**

ACL 3000  $\Delta$ Abs per 1 IU/mL Heparin Aktivität: 6.2 Abs

**Spezifität und störsubstanzen**

## COATEST® Heparin - 25 5539 63

**Utilisation prévue de la trousse**

Détermination colorimétrique de l'héparine dans le plasma.

**Principe de la mesure**

- Heparin + AT (en excès) → [Heparine · AT]
- [Heparine · AT] + FXa (en excès) → [Heparine · AT · FXa] + FXa (résiduel)

- S-2222 →<sup>FXa</sup>→ Peptide + pNA

L'Héparine est dosée sous sa forme complexée à l'antithrombine (AT). La concentration de ce complexe dépendant de la concentration en antithrombine, on ajoute un excès d'AT à l'échantillon pour être à concentration constante. Une partie du Facteur Xa ajouté en excès est neutralisé par le complexe [Héparine · AT]. Le FXa résiduel hydrolyse le substrat S-2222 en libérant le groupement pNA dont la quantité est inversement proportionnelle à l'activité de l'Héparine. La réaction est mesurée au spectrophotomètre 405 nm.

**Reactifs**

Avant l'ouverture, les réactifs sont stables à 2-8°C jusqu'à la date de péremption. Éviter la contamination par les microorganismes après l'ouverture.

- S-2222** **1 flacon**

Substrat chromogène lyophilisé 15 mg (Bz-Ile-Glu(g-OR)-Gly-Arg-pNA-HCl) excipient mannitol. Reconstituer par 20 ml d'eau stérile. Concentration: 1 mmol/l. Stabilité 6 mois à 2 et 8°C.
- Facteur Xa** **1 flacon**

Facteur Xa bovin 71 nkat. Reconstituer par 10 ml d'eau stérile. Stabilité 1 mois à 2-8°C ou 6 mois -20°C.
- Tampon solution mère** **1 flacon**

Tris 0,5 mol/l, pH 8,4, 10 ml. Stabilité 2 mois à 2-8°C. Dilution extemporanée: 1 volume de tampon pour 9 volumes d'eau stérile.
- Antithrombine** **1 flacon**

Antithrombine humaine lyophilisée, 10 UI. Reconstituer par 10,0 ml d'eau stérile. Concentration: 1 UI/ml. Stabilité: 1 mois à 2-8°C ou 6 mois à -20°C.
- Plasma normal humain** **4 flacons**

Plasma lyophilisé. Reconstituer par 1,00 ml d'eau stérile. Stabilité: 2 semaines à 2-8°C, 1 mois à -20°C.

**ATTENTION**

Chaque unité provenant d'un donneur et utilisée pour la préparation d'un réactif d'origine humaine a été testée selon des méthodes approuvées par la FDA pour la recherche des anticorps anti VIH 1 et 2 et anti HCV et de l'antigène HBS. Cette recherche s'est révélée négative. Néanmoins, étant donné qu'aucun test ne permet d'éliminer avec une certitude absolue la présence de l'antigène de surface de l'hépatite B et de l'hépatite C ou des anticorps dirigés contre le VIH, le maintien et l'élimination des réactifs d'origine humaine de ce produit devront faire l'objet de toutes les attentions.<sup>8</sup>

Classe de danger: **Aucune**

Indications de danger: **Aucune**

Conseils de prudence: **Aucune**

Ces produits sont à usage diagnostique *in vitro*.

**Reactifs non fournis**

— Eau stérile
— Acide acétique à 20% ou acide citrique à 2%.
— Sérum physiologique
— Héparine

**Matériel nécessaire mais non fourni**

— Spectrophotomètre à 405 nm
— Incubateur 37°C ± 0,2°C
— Pipettes jaugées
— Tubes en plastique
— Agitateur
— Chronomètre
— Centrifugeuse, 2000 x g

## COATEST® Heparin - 25 5539 63

**Utilizzo del kit**

Per la determinazione fotometrica dell'eparina nel plasma.

**Principio del metodo**

- Eparina + AT (eccesso) → [Eparina · AT]
- [Eparina · AT] + FXa (in eccesso) → [Eparina · AT · FXa] + FXa (residuo)

- S-2222 →<sup>FXa</sup>→ Peptide + pNA

L'eparina viene analizzata come complesso con l'antitrombina (AT) presente nel campione. La concentrazione di questo complesso dipende dalla disponibilità dell' AT. Per ottenere una concentrazione costante di AT si aggiunge AT purificata al plasma in esame.

Il FXa (in eccesso) viene neutralizzato in proporzione alla quantità di eparina, il che determina la quantità del complesso [Eparina · AT]. La quantità restante di FXa idrolizza il substrato cromogenico S-2222 liberando così il gruppo cromoforo pNA. Il colore così formatosi viene letto fotometricamente a 405 nm.

**Reagenti**

Se mantenuti alla temperatura tra 2-8°C in confezione sigillata i reattivi rimangono stabili fino alla data di scadenza stampata sull' etichetta. Evitare contaminazione batterica dei flaconi aperti.

- S-2222** **1 fiala**

Substrato cromogenico (Bz-Ile-Glu-(g-OR)-Gly-Arg-pNA-HCl) 15 mg con aggiunta di mannitolo come eccipiente. Ricostituire con 20 mL di acqua sterile per ottenere una concentrazione di 1 mmol/l. La soluzione resta stabile per 6 mesi a 2-8°C.
- Fattore Xa** **1 fiala**

Fattore Xa Bovino 71 nkat. Ricostituire con 10 mL di acqua sterile. Il Fattore Xa ricostituito rimane stabile per 1 mese a 2-8°C oppure 6 mesi -20°C o meno.
- Tampone soluzione madre** **1 fiala**

Tris 0,5 mmol, pH 8,4, 10 mL. Un flacone aperto di questa soluzione rimane stabile per 2 mesi a 2-8°C. Diluire prima dell' uso come segue: 1 volume di soluzione madre in 9 volumi di acqua sterile.
- Antitrombina** **1 fiala**

Antitrombina umana liofilizzata, 10 UI. Ricostituire con 10 mL di acqua sterile per ottenere una concentrazione di 1 UI/mL. L'antitrombina così ricostituita rimane stabile per un mese a 2-8°C oppure 6 mesi a -20°C o meno.
- Plasma normale (umano)** **4 fiale**

Plasma liofilizzato. Ricostituire con 1,00 mL di acqua sterile. Il plasma così ricostituito rimane stabile per due settimane a 2-8°C, oppure un mese a -20°C o meno.

**Avvertenze**
Ciascuna unità di donatore utilizzata nella preparazione di reagenti di origine umana è stata testata con metodi approvati dalla FDA per la presenza di anticorpi anti HIV 1 e 2, per l'antigene di superficie dell'epatite B ed epatite C, ed è stata trovata negativa. Comunque, poiché nessun test è in grado di escludere completamente la presenza di questi agenti infettivi trasmessi per via ematica, l'impiego e l'eliminazione di reagenti di origine umana utilizzati in questo prodotto, dovrebbero essere fatti con attenzione.<sup>8</sup>

Classe di pericolo: **nessuno**

Indicazioni di pericolo: **nessuno**

Consigli di prudenzas: **nessuno**

Per l'impiego diagnostico *in vitro*.

**Reattivi non forniti**

— Acqua sterile
— Acido acetico al 20% o acido citrico al 2%.
— NaCl 0,9% (soluzione fisiologica salina)
— Eparina.

**Materiali necessari ma non forniti**

— Fotometro a 405 nm
— Dispositivo di riscaldamento a 37°C ±0,2°C
— Pipette calibrate
— Provette in plastica
— Cuvette-semimicro
— Miscelatore
— Cronometro
— Centrifuga a 2000 x g

## COATEST® Heparin - 25 5539 63

**PORTUGUÊS - Revisão do folheto 02/2015**

Para a revisao actual deste folheto informativo em Portugues, contacte o representante da Chromogenix da sua área.

**PRECAUÇÕES E ADVERTÊNCIAS:**

Classe de perigo: **nenhuma**

Advertências de perigo: **nenhuma**

Recomendações de prud ncia: **nenhuma**

Este reagente destina-se a utilização em diagnóstico *in vitro*.

## COATEST® Heparin - 25 5539 63

**ΕΛΛΗΝΙΚΑ - Αναθεώρηση εσωκλειστού 02/2015**

Για την τρέχουσα αναθεώρηση αυτού του εσωκλειστού στα Ελληνικά, παρακαλούμε επικοινωνήστε με τον τοπικό αντιπρόσωπο της CHROMOGENIX.

**ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ:**

τάξη κινδύνου: ουδέν

Δηλώση(εις) κινδύνου: ουδέν






Δηλώση(εις) προφύλαξης: ουδέν

Το προϊόν προορίζεται για διαγνωστική χρήση *in vitro*.

***Bibliography / Literatur / Bibliografía / Bibliographie / Litteratur / Litteraturförteckning / Βιβλιογραφία***

- Teien, A.N. et al: Assay of heparin in plasma using a chromogenic substrate. Thromb Res 8, 413-416 (1976).
- Teien, A.N. & LIE, M.: Evaluation of an amidolytic heparin assay method: Increased sensitivity by adding purified antithrombin III. Thromb Res 10, 399-410 (1977).
- Holmer, E. et al: The molecular-weight dependence of the rate-enhancing effect of heparin on the inhibition of thrombin, factor Xa, factor IXa and kallikrein by antithrombin. Biochem J 193, 395-400 (1981).
- Holm, H A et al: The antithrombotic effect of Heparin in deep venous thrombosis. Relation to four Heparin assays. Acta Med Scand 216, 287-293 (1984).
- Holm, H A et al: Heparin assays and bleeding complications in deep venous thrombosis with particular reference to retroperitoneal bleeding. Thromb Haemostasis 53, 278-281 (1985).
- Ten Cate, H et al: Automated amidolytic method for determining Heparin, a heparinoid, and low-MR Heparin fragmnet, based on their anti-FXa activity. Clin Chem 30, 860-864 (1984).
- Chromogenix AB. Determination of Fragmin in Plasma. Available on request.
- Richmond JY, McKinney RW eds. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, U.S. Dept. of Health and Human Services, Public Health Service, 4 th Edition, 1999.
- Zucker S, Cathey M H, West B. Preparation of Quality Control Specimens for Coagulation. Am J Clin Pathol 53, 924-927 (1970).
- Westgard J O, Barry P L . Cost-effective quality control: Managing the quality and productivity of analytical process. AACQ press (1988).

***Symbols used / Verwendete Symbole / Simbolos utilizados / Symboles utilisés / Simboli impiegati / Χρησιμοποιήθέντα σύμβολα***

IVD	LOT				<b>CONTROL</b>			<b>EC</b> <b>REP</b>
<i>In vitro</i> Diagnostic Medical Device	Batch code	Use by	Temperature limitation	Consult instructions for use	Control	Biological risks	Manufacturer	Authorised representative
<i>In vitro</i> Diagnostikum	Chargenbezeichnung	Verwendbar bis	Zulassung	Consulte las instrucciones de uso	Kontrollen	Biologisches Risiko	Hersteller	Bevollmächtigter
Dispositif médical de diagnostic <i>in vitro</i>	Codigo de lote	Fecha de caducidad	Temperaturbereich	Gebrauchsanweisung beachten	Control	Riesgo biológico	Fabricant	Representante autorizado
Producto sanitario para diagnóstico <i>in vitro</i>	Code du lot	Utilizer jusque	Limite de temperatura	Consulte las instrucciones de uso	Contrôle	Risque biologique	Fabricant	Mandataire
Dispositivo medicodiagnóstico <i>in vitro</i>	Codice del lotto	Utilizzare entro	Limites de température	Consultare le istruzioni d'utilisation	Controllo	Rischio biologico	Fabricante	Rappresentanza autorizzata
Dispositivo médico para utilização em diagnóstico <i>in vitro</i>	Número de lote	Data limite de utilização	Limite di temperatura	Consultare le istruzioni per l'uso	Controlo	Risco biologico	Fabricado por	Representante autorizado
Medicinsk udstyr til <i>in vitro</i> -diagnostik	Batchkoden	Temperaturbegrænsning	Limite de temperatura	Se instruksen for brug	Kontrol	Miljø oplysninger	Producent	Leverandør
<i>In vitro</i> diagnostisk medicinsk produkt	Anvendelsesdato	Temperatur gräns	Temperaturgränsning	Se instruktion for brug	Kontrol	Biologiska risker	Tilverkarer	Auktoriserad representant
Προϊόν για διαγνωστική χρήση <i>in vitro</i>	Αρ. Παρτίδας	Ανvändning	Periöriamó θερμοκρασίας	Ta del av instruktionen före användning	Κontrol	Βιολογικοί κίνδυνοι	Κατασκευαστής	Εξουσιοδοτημένος αντιπρόσωπος
		Χρήση έως	Χρήση έως	Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης	ελέγχου			

**Prelevement**

Prélever sur citrate à 0,1 mol/l. Placer immédiatement dans dela glace pour minimiser les effets des inhibiteurs. Centrifuger le plus rapidement possible 20 minutes à 2000 g et à basse température. Le plasma est stable 24 H à 2-8°C, 6 mois à -20°C.

**Controlo de qualite**

Le recours à deux contrôles de concentration différente en héparine, étalonée par rapport au 1er étalon International, établi par le WMO avec une méthode anti Xa, est recommandé pour le contrôle de la qualité <sup>9</sup> Il appartient à chaque laboratoire d'établir sa propre moyenne et son propre écart type, ainsi que de mettre sur pied un programme de contrôle de la qualité des tests de laboratoire. Les témoins doivent être analysés au minimum lors de chaque relais d'équipe toutes les 8 heures, conformément aux BPL.

On se reportera à Westgard et coll. pour l'identification et la résolution des cas situés en dehors des normes résolution des cas situés en dehors des normes.<sup>10</sup>

**Made d'emploi**

Toutes les conditions contenues dans la brochure annexée à la confection se rapportent à la Méthode en microplaque et ACL 3000. Des adaptations détaillées, pour de nombreux automatés avec les consignes de préparation des, sont disponibles chez CHROMOGENIX et leurs distributeurs sur simple demande.

**Etalonnage**
Une courbe d'étalonnage est nécessaire à chaque nouveau lot de Coatest Héparine. La préparation des étalons requiert une héparine de concentration connue (non fournie). Inclure deux points de contrôle à chaque série (ex 0,1 et 0,7 UI/ml).

- Préparation des étalons.
  - Dilution en sérum physiologique en deux étapes:
    - Diluer en sérum physiologique afin d'obtenir une solution à 10 UI/ml.
    - Rediluer au 1/100 avec le tampon pour obtenir une solution à 0,1 UI/ml.
- Réalisation de la gamme

	Heparine UI/ml plasma	Heparine à 0,1 UI/ml µL	Tampon µL	Plasma normal humain µL	AT µL
	0,1	100	700	100	100
	0,3	300	500	100	100
	0,5	500	300	100	100
	0,7	700	100	100	100

b)

Dilution des échantillons

Plasma (2-8°C) 100 µl
AT III 100 µl
Tampon 800 µl

c) Dosage

	Ajouter dans le tube	Echantillon	Blanc	
	Echantillon ou étalon dilué	200 µl	200 µl	
	Incuber 3 minutes à 37°C			
	FXa (20-25°C)	100 µl		
	Agiter et incuber 30 secondes à 37°C			
	S-2222	200 µl		
	Agiter et incuber à 37°C exactement 3 minutes			
	Acide acétique à 20% ou acide citrique à 2%	300 µl	300 µl	
	Eau		300 µl	

Lire la densité optique à 405 nm. La coloration est stable 4 heures.

**N.B.** Le dosage peut-être réalisé en mode cinétique. Dans ce cas, diluer le S-2222 avec 10 ml d'eau stérile pour obtenir une solution à 2 mmol/l et garder les volumes dans les mêmes proportions que celles décrites ci-dessous.

**Preparazione dei campioni**

Il sangue (9 volumi) viene miscelato con 0,1 mol/mL di citrato sodico (1 volume) e raffreddato , se possibile immediatamente, in ghiaccio, onde minimizzare il rilascio di antagonisti dell' eparina dalle cellule del sangue. Centrifugare a 2000 x g per 20 minuti a bassa temperatura se possibile immediatamente dopo la raccolta del campione di sangue. Il plasma rimane stabile per 24 ore a 2-8°C o per 6 mesi a -20°C o meno.

**Controllo di qualità**

Per un programma completo di controllo della qualità<sup>9</sup>, si raccomanda l' uso di controlli dell'eparina a due livelli calibrati contro uno standard Internazionale. Ogni laboratorio dovrà determinare le proprie deviazioni standard ed il valore medio, e stabilire un programma di qualità per controllare i propri risultati. I campioni di controllo dovranno essere analizzati almeno una volta per ogni turno di 8 ore del personale, secondo pratiche di laboratorio adeguate. Per l'individuazione e la soluzione di situazioni che sfuggono ad ogni controllo, consultare Westgard et al.<sup>10</sup>

**Procedura**

Tutte le condizioni riportate in questo inserto sono riferite al metodo in micropiastra e con ACL 3000. Applicazioni e volumi di ricostituzione dei reagenti per una vasta gamma di strumenti sono disponibili su richiesta da Chromogenix.
**Calibrazione**
E' necessario stabilire una curva standard per ogni nuovo lotto di Coatest Heparin. Per la preparazione degli standard bisogna utilizzare uno standard di eparina a concentrazione nota (non fornito). Due di questi standards (ad es. 0,1 e 0,7 UI/mL) devono essere inclusi in ogni serie.

- Preparazione degli standard
  - Utilizzare un procedimento a due stadi per la diluizione dell' eparina:

- Diluire con soluzione fisiologica per ottenere 10 UI/mL.
  - Diluire ulteriormente 100 volte con soluzione tampone per ottenere 0,1 UI/mL.
- La soluzione di eparina a 0,1 UI/mL deve essere ancora ulteriormente diluita secondo la seguente tabella per ottenere diverse concentrazioni standard:

	Eparina UI/mL plasma	Eparina diluita 0,1 UI/mL µL	Soluzione tampone µL	Plasma umano normale µL	AT µL
	0,1	100	700	100	100
	0,3	300	500	100	100
	0,5	500	300	100	100
	0,7	700	100	100	100

b)

Diluizione dei campioni

Plasma da analizzare (tenuto in ghiaccio) 100 µL
Antitrombina 100 µL
Tampone,soluzione di lavoro 800 µL
Mescolare accuratamente

c) Analisi

	Aggiungere in una provetta	Campione	Bianco	Campione
	Plasma da analizzari diluito o standard	200 µL	200 µL	
	Incubare a 37°C (3-4 minutes)			
	FXa (20-25°C)	100 µL		
	Mescolare ed incubare at 37°C per 30 sec.			
	S-2222 (37°C)	200 µL		
	Mescolare and incubare a 37°C per 3 min esatti			
	Acido acetico 20% o acido citrico al 2%	300 µL	300 µL	
	Acqua		300 µL	
	Mescolare			

Trasferire il contenuto in una cuvetta-semicro e leggere l' assorbanza del campione e del bianco a 405 nm. Il colore rimane stabile per almeno 4 ore.

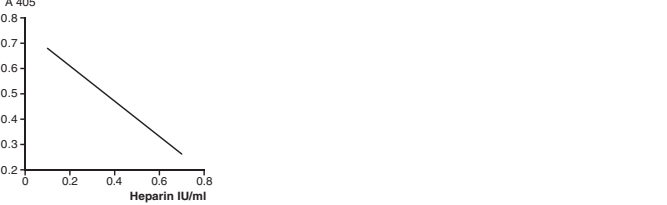
**NOTA:** L'analisi può essere eseguita anche nella modalità iniziale. Diluire l'S-2222 con 10 mL di acqua sterile per ottenere una concentrazione di 2 mmol/L. Le condizioni di reazione sopra descritte vanno mantenute accuratamente, il che include ad esempio dei cambiamenti proporzionali di volumi se necessario.

**FRANÇAIS - Révision de la notice 02/2015**

**Resultats**

Soustraire les valeurs des blancs plasmas des résultats obtenus pour les étalons. Tracer la droite d'étalonnage avec les densités optiques corrigées des étalons en ordonnées et leur concentrations respectives en abscisses.

**Courbe d'etalonnage**



**Limite de la technique**

Dans certains cas pathologiques, le plasma peut-être à lui seul responsable de l'hydrolyse du substrat. Cette interférence peut-être mise en évidence en substituant au FXa un volume égal de tampon.

**Performances-caracteristiques**

**Précision**

Le coefficient de variation (CV) intrasérie est de 2,6%, le CV intersérie est de 2,3% pour un taux d'héparine à 0,7 UI/ml.

**Limite de detection**

Des taux de 0,05 UI/ml d'Héparine peuvent être mis en évidence par ce dosage.

**Linéarité**

Au-dessus de 0,7 UI/ml diluer d'échantillon au 1/5 avec du plasma humain normal.

Multiplier par 5 le résultat obtenu dans ce cas.

Pour des taux d'Héparine inférieurs à 0,2 UI/ml, soigner le prélèvement ainsi que le traitement du plasma.

**Sensibilité:**

**Appareil**

ACL 3000 ΔAbs par 1IU/mL de l'activité de l'héparine : 6.2 Abs

**Fiabilité**

Si l'on compare la technique du Coatest Héparine avec le TCA, pour des patients sous traitement héparinémique et pour des volontaires sains sous Héparine, les CV obtenus sont respectivement de 0,90 et 0,91.

**Spécificité**

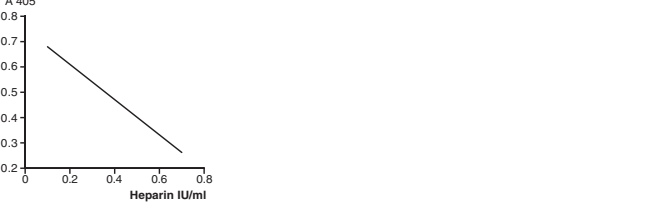
Aucune interférence médicamenteuse n'a été observée. Cette méthode est moins sensible à l'action du Facteur 4 plaquettaire que le TCA ou le temps de thrombine. Teien et al. (2) ont trouvé que cette technique est également insensible aux taux de PDF des plasmas pathologiques.

**ITALIANO - Revisione dell'inserto 02/2015**

**Risultati**

Sottrarre i valori di assorbanza (A) ai bianchi degli standard a 405 nm. Riportare su scala lineare le (A) corrette per gli standard contro le rispettive concentrazioni di eparina. Leggere il valore percentuale di eparina corrispondente alla (A) del campione e dalla curva standard dopo correzione per il bianco campione.

**Curva standard**



**Limit**

Printed Insert Sheet: 302087  
Revision: R3  
Issued: 02/2015  
C.O.: 453590

***LANGUAGES***

---

ENGLISH  
DEUTSCH  
ESPAÑOL  
FRANÇAIS  
ITALIANO  
PORTUGÊES  
DANSK  
SWENSK  
GREEK

***TECHNICAL SPECS***

---

PAPER: White paper, 50-60 g/m<sup>2</sup> weight.  
SIZE: 11 x 17" (280 x 432 mm.).  
PRINT: Front/Back.  
PRINT COLOR: Front - Top rule Orange Pantone 137, all remaining type in black  
Back - All type in black.