COAMATIC® Heparin - 82 3393 63

ENGLISH - Insert revision 06/2013

Intended Use

For the quantitative determination of unfractionated heparin (UF Heparin) or low molecular weight heparin (LMW Heparin) in human citrated plasma using automated and microplate methods.

Background and summary

Heparin is the most frequently used antithrombotic therapeutic.
The biological activity of this sulfated glycosaminoglycan resides in its ability to accelerate (up to 2000-fold) the inhibitory effect of antithrombin (AT) on the coagulation proteases. The amount of LMW Heparin or UF Heparin is determined from the anti-FXa activity expressed by the [AT • Heparin] complex formed in plasma.[1-3]

Measuring principle

Heparin + AT ⟶ [AT • Heparin]

[AT • Heparin] + FXa (excess) ⟶ [FXa • AT • Heparin] + FXa (residual)

FXa (residual) + S-2732 ⟶ Peptide + pNA

Factor Xa (FXa) is added to a mixture of undiluted plasma and the chromogenic substrate S-2732.
When Heparin and AT are complexed, two competing reactions occur simultaneously:

1. Inhibition of FXa by the [AT • Heparin] complex.
2. Reaction of FXa with S-2732 resulting in cleavage of pNA.

The pNA release measured at 405 nm is inversely proportional to the heparin level in the sample.[1]
In order to reduce the influence from heparin antagonists, such as platelet factor 4 (PF4), dextran sulfate is included in the reaction mixture.[4]

Reagents

1. **S-2732, 15 mg** — 2 vials
   Chromogenic substrate, Suc-Ile-Glu(γ-pip)-Gly-Arg-pNA • HCl lyophilized with detergent and mannitol as bulking agent.
2. **Factor Xa, 35 nkat** — 2 vials
   Lyophilized bovine FXa containing Tris buffer, EDTA, NaCl, dextran sulfate and bovine serum albumin.

PRECAUTIONS AND WARNINGS:

Hazard class: **none**
Risk phrases: **none**
Safety phrases: **none**
This product is for *in vitro* diagnostic use.

Reagent preparation:
For the microplate method reconstitute REAGENTS 1 and 2 with 5.0 mL of water (see REAGENTS 3). Replace the stoppers and swirl gently. Make sure of the complete reconstitution of the product. Keep reagent at 15-25°C for 10-30 min and invert before use.
NOTE: Other reagent reconstitution volumes may apply for automated methods. (See section: INSTRUMENT APPLICATIONS). The reagents are not interchangeable between lots.

Reagents required but not provided:

3. Deionized water filtered through 0.22 mm or NCCLS type II water.[5]
4. Acetic acid 20% or citric acid 2% (end-point method).
5. Saline (0.9% NaCl).
6. Human normal plasma.
7. Calibrator plasma for LMW Heparin and/or UF Heparin calibrated against International Standards.
8. Controls for LMW Heparin and/or UF Heparin activity.

NOTE: Antithrombin reagent and tris buffer is required for the ACL Hundred/Thousand Series method (the assay is run as a two stage method with the addition of antithrombin). See the instrument Application Sheet for specific information.

Materials required but not provided:

— Spectrophotometer 405 nm (and 490 nm for the microplate procedure)
— Incubator 37°C
— Microplates*
— Centrifuge, 2000 x g
— Plastic test tubes
— Stopwatch
— Vortex mixer
— Calibrated pipettes
— Linear graph paper

*NOTE: Do not use microplates intended for coating

Storage conditions and stability

The sealed reagents are stable at 2-8°C until the expiry date printed on the label.

1. **S-2732:** Stability after reconstitution: 3 months at +2-8°C in the original vial.
2. **Factor Xa:** Stability after reconstitution: 3 months at +2-8°C in the original vial.

WARNING: Do not use reagents beyond the expiry date printed on the package label. Substrate - Avoid exposure to light. Discard the substrate solution if it appears yellow. Avoid contamination by microorganisms.

Specimen collection

Nine parts of freshly drawn venous blood is collected into one part trisodium citrate. Centrifugation: 2000 x g for 20 minutes at 20-25°C. Refer to NCCLS document H21-A2 for further instructions on specimen collection, handling and storage.[6]

Quality Controls

Two levels of heparin controls, calibrated against International standards, are recommended for a complete quality control program.[7] 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-ofcontrol situations.[8]

Results

Heparin results are reported in activity (IU/mL).

Expected values

To obtain an optimal effect with minimum risk of bleeding or thromboembolic complications the heparin should be in the range recommended by the manufacturer.[9]

Procedures

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

Assay condition for microplate and test tube techniques
Dilutions of samples and controls.

Samples/controls/standards	100 µL
Water (see REAGENTS 3)	300 µL
Mix well	
Add diluted samples/controls/standards to the microplate wells	50 µL
Incubate at 37°C for 2-6 min	
Add S-2732 (pre-heated at 37°C)	50 µL
Mix and add within 2 min Factor Xa (pre-heated at 37°C)	50 µL
Mix and incubate at +37°C for 120 sec.	
Stop reaction with acetic acid 20% or citric acid 2%	50 µL

Read the absorbance against water (see REAGENT 3) at 405 nm.
If possible, read and subtract the absorbance at 490 nm in order to compensate for differences in the material of the microplate wells.

Calibration

For the calibration of LMW Heparin or UF Heparin use a source of material which has been calibrated against an International Standard preparation.
For example: To prepare standards for 10 runs.
i. Dilute heparin with saline (0.9% NaCl) to obtain a working solution with a value of 100 IU/mL.
ii. Add 160 µL of the heparin working solution to 20.0 mL of normal plasma to obtain the heparin concentration of 0.8 IU/mL. Dilute according to the table below.:

Standard IU/mL	Plasma with heparin 0.8 IU/mL mL	Normal plasma mL
0	-	4.0
0.2	1.0	3.0
0.4	2.0	2.0
0.6	3.0	1.0
0.8	4.0	-

These standards can be kept in aliquots at -20°C for 12 months.

Calculation

Microplate Method:
Plot the absorbance (A) for the standards against the concentration of heparin using an appropriate software program or on linear graph paper. Plot A on the Y-axis and IU/mL heparin on the X-axis. Connect the standard points with the best fitting second order polynomial line. Samples and controls are evaluated based on this standard curve. Examples of typical standard curves (microplate method), Standard curve Unfractionated heparin and Standard curve LMW heparin, are shown on the back of this sheet.

Performance characteristics

Limitations/interfering substances
Heparin results are not affected by hemoglobin up to 200 mg/dl, triglycerides up to 600 mg/dl and bilirubin up to 12 mg/dl. The presence of dextran sulfate reduces the influence from heparin antagonists, e.g. platelet factor 4 (PF4).[4]

Precision:
Microplate method. The data summarized below was obtained with the microplate method using unfractionated heparin (UFH) and low molecular weight heparin (LMWH).

Mean concentration	Within run C.V. (%)	Between run C.V. (%)	Total C.V. (%)
0.7 IU/mL UFH	2.8	1.2	2.8
0.4 IU/mL UFH	3.4	1.5	3.7
0.7 IU/mL LMWH	3.6	2.8	4.4
0.4 IU/mL LMWH	2.4	2.3	3.2

Examples of instrument-specific precision results obtained by or for Chromogenix are included in the instrument application sheets.
Each laboratory should establish their own precision data.

Correlation:

1. The COAMATIC® Heparin assay shows good correlation with COATEST® Heparin and COATEST® LMW Heparin/Heparin performed on the Cobas Mira instrument:
   COAMATIC® Heparin versus COATEST® Heparin (n = 112)
   IU/mL Heparin = +0.005 + 1.00 x Heparin, r = 0.97
   COAMATIC® Heparin versus COATEST® LMW Heparin/Heparin (n = 90)
   IU/mL Heparin = +0.002 + 1.04 x Heparin, r = 0.96
2. The COAMATIC® Heparin (performed on various Instruments) versus IL Test™ Heparin performed on the ACL 300 Instrument

Microplate			
	(n = 70)	IU/mL Heparin = +0.017 + 1.00x Heparin,	r = 0.97
Instruments			
Cobas Mira	(n = 87)	IU/mL Heparin = -0.012 + 1.04x Heparin,	r = 0.98
ACL 300†	(n = 62)	IU/mL Heparin = +0.004 + 1.03x Heparin,	r = 0.98
Futura	(n = 113)	IU/mL Heparin = +0.009 + 0.97x Heparin,	r = 0.97
MLA Electra 1600	(n = 80)	IU/mL Heparin = +0.004 + 1.01x Heparin,	r = 0.97
Thrombolyzer*	(n= 76)	IU/mL Heparin = +0.008 + 0.92x Heparin	r = 0.97
BCS*	(n = 30)	IU/mL Heparin = +0.008 + 0.93x Heparin,	r = 0.99
STA*	(n = 29)	IU/mL Heparin = +0.017 + 0.96x Heparin,	r = 0.99
Sysmex 6000	(n = 30)	IU/mL Heparin = +0.061 + 0.91x Heparin,	r = 0.99
AMAX	(n = 30)	IU/mL Heparin = +0.028 + 0.97x Heparin,	r = 0.99
AMGA*	(n = 30)	IU/mL Heparin = -0.061 + 1.02x Heparin,	r = 0.99
Hitachi 911	(n = 30)	IU/mL Heparin = +0.014 + 0.98x Heparin,	r = 0.99
Hitachi 917	(n = 30)	IU/mL Heparin = +0.021 + 1.00x Heparin,	r = 0.98

*NOTE:Instrument not available in all countries.

†NOTE: In the case of the ACL Hundred/Thousand Series, the assay is run as a two-stage method with the addition of antithrombin reagent. See the Instrument Application Sheet for specific information.

Recommended measuring range
For the microplate method the relationship between the heparin concentration and the pNA release, measured as absorbance at 405 nm, follows a second order polynomial function in the range of 0-1.5 IU/mL.

Sensitivity:
System
Cobas Mira mAbs / min per 1IU/mL Heparin 333 mAbs

Determinations/kit

Microplate: 200

COAMATIC® Heparin - 82 3393 63

DEUTSCH - Packungsbeilage Version 06/2013

Verwendungszweck

Quantitative Bestimmung von unfraktioniertem Heparin (UF Heparin) oder niedermolekularem Heparin (LMW Heparin) in menschlichem Citratplasma unter Verwendung von automatischen Methoden oder Mikrotiterplatten.

Hintergrund und Zusammenfassung

Heparin ist das am häufigsten verwendete antithrombotische Medikament. Die biologische Aktivität dieses sulfatierten Glukosaminoglykans beruht auf seiner Fähigkeit, die inhibitorische Wirkung von Antithrombin (AT) auf die an der Blutgerinnung beteiligten Proteasen zu beschleunigen (bis zu 2000fach).
Die Menge des niedermolekularen (LMW) oder unfraktionierten (UF) Heparins wird anhand der anti – FXa – Aktivität des im Plasma gebildeten [AT • Heparin] – Komplexes bestimmt.[1-3]

Messprinzip

Heparin + AT ⟶ [AT • Heparin]

[AT • Heparin] + FXa (Überschuß) ⟶ [FXa • AT • Heparin] + FXa (Rest)

FXa (residual) + S-2732 ⟶ Peptide + pNA

Faktor Xa (FXa) wird zu einer Mischung von unverdünntem Plasma und dem chromogenen Substrat S-2732 gegeben.
Bei der Bildung des Komplexes aus Heparin und Antithrombin (AT) finden gleichzeitig zwei kompetitive Reaktionen statt:

1. Factor Xa wird durch den Komplex [AT • Heparin] inhibiert.
2. Factor Xa spaltet von dem chromogen Substrat S-2732 p-Nitroanilin (pNA) ab.

Die bei 405 nm gemessene pNA Freisetzung ist umgekehrt proportional zur Heparinaktivität[1], umgekehrt proportional zur Heparinaktivität in der Plasmaprobe. Um den Einfluß von Heparinantagonisten wie z. B. Plättchenfaktor 4 (PF4) zu minimieren, enthält das Reaktionsgemisch Dextransulfat.[4]

Reagenzien

1. **S-2732, 15 mg** — 2 Flaschen
   Chromogenes Substrat, Suc-Ile-Glu(γ-pip)-Gly-Arg-pNA • HCl lyophilisiert mit Detergens und Mannitol als Trägersubstanz.
2. **Factor Xa, 35 nkat** — 2 Flaschen
   Lyophilisierter Faktor Xa vom Rind,Trispuffer, EDTA, NaCl, Dextransulfat und Rinder Serumalbumin (BSA).

ACHTUNG: INFEKTIONSRISIKO:

Gefahrenklasse: **keine**
Risikoeinstufung: **keine**
Sicherheitseinstufung: **keine**
Dieses Produkt ist nur für die *in vitro* Diagnostik geeignet.

Vorbereitung der Reagenzien:
Zur Durchführung der Mikrotiterplatten-Methode werden die Reagenzien 1. und 2. mit 5 mL Wasser rekonstituiert. (siehe REAGENZIEN 3). Vorsichtig mischen. Zur vollständigen Rekonstitution werden die Reagenzien 10-30 Minuten bei 15-25°C stehen gelassen. Vor Gebrauch ebenfalls vorsichtig mischen.
ZU BEACHTEN: Bei automatischen Methoden können andere Volumina zum Auflösen der Reagenzien nötig sein, s. spezielle Automatenadaptionen.
Reagenzien verschiedener Chargen dürfen nicht gemischt werden.

Zusätzlich benötigte Reagenzien, nicht im Kit enthalten:

3. Entionisiertes Wasser, gefiltert durch ein Filter mit einer Porengröße von 0,22 µm oder NCCLS Typ II Wasser.[5]
4. Essigsäure 20% oder Zitronensäure 2% (Endpunktmethode)
5. Physiologische Kochsalzlösung (0,9% NaCl) Unfraktioniertes oder LMW Heparin
6. Humanes Normalplasma
7. Kalibrationsplasmen für LMW Heparin und UF Heparin, kalibriert gegen Internationale Standards
8. Kontrollplasmen zur Bestimmung der Aktivität des LMW Heparins and UF Heparins

Anmerkung: Bei Durchführung des Testes auf den ACL-Geräten (200, 300/3000, 6000, 7000-Serien) wird zusätzlich Antithrombin-Reagenz und Tris-Puffer benötigt. Der Test wird an diesen Geräten in einer Zweistufen-Methode mit Zugabe von Antithrombin durchgefürt. Siehe spezifische Automaten-Adaptionsvorschrift für genauere Information.

Zusätzlich benötigte Materialien:

— Spektrophotometer 405 nm (und 490 nm bei Verwendung von Mikrotiterplatten)
— Inkubator 37°C
— Mikrotiterplatten*
— Zentrifuge 2000 x g
— Reagenzgläser aus Kunststoff
— Stoppuhr
— Vortex Mixer
— Kalibrierte Pipetten
— Millimeterpapier (linear)

*ZU BEACHTEN: Verwenden Sie keine zur Beschichtung vorgesehenen Mikrotiterplatten.

Haltbarkeit und Lagerungsbedingungen

Die Reagenzien sind ungeöffnet bei +2-8°C zu lagern und bis zu dem auf dem Etikett angegebenen Datum verwendbar.

1. **S-2732:** Haltbarkeit nach Rekonstitution: 3 Monate bei 2-8°C in der Originalflasche.
2. **Factor Xa:** Haltbarkeit nach Rekonstitution: 3 Monate 2-8°C in der Originalflasche.

WARNUNG: Reagenz nach Ablauf des auf dem Etikett aufgedruckten Verfalldatums nicht mehr verwenden. Substratlösung, die eine gelbe Verfärbung aufweist, verwerfen. Kontamination durch Mikroorganismen vermeiden.

Probengewinnung

Neun Teile frisch entnommenes Venenblut werden zu einem Teil Trinatriumcitrat gegeben. Zentrifugieren bei 2000 x g während 20 min bei 20-25°C. In dem NCCLS – Dokument H21- A2 finden Sie weitere Hinweise bezüglich Entnahme, Verwendung und Lagerung von Proben.[6]

Qualitätskontrolle

Für ein vollständiges Programm zur Qualitätskontrolle wird empfohlen, Heparinkontrollen, kalibriert gegen Internationale Standards, mit zwei unterschiedlichen Werten einzusetzen.[7] 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.[8]

Ergebnisse

Die Heparinspiegel werden als Heparinaktivität (IU/mL) angegeben.

Zu erwartende Ergenisse

Die Heparinaktivität sollte in dem vom Hersteller empfohlenen Bereich liegen, damit eine möglichst gute Wirkung bei einem möglichst niedrigen Risiko von Blutungen oder thromboembolischen Komplikationen erzielt wird.[9]

Testdurchführung

Alle Angaben in dieser Packungsbeilage beziehen sich auf die Mikrotiterplatten, Manuelle Methode und Cobas Mira. Spezielle Automatenadaptionen sind auf Anfrage bei Chromogenix erhältlich.

Mikrotiterplatten und Manuelle Methode:
Verdünnung von Proben, Kontrollen und Standards

Proben / Kontrollen / Standards	100 µL
Wasser (siehe REAGENZIEN 3)	300 µL
Gut mischen	
Durchführung	
Verdünnte Proben / Kontrollen / Standards	50 µL
Bei 37°C 2 – 6 min inkubieren	
S-2732 (auf 37°C vorwärmen)	50 µL
Mischen und innerhalb von 2 min hinzufügen	
Faktor Xa (auf 37°C vorwärmen)	50 µL
Mischen und bei 37°C 120 s inkubieren	
Essigsäure 20% oder Zitronensäure 2%	50 µL

Die Absorption bei 405 nm gegen Aqua dest. messen. Es wird empfohlen, bei zwei verschiedenen Wellenlängen abzulesen (Absorption 405 nm - Absorption 490 nm). So können Absorptionen, die nicht auf Enzym-Substrat-Reaktionen zurückzuführen sind (Unterschiede im Material der Mikrotiterplatten, Fingerabdrücke und Kratzer), kompensiert werden.

Kalibration

Zur Herstellung der Standardlösungen Kalibrationsplasmen oder UF- bzw. LMW Heparin verwenden, das gegen den internationalen Standard kalibriert wurde (Herstellung der Heparin Standardlösungen s. unten).
Beispiel: Herstellung der Standards für 10 Messungen
i. Heparin mit physiologischer Kochsalzlösung (0,9% NaCl) verdünnen, um eine Lösung von 100 IU/mL (Stammlösung) zu erhalten.
ii. Zu 20 mL Normalplasma werden 160 µL der Stammlösung (100 IU/mL) gegeben, um eine Heparin-Konzentration von 0,8 IU/mL zu erhalten.

Standards werden entsprechend der folgenden Tabelle hergestellt:

Standard IU/mL	Plasma mit 0,8 IU/mL Heparin mL	Normalplasma mL
0	-	4,0
0,2	1,0	3,0
0,4	2,0	2,0
0,6	3,0	1,0
0,8	4,0	-

Diese Standardlösungen können bei -20°C bis zu 12 Monate lang aufbewahrt werden.

Ergebnisse

Mikrotiterplatten-Methode:
Tragen Sie die Absorption (A) der Standards gegen die Heparinkonzentration auf linearem Millimeterpapier auf oder verwenden Sie ein geeignetes Software Programm. Auf der y – Achse tragen Sie A und auf der x – Achse tragen Sie die Heparinkonzentration (IU/mL) auf. Verbinden Sie die Standardpunkte mit der am besten passenden Kurve eines Polynoms zweiter Ordnung. Die Proben und Kontrollen werden mit Hilfe dieser Standardkurve ausgewertet. Unten finden Sie Beispiele für typische Standardkurven (Verfahren mit Mikrotiterplatten). Eine Standardkurve für unfraktioniertes Heparin und eine für niedermolekulares Heparin werden auf der Rückseite dieser Packungsbeilage gezeigt.

Testeigenschaften

Einschränkungen / Störende Substanzen
Die Resultate der Heparinbestimmung werden nicht durch Hämoglobinkonzentrationen von bis zu 200 mg/dl, Triglyzeridkonzentrationen von bis zu 600 mg/dl oder durch Bilirubinspiegel von bis zu 12 mg/dl gestört.
Durch Dextransulfat wird der Einfluß von Heparinantagonisten wie z. B. Plättchenfaktor 4 (PF4) vermindert.[4]

Präzision:
Die unten zusammengefaßten Daten wurden mit Mikrotiterplatten-Methode und unter Verwendung von unfraktioniertem Heparin (UFH) und niedermolekularem Heparin (LMWH) ermittelt.

Mittlere Konzentration	Innerhalb einer Serie VK (%)	Zwischen verschiedenen Serien VK (%)	Insgesamt VK (%)
0,7 IU/mL UFH	2,8	1,2	2,8
0,4 IU/mL UFH	3,4	1,5	3,7
0,7 IU/mL LMWH	3,6	2,8	4,4
0,4 IU/mL LMWH	2,4	2,3	3,2

Präzisionsdaten spezifischer Automaten, die von oder für Chromogenix ermittelt worden sind, werden den Adaptionsvorschriften beigefügt. Diese Daten dienen nur als Beispiele, denn jedes Laboratorium sollte eigene Präzisionsdaten erstellen.

Korrelation:

1. COAMATIC® Heparin zeigt eine gute Korrelation mit COATEST Heparin und COATEST LMW Heparin / Heparin (Cobas Mira).
   COAMATIC® Heparin versus COATEST® Heparin (n = 112)
   IU/mL Heparin = +0,005 + 1,00x Heparin, r = 0,97
   COAMATIC® Heparin versus COATEST® LMW Heparin/Heparin (n = 90)
   IU/mL Heparin = +0,002 + 1,04x Heparin, r = 0,96
2. COAMATIC® Heparin (verschiedene Automaten) versus IL Test Heparin (ACL 300)

Mikrotiterplatten			
	(n = 70)	IU/mL Heparin = +0.017 + 1.00x Heparin,	r = 0.97
Geräte			
Cobas Mira	(n = 87)	IU/mL Heparin = -0.012 + 1.04x Heparin,	r = 0.98
ACL 300†	(n = 62)	IU/mL Heparin = +0.004 + 1.03x Heparin,	r = 0.98
Futura	(n = 113)	IU/mL Heparin = +0.009 + 0.97x Heparin,	r = 0.97
MLA Electra 1600	(n = 80)	IU/mL Heparin = +0.004 + 1.01x Heparin,	r = 0.97
Thrombolyzer	(n= 76)	IU/mL Heparin = +0.008 + 0.92x Heparin	r = 0.97
BCS	(n = 30)	IU/mL Heparin = +0.008 + 0.93x Heparin,	r = 0.99
STA	(n = 29)	IU/mL Heparin = +0.017 + 0.96x Heparin,	r = 0.99
Sysmex 6000	(n = 30)	IU/mL Heparin = +0.061 + 0.91x Heparin,	r = 0.99
AMAX	(n = 30)	IU/mL Heparin = +0.028 + 0.97x Heparin,	r = 0.99
AMGA	(n = 30)	IU/mL Heparin = -0.061 + 1.02x Heparin,	r = 0.99
Hitachi 911	(n = 30)	IU/mL Heparin = +0.014 + 0.98x Heparin,	r = 0.99
Hitachi 917	(n = 30)	IU/mL Heparin = +0.021 + 1.00x Heparin,	r = 0.98

†ZU BEACHTEN: Auf den ACL-Geräten (200, 300 und 3000, 6000, 7000) wird der Test mit einer Zweistufen-Methode, mit Zugabe von Antithrombin, durchgeführt, siehe spezielle Automatenadaptionen für weitere Informationen.

Empfohlener Meßbereich
Mikrotiterplatten-Methode: Das Verhältnis zwischen der Heparinkonzentration und der Freisetzung von pNA (gemessen bei 405 nm) entspricht im Bereich zwischen 0 und 1,5 IU/mL einem Polynom zweiter Ordnung.

Sensitivität:
System
Cobas Mira mAbs / min per 1IU/mL Heparin 333 mAbs

Bestimmungen / Kit

Mikrotiterplatten: 200

COAMATIC® Heparin - 82 3393 63

ESPAÑOL - Revisión Folleto 06/2013

Usos

Determinación cuantitativa de la heparina no fraccionada (UF Heparina) o la heparina de bajo peso molecular (LMW Heparina) en el plasma humano tratado con citrato trisódico, mediante métodos automatizado y de microplaca.

Antecedentes y resumen

La heparina es el fármaco antitrombótico de uso más frecuente. La actividad biológica de este glicosaminoglicano sulfatado se debe a su capacidad de acelerar (hasta 2.000 veces) el efecto inhibitorio de la antitrombina (AT) en las proteasas de coagulación. La cantidad de heparina de bajo peso molecular (LMW) o de heparina no fraccionada (UF) se determina mediante la actividad anti-FXa expresada por el complejo [AT • Heparina] formado en el plasma.[1-3]

Fundamento del método

Heparina + AT ⟶ [AT • Heparina]

[AT • Heparina] + FXa (exceso) ⟶ [FXa • AT • Heparina] + FXa (residual)

FXa (residual) + S-2732 ⟶ Péptido + pNA

Se añade el factor Xa (FXa) a una mezcla de plasma no diluido y substrato cromogénico S-2732.
Cuando se forma el complejo de AT y heparina, se producen dos reacciones simultáneas que compiten entre sí:

1. Inhibición de FXa por el complejo [AT • Heparina].
2. Reacción de FXa con S-2732 que da como resultado la división de pNA. La liberación de pNA medida a 405 nm es inversamente proporcional al nivel de heparina de la muestra.[1]

Con el fin de reducir la influencia de los antagonistas de la heparina, por ejemplo el factor 4 de plaquetas (PF4), se ha incluido sulfato de dextrano en la mezcla de reacción.[4]

Reactivos

1. **S-2732, 15 mg** — 2 viales
   Substrato cromogénico Suc-Ile-Glu(γ-pip)-Gly-Arg-pNA • HCl liofilizado con detergente y manitol como agente de volumen.
2. **Factor Xa, 35 nkat** — 2 viales
   FXa bovino liofilizado que contiene tampón tris, EDTA, NaCl, sulfato de dextrano y albúmina de suero bovino.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES:

Indicaciones de peligro: **Ninguna**
Frases de Riesgo: **Ninguna**
Frases de Seguridad: **Ninguna**
Este producto es para diagnóstico *in vitro.*

Preparación del reactivo:
Para la técnica de microplaca, reconstituir los REACTIVOS 1 y 2, con 5,0 mL de agua (ver REACTIVOS 3). Tapar y agitar suavemente. Cercionarse de la reconstitución total del producto. Mantener el reactivo a 15-25°C durante 10 a 30 minutos e invertir antes de usar. NOTA: Los volúmenes de reconstitución de los reactivos pueden variar para los métodos automatizados. Los reactivos no son intercambiables de un lote a otro.

Reactivos necesarios pero no suministrados:

3. Agua desionizada filtrada con 0,22 µm o agua NCCLS de tipo II[5]
4. Acido acético 20% o ácido cítrico 2% (método de punto final)
5. Salino (0,9% NaCl)
6. Plasma humano normal
7. Plasma de Calibrado para Heparina de bajo peso molecular (LMW) y/o Heparina no fraccionada (UF) calibrada frente a patrones internacionales.
8. Controles para la actividad de Heparina de bajo peso molecular (LMW) y/o Heparina no fraccionada (UF).

NOTA: El reactivo de la antitrombina y el tampón Tris son necesarios para su uso con el método de las ACLs Series cientos/miles (el ensayo se realiza con un método en dos fases con la adición de antitrombina). Ver la hoja de instrucciones del aparato para información especifica.

Equipos necesarios pero no suministrados:

— Espectrofotómetro 405 nm (y 490 nm para procedimiento de microplaca)
— Incubador 37°C
— Microplacas*
— Centrífuga 2000 x g
— Tubos de ensayo de plástico
— Cronómetro
— Mezclador vortex
— Pipetas calibradas
— Papel milimetrado

*NOTA: No usar microplacas destinadas para recubrimiento

Condiciones de almacenamiento y estabilidad

Los reactivos sellados son estables entre 2 y 8°C hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta.

1. **S-2732:** Estabilidad después de la reconstitución: 3 meses a + 2-8°C en el vial original.
2. **Factor Xa:** Estabilidad después de la reconstitución: 3 meses a + 2-8°C en el vial original.

ADVERTENCIA: No usar los reactivos después de la fecha de caducidad impresa en la etiqueta. Evitar la exposición de la solución del substrato a la luz. Desechar cuando la solución del substrato tenga apariencia amarilla. Evitar la contaminación de los reactivos por microorganismos.

Toma de muestras

Recoger nueve partes de sangre venosa fresca con una parte de citrato trisódico.
Centrifugar a 2.000 g durante 20 minutos a 20-25°C.
Consultar el documento H21-A2 para instrucciones más detalladas sobre la toma de muestras, su manipulación y almacenamiento.[6]

Control de calidad

Se recomiendan dos niveles de control de heparina, calibrada frente a patrones internacionales, para un programa completo de control de calidad.[7] 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.[8]

Resultados

Los resultados de la heparina se expresan como actividad (IU/mL).

Valores esperados

Para conseguir un efecto óptimo con mínimo riesgo de hemorragia o de complicaciones tromboembólicas, la heparina debe encontrarse en el rango recomendado por el fabricante.[9]

Procedimiento

Todas los comentarios incluidos en este inserto son refereidos a las técnicas en microplacas y Cobas Mira. Es posible solicitar a Chromogenix los ajustes detallados de los instrumentos y las instrucciones de preparación de los reactivos para diversos instrumentos automáticos.

Técnica manual y de microplaca:
Dilución de las muestras y controles

Muestras/Controles/Patrones	100 µL
Agua (ver REACTIVOS 3)	300 µL
Mezclar bien.	
Añadir las Muestras/controles o patrones diluidos	50 µL
Incubar a 37°C durante 2-6 minutos	
Añadir S-2732 (precalentado a 37°C)	50 µL
Mezclar y añadir el Factor Xa (precalentado a 37°C) antes de 2 minutos	50 µL
Mezclar e incubar a + 37°C durante 120 segundos	
Añadir Acido acético 20% o ácido cítrico 2%	50 µL

Leer la absorbancia frente a agua estéril a 405 nm.
De ser posible, leer y restar la absorbancia a 490 nm con el fin de compensar las diferencias entre equipos o entre pocillos de la microplaca.

Calibracion

Para la preparación de los patrones, usar una fuente de heparina UF o LMW que haya sido calibrada según una norma internacional.

Por ejemplo: para preparar solino para 10 análisis,
i. Diluir la heparina con salina para obtener 100 IU/mL.
ii. Añadir 160 µL de la dilución de Heparina (100 IU/mL) a 20,0 mL de plasma normal. Mezclar cuidadosamente para obtener un plasma que contenga 0,8 IU/mL de Heparina.
Las diluciones patrón se efectúan según el cuadro siguiente:

Patrón IU/mL	Plasma con 0,8 IU/mL Heparina mL	Plasma normal mL
0	-	4,0
0,2	1,0	3,0
0,4	2,0	2,0
0,6	3,0	1,0
0,8	4,0	-

Estos patrones pueden conservarse en aliquotas a - 20°C durante 12 meses.

Calculo

Trazar la absorbancia (A) de los patrones frente a la concentración de heparina utilizando un programa informático adecuado o sobre papel milimetrado. Trazar A en el eje Y y la heparina en IU/mL en el eje X.
Unir los puntos del patrón mediante la curva polinómica de segundo orden que mejor se ajuste. Las muestras y los controles se evalúan sobre la base de esta curva estándar. En la parte de atrás de esta hoja se adjuntan ejemplos de curvas estándar típicas (según método de microplaca): una curva Estándar con Heparina No Fraccionada y una curva Estándar con Heparina de Bajo Peso Molecular (LMW).

Caracteristicas de rendimiento

Limitaciones/ Sustancias que interfieren
Los resultados de la heparina no se ven afectados por la hemoglobina, hasta 200 mg/dl, los triglicéridos hasta 600 mg/dl y la bilirrubina hasta 12 mg/dl.
La presencia de sulfato de dextrano reduce la influencia de los antagonistas de la heparina, por ejemplo el factor 4 de plaquetas (PF4).[4]

Precision:
Método de microplaca. Los datos indicados abajo se obtuvieron mediante el método de microplacas utilizando heparina no fraccionada (UHF) y heparina de bajo peso molecular (LMHW).

Concentración media	Dentro del análisis C.V. (%)	De un análisis a otro C.V. (%)	Total C.V. (%)
0,7 IU/mL UFH	2,8	1,2	2,8
0,4 IU/mL UFH	3,4	1,5	3,7
0,7 IU/mL LMWH	3,6	2,8	4,4
0,4 IU/mL LMWH	2,4	2,3	3,2

La precisión según el instrumento, obtenida por o para Chromogenix, se incluye en las fichas de aplicación a título de mero ejemplo. Cada laboratorio debe elaborar sus propios datos de precisión.

Correlacion

1. El ensayo COAMATIC® Heparin presenta una buena correlación con los resultados obtenidos con los ensayos COATEST® Heparin y COATEST® LMW Heparin/Heparin obtenidos con el intrumento Cobas Mira:
   COAMATIC® Heparin versus COATEST® Heparin (n = 112)
   IU/mL Heparina = +0,005 + 1,00 x Heparina, r = 0,97
   COAMATIC® Heparin versus COATEST® LMW Heparin/Heparin (n = 90)
   IU/mL Heparina = +0,002 + 1,04 x Heparina, r = 0,96
2. El ensayo COAMATIC® Heparin (ensayado en diversos instrumentos) versus IL Test™ Heparin obtenido en el instrumento ACL 300

Microplaca			
	(n = 70)	IU/mL Heparina = +0.017 + 1.00x Heparina,	r = 0.97
Instrumento			
Cobas Mira	(n = 87)	IU/mL Heparina = -0.012 + 1.04x Heparina,	r = 0.98
ACL 300†	(n = 62)	IU/mL Heparina = +0.004 + 1.03x Heparina,	r = 0.98
Futura	(n = 113)	IU/mL Heparina = +0.009 + 0.97x Heparina,	r = 0.97
MLA Electra 1600	(n = 80)	IU/mL Heparina = +0.004 + 1.01x Heparina,	r = 0.97
Thrombolyzer*	(n= 76)	IU/mL Heparina = +0.008 + 0.92x Heparina	r = 0.97
BCS*	(n = 30)	IU/mL Heparina = +0.008 + 0.93x Heparina,	r = 0.99
STA*	(n = 29)	IU/mL Heparina = +0.017 + 0.96x Heparina,	r = 0.99
Sysmex 6000	(n = 30)	IU/mL Heparina = +0.061 + 0.91x Heparina,	r = 0.99
AMAX	(n = 30)	IU/mL Heparina = +0.028 + 0.97x Heparina,	r = 0.99
AMGA*	(n = 30)	IU/mL Heparina = -0.061 + 1.02x Heparina,	r = 0.99
Hitachi 911	(n = 30)	IU/mL Heparina = +0.014 + 0.98x Heparina,	r = 0.99
Hitachi 917	(n = 30)	IU/mL Heparina = +0.021 + 1.00x Heparina,	r = 0.98

*NOTA: Instrumento que no está disponible en todos los países
†NOTA: En el caso de la serie ACL Cien/Mil, este ensayo se efectúa en dos fases añadiendo el reactivo antitrombótico como parte del proceso. La ficha de aplicaciones contiene informaciones más específicas.

Rango de medida recomandado
La relación entre la concentración de la heparina y la liberación de pNA, medida como absorbancia a 405 nm, es una función polinómica de segundo orden en el rango de 0-1,5 IU/mL.

Límite de medición:
Sistema
Cobas Mira mAbs / min per 1IU/mL Heparin 333 mAbs

Determinaciones/kit

Microplaca: 200

CHROMOGENIX

COAMATIC® Heparin - 82 3393 63

FRANÇAIS - Révision de la notice 06/2013

Utilisation prevue

Dosage de l'héparine non fractionnée (Héparine NF) ou de l'héparine de bas poids moléculaire (Héparine BPM) dans le plasma humain citraté à l'aide de méthodes automatisées et de la technique sur la microplaque.

Contexte et resume

L'héparine est l'antithrombotique le plus souvent utilisé. L'activité biologique de ce glycosaminoglycane sulfaté réside dans son aptitude à accélérer (jusqu'à 2000 fois) l'effet inhibiteur de l'antithrombine (AT) sur le processus de coagulation.
La détermination de la quantité d'héparine de bas poids moléculaire (BPM) ou non fractionnée (NF) se fait à partir de l'activité anti-FXa exprimée par le complexe [AT • Héparine] formé dans le plasma.[1-3]

Principe de mesure

Héparine + AT ⟶ [AT • Héparine]
[AT • Héparine] + FXa (exès) ⟶ [FXa • AT • Héparine] + FXa (résidual)
FXa (résidual) + S-2732 ⟶ Péptide + pNA

Du facteur Xa (FXa) est ajouté à un mélange de plasma non dilué avecle substrat chromogène S-2732.
Lorsque l'héparine et l'AT sont complexées, il se produit en même temps deux réactions concurrentes:
1. Inhibition du FXa par le complexe [AT • Héparine].
2. Réaction du FXa avec le S-2732 aboutissant à un clivage du pNA.
   La libération de pNA mesurée à 405 nm est inversement proportionnelle au taux d'héparine du mélange.

De façon à réduire l'influence des antagonistes de l'héparine tels que le facteur plaquettaire 4 (FP4), on inclut du sulfate de dextrane dans le mélange réactionnel.[4]

Reactifs

1. **S-2732, 15 mg** 2 flacons
   Substrat chromogène, Suc-Ile-Glu(γ-pip)-Gly-Arg-pNA • HCl lyophilisé avec un détergent et du mannitol comme agent gonflant.
2. **Factor Xa, 35 nkat** 2 flacons
   FXa bovin lyophilisé contenant du tampon Tris, de l'EDTA, du NaCl, du sulfate de dextrane et de la sérum-albumine bovine.

ATTENTION:
Classification risque: **Aucune**
Phrases risque: **Aucune**
Phrases sécurité: **Aucune**
Ce produit est à usage diagnostique *in vitro.*

Préparation des réactifs:
Pour la technique sur microplaque, reconstituer les REACTIFS 1. et 2., à l'aide de 5,0 mL d'eau (voir REACTIFS 3). Remettre les bouchons en place et agiter doucement par rotation. S'assurer que la reconstitution du produit est totale. Maintenir le réactif à 15-25°C pendant 10 à 30 mn et retourner avant mise en oeuvre.
REMARQUE: Il se peut que d'autres volumes de reconstitution des réactifs s'appliquent dans le cas des méthodes automatisées (voir chapitre: APPLICATIONS SUR INSTRUMENTS). Les réactifs ne sont pas interchangeables entre lots.

Réactifs nécessaires mais non fournis:
3. Eau désionisée, filtrée sur filtre de 0,22 µm
4. Acide acétique à 20% ou acide citrique à 2% (méthode du point final)
5. Sérum physiologique (0,9% NaCl)
6. Plasma normal humain
7. Plasma étalon pour HBPM ou HNF (étalonée par raport au 1er étalon International établi par le WMO avec une méthode anti Xa)
8. Plasma de contrôle pour HBPM ou HNF.

REMARQUE: Le réactif antithrombine et le tampon Tris sont nécessaires à la méthode adaptée sur la série des ACL. (Cette méthode est une technique en 2 temps, comprenant l'addition d'antithrombine), se référer à la notice d'explication spécifique.

Matériel nécessaire mais non fourni:
— Spectrophotomètre à 405 nm
  (et 490 nm pour la procédure sur microplaque)
— Incubateur à 37°C
— Microplaques*
— Centrifugeuse à 2000 x g
— Tubes à essai en plastique
— Chronomètre
— Mélangeur à tourbillons
— Pipettes jaugées
— Papier millimétré

*REMARQUE: Ne pas utiliser de microplaques pour le coating.

Conditions de conservation et stabilité

Les réactifs avant l'ouverture sont stables à 2-8°C jusqu'à la date de péremption qui figure sur l'étiquette.
1. **S-2732:** Stabilité après reconstitution: 3 mois à +2-8°C dans l'ampoule d'origine.
2. **Factor Xa:** Stabilité après reconstitution: 3 mois à +2-8°C dans l'ampoule d'origine.

MISE EN GARDE: Ne pas utiliser les réactifs au-delà de la date de péremption figurant sur l'étiquette. Substrat- Eviter l'exposition à la lumière. Jeter la solution de substrat si elle présente une coloration jaune. Eviter la contamination par des microorganismes dans les réactifs.

Recuil des echantillons

Neuf volumes de sang veineux fraîchement prélevé sont recueillis dans un volume de citrate trisodique. Centrifugation: 2000 x g pendant 20 minutes à 20-25°C. Pour des instructions complémentaires au sujet du recueil, de la manipulation et de la conservation des échantillons, se reporter au document H21-A2 NCCLS.[6]

Controle de qualite

Le recours à deux contrôles de concentration differente en héparine, étalonée par raport au 1er étalon International établi par le WMO avec une méthode anti Xa, est recommandé pour le contrôle de la qualité.[7] 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.[8]

Resultats

Les résultats de l'héparine sont indiqués en activité (IU/ml).

Valeurs attendues

Afin d'obtenir un effet optimal avec un minimum de risques d'hémorragie ou de complications thrombo-emboliques, l'héparine doit se situer dans la fourchette recommandée par le fabricant.[9]

Procedure

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

Méthode en microplaque:
Dilution des échantillons et des témoins

Echantillons/témoins/standards	100 µL
Eau (voir REACTIFS 3)	300 µL
Bien mélanger.	
Echantillons/témoins/standards dilués	50 µL
Incuber à 37°C pendant 2 à 6 minutes.	
S-2732 (préchauffer à 37°C)	50 µL
Mélanger et ajouter dans les 2 minutes.	
Facteur Xa (préchauffer à 37°C)	50 µL
Mélanger et incuber à 37°C pendant 120 secondes.	
Acide acétique à 20% ou acide citrique à 2%	50 µL

Lire l'absorbance par comparaison avec de l'eau stérile à 405 nm. Si possible, lire et soustraire l'absorbance à 490 nm en vue de compenser les interférences dues à la microplaque.

Etalonnage

Pour la préparation des standards, utiliser une source d'héparine NF ou BPM étalonnée par référence à un Standard International.
Par exemple: Preparation des standards pour 10 séries.
i. Diluer l'héparine avec du sérum physiologique (0,9% NaCl) de manière à obtenir 100 IU/mL.
ii. Ajouter 160 µL de la dilution à 20,0 mL de plasma normal provenant d'un pool de sujets et mélanger soigneusement afin d'obtenir un plasma contenant 0,8 IU/mL.

Les dilutions standard sont réalisées selon le tableau ci-dessous:

Standard IU/mL	Plasma à 0,8 IU/mL Héparine mL	Plasma normal mL
0	-	4,0
0,2	1,0	3,0
0,4	2,0	2,0
0,6	3,0	1,0
0,8	4,0	-

Ces standards peuvent être conservés 12 mois à -20°C.

Calcul

Méthode de la microplaque:
Utiliser un programme informatique approprié on sur une feuille de papier millimitré, tracer la courbe de l'absorbance (A) des standards en fonction de la concentration d'héparine. Porter A en ordonnées et les IU/mL d'héparine en abscisses. Relier les points standard par la ligne polynomiale de second ordre la mieux ajustée. Les échantillons et les témoins sont évalués sur la base de cette courbe standard. Des exemples de courbes standard types (technique de la microplaque), Courbe standard Héparine non fractionnée et Courbe standard Héparine BPM, sont présentés ci-dessous.

Evaluation du coffret

Limites du test / Interferences
Une hémoglobinémie, une triglycéridémie et une bilirubinémie allant respectivement jusqu'à 200 mg/dl, 600 mg/dl et 12 mg/dl ne modifient pas les résultats de l'héparine. La présence de sulfate de dextrane réduit l'influence des antagonistes de l'héparine, comme par exemple le facteur plaquettaire 4 (FP4).[4]

Precision:
Méthode de la microplaque. Les données résumées ci-dessous ont été obtenues avec la méthode de la microplaque, en utilisant de l'héparine non fractionnée (HNF) et de l'héparine de bas poids moléculaire (HBPM).

Concentration moyenne	Intra-série C.V. (%)	Inter-séries C.V. (%)	Total C.V. (%)
HNF 0,7 IU/ml	2,8	1,2	2,8
HNF 0,4 IU/ml	3,4	1,5	3,7
HBPM 0,7 IU/ml	3,6	2,8	4,4
HBPM 0,4 IU/ml	2,4	2,3	3,2

Les études de corrélation sur différents instrument obtenus par ou pour le compte de Chromogenix sont inclus dans cette notice à titre d'exemples seulement. Chaque laboratoire est invité à établir ses propres données de précision.

Correlation
1. Des études complémentaires montrent une bonne corrélation du COAMATIC® Heparin avec COATEST® Heparin et COATEST® LMW Heparin/Heparin, sur Cobas Mira:
   COAMATIC® Héparine versus COATEST® Héparine (n = 112)
   IU/mL Héparine = +0.005 + 1.00 x Héparine, r = 0.97
   COAMATIC® Héparine versus COATEST® LMW Héparine/Héparine (n = 90)
   IU/mL Héparine = +0.002 + 1.04 x Héparine, r = 0.96
2. La comparaison du coffret COAMATIC® Heparin sur different instruments avec le Test™ IL Heparin sur ACL 300 donne les résultats suivants

Microplaque			
	(n = 70)	IU/mL Héparine = +0.017 + 1.00x Héparine,	r = 0.97
Instruments			
Cobas Mira	(n = 87)	IU/mL Héparine = -0.012 + 1.04x Héparine,	r = 0.98
ACL 300†	(n = 62)	IU/mL Héparine = +0.004 + 1.03x Héparine,	r = 0.98
Futura	(n = 113)	IU/mL Héparine = +0.009 + 0.97x Héparine,	r = 0.97
MLA Electra 1600	(n = 80)	IU/mL Héparine = +0.004 + 1.01x Héparine,	r = 0.97
Thrombolyzer*	(n= 76)	IU/mL Héparine = +0.008 + 0.92x Héparine	r = 0.97
BCS*	(n = 30)	IU/mL Héparine = +0.008 + 0.93x Héparine,	r = 0.99
STA*	(n = 29)	IU/mL Héparine = +0.017 + 0.96x Héparine,	r = 0.99
Sysmex 6000	(n = 30)	IU/mL Héparine = +0.061 + 0.91x Héparine,	r = 0.99
AMAX	(n = 30)	IU/mL Héparine = +0.028 + 0.97x Héparine,	r = 0.99
AMGA*	(n = 30)	IU/mL Héparine = -0.061 + 1.02x Héparine,	r = 0.99
Hitachi 911	(n = 30)	IU/mL Héparine = +0.014 + 0.98x Héparine,	r = 0.99
Hitachi 917	(n = 30)	IU/mL Héparine = +0.021 + 1.00x Héparine,	r = 0.98

*REMARQUE: Instrument non disponible dans tous les pays.
†REMARQUE: Dans le cas de l'automate ACL (série cent et mille), ce dosage est réalisé en deux étapes et la procédure comporte l'addition d'un réactif à l'antithrombine. Pour des informations spécifiques, voir la notice.

Sensibilité:

Appareil	
Cobas Mira	mAbs / min for 1IU/mL : 333 mAbs

Linearité

Pour la technique sur microplaque la relation entre la concentration d'héparine et la libération de pNA, mesurée en tant qu'absorbance à 405 nm, suit une fonction polynomiale de second ordre dans la fourchette de 0 à 1,5 IU/mL.

Limite de detection

Ce dosage permet la détection d'une activité héparinemique inferieure à 0,1 IU/mL.

Nombre de dosages par trousse.

Microplaque: 200

COAMATIC® Heparin - 82 3393 63

ITALIANO - Revisione dell'inserto 06/2013

Uso

Per il dosaggio di eparina non frazionata (UFH) o di eparina a basso peso molecolare (LMWH) nel plasma umano citratato usando metodi automatici e micropiastra.

Introduzione

L'eparina è l'antitrombotico più usato. L'attività biologica di questo glicosaminoglicano solfato sta nella sua capacità di accelerare (fino a 2000 volte) l'effetto inibitorio dell'antitrombina (AT) sulle proteasi di coagulazione. La quantità di eparina a basso peso molecolare (LMW) o di eparina non frazionata (UF) è determinata dall'attività anti- FXa espressa dal complesso [AT • Eparina] formatosi nel plasma.[1-3]

Principio del metodo

Eparina + AT ⟶ [AT • Eparina]
[AT • Eparina] + FXa (eccesso) ⟶ [FXa • AT • Eparina] + FXa (résiduo)
FXa (résiduo) + S-2732 ⟶ Péptide + pNA

Il fattore Xa (FXa) viene aggiunto ad una miscela di plasma non diluito con il substrato cromogenico S-2732. Quando Eparina e AT sono complessati, si verificano simultaneamente due reazioni opposte:
1. Inibizione del FXa da parte del complesso [AT • Eparina]
2. Reazione del FXa con S-2732, che determina la liberazione della pNA.

La pNA rilasciato viene misurato A 405 nm ed è inversamente proporzionale alla quantità di eparina presente nel campione.[1] Per ridurre l'influsso degli antagonisti dell'eparina, come il fattore piastrinico 4 (PF4), nella miscela di reazione viene aggiunto desrano solfato.[4]

Reagenti

1. **S-2732, 15 mg** 2 fiale
   Substrato cromogenico, Suc-Ile-Glu(g-pip)-Gly-Arg-pNA • HC1 liofilizzato con detergente e mannitolo quale eccipiente.
2. **Factor Xa, 35 nkat** 2 fiale
   FXa bovino liofilizzato contenente tri(idrossimetil)amminometano, EDTA, NaCl, destrano solfato e albumina bovina.

Avvertenze:
Simbolo di pericolo: **nessuno**
Frasi di rischio: **nessuno**
Consigli di prudenza: **nessuno**
Per l'impiego diagnostico *in vitro*.

Preparazione dei reagenti:
Per la tecnica a micropiastra, ricostituire REAGENTI 1. e 2. con 5,0 mL di acqua (vedi REAGENTI 3). Rimettere il tappo e agitare delicatamente. Assicurarsi della completa ricostituzione del prodotto.
Tenere il reagente a 15-25°C per 10-30 minuti e miscelare prima dell'uso.
NOTA: I metodi automatici possono richiedere altri volumi di ricostituzione dei reagenti. (Vedi paragrafo: APPLICAZIONI STRUMENTALI).
I reagenti non sono interscambiabili tra i vari lotti.

Reagenti necessari ma non inclusi nel kit:
3. Acqua deionizzata filtrata a 0,22 mm o acqua NCCLS tipo II[5]
4. Acido acetico al 20% o acido citrico al 2% (metodo end-point)
5. Soluzione fisiologica (0,9% NaCl)
6. Plasma umano normale
7. Calibrator plasma per LMW Eparina e/o UF Eparina calibrata contro standards internazionali
8. Controlli per LMW e/o attività UF Eparina

NOTA: Nel caso della serie ACL 100/1000, il dosaggio viene effettuato con metodo a due fasi, e il procedimento prevede l'aggiunta di reagente antitrombina. Per informazioni più specifiche vedi il foglio esplicativo.

Materiale necessario ma non incluso nel kit
— Spettrofotometro 405 nm (e 490 nm per procedimento a micropiastra)
— Termostato 37°C
— Micropiastre*
— Centrifuga, 2000 x g
— Provette in plastica
— Cronometro
— Miscelatore tipo Vortex
— Pipette graduate
— Carta millimetrata per diagrammi

*NOTA: Non usare micropiastre per copertura.

Condizioni di conservazione e stabilità

I reagenti sigillati sono stabili a 2-8°C fino alla data di scadenza stampata sull'etichetta.
1. **S-2732:** Stabilità dopo la ricostituzione: 3 mesi a +2-8°C nella fiala originale
2. **Factor Xa:** Stabilità dopo la ricostituzione: 3 mesi a +2-8°C nella fiala originale

AVVERTENZA: Non usare i reagenti oltre la data di scadenza stampata sull'etichetta della confezione. Substrato - Evitare l'esposizione alla luce, non utilizzare se la soluzione presenta una colorazione gialla.
Evitare ogni contaminazione da microorganismi nei reagenti.

Raccolta dei campioni

Nove parti di sangue venoso, appena prelevato, vengono miscelate con una parte di citrato di trisodio. Centrifugazione: 2000 x g per 20 minuti a 20-25°C. Per ulteriori informazioni sul prelievo, la manipolazione e la conservazione di campioni consultare il documento NCCLS H21-A2.[6]

Controllo di qualità

Per un programma completo di controllo della qualità[7], si raccomanda l' uso di controlli dell'eparina, calibrati contro uno Standard Internazionale, a due livelli. Ogni laboratorio dovrà determinare le proprie deviazioni standard e medie, e stabilire un programma di qualità per controllare le prove di laboratorio. 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.[8]

Risultati

I risultati relativi all'eparina sono espressi in attività (IU/mL).

Intervallo di riferimento

Per ottenere un effetto ottimale con rischio minimo di emorragia o complicazioni tromboemboliche, la concentrazione di eparina dovrebbe essere compresa nell'intervallo raccomandato dal produttore.[9]

Procedure

Tutte le condizioni riportate in questo inserto sono riferite al metodo in micropiastra or Cobas Mira. Applicazioni e volumi di ricostituzione dei reagenti per una vasta gamma di strumenti sono disdponibili su richiesta da Chromogenix.

Metodo micropiastra:
Diluizione di campioni e dei controlli

Campioni/controlli/standards	100 mL
Acqua (vedi REAGENTI 3)	300 mL
Mescolare bene	
Aggiungere campioni /controlli /standard diluiti ai micropozzetti	50 mL
Incubare a 37°C per 2-6 min.	
Aggiungere S-2732 (preriscaldato a 37°C)	50 mL
Mescolare e aggiungere entro 2 min Fattore Xa (preriscaldato a 37°C)	50 mL
Mescolare e incubare a +37°C per 120 sec.	
Acido acetico al 20% o acido citrico al 2%	50 mL

Leggere l'assorbanza contro acqua (vedi REAGENTE 3) a 405 nm.
Se possibile, leggere e sottrarre l'assorbanza a 490 nm in modo da compensare le eventuali differenze del materiale delle micropiastre.

Calibrazione

Per la preparazione degli standard, usare una fonte di eparina UF o LMW che sia stata calibrata contro uno Standard Internazionale.
Esempio di preparazione di standards per 10 serie.
i. Diluire l'eparina con soluzione fisiologica (0,9% NaCl) in modo da ottenere 100 IU/mL.
ii. Aggiungere 160 mL dell'eparina diluita a 20 mL di un pool di plasmi normale per ottenere un plasma contenente 0,8 IU/mL e mescolare con cura.

Le diverse concentrazioni di standard si ottengono con le diluizioni indicate nella sequente tabella:

Standard IU/mL	Plasma con Eparina 0,8 IU/mL mL	Plasma normale mL
0	-	4,0
0,2	1,0	3,0
0,4	2,0	2,0
0,6	3,0	1,0
0,8	4,0	-

Questi standards si possono conservare a –20°C per 12 mesi.

Calcolo

Metodo micropiastra:
Utilizzando un software appropriato (o carta millimetrata) creare un grafico riportando l'assorbanza degli standards (A) sull'asse y e la concentrazione di eparina (IU/mL) sull'asse x. Interpolare i punti ottenuti mediante una funzione polinomiale di secondo ordine. Campioni e controlli sono valutati sulla base di questa curva standard. Esempi di curve standard tipiche (metodo a micropiastra), Curva standard eparina non frazionata e Curva standard eparina LMW, sono indicati di seguito.

Caratteristiche del metodo

Interferenze
I risultati relativi all'eparina non sono influenzati dall'emoglobina fino a 200 mg/dl, dai trigliceridi fino a 600 mg/mL e dalla bilirubina fino a 12 mg/dl.
La presenza di destrano solfato riduce l'influenza degli antagonisti dell'eparina, come ad es. il fattore piastrinico 4 (PF4).[4]

Precisione:
Metodo micropiastra. I dati di seguito riportati sono stati ottenuti in micropiastra usando eparina non frazionata (UHF) e eparina a basso peso molecolare (LMWH).

Concentrazione media	Intra-série C.V. (%)	Inter-série C.V. (%)	Totale C.V. (%)
0,7 IU/mL UFH	2,8	1,2	2,8
0,4 IU/mL UFH	3,4	1,5	3,7
0,7 IU/mL LMWH	3,6	2,8	4,4
0,4 IU/mL LMWH	2,4	2,3	3,2

Risultati di precisione ottenuti da Chromogenix con i vari strumenti sono inclusi nelle rispettive applicazioni, solo a titolo di esempio.
Ogni laboratorio dovrà stabilire i propri dati di precisione.

Correlazione
1. COAMATIC® Heparin mostra una buona correlazione con il COATEST® Heparin e il COATEST® LMWH/Heparin con l'analizzatore Cobas Mira:
   COAMATIC® Heparin versus COATEST® Heparin (n = 112)
   IU/mL Heparin = +0.005 + 1.00 x Heparin, r = 0.97
   COAMATIC® Heparin versus COATEST® LMW Heparin/Heparin (n = 90)
   IU/mL Heparin = +0.002 + 1.04 x Heparin, r = 0.96
2. Eparina COAMATIC® Heparin (su diversi analizzatori) vs IL Test™ Eparina (su ACL 300).

Micropiastra			
	(n = 70)	IU/mL Heparin = +0.017 + 1.00x Heparin,	r = 0.97
Strumento			
Cobas Mira	(n = 87)	IU/mL Heparin = -0.012 + 1.04x Heparin,	r = 0.98
ACL 300†	(n = 62)	IU/mL Heparin = +0.004 + 1.03x Heparin,	r = 0.98
Futura	(n = 113)	IU/mL Heparin = +0.009 + 0.97x Heparin,	r = 0.97
MLA Electra 1600	(n = 80)	IU/mL Heparin = +0.004 + 1.01x Heparin,	r = 0.97
Thrombolyzer*	(n= 76)	IU/mL Heparin = +0.008 + 0.92x Heparin	r = 0.97
BCS*	(n = 30)	IU/mL Heparin = +0.008 + 0.93x Heparin,	r = 0.99
STA*	(n = 29)	IU/mL Heparin = +0.017 + 0.96x Heparin,	r = 0.99
Sysmex 6000	(n = 30)	IU/mL Heparin = +0.061 + 0.91x Heparin,	r = 0.99
AMAX	(n = 30)	IU/mL Heparin = +0.028 + 0.97x Heparin,	r = 0.99
AMGA*	(n = 30)	IU/mL Heparin = -0.061 + 1.02x Heparin,	r = 0.99
Hitachi 911	(n = 30)	IU/mL Heparin = +0.014 + 0.98x Heparin,	r = 0.99
Hitachi 917	(n = 30)	IU/mL Heparin = +0.021 + 1.00x Heparin,	r = 0.98

*NOTA: Strumento non disponibile in tutti i paesi.
†NOTA: Nel caso della serie ACL 100/1000, il dosaggio viene effettuato con metodo a due fasi, e il procedimento prevede l'aggiunta di reagente antitrombina. Per informazioni più specifiche vedi il foglio esplicativo.

Intervallo di misura
Il rapporto tra concentrazione di eparina e di pNA rilasciato, misurato come assorbanza a 405 nm, segue una funzione polinomiale di secondo ordine nell´intervallo di 0-1,5 IU/mL.

Sensibilità:

Sistema	
Cobas Mira	mAbs / min for 1IU/mL Eparina 333 mAbs

COAMATIC® Heparin - 82 3393 63

PORTUGUÊS - Revisão do folheto 06/2013

Para a revisao actual deste folheto informativo em Portugues, contacte o representante da Chromogenix da sua área.
PRECAUÇÕES E ADVERTÊNCIAS:
Classe de risco: **nenhuma**
Frases de risco: **nenhuma**
Frases de segurança: **nenhuma**
Este reagente destina-se a utilização em diagnóstico *in vitro.*

COAMATIC® Heparin - 82 3393 63

SVENSK - Instick revision 06/2013

För aktuell revision av detta insticksblad på svenska ber vi Er att kontakta Chromogenix distributör.
FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER OCH VARNINGAR:
Faroklass: **ingen**
Riskfraser: **ingen**
Skyddsfraser: **ingen**
Denna produkt är för *in vitro* diagnostiskt användande

COAMATIC® Heparin - 82 3393 63

DANSK - Metodeforskrift revision 06/2013

Venligst rekvirer den gældende udgave af metodeforskriften på dansk fra den lokale Chromogenix distributør.
ADVARSEL:
Fareklasse: **Ingen**
Risikosærninger: **Ingen**
Sikkerhedssætninger: **Ingen**
Dette produkt er til *in vitro* diagnostisk anvendelse.

COAMATIC® Heparin - 82 3393 63

ΕΛΛΗΝΙΚΑ - Αναθεώρηση εσωκλείστου 06/2013

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

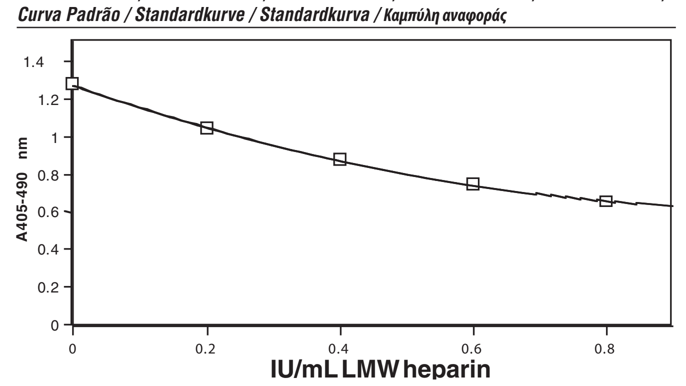
ΠΡΟΣΟΧΗ:
Σήμα κινδύνου Κατηγορία: ουδέν
Φράσεις κινδύνου: ουδέν
Φράσεις οδηγιών ασφαλούς χρήσης: ουδέν

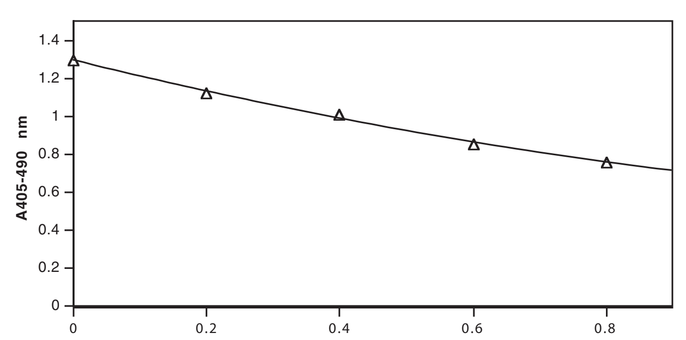
Το προϊόν προορίζεται για διαγνωστική χρήση in vitro.

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

1. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Specifications for reagent water used in the clinical laboratory. NCCLS Approved Standard: ASC-3.
2. ZUCKER S, CATHEY M H, WEST B. Preparation of Quality control specimens for coagulation. Am J Clin Pathol 53, 924-927 (1970).
3. WESTGARD J O, BARRY P L. Cost-effective quality control: Managing the quality and productivity of analytical process. AACC press (1988).
4. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Collection, transport and processing of blood specimens for coagulation testing and performance of coagulation assays, NCCLS Document H21-A2; vol 11 No. 23.
5. ÖDEGÅRD O R et al. Heparin cofactor activity measured with an amidolytic method. Thromb Res 6, 287-294 (1975).
6. TRANT H et al. Influence of heparin cofactor II (HCII) in the determination of antithrombin III (AT). Thromb Res 40, 571-576 (1985).
7. TOLLEFSEN D M. Laboratory diagnosis of antithrombin and heparin cofactor II deficiency. Semin Thromb Hemost 16, 162-168 (1990).
8. DEMERS C et al. An antithrombin III assay based on factor Xa inhibition provides a more reliable test to identify congenital antithrombin III deficiency than an assay based on thrombin inhibition. Thromb Haemost 69, 231-235 (1993).
9. BOHNER J et al. Thrombin-based antithrombin assays show overestimation of antithrombin III activity in patients on heparin therapy due to heparin cofactor II influence. Thromb Haemost 71, 280-283 (1994).

Standard Curve / Standardkurve / Curva estándar / Courbe standard / Curva standard / Curva Padrão / Standardkurve / Standardkurva / Καμπύλη αναφοράς





Symbols used / Verwendete Symbole / Símbolos utilizados / Symboles utilisés / Simboli impiegati / Símbolos utilizados / Anvendte symboler / Använda Symboler / Χρησιμοποιηθέντα σύμβολα

IVD
In Vitro Diagnostic Medical Device
In Vitro Diagnostikum
Dispositif medical de diagnostique in vitro
Producto sanitario para diagnóstico in vitro
Dispositivo medicodiagnostico in vitro
Dispositivo médico para utilização em diagnóstico in vitro
Medicinsk udstyr til in vitro-diagnostik
In vitro diagnostisk medicinsk produkt
Προϊόν για διαγνωστική χρήση

LOT
Batch code
Chargenbezeichnung
Codigo de lote
Code du lot
Codice del lotto
Número de lote
Batchkoden
Tillverkningskod
Αρ. Παρτίδας

Use by
Verwendbar bis
Fecha de caducidad
Utiliser jusque
Utilizzare entro
Data límite de utilização
Anvendelsesdato
Användning
Χρήση έως

Temperature limitation
Zulässiger Temperaturebereich
Limite de temperatura
Limites de température
Limite di temperatura
Límite de temperatura
Temperaturbegrænsning
Temperatur gräns
Περιορισμοί θερμοκρασίας

Consult instructions for use
Gebrauchsanweisung beachten
Consulte las instrucciones de uso
Consulter les instructions d'utilisation
Consultare le istruzioni per l'uso
Consultar as instruções de utilização
Se instruktion før brug
Ta del av instruktionen före användning
Συμβουλευτήτε τις οδηγίες χρήσης

CONTROL
Control
Kontrollen
Control
Contrôle
Controllo
Controlo
Kontrol
Kontroll
Υλικό ποιοτικού ελέγχου

Biological risks
Biologisches Risiko
Riesgo biológico
Risque biologique
Rischio biologico
Risco biológico
Miljø oplysninger
Biologiska risker
Βιολογικοί κίνδυνοι

Manufacturer
Hersteller
Fabricante
Fabricant
Fabbricante
Fabricado por
Producent
Tillverkare
Κατασκευαστής

EC REP
Authorised representative
Bevollmächtigter
Representante autorizado
Mandataire
Rappresentanza autorizzata
Representante autorizado
Leverandør
Auktoriserad representant
Εξουσιοδοτημένος αντιπρόσωπος

Coamatic Heparin	*82 3393 63*
Printed Insert Sheet:	302002
Revision:	R4
Issued:	06/2013
C.O.:	436578

LANGUAGES

ENGLISH
DEUTSCH
ESPAÑOL
FRANÇAIS
ITALIANO
PORTUGÛES
DANSK
SWENSK
GREEK

TECHNICAL SPECS

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