



BIOPHEN™ AT (Anti-IIa) Ref 221122 (R1,R2 : 2 x 2,5 mL, R3 : 2 x 25 mL)

Méthode chromogène anti-IIa pour le dosage quantitatif de l'activité antithrombine (AT), sur plasma humain.

Français, dernière révision : 09-2024

UTILISATION :

Le coffret BIOPHEN™ AT (Anti-IIa) est une méthode chromogène proposée pour la détermination quantitative *in vitro* de l'activité antithrombine (AT), en présence d'un excès d'héparine, sur plasma humain citraté ou milieu purifié, en utilisant une méthode anti-IIa, manuelle ou automatisée.

RESUME ET EXPLICATION :

Le Déficit congénital en AT induit des troubles thromboemboliques spontanés. Ces déficits congénitaux en AT sont classés en 4 catégories¹ :

- Type I : Taux d'AT diminué et activité AT diminuée ; cas le plus fréquent.
- Type II RS (Reactive Site) : Taux d'AT normal et activité biologique diminuée; une anomalie de la protéine est présente au niveau du site actif.
- Type II HBS (Heparin Binding Site) : Taux d'AT normal, activité biologique normale en l'absence d'héparine, mais diminution en sa présence et anomalie au niveau de la liaison AT-Héparine.
- Type II PE (Pleiotropic Effects) : Taux d'AT diminué, activité biologique diminuée, protéine non fonctionnelle et en quantité réduite.

Aide au diagnostic des déficits congénitaux ou acquis en Antithrombine.

Dosage d'AT (activité anti-IIa) sur plasma, ou milieu purifié lorsque nécessaire.

PRINCIPE :

L'Antithrombine (AT) est le principal inhibiteur physiologique de la coagulation. Il inhibe les sérines-estérases de la coagulation, en particulier la thrombine, le Facteur Xa et le Facteur IXa, régule la coagulation et protège contre la thrombose. Complexée à l'héparine, l'AT devient un inhibiteur immédiat et puissant des sérines estérases de la coagulation. Ce dosage anti-IIa mesure donc l'activité anti-IIa héparine-dépendante de l'AT^{2,3,4,5}.

La méthode BIOPHEN™ AT (Anti-IIa) est un dosage basé sur l'inhibition d'une quantité constante et en excès de Thrombine (IIa), par l'AT à doser, en présence d'un excès d'héparine, et l'hydrolyse d'un substrat chromogène spécifique de la Thrombine, par la Thrombine résiduelle. PNA est ensuite libérée de ce substrat. La quantité de pNA libérée (mesurée par l'absorbance à 405nm) est fonction de la quantité de Thrombine résiduelle. Elle est inversement proportionnelle à la concentration d'AT présente dans l'échantillon testé.

Héparine + AT → [AT Hep.]

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

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

REACTIFS :

R1 : Thrombine bovine, lyophilisée en présence de stabilisants. Contient de la BSA. **2 flacons de 2,5 mL.**

R2 : Substrat chromogène spécifique de la thrombine (SIIa-01), lyophilisé. **2 flacons de 2,5 mL.**

R3 : Tampon de dilution spécifique avec Héparine, à pH 8.40, sous forme liquide. **2 flacons de 25 mL.**

MISE EN GARDE ET AVERTISSEMENTS :

- Tout produit d'origine biologique doit être manipulé avec toutes les précautions nécessaires, et considéré comme étant potentiellement infectieux.
- Si le substrat devient jaune, cela indique une contamination. Le flacon doit être jeté et un nouveau utilisé.
- L'élimination des déchets doit être effectuée conformément aux réglementations locales en vigueur.
- Utiliser uniquement les réactifs d'un même lot de coffret. Ne pas mélanger les réactifs de différents lots de coffrets pour réaliser un dosage, ils sont optimisés pour chaque lot de coffrets.
- Les réactifs doivent être manipulés avec précautions afin d'éviter toute contamination lors de leur utilisation. Eviter autant que possible toute évaporation des réactifs lors de leur utilisation, en limitant la surface d'échange liquide-air. L'évaporation réduit la stabilité du réactif à bord de l'automate.
- Pour conserver la stabilité des réactifs, refermer les flacons après chaque utilisation avec leurs bouchons respectifs.
- Les études de vieillissement, réalisées à 30°C pendant 3 semaines, montrent que les réactifs peuvent être expédiés à température ambiante pendant une période courte, sans aucun dommage.
- Le plasma bovin utilisé pour la préparation de la BSA et de la thrombine bovine a été testé par des méthodes enregistrées et est certifié exempt de maladies infectieuses, notamment de l'encéphalopathie spongiforme bovine.
- Faire un blanc plasma si le plasma est icterique, lipémique, hémolysé ou présente une coloration différente des plasmas étalons.
- Quand la méthode cinétique est utilisée, utiliser les ΔDO 405 au lieu des DO 405.
- La concentration en thrombine bovine est ajustée pour chaque lot pour une réactivité optimale.
- Pour usage de diagnostic *in vitro*.

PREPARATION ET STABILITE DES REACTIFS :

Les flacons sont lyophilisés sous vide. Retirer délicatement le bouchon de lyophilisation des réactifs lyophilisés, pour s'affranchir de toute perte du produit à l'ouverture du flacon.

R1: Réactif 1 : Thrombine bovine

Reconstituer chaque flacon avec exactement **2,5 mL d'eau distillée**, agiter vigoureusement jusqu'à dissolution complète. Laisser stabiliser pendant 30 min à température ambiante (18-25°C) en agitant de temps en temps.

Homogénéiser le réactif avant chaque utilisation.

La stabilité du réactif après reconstitution, sous réserve de toute contamination ou d'évaporation, conservé dans son flacon d'origine est de :

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

R2: Réactif 2 : Substrat chromogène spécifique de la thrombine

Reconstituer chaque flacon avec exactement **2,5 mL d'eau distillée**, agiter vigoureusement jusqu'à dissolution complète. Laisser stabiliser pendant 30 min à température ambiante (18-25°C) en agitant de temps en temps.

Homogénéiser le réactif avant chaque utilisation.

La stabilité du réactif après reconstitution, sous réserve de toute contamination ou d'évaporation, conservé dans son flacon d'origine est de :

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

*Décongeler une seule fois, le plus rapidement possible à 37°C en adaptant la durée d'incubation au volume de réactif. La stabilité du réactif décongelé doit être vérifiée dans les conditions de travail du laboratoire.

R3: Réactif 3 : Tampon de dilution spécifique avec Héparine

Prêt à l'emploi. Laisser stabiliser pendant 30 min à température ambiante (18-25°C), avant utilisation.

Homogénéiser le réactif avant chaque utilisation.

La stabilité du réactif après ouverture, sous réserve de toute contamination ou d'évaporation, conservé dans son flacon d'origine est de :

- **Au moins 7 jours** à 2-8°C.
- **7 jours** à température ambiante (18-25°C).
- **Ne pas congeler.**

CONDITIONS DE STOCKAGE :

Les réactifs non ouverts doivent être conservés à 2-8°C dans leur emballage d'origine. Ils sont alors utilisables jusqu'à la date de péremption imprimée sur le coffret.

REACTIFS ET MATERIELS REQUIS MAIS NON FOURNIS :

Réactifs :

- Eau distillée.
- Acide acétique à 20% ou acide citrique à 2% (méthode en point final).
- Etalon ou matériel de référence pour dosage d'AT (international ou interne, ou pool de plasma humain normal citraté de référence) et contrôles spécifiques avec titration connue tels que :

| Nom du produit | Reference |
|----------------------------------|-----------|
| BIOPHEN™ Plasma Calibrator | 222101 |
| BIOPHEN™ Normal Control Plasma | 223201 |
| BIOPHEN™ Abnormal Control Plasma | 223301 |

Matériels :

- Spectrophotomètre, ou automates pour dosage chromogène.
- Chronomètre, Pipettes calibrées.

PRELEVEMENTS ET PREPARATION DES ECHANTILLONS :

La préparation et la conservation des échantillons doivent être réalisées selon les recommandations locales en vigueur (pour les Etats-Unis, se référer aux recommandations du CLSI H21-A5⁶ pour plus d'informations concernant le prélèvement, la manipulation et la conservation).

Echantillons :

Plasma humain obtenu à partir de sang anticoagulé (citrate trisodique).

Prélèvement :

Le sang (9 volumes) doit être collecté sur l'anticoagulant citrate trisodique (1 volume) (0.109M) avec précautions, par ponction veineuse franche. Le premier tube doit être éliminé.

Centrifugation :

Dans les 2 heures, utiliser une méthode validée au sein du laboratoire permettant d'obtenir un plasma pauvre en plaquettes, par exemple un minimum de 15 minutes à 2500g à température ambiante (18-25°C), et le plasma doit décanter dans un tube plastique.

Conservation du plasma^{7, 8} :

- 4 heures à température ambiante (18-25°C)
- 1 mois à -20°C.
- 24 mois à -70°C.

Les échantillons de plasma congelés doivent être décongelés rapidement à 37°C, puis agités soigneusement et testés immédiatement. Resuspendre tout précipité en agitant vigoureusement immédiatement après décongélation et avant utilisation.

PROCEDURE :

Le coffret peut être utilisé en méthode cinétique, automatisée, ou en méthode manuelle (point final). Le test est réalisé à **37°C** et l'intensité de la coloration est mesurée à **405nm**.

Méthode automatisée :

Les applications sur les différents automates sont disponibles sur demande. **Se reporter à l'application spécifique et aux précautions spécifiques de chaque automate.**

Méthode de dosage :

1. Reconstituer les étalons et les contrôles comme indiqué dans les notices spécifiques. Lorsque l'étalonnage est réalisé avec un plasma étalon disponible du commerce (ex : BIOPHEN™ Plasma Calibrator) ou avec un matériel de référence pour l'AT international ou interne, la dilution au 1/40 correspond à la concentration indiquée (C%) en AT. Le taux de 100% (dans les conditions de dosage) est ensuite obtenu en diluant cet étalon par le facteur suivant : **40 x C / 100**.

Le coffret peut aussi être calibré avec un pool de plasma citratés normaux (au moins 30 individus normaux, hommes et femmes, de 18 à 55 ans, sans traitement ou pathologie connue), avec une valeur assignée de 100% d'AT. Le dosage intègre une dilution du plasma standard au 1/40 en tampon R3 qui par définition représente 100% d'AT.

Préparer 2 mL de la dilution 1/40 du pool de plasmas normaux, ou d'une dilution (**40 x C/100**) du plasma étalon titré en AT, en tampon de dilution spécifique (R3). Ceci correspond à 100% d'AT (noté C1), la gamme de calibration peut être ensuite obtenue en préparant les dilutions successives comme suit :

| Etalon | C1 | C2 | C3 | C4 | C5 |
|------------------|--------------|-------------|-------------|-------------|-------|
| AT (%) | 100 | 50 | 25 | 12,5 | 0 |
| Volume Etalon | 1000µL de C1 | 500µL de C1 | 500µL de C2 | 500µL de C3 | 0µL |
| Volume Tampon R3 | 0 µL | 500µL | 500µL | 500µL | 500µL |

Réaliser la gamme de calibration extemporanément pour une performance optimale.

La gamme de calibration peut également être réalisée à partir d'un matériel de référence titré en AT (standard international ou standard interne). Pré-diluer ce matériel en tampon approprié pour obtenir une solution à 1 UI/mL puis effectuer une dilution au 1/40 en R3 pour obtenir une solution à 100% d'AT (notée C1) et préparer la gamme de calibration comme expliqué précédemment.

2. Diluer les échantillons et contrôles dans du tampon R3 comme décrit dans le tableau ci-dessous :

| Echantillons | Référence | Dilution |
|--------------|-----------------|----------|
| Contrôles | 223201 / 223301 | 1/40 |
| Echantillons | n.a | 1/40 |

Pour l'AT en milieu purifié, l'échantillon à tester doit être pré-dilué en tampon approprié pour cibler une concentration d'AT dans la zone de 0,2 à 1 UI/mL. Puis diluer au 1/40 en R3 pour la réalisation du test. La concentration en AT attendue se situe ainsi entre 20 et 100% (la concentration mesurée doit ensuite être multipliée par le facteur de « pré-dilution »).

Réaliser la gamme de calibration et la tester avec les contrôles de qualité. Les échantillons dilués doivent être testés dans 2 heures, s'ils sont conservés à température ambiante (18-25°C). Les concentrations exactes des étalons et des contrôles sont indiquées pour chaque lot sur le papillon fourni avec le coffret.

3. Introduire dans les puits d'une microplaque ou dans un tube plastique incubé à 37°C :

| | Microplaque | Volume |
|---|-------------|--------|
| Etalon, Contrôles, ou échantillons dilués (1/40) à tester | 100 µL | 400 µL |
| R1: Thrombine Préincubée à 37°C | 50 µL | 200 µL |
| Mélanger et incuber à 37°C, pendant exactement 1 minute puis introduire : | | |
| R2 : Substrat thrombine Préincubé à 37°C | 50 µL | 200 µL |
| Mélanger et incuber à 37°C pendant exactement 1 minute | | |
| Arrêter la réaction en introduisant : | | |
| Acide citrique (2%)* | 100 µL | 400 µL |
| Mélanger et mesurer la densité optique à 405nm contre le blanc correspondant. | | |

*Ou acide acétique (20%). La couleur jaune est stable pendant 2 heures.

Le blanc échantillon est obtenu par mélange des réactifs dans l'ordre inverse à celui du test : Acide Citrique (2%), R2, R1, échantillon dilué.

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

Méthode cinétique :

Le dosage peut être réalisé par méthode cinétique en mesurant le changement d'absorption sur un temps plus court après l'addition du substrat (soit ΔDO405). Dans ce cas il n'est pas nécessaire de soustraire le blanc échantillon, ni d'arrêter la réaction.

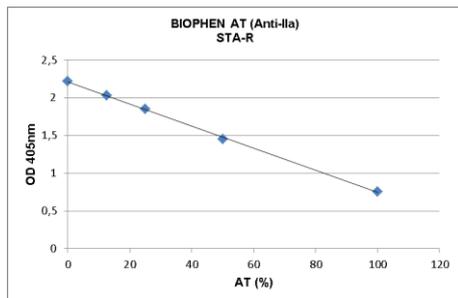
Si un volume réactionnel différent de celui indiqué ci-dessus est requis pour la méthode utilisée, le rapport des volumes doit être strictement respecté afin de garantir les performances du dosage. L'utilisateur est responsable de la validation des modifications et de leur impact sur tous les résultats.

CALIBRATION :

L'étalon couvrant la zone de test dynamique est disponible chez HYPHEN BioMed (Voir paragraphe REACTIFS ET MATERIEL REQUIS MAIS NON FOURNIS) et peut être utilisé pour générer la courbe de calibration.

La zone de calibration est environ de 0 à 100% AT (soit environ 0 à 1UI/mL).

La courbe de calibration ci-dessous, obtenue sur instrument STA-R® est indiquée à titre d'exemple uniquement. La courbe de calibration générée pour la série de dosages doit être utilisée.



CONTROLE QUALITE :

L'utilisation des contrôles qualité permet de valider la conformité de la méthode ainsi que l'homogénéité des dosages entre les différents essais pour un même lot de réactifs.

Inclure des contrôles qualité dans chaque série, selon les bonnes pratiques de laboratoire, afin de valider le test. Une nouvelle courbe de calibration doit être établie, de préférence, pour chaque série d'essai, et au moins pour chaque nouveau lot de réactif ou après chaque maintenance de l'automate, ou quand les valeurs des contrôles de qualité sont mesurées en dehors de la zone d'acceptation définie pour la méthode.

Chaque laboratoire doit établir les zones d'acceptation et vérifier les performances attendues dans son système analytique.

RESULTATS :

- Pour la méthode manuelle, en point final, tracer la droite Lin-Lin de calibration, en portant en ordonnées la DO à 405 nm et en abscisses la concentration d'Antithrombine en %.
- La concentration d'Antithrombine dans l'échantillon à doser est déduite directement de la courbe de calibration si la dilution standard est utilisée. Multiplier ensuite par le facteur de pré-dilution éventuel pour avoir le taux dans l'échantillon testé.
- Les résultats sont exprimés en %.
- Les résultats doivent être interprétés selon l'état clinique et biologique du patient.

LIMITATIONS :

- Pour obtenir les performances optimales du test et répondre aux spécifications, suivre scrupuleusement les instructions techniques validées par HYPHEN BioMed. Il est de la responsabilité du laboratoire de valider toutes les modifications apportées à ces instructions d'utilisation.
- Tout réactif présentant un aspect inhabituel ou des signes de contamination doit être rejeté.
- Tout prélèvement suspect ou présentant des signes d'activation doit être rejeté.
- Tout plasma présentant un coagulum ou des signes de contamination doit être rejeté.
- Pour une meilleure précision, un échantillon mesuré ≤20%, peut être utilisé à la dilution 1/20 et diviser le taux ainsi obtenu par 2 ; pour un échantillon mesuré >120% utiliser la dilution 1/80 et multiplier le taux ainsi obtenu par 2. Si une dilution différente de la dilution standard 1/40 est utilisée, la concentration doit être corrigée par le facteur de dilution complémentaire (ex : x 2 pour 1/80, ou x 0.5 pour 1/20).
- Pour l'influence possible d'interférences, se reporter à l'application spécifique pour l'instrument utilisé (aucun effet significatif n'est observé en méthode cinétique 2 points (STA-R®) pour des taux de bilirubine jusqu'à 60 mg/dL, d'hémoglobine jusqu'à 500 mg/dL et de triglycérides jusqu'à 125 mg/dL, par tests de surcharge en plasma).
- La présence d'inhibiteurs de thrombine (ex : Hirudine, Argatroban, Dabigatran...) dans l'échantillon testé est susceptible d'induire une surestimation de la concentration d'AT.
- Le dosage est réalisable sur milieu purifié, en utilisant une calibration correspondante appropriée.
- L'AT mesurée dans certains variants peut présenter des variations lorsqu'elle est testée avec différents tests d'activité de l'AT. En fonction du variant (et du traitement), une divergence entre les tests d'activité AT anti Ila et anti Xa est rapportée ainsi que de très rares résultats normaux⁹

VALEURS ATTENDUES :

La valeur normale en Antithrombine dans un plasma adulte est généralement comprise entre 80 et 120%. Cependant, chaque laboratoire doit établir son propre intervalle normal.

Un taux d'AT ≤ 70% indique la présence d'un déficit qui doit être confirmé par un autre dosage et/ou un autre prélèvement. Le taux d'AT est diminué au cours de la grossesse, lors de la prise d'un traitement contraceptif par voie orale, en cas de CIVD ou de pathologie hépatique. Il est aussi normalement faible chez les nouveau-nés.

PERFORMANCES :

- La limite de détection est déterminée en mesurant sur la courbe d'étalonnage le taux « apparent » d'AT, qui correspond à la valeur DO moyenne obtenue pour un taux réactionnel sans AT (tampon seul) moins de 3 écart-types (SD). Cette limite de détection est <0.10 UI/mL soit <10 % AT.
- Sur STA-R®, la zone de mesure va d'environ 20 à 120% d'AT.
- Spécificité** : Un échantillon dépleté en AT est mesuré <5% AT. Le dosage n'étant pas influencé par l'héparine (HNF, HBPM) aux concentrations thérapeutiques usuelles, il peut être effectué chez un sujet traité par l'héparine. L'utilisation de thrombine bovine permet de rendre l'interférence de l'Héparine Cofacteur II négligeable aux concentrations habituelles. Pas d'impact de l'activité progressive de l'AT (ex α2-macroglobuline) dans le dosage, grâce à son action immédiate en présence d'Héparine, et aux temps de réactions courts. La plasmine, éventuellement présente dans l'échantillon, est bloquée par l'aprotinine présente dans le R1.
- Les études de performances ont été réalisées en interne sur 1 lot de réactif avec N=10 sur STA-R®. Les performances ont été évaluées avec les contrôles du laboratoire pour un niveau de contrôle. Les résultats suivants ont été obtenus :

| Contrôle | Intra-essai | | | | Inter-essais | | | |
|------------------|-------------|------|-----|------|--------------|------|-----|------|
| | N | Moy. | CV% | SD | n | Moy. | CV% | SD |
| Contrôle Normal | 10 | 92 | 1.9 | 1.79 | 10 | 91 | 5.7 | 5.14 |
| Contrôle Anormal | 10 | 53 | 1.7 | 0.88 | 10 | 54 | 3.4 | 1.81 |

REFERENCES :

- Cooper P.C. et al. The phenotypic and genetic assessment of antithrombin deficiency. Int J Lab Hematol. 2011.
- Leslie B. et al. Investigation of the anticoagulant mechanism of a covalent antithrombin-heparin complex. The Journal of Biological Chemistry. 1999.
- Tsiang M et al. Functional requirements for inhibition of Thrombin by Antithrombin III in the presence and absence of heparin. The Journal of Biological Chemistry. 1997.
- Tollefsen D.M. Laboratory Diagnosis of Antithrombin and Heparin Cofactor II deficiency. Seminars in Thromb Haemost. 1990.
- Mortensen J.Z. Inherited ATIII deficiency. Fast and slow inactivation of thrombin and Factor Xa Thromb. Res. 1984.
- CLSI Document H21-A5: "Collection, transport, and processing of blood specimens for testing plasma-based coagulation assays and molecular hemostasis assays; approved guideline". 2008.
- Woodhams B. et al. Stability of coagulation proteins in frozen plasma. Blood coagulation and Fibrinolysis. 2001.
- Mauge L. and Alhenc-Gelas M. Stabilité pré-analytique des paramètres de la coagulation: revue des données disponibles. Ann Biol Clin. 2014.
- Van Cott E.M et al. Recommendations for clinical laboratory testing for antithrombin deficiency; Communication from the SSC of the ISTH, J Thromb Haemost 2020.

SYMBOLS :

Symboles utilisés et signes énumérés dans la norme ISO 15223-1, se référer au document Définition des symboles.

Changements par rapport à la précédente version