

BIOPHEN™ α 2-Antiplasmin (LRT)



REF 220502

R1 R2 3 x 3 mL



Méthode chromogène pour le dosage de l' α 2-Antiplasmine dans le plasma avec réactifs liquides prêts à l'emploi.

Français, dernière révision : 01-2021

UTILISATION:

Le coffret BIOPHEN™ α 2-Antiplasmin (LRT) est une méthode chromogène pour la détermination quantitative *in vitro* de l'activité de l' α 2-Antiplasmine (α 2-AP), sur plasma humain citraté, en utilisant une méthode automatisée ou manuelle. L'ensemble des réactifs est sous forme liquide prête à l'emploi (LRT = Liquid Reagent Technology).

RÉSUMÉ ET EXPLICATION:

Technique :

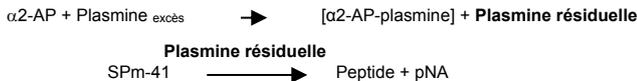
L' α 2-Antiplasmine (ou α 2-Antiplasmine ou plasmin inhibiteur) est un inhibiteur de sérine protéase (serpine) responsable de l'inactivation de la plasmin, une enzyme importante qui participe à la fibrinolyse et à la dégradation de différentes protéines.

Clinique :

La détermination de l'activité de l' α 2-AP peut être utile en cas de déficit en α 2-AP ou de thérapie fibrinolytique.

PRINCIPE:

L' α 2-AP présente dans le plasma inactive la plasmin. La plasmin résiduelle clive le substrat spécifique SPM-41, libérant ainsi de la paranitroaniline (pNA), dont la coloration est mesurée à 405nm. Il y a une relation inversement proportionnelle entre la coloration mesurée et l'activité de l' α 2-AP dans l'échantillon testé.



REACTIFS:

R1 Plasmin humaine, forme liquide prête à l'emploi. Contient de faibles quantités d'azide de sodium (0.9 g/L).

R2 Substrat chromogène spécifique de la plasmin (SPM-41), forme liquide prête à l'emploi. Contient du Proclin.

R1 R2 3 flacons de 3 mL

MISE EN GARDE ET AVERTISSEMENTS:

- Certains réactifs de ce coffret contiennent des produits d'origine humaine. Lorsque du plasma humain a été utilisé dans la préparation de ces réactifs, la recherche de l'antigène HBs, des anticorps anti-VHC, anti-HIV 1 et anti-HIV 2 a été effectuée et trouvée négative. Cependant aucun test ne peut garantir de façon absolue l'absence de tout agent infectieux. Aussi, ces réactifs d'origine biologique doivent être manipulés avec les précautions d'usage s'agissant de produits potentiellement infectieux.
- L'azide de sodium peut générer des composants explosifs au contact des canalisations en plomb ou en cuivre.
- L'élimination des déchets doit être effectuée conformément aux réglementations locales en vigueur.
- Utiliser uniquement les réactifs d'un même lot de coffret.
- Les études de vieillissement montrent que les réactifs peuvent être expédiés à température ambiante sans aucun dommage.
- Ce dispositif de diagnostic *in vitro* est destiné à une utilisation professionnelle en laboratoire.

PRÉPARATION DES REACTIFS:

R1 R2 Réactif prêt à l'emploi, homogénéiser, en évitant la formation de mousse, et charger directement sur l'automate en suivant les instructions du guide d'application.

Pour la méthode manuelle, laisser stabiliser pendant 30 min à température ambiante (18-25°C), homogénéiser avant utilisation.

STOCKAGE ET STABILITÉ:

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.

R1 R2 La stabilité du réactif après ouverture, sous réserve de toute contamination ou d'évaporation, conservé fermé est de :

- 5 semaines à 2-8°C.
- 7 jours à température ambiante (18-25°C).
- Ne pas congeler.
- Stabilité à bord de l'automate : se référer à l'application spécifique.

Si le substrat devient jaune, cela indique une contamination. Le flacon doit être jeté et un nouveau utilisé.

REACTIFS ET MATERIELS REQUIS MAIS NON FOURNIS:

Réactifs:

- Eau distillée.
- Acide acétique à 20% ou acide citrique à 2% (méthode en point final).
- Diluant : Solution saline (0,9% NaCl) ou tampon Imidazole Buffer (AR021B/AR021K/AR021L/AR021M/AR021N). Utiliser le même tampon pour l'ensemble des dilutions.
- Etalon et contrôles spécifiques titrés en α 2-AP tels que :

Nom du produit	Référence
BIOPHEN™ Plasma Calibrator	222101
BIOPHEN™ Normal Control Plasma	223201
BIOPHEN™ Abnormal Control Plasma	223301

Se référer également au guide d'application spécifique de l'automate utilisé.

Matériels:

- Spectrophotomètre, ou automates pour dosages chromogènes.
- Chronomètre, Pipettes calibrées, tubes pour tests en plastique.

PRÉLEVEMENTS ET PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS:

Le sang (9 volumes) doit être collecté sur l'anticoagulant citrate trisodique (1 volume) (0,109M, 3,2%) avec précautions, par ponction veineuse franche. Le premier tube doit être éliminé.

La préparation et la conservation des échantillons doivent être réalisées selon les recommandations locales en vigueur (pour les États-Unis, se référer aux recommandations du CLSI H21-A5⁵ pour plus d'informations concernant le prélèvement, la manipulation et la conservation). Pour la conservation des plasmas, se référer aux références⁵.

PROCÉDURE:

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.

Pour une méthode automatisée, les guides d'applications sont disponibles sur demande. Se référer aux guides d'application et aux précautions spécifiques pour chaque automate.

Méthode de dosage:

1. Reconstituer les étalons et les contrôles comme indiqué dans les notices spécifiques. Les étalons doivent être dilués dans le diluant comme décrit dans le tableau ci-dessous afin de préparer la gamme de calibration ("C") définit la concentration en α 2-AP ou par définition 100% pour un pool de plasma normal).

La gamme de calibration peut être réalisée avec un étalon plasmatique commercial ayant une concentration connue d' α 2-AP (C) ou à l'aide d'un pool de plasmas citratés normaux (au moins 30 individus normaux, hommes et femmes, de 18 à 55 ans, sans traitement ou pathologie connus), qui par définition titre 100% d' α 2-AP. Le dosage intègre une dilution du plasma au 1/30, qui représente par définition le taux 100% d' α 2-AP ou une concentration « C » pour l'étalon commercial. Dans ce cas, la concentration de 150% (C1) est obtenue en diluant cet étalon par le facteur de dilution suivant : 30x(C)/150.

Etalon	C1	C2	C3	C4	C5	C6
α 2-AP (%)	150	100	50	25	12,5	0
Volume Etalon	1500 μ L	660 μ L de C1	500 μ L de C2	500 μ L de C3	500 μ L de C4	0
Volume de diluant	0 μ L	330 μ L	500 μ L	500 μ L	500 μ L	500 μ L

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

Echantillons	Références	Dilution
Contrôles	223201 / 223301	1/30
Echantillons	NA	1/30

Réaliser la gamme de calibration et la tester avec les contrôles de qualité. Les échantillons dilués doivent être testés rapidement, 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. Dans un tube plastique préincubé à 37°C, introduire :

	Volume
Plasma à tester, étalon ou contrôles dilués	200 µL
R1 Plasmine humaine préincubée à 37°C	200 µL
Mélanger et incuber à 37°C pendant 4 minutes exactement, puis introduire:	
R2 Substrat SPm-41 préincubé à 37°C	200 µL
Mélanger et incuber à 37°C pendant 4 minutes exactement	
Stopper la réaction en introduisant:	
Acide citrique (2%)*	400 µL
Mélanger et mesurer l'absorbance à 405nm contre le blanc correspondant.	

*Ou acide acétique (20%). La couleur jaune est stable pendant 1 heure.
Le blanc échantillon est obtenu par mélange des réactifs dans l'ordre inverse à celui du test : Acide Citrique (2%), R2, R1, plasma dilué.

Mesurer la densité optique à 405 nm. La valeur du blanc mesurée doit être soustraite de l'absorbance mesurée pour le test correspondant. Faire un blanc plasma si l'échantillon est icterique, lipémique, hémolysé ou présente une coloration différente des plasmas étalons.

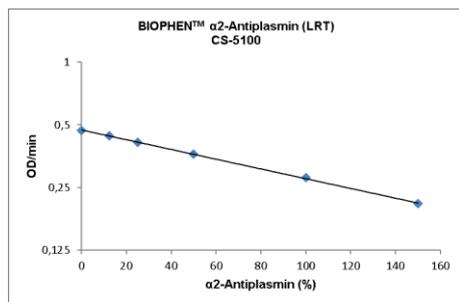
Si un volume réactionnel différent de celui indiqué ci-dessus est requis pour la méthode utilisée, le rapport des volumes doit être strictement respecté afin de garantir les performances du dosage. L'utilisateur est responsable de la validation des modifications et de leur impact sur tous les résultats.

CALIBRATION:

Le test BIOPHEN™ α2-Antiplasmin (LRT) peut être calibré pour le dosage d'activité d'α2-AP. L'étalon couvrant la zone de calibration 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 150% (sur Sysmex CS-series).

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



CONTRÔLE QUALITE:

L'utilisation de contrôles de 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 de calibration linéaire, en portant en ordonnées la DO à 405 nm et en abscisses la concentration d'α2-AP en %.
- Quand une méthode cinétique est utilisée, utiliser les ΔDO 405 au lieu des DO 405.

- La concentration d'α2-AP (%) dans l'échantillon à doser est déduite directement de la courbe de calibration, lorsque la dilution standard est utilisée.
- Si d'autres dilutions sont utilisées le taux obtenu doit être multiplié par le facteur de dilution complémentaire utilisé.
- 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.
- Tout réactif présentant un aspect inhabituel ou des signes de contamination doit être rejeté.
- Tout échantillon suspect ou présentant des signes d'activation doit être rejeté.
- Spécificité sur échantillons à taux faibles d'α2-AP : plasma déplété en α2-AP mesuré à environ 8-15%. Une variante de protocole utilisant un temps d'incubation plus court avec la plasmine (30 sec sur Sysmex CS-series) favorise l'activité de l'α2-AP et rend négligeables les réactions des autres inhibiteurs.

VALEURS ATTENDUES:

La concentration d'α2-AP chez l'adulte est généralement attendue entre 75% et 135%^{6,7}. Cependant, chaque laboratoire doit établir son propre intervalle normal.

PERFORMANCES:

- La limite basse de détection dépend du système analytique utilisé (<3,1% sur Sysmex CS-5100).
- La zone de mesure dépend du système analytique utilisé (environ de 10 à 150% d'α2-AP sur Sysmex CS-series).
- Les études de performances ont été réalisées en interne sur Sysmex CS-5100. Les performances ont été évaluées avec les contrôles du laboratoire sur 5 jours, 2 séries par jour et 2 répétitions à chaque série pour un niveau de contrôle. Les résultats suivants ont été obtenus :

Contrôle	Intra-essai				Inter-essais			
	N	Moy.%	CV%	SD	n	Moy.%	CV%	SD
Normal	10	113,8	1,0	1,2	20	112,8	1,6	1,8
Anormal	10	36,7	1,8	0,7	20	37,1	2,4	0,9

- Corrélation avec une autre méthode (Berichrom A2antiplasmin vs BIOPHEN™ α2-Antiplasmin (LRT) sur Sysmex CS-5100) :

$$n = 60 \quad y = 0,95x + 5,04 \quad r = 0,995$$

- Interférences :

Aucune interférence, sur l'automate Sysmex CS-5100 n'a été observée avec les molécules et jusqu'aux concentrations suivantes :

Hémoglobine	Bilirubine (C/F)	Intralipides	Héparines (HNF/HBPM)
500 mg/dL	28 mg/dL	300 mg/dL	1 UI/mL

Se référer également au guide d'application spécifique de l'automate utilisé.

REFERENCES:

- Carpenter S.L. and Mathew P. α2-Antiplasmin and its deficiency: Fibrinolysis out of balance. Haemophilia. 2008.
- Kettle P. and Mayne E.E. A bleeding disorder due to deficiency of α2-Antiplasmin. J Clin Pathol. 1985.
- Weitz J.I. et al. α2-Antiplasmin supplementation inhibits Tissue Plasminogen Activator-induced Fibrinogenolysis and bleeding with little effect on thrombosis. J Clin Invest. 1993.
- Aoki N. and Yamanaka T. The α2-Antiplasmin inhibitor levels in liver disease. Clin Chem Acta. 1978.
- CLSI Document H21-A5: "Collection, transport, and processing of blood specimens for testing plasma -based coagulation assays and molecular hemostasis assays; approved guideline". 2008.
- Kratz A. et al. Laboratory Reference Values. The New England Journal of Medicine. 2004.
- Andrew M. et al. Maturation of the hemostatic system during childhood. Blood. 1992.

SYMBOLES:

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

R2 H317: peut provoquer une allergie cutanée.

Changements par rapport à la précédente version.