

**LIAPHEN™ AT**REF 120002 **R1** 2 x 2 mL, **R2** 2 x 10 mL  
REF 120008 **R1** 2 x 1,5 mL, **R2** 2 x 5 mLMéthode immuno-turbidimétrique pour l'Antithrombine,  
avec réactifs liquides prêts à l'emploi.

Français, dernière révision : 10-2023

**UTILISATION:**

Le coffret LIAPHEN™ AT est une méthode immuno-turbidimétrique pour la détermination quantitative *in vitro* de l'antigène Antithrombine (AT:Ag) sur plasma humain citraté, en utilisant une méthode manuelle ou automatisée. L'ensemble des réactifs est sous forme liquide prête à l'emploi.

**RESUME ET EXPLICATION:****Technique :**

L'AT est le principal inhibiteur physiologique de la coagulation. En inhibant les protéases de la coagulation, en particulier la thrombine, les Facteurs Xa (FXa) et IXa, l'AT régule la coagulation et protège contre la thrombose. Complexée à l'héparine, l'AT devient un inhibiteur immédiat et puissant des sérines estérases<sup>1</sup>.

**Clinique :**

Le Déficit congénital en AT induit des troubles thromboemboliques spontanés. Ces déficits congénitaux en AT sont classés en 4 groupes<sup>2,3,4</sup>. La concentration d'AT est diminuée chez les nouveaux nés, et dans divers contextes tels que grossesse, pathologie hépatique, CIVD.<sup>4</sup> Le dosage fonctionnel<sup>4</sup> associé au test immunologique permet de caractériser le type de déficit.

**PRINCIPE:**

Le coffret LIAPHEN™ AT est une méthode immuno-turbidimétrique, basée sur une réaction antigène-anticorps : l'AT:Ag de l'échantillon réagit avec les particules de latex sensibilisées avec des anticorps polyclonaux de chèvre anti-AT humaine, conduisant à l'agglutination des particules de latex. Cette agglutination peut être directement détectée par un changement d'absorbance. Le changement d'absorbance est directement proportionnel à la quantité d'AT:Ag dans l'échantillon.

**REACTIFS:**

- R1** Latex : sous forme liquide. Contient de la BSA.  
**R2** Tampon réactionnel : Tampon Hepes NaCl, sous forme liquide.

REF 120002 → **R1** 2 flacons de 2 mL.  
**R2** 2 flacons de 10 mL.REF 120008 → **R1** 2 flacons de 1,5 mL.  
**R2** 2 flacons de 5 mL.**MISE EN GARDE ET AVERTISSEMENTS:**

- Certains réactifs de ce coffret contiennent des produits d'origine animale. Ces réactifs d'origine biologique doivent être manipulés avec les précautions d'usage s'agissant de produits potentiellement infectieux
- 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.

**PREPARATION DES REACTIFS:**

**R1** **R2** Réactif prêt à l'emploi, homogénéiser par inversion douce 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 STABILITE:**

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 :

- 6 mois 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.

**REACTIFS ET MATERIELS REQUIS MAIS NON FOURNIS:****Réactifs:**

- Eau distillée.
- Solution saline (0.9% NaCl).
- Etalon et contrôles spécifiques avec titration en AT:Ag connue 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, automates pour dosage immuno-turbidimétrique.
- Chronomètre, Pipettes calibrées, cuves de spectrophotomètre pour tests en plastique.

**PRELEVEMENTS ET PREPARATION DES ECHANTILLONS:**

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 Etats-Unis, se référer aux recommandations du CLSI H21-A5<sup>5</sup> pour plus d'informations concernant le prélèvement, la manipulation et la conservation). Pour la conservation des plasmas, se référer aux références.<sup>5,6</sup>

**PROCEDURE:**

Le coffret peut être utilisé en méthode cinétique, automatisée, ou en méthode manuelle. Le test est réalisé à 37°C et la turbidimétrie est mesurée à 620nm (d'autres longueurs d'onde sont utilisables, de préférence entre 450 et 700nm).

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. La dilution préalable du latex n'est pas nécessaire en méthode automatisée.

**Méthode de dosage:**

1. Reconstituer la préparation de référence ou l'étalon plasmatique, et les contrôles plasmatiques, comme indiqué dans les notices spécifiques ou selon la pratique interne.

Pour un étalon avec une concentration d'AT:Ag connue (C%) et une dilution de travail au 1/15, le taux de 150% (dans les conditions du dosage) est obtenu en diluant cet étalon par le facteur suivant :  $10 \times (C) / 100$  soit  $D = C (\text{en } \%) / 10$ .

La gamme de calibration peut également être réalisée à l'aide d'un pool de plasma 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'AT:Ag. Le dosage intègre une dilution du plasma au 1/15, qui représente par définition le taux 100% d'AT:Ag. La dilution au 1/10 en solution saline représente 150% d'AT:Ag.

Préparer 2 mL de la dilution 1/10 du pool de plasmas normaux, ou une dilution 1/D ( $D=C/10$ ) de l'étalon (soit C1) correspondant à 150% d'AT:Ag. Préparer la gamme d'étalonnage suivante par dilutions successives en solution saline comme décrit dans le tableau ci-dessous afin d'effectuer la gamme de calibration:

Standard	C1	C2	C3	C4	C5	C6
% AT:Ag	150	100	75	50	25	0
Volume de standard	2000 µL	600 µL de C1	500 µL de C1	500 µL de C2	500 µL de C4	0 µL
Volume Solution Saline	0 µL	300 µL	500 µL	500 µL	500 µL	1000 µL

**Pour la méthode manuelle, une courbe de calibration doit être réalisée pour chaque série de mesure.**

2. Diluer les échantillons et contrôles en solution saline comme décrit dans le tableau ci-dessous (méthode manuelle):

Echantillons	Référence	Dilution
BIOPHEN™ Normal Control Plasma	223201	1/15
BIOPHEN™ Abnormal Control Plasma	223301	1/15
Echantillons	n.a	1/15

Pour le dosage d'AT purifiée, diluer les échantillons de façon appropriée (concentration finale de 0,5 à 10 µg/mL environ) en solution saline avec 1% de BSA.

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. Introduire dans un tube plastique incubé à 37°C:

Préparer extemporanément le volume juste nécessaire de latex [R1] dilué in [R2] (voir ci-dessous)	
	Volume
Echantillons, contrôles ou étalon dilués en solution saline	100 µL
[R1] Latex dilué au 1/5 en [R2] préincubé à 37°C et homogénéisé avant utilisation	400 µL
Mélanger et incubé à 37°C, pendant exactement 15 minutes, puis immédiatement après :	
Agiter et lire la densité optique à 620nm contre de la solution saline.	
<b>Bien respecter la même durée d'incubation totale pour chaque échantillons.</b>	

Faire un blanc plasma si l'échantillon est icterique, lipémique, hémolysé ou présente une coloration différente des plasmas étalons.

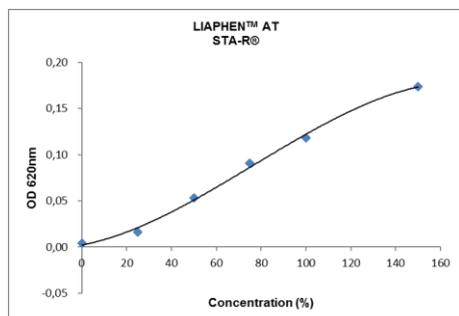
Si un volume réactionnel différent de celui indiqué ci-dessus est requis pour la méthode utilisée, le rapport des volumes doit être strictement respecté afin de garantir les performances du dosage. L'utilisateur est responsable de la validation des modifications et de leur impact sur tous les résultats.

#### CALIBRATION:

Le test LIAPHEN™ AT peut être calibré pour le dosage de l'AT (antigène). L'étalon plasmatique couvrant la zone 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 STA-R®).

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 620nm et en abscisses la concentration d'AT en % en choisissant le mode d'interpolation le plus adapté.
- La concentration d'AT (%) 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.
- La présence de facteur rhumatoïde est susceptible d'interférer dans le dosage en donnant une valeur anormalement élevée d'AT:Ag.
- Pour l'influence possible d'effet crochet, se reporter à l'application spécifique pour l'instrument utilisé (aucun effet significatif n'est observé sur STA-R® pour des taux d'AT:Ag jusqu'à 200%).

#### VALEURS ATTENDUES:

Le domaine de référence a été mesuré sur des sujets sains (n=100) sur STA-R® (Central 90%, 95th percentile) entre 86 et 124 % d'AT:Ag. Cependant, chaque laboratoire doit établir son propre intervalle normal.

#### PERFORMANCES:

- La zone de mesure dépend du système analytique utilisé (environ de 11 à 150% d'AT:Ag sur STA-R®-series).
- Spécificité: plasma déficient en AT mesuré <5%.
- Les études de performances ont été réalisées en interne sur STA-R®. Les performances ont été évaluées avec les contrôles du laboratoire dans 10 séries 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
Haut	10	102	1,9	1,9	10	102	4,4	4,5
Moyen	10	63	1,5	1,0	10	63	4,0	2,5
Bas	10	23	3,0	0,7	10	23	7,4	1,7

- Corrélation avec une autre méthode (Berichrom AT vs LIAPHEN™ AT sur BCS-XP):

$$n = 62 \quad y = 1,04x - 1,47 \quad r = 0,987$$

- Interférences:

Aucune interférence, sur l'automate STA-R® n'a été observée avec les molécules et jusqu'aux concentrations suivantes :

Héparines (HNF / HBPM)	2 UI/mL	Hémoglobine	500 mg/dL
Bilirubine	60 mg/dL	Intralipides (équivalent Triglycérides)	2000 mg/dL

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

#### REFERENCES:

- Mann K.G. Biochemistry and Physiology of blood coagulation. Thrombosis and Haemostasis. 1999.
- Patnaik M.M. and Moll S. Inherited antithrombin deficiency: a review. Haemophilia. 2008.
- Amiral J and Seghatchian J. Revisiting antithrombin in health and disease, congenital deficiencies and genetic variants, and laboratory studies on  $\alpha$  and  $\beta$  forms. Transfus Apher Sci. 2018.
- Khor B. and Van Cott E.M. Laboratory tests for antithrombin deficiency. American Journal of Hematology. 2010.
- CLSI Document H21-A5: "Collection, transport, and processing of blood specimens for testing plasma -based coagulation assays and molecular hemostasis assays; approved guideline". 2008.
- Mauge L. and Alhenc-Gelas M. Stabilité pré-analytique des paramètres de la coagulation: revue des données disponibles. Ann Biol Clin. 2014.

#### SYMBÔLES:

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.