



Arachidonic Acid

REF AG003K

R 3 x 7,5 µmol



HYPHEN BioMed

155 rue d'Eragny, 95000 Neuville-sur-Oise, France

Tél : +33 (0)1 34 40 65 10

Fax : +33 (0)1 34 48 72 36

www.hyphen-biomed.com

info@hyphen-biomed.com

Acide Arachidonique pour tests d'agrégation plaquettaire

Français, dernière révision : 06-2021

UTILISATION :

Pour usage de diagnostic *in vitro*. Mesure de l'agrégation plaquettaire.

RESUME ET EXPLICATION :

Recherche d'une thrombopathie constitutionnelle (ex : thrombasthénie de Glanzmann, Bernard-Soulier, syndrome des plaquettes grises, ...) ou acquise (ex : syndrome myélodysplasique, syndrome myéloprolifératif, myélome multiple, maladie de Waldenström, insuffisance hépatique ou rénale...).

Suivi biologique d'un traitement antiagrégant comme l'aspirine, les AINS, les thiénopyridines, l'abciximab ou les autres inhibiteurs de la GPIIb/IIIa.

PRINCIPE :

Après ajout à un plasma riche en plaquettes (PRP), l'Acide Arachidonique est converti en thromboxane A₂ (TXA₂) par l'enzyme cyclooxygénase (COX). Le TXA₂ généré induit l'activation plaquettaire, et la libération des granules, conduisant à un changement de forme des plaquettes, visualisé par une baisse de la transmission lumineuse, puis à une simple vague d'agrégation. L'Acide Arachidonique est considéré comme un agoniste fort^{1,2}.

REACTIFS :

[R] Acide Arachidonique (sel de sodium) : lyophilisé, contient des stabilisants.
3 flacons de 7,5 µmol.

MISE EN GARDE ET AVERTISSEMENTS :

- Tout produit d'origine biologique doit être manipulé avec toutes les précautions nécessaires, et considéré comme étant potentiellement infectieux.
- L'élimination des déchets doit être effectuée conformément aux réglementations locales en vigueur.
- Les réactifs doivent être manipulés avec précaution 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.
- 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.
- Il est recommandé de tester successivement et sans interruption les échantillons à tester et les contrôles, pour obtenir les performances optimales du test.
- Si le réactif présente un aspect jaune après reconstitution ou ne permet pas d'obtenir au moins 70% d'agrégation avec des plaquettes normales, il ne doit pas être utilisé.
- Pour usage de diagnostic *in vitro*.

[R] H319: Provoque une sévère irritation des yeux

PREPARATION ET STABILITE DES REACTIFS :

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

[R] Acide Arachidonique

Pour agrégomètre :

Reconstituer chaque flacon avec **exactement 0,5 mL d'eau distillée**, agiter vigoureusement jusqu'à dissolution complète. Laisser stabiliser le réactif pendant 30 min à température ambiante (18-25°C) en agitant de temps en temps. Homogénéiser le réactif avant chaque utilisation.

Pour automate :

Reconstituer chaque flacon avec **exactement 0,625 mL d'eau distillée**, agiter vigoureusement jusqu'à dissolution complète. Laisser stabiliser le réactif 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 :

- **7 jours** à 2-8°C.
- **24 heures** à température ambiante (18-25 °C).
- **2 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.

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.

Matériels:

- Agrégomètre à transmission lumineuse.
- Automate de coagulation Sysmex CS-series et consommables associés.
- 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 pour plus d'informations concernant le prélèvement, la manipulation et la conservation). Dans le cas de la recherche d'une thrombopathie, les patients ne doivent être sous aucune médication connue pour affecter les fonctions plaquettaires (ex : aspirine) depuis 10 jours. Les patients doivent éviter les aliments gras, le café et les produits laitiers au moins 12 heures avant le prélèvement⁴.

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. Couvrir et inverser 4 à 5 fois doucement pour mélanger. **Maintenir les échantillons à température ambiante** (-18°C à 25°C). Ne pas prélever en utilisant des tubes CTAD.

Centrifugation :

Préparation du plasma riche en plaquettes (PRP) et du plasma pauvre en plaquettes (PPP) :

- 1) Préparer le PRP par centrifugation du sang prélevé sur citrate à 150xg pendant 10 minutes à température ambiante (18°C-25°C).
- 2) Examiner le plasma : si des globules rouges persistent, re-centrifuger à 150xg pendant 5 minutes supplémentaires.
- 3) A l'aide d'une pipette en plastique, identifier et enlever avec précaution la couche plaquettaire sans toucher au culot globulaire (leucocytes et globules rouges), et transférer dans un tube identifié (PRP). **Boucher et conserver à température ambiante.**
- 4) Préparer le PPP en centrifugeant l'échantillon de sang restant à 2000-2500xg pendant 15 minutes. Examiner le PPP pour l'hémolyse, puis transférer dans un tube en plastique identifié PPP. **Boucher et conserver à température ambiante.**
- 5) Pour la numération plaquettaire du PRP, se référer aux recommandations de l'ISTH⁵.

PROCEDURE :

Méthode automatisée :

L'application sur les automates Sysmex CS-séries est disponible sur demande. **Se reporter à l'application spécifique et aux précautions spécifiques de chaque automate.**

Agrégomètre : Protocole :

Le test doit être réalisé dans les 3 heures suivant le prélèvement.

1. Placer un agitateur dans chaque cuvette.
2. Etablir le 100% d'agrégation avec une cuvette contenant **360 µL de PPP**.
3. Pipeter **360 µL** de plasma riche en plaquettes (PRP) dans une seconde cuvette. Incuber à **37°C pendant 2 minutes**. Etablir le 0% d'agrégation avec le **PRP**.
4. Ajouter **40 µL d'Acide Arachidonique (15 mM)** directement dans le plasma riche en plaquettes en utilisant un embout de pipette long et fin. **Ne pas injecter contre les parois de la cuvette.**
5. Laisser développer le profil d'agrégation pendant 5 à 10 minutes.

Chaque laboratoire peut établir et valider son propre protocole de test et vérifier les performances obtenues dans les conditions exactes de travail du laboratoire (combinaison réactifs/instruments/protocole de test).

L'utilisateur est responsable de la validation des modifications et de leur impact sur tous les résultats.

CONTROLE 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.

Le contrôle doit être préparé comme les échantillons. Pour des études d'agrégation plaquettaire qualitatives, le contrôle peut consister en PRP frais prélevé sur donneur normal (spécifié et qualifié) n'ayant pas ingéré d'aspirine ou équivalent depuis 10 jours et avec un historique de fonction plaquettaire normale.

Inclure des contrôles qualité dans chaque série, selon les bonnes pratiques de laboratoire afin de valider le test. Un nouveau contrôle doit être établi, 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 :

L'historique détaillé du patient est nécessaire pour une interprétation précise des résultats du test. En particulier il est recommandé de questionner le patient sur toute prise récente de traitement, de nombreuses substances avec ou sans prescription étant susceptibles d'interférer avec l'agrégation plaquettaire. Des substances telles que caféine, tabac, alcool, vitamine C... sont également susceptibles d'affecter les résultats. Les résultats doivent être analysés en relation avec le contexte clinique 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 plasma présentant un coagulum ou des signes de contamination doit être rejeté.
- Tout prélèvement suspect ou présentant des signes d'activation doit être rejeté.

VALEURS ATTENDUES :

Les gammes attendues pour chaque réactif aux différentes concentrations utilisées pour induire l'agrégation plaquettaire, ainsi que les performances attendues, doivent être vérifiées et établies par chaque laboratoire dans ses conditions exactes de travail.

PERFORMANCES :

Exemple d'agrégation maximale normale et anormale (%) :

	Normale	Anormale
Agrégation maximale (%)	83	7

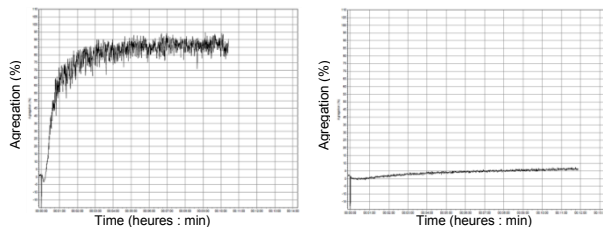


Figure: Exemple de courbes d'agrégation normale (gauche) et anormale (droite) avec de l'Acide Arachidonique (1,5 mM).

REFERENCES :

1. Yardumian *et al.*, « Laboratory investigation of platelet function: a review of methodology ». *J Clin Pathol*, 39 :701-712, 1986.
2. Zhou *et al.*, « Platelet aggregation testing in platelet-rich plasma ». *AM J Clin Pathol*, 123 :172-183, 2005.
3. Angiolillo *et al.*, « Basic principles of platelet biology and clinical implications ». *Circ J*, 74 :597-607, 2010.
4. McCabe-White and Jennings, « Platelet protocols: research and clinical laboratory procedure ». Academic press London, p 35, 1999.
5. Recommendations for the Standardization of Light Transmission Aggregometry : A consensus of the Working Party from the Platelet Physiology Subcommittee of SSC/ISTH. 2013.

SYMBLES :

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