

BIOPHEN™ AT anti-(h)-Xa LRT

www.hyphen-biomed.com

155, rue d'Eragny
95000 NEUVILLE SUR OISE
FRANCE
Tel. : +33 (0)1 34 40 65 10
Fax : +33 (0)1 34 48 72 36
info@hyphen-biomed.com



REF 221123 [R1] [R2] 3 x 3 mL

REF 221127 [R1] [R2] 4 x 7,5 mL



Méthode chromogène pour le dosage de l'Antithrombine dans le plasma, avec réactifs liquides prêts à l'emploi.

Français, dernière révision : 01-2021

UTILISATION :

Le coffret BIOPHEN™ AT anti-(h)-Xa LRT est une méthode chromogène proposée pour la détermination quantitative *in vitro* de l'activité de l'antithrombine (AT) sur plasma humain citraté en utilisant une méthode anti-Xa, manuelle ou automatisée.

L'ensemble des réactifs est sous forme liquide prête à l'emploi (LRT, Liquid reagent Technology).

RESUME ET EXPLICATION :

Technique :

L'AT est le principal inhibiteur physiologique de la coagulation. En inhibant les sérines estérases de la coagulation, en particulier la thrombine et 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 estérases¹.

Clinique :

Le déficit congénital en AT induit des troubles thromboemboliques spontanés. Ces déficits congénitaux en AT sont classés en 4 groupes^{2,3,4}. La concentration d'AT est diminuée chez les nouveaux nés, et dans divers contextes tels que grossesse, pathologie hépatique, CIVD⁴. La mesure de l'activité anti-Xa de l'AT est utilisée dans le diagnostic des déficits congénitaux ou acquis en AT⁴.

PRINCIPE :

La méthode BIOPHEN™ AT anti-(h)-Xa LRT est un dosage cinétique basé sur l'inhibition d'une quantité constante et en excès de FXa, par l'AT, en présence d'héparine. Le FXa résiduel est ensuite mesuré par son activité amidolytique sur un substrat chromogène spécifique du FXa (Sxa-11-65), qui libère du pNA. La quantité de pNA libérée est inversement proportionnelle à la concentration d'AT présente dans le plasma testé.

Le dosage n'étant pas influencé par l'héparine, les plasmas de sujets traités par l'héparine peuvent être testés.

Héparine + AT → [AT Hep.]

[AT Hep.] + [FXa (Excès)] → [FXa-AT-Hep.] + [FXa Résiduel]

[FXa résiduel] + Sxa-11-65 → Peptide + pNA

REACTIFS :

[R1] **Facteur Xa Humain**, forme liquide à pH d'environ 7,85. Contient de l'héparine, de la BSA et de faibles quantités d'azide de sodium (0,9 g/L).

[R2] **Substrat Facteur Xa**, substrat chromogène spécifique du Facteur Xa (11-65), forme liquide avec des stabilisants. Contient du Proclin.

REF 221123 → [R1] [R2] 3 flacons de 3 mL.

REF 221127 → [R1] [R2] 4 flacons de 7,5 mL.

MISE EN GARDE ET AVERTISSEMENTS :

- Certains réactifs de ce coffret contiennent des produits d'origine humaine et animale. Lorsque du plasma humain a été utilisé dans la préparation de ces réactifs, la recherche de l'antigène HBs, des anticorps anti-HCV, 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.

PREPARATION 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 (en faisant attention à la viscosité du produit).

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 :

- 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 type Imdazole (AR021B/AR021K/AR021L/AR021M/AR021N). Utiliser le même tampon pour l'ensemble des dilutions.
- Etalon 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

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

Matériels :

- Spectrophotomètre, ou automates pour dosage chromogène.
- Chronomètre, Pipettes calibrées, tubes pour tests en plastique ou en verre siliconé.

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-A5⁵ pour plus d'informations concernant le prélèvement, la manipulation et la conservation).

Pour la conservation des plasmas, se référer aux références^{5,6}.

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.

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 du diluant comme décrit ci-dessous afin de préparer la gamme de calibration ("C" définit la concentration en AT) :

Lorsque la gamme de calibration est réalisée à l'aide d'un plasma étalon commercial (ex : BIOPHEN™ Plasma Calibrator), la dilution au 1/50 correspond à la concentration (C) en AT indiquée, et le 1/33,3 à 1,5 fois cette concentration. Pour un étalon titrant C, le taux de 150% (dans les conditions du dosage) est obtenu en diluant cet étalon par le facteur suivant : 33,3x(C)/100.

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. Le dosage intègre une dilution du plasma au 1/50, qui représente par définition le taux 100% d'activité du pool. La gamme de calibration dynamique va d'environ 10 à 150% d'AT. La dilution au 1/33,3 en diluant représente 150% d'activité AT.

La gamme d'étalonnage peut alors être préparée comme suit (à partir de l'étalon ou pool pré-dilués) :

AT (%)	0	C/8	C/4	C/2	C	3C/2
AT (%)	0	12.5	25	50	100	150
Volume Etalon	0µL	60µL	125µL	250µL	500µL	Obtenu par facteur de dilution : 33,3 x C/100 en diluant
Volume diluant	500µL	420µL	375µL	250µL	0µL	

Préparer la gamme de calibration juste avant le test pour une performance optimale.

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

Echantillons	Reference	Dilution
Contrôles	223201 / 223301	1/50
Echantillons	NA	1/50

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 kit.

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

	Volume
Echantillon, contrôle ou étalon dilués.	200 µL
R1 Facteur Xa humain Préincubé à 37°C	200 µL
Mélanger et incubé à 37°C, pendant 1 minute puis introduire :	
R2 Substrat Facteur Xa Préincubé à 37°C	200 µL
Mélanger et incubé à 37°C exactement 1 minute	
Arrêter la réaction en introduisant :	
Acide citrique (2%)*	400 µL
Mélanger et mesurer la densité optique 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, 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.

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

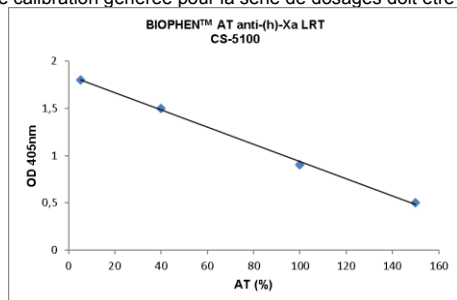
Si un volume réactionnel différent de celui indiqué ci-dessus est requis pour la méthode utilisée, le rapport des volumes doit être strictement respecté afin de garantir les performances du dosage. L'utilisateur est responsable de la validation des modifications et de leur impact sur tous les résultats.

CALIBRATION :

Le test BIOPHEN™ AT anti-(h)-Xa LRT peut être calibré pour le dosage de l'activité AT. 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. En utilisant une échelle linéaire :

- La zone de calibration est environ de 5 à 150% (sur CS-5100).

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.



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.

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 lin-lin, en portant en ordonnées la DO à 405 nm et en abscisses la concentration d'AT en %.
- 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.
- Comme le test est une méthode anti-Xa, il n'y a aucune interférence attendue de l'héparine cofacteur II, α -2-macroglobuline ou α -1-Antitrypsin^{2,4,7}.
- Les inhibiteurs directs du Facteur Xa (DOACs) peuvent induire une surestimation des mesures d'activité AT.

VALEURS ATTENDUES :

La zone de référence établie sur des sujets adultes sains (n=120) en utilisant le Sysmex CS-5100 (central 90%, 95th percentile) a été mesurée entre 85 et 129%. Cependant, chaque laboratoire doit établir son propre intervalle normal.

PERFORMANCES :

- La limite basse de détection dépend du système analytique utilisé (<5% sur Sysmex CS-5100).
- La zone de mesure dépend du système analytique utilisé (environ de 5 à 200 % d'AT sur Sysmex CS-5100).
- Le test BIOPHEN™ AT anti-(h)-Xa LRT est insensible aux héparines aux concentrations usuelles.
- Spécificité : un plasma pauvre en AT a été mesuré \leq 15%.
- Les études de performances ont été réalisées en interne sur Sysmex CS-5100. Les performances ont été évaluées avec les contrôles du laboratoire sur 20 jours, 2 séries par jour et 3 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
Contrôle 1	40	34,7	1,8	0,6	120	34,6	3,1	1,1
Contrôle 2	39	89,7	1,2	1,1	120	87,7	2,3	2,0

- Selon le principe de dosage, aucune interférence aux anticoagulants anti-IIa, tels que le Dabigatran ou la Bivalirudine, n'est attendue.
- Corrélation avec une autre méthode (INNOVANCE Antithrombin (Siemens) sur CS-5100) :

$$n = 120 \quad y = 1,04x - 0,49 \quad r = 0,945$$

Interférences :

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

Intralipides (mg/dL)	Hémoglobines (mg/dL)	Bilirubine (F/C) (mg/dL)	Héparine (HNF/HBPM) (UI/mL)
1000	1000	60	2

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 MM 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 α and β forms. Transfus Apher Sci. 2018.
- Khor B and Van Cott EM. 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.
- Odegard O R et al. Heparin cofactor activity measured with an amidolytic method. Thromb res 6. 1975.

SYMBLES :

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.