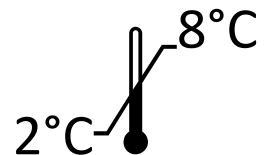


ACTICLOT[®] C

REF ACC-45



Obelis s.a
Bd. Général Wahis 53, 1030 Brussels, BELGIQUE

USAGE PRÉVU

ACTICLOT® C est destiné à la mesure de l'activité de la protéine C dans le plasma humain par un test de coagulation en point final. Le test est destiné à un usage diagnostic *in vitro*.

EXPLICATION DU TEST

La protéine C est une protéine anticoagulante dépendante de la vitamine K qui circule normalement comme un zymogène inactif. Après activation, la protéine C inactive les facteurs V et VIII, prolongeant ainsi le temps de coagulation. Si la protéine C peut être activée par la thrombine, le taux d'activation *in vitro* est lent. Dans ces conditions, la protéine inhibitrice de la protéine C inactive la protéine C aussi vite qu'elle est activée.

PRINCIPE DE LA MÉTHODE

Le venin du mocassin à tête cuivrée *Agkistrodon contortrix* contient un activateur rapide de la protéine C.¹ Dans ACTICLOT C, le réactif activateur, formulé avec l'activateur de la protéine C isolé de ce venin, convertit la protéine C humaine en sa protéase active en 5 minutes.² Le réactif activateur est également formulé pour activer les facteurs de contact de la voie intrinsèque. Avec ce réactif, le temps de coagulation du plasma normal est très long, supérieur à 100 secondes, alors que le temps de coagulation d'un plasma déficient en protéine C est essentiellement le même que le temps de coagulation d'un test APTT, soit environ 30–40 secondes. Lorsqu'un plasma de test inconnu est mélangé à un plasma déficient en protéine C, le taux de protéine C est proportionnel à la prolongation du temps de coagulation.

RÉACTIFS

Le kit contient des réactifs suffisants pour réaliser 90 tests à l'aide d'un analyseur de coagulation automatisé, 45 tests si une méthode en point final manuelle est utilisée.

1. Activateur ACTICLOT : 3 flacons, 1,5 ml (lyophilisé)


2. Plasma déficient en protéine C : 3 flacons, 1,5 ml (lyophilisé)
3. Plasma de contrôle de la protéine C : 3 flacons, 0,5 ml (lyophilisé)
4. Tampon de dilution : 3 flacons, 5,0 ml, 10X concentré

AVERTISSEMENT

Ce produit contient une matière d'origine *humaine* qui s'est avérée non réactive à l'antigène de surface de l'hépatite B (AgHBs), au virus de l'hépatite C (VHC) et au virus de l'immunodéficience humaine de type 1 et de type 2 (VIH-1, VIH-2) selon des méthodes enregistrées. Comme aucune méthode de test connue ne peut fournir une assurance complète que les produits dérivés d'échantillons humains ne transmettront pas l'AgHBs, le VHC, le VIH-1, le VIH-2 ou d'autres agents pathogènes transmissibles par le sang, ce produit doit être manipulé conformément aux recommandations pour tout échantillon humain potentiellement infectieux.

Ce produit contient des matières d'origine *animale*. Comme aucune méthode de test connue ne peut fournir une assurance complète que les produits dérivés d'échantillons animaux ne transmettront pas d'agents pathogènes transmissibles par le sang, ce réactif doit être manipulé conformément aux recommandations pour tout échantillon potentiellement infectieux.

Le tampon de dilution contient de l'azoture de sodium qui peut réagir avec les tuyauteries en plomb ou en cuivre pour former des azotures métalliques hautement explosifs. Les matières éliminées dans un évier doivent être rincées abondamment à l'eau pour éviter toute accumulation d'azoture.

Tampon de dilution	Danger		CONT	Imidazole
			H315, H319, H360, P202, P280, P273, P305 + P351 + P338, P310	

Mentions de danger : H315 Provoque une irritation cutanée.
H319 Provoque une sévère irritation des yeux.
H360 Peut nuire à la fertilité ou au fœtus.



Conseils de prudence :
 P202 Ne pas manipuler avant d'avoir lu et compris toutes les précautions de sécurité.
 P264 Se laver soigneusement les mains après manipulation.
 P280 Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage.
 P302 + P352 EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU : laver abondamment à l'eau.
 P332 + P313 En cas d'irritation cutanée : consulter un médecin.
 P305 + P351 + P338 EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX : rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer.
 P337 + P313 Si l'irritation oculaire persiste : consulter un médecin.

PRÉPARATION ET STOCKAGE DES RÉACTIFS

Les réactifs lyophilisés sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette lorsqu'ils sont conservés à une température comprise entre 2 °C et 8 °C.



1. Activateur ACTICLOT

Reconstituer avec 1,5 ml d'eau désionisée de type I. Mélanger/agiter pour permettre une dissolution complète. L'activateur reconstitué est stable pour :

	4 heures	48 heures	3 mois
	37 °C	2 °C – 8 °C	-20 °C



2. Plasma déficient en protéine C

Reconstituer avec 1,5 ml d'eau désionisée de type 1. Mélanger/agiter pour permettre une dissolution complète. Le plasma déficient en protéine C reconstitué est stable pour :

	4 heures
	2 °C – 8 °C



3. Plasma de contrôle de la protéine C

Reconstituer avec 0,5 ml d'eau désionisée de type 1. Mélanger/agiter pour permettre une dissolution complète. Le plasma de contrôle de la protéine C reconstitué est stable pour :

	4 heures
	2 °C – 8 °C

4. Tampon de dilution

Diluer le concentré du tampon de dilution à 50 ml avec de l'eau désionisée de type 1. La concentration de travail du tampon de dilution est stable pour :

	1 semaine	1 mois
	18 °C – 25 °C	2 °C – 8 °C

PRÉLÈVEMENT ET PRÉPARATION DE L'ÉCHANTILLON

Voir « Collection, Transport and Processing of Blood Specimens for Testing Plasma-based Coagulation Assays; Approved Guidelines-Fifth Edition » (« Collecte, transport et traitement des échantillons de sang pour les tests de coagulation plasmatique ; Directives approuvées — cinquième édition »), Document CLSI H21-A5, Vol. 28, N° 5, 2008.³

Neuf volumes de sang sont prélevés dans 1 volume de 0,1 M de citrate trisodique et centrifugés à 3 000 x g pendant 10 minutes. Le plasma doit être stocké à une température comprise entre 2 °C et 8 °C et analysé dans les 2 heures. Le plasma peut également être conservé à -20 °C pendant 1 mois et décongelé une fois à 37 °C, 30 minutes avant utilisation.

PROCÉDURE

Matériel fourni — Voir Réactifs

Matériel requis mais non fourni

Eau désionisée de type 1 ou eau distillée

Solution de chlorure de calcium 0,025 M

minuterie de coagulation

Bouteille graduée de 50 ml

pipette à volume variable (100–1 000 µl)

Calibration du test

Le plasma normal mélangé provenant d'au moins 10 donneurs normaux et ayant été collecté de la même manière que le plasma à tester doit être utilisé pour la préparation des étalons de calibration de la protéine C. On peut également utiliser des dilutions du plasma de contrôle de la protéine C pour préparer les étalons de calibration.

Préparer les étalons de calibration de la protéine C du plasma et les échantillons de plasma des patients comme suit. Utiliser les étalons et les échantillons immédiatement après leur préparation.

Étalon/Échantillon	Volume de plasma normal mélangé	Volume du tampon de dilution
100 %	100 µl	400 µl
50 %	250 µl	250 µl
25 %	250 µl	250 µl
12,5 %	250 µl	250 µl
Échantillon du patient	50 µl	450 µl

Procédure de test

ACTICLOT C peut être réalisé manuellement ou à l'aide d'analyseurs de coagulation semi-automatisés ou automatisés.

Méthode des analyseurs de coagulation automatisés

BioMedica Diagnostics propose des applications d'instruments pour réaliser l'ACTICLOT C sur plusieurs analyseurs de coagulation. Ces applications d'instruments peuvent contenir des données de programmation et de performance spécifiques à la plate-forme qui diffèrent de celles fournies dans ce mode d'emploi. Dans ces cas, les informations contenues dans l'application d'instruments remplacent les informations de ce mode d'emploi. Veuillez consulter le manuel de l'instrument spécifique du fabricant pour obtenir des instructions d'utilisation complètes.

Méthode en point final manuelle

Transférer l'activateur ACTICLOT et une solution de chlorure de calcium de 25 mM dans les puits de réactifs de 37 °C.

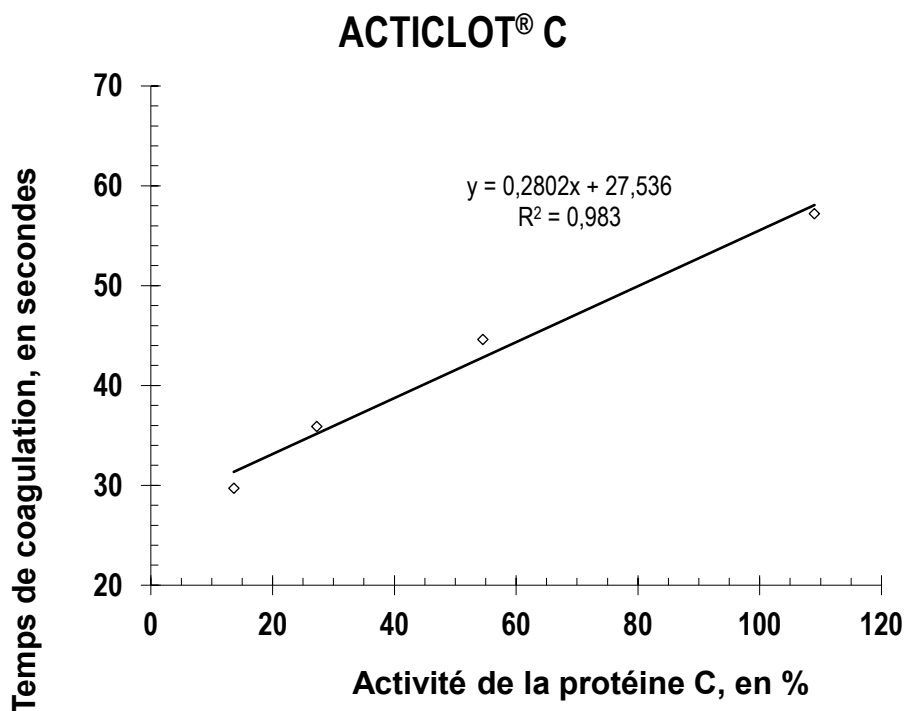
1. Ajouter 0,1 ml de plasma déficient en protéine C + 0,1 ml de dilution standard ou d'échantillon de patient dans une cuvette de coagulation.
2. Incuber à 37 °C pendant 2 minutes.
3. Ajouter 0,1 ml d'activateur ACTICLOT.
4. Incuber à 37 °C pendant 5 minutes.
5. Ajouter 0,1 ml de solution de chlorure de calcium 0,025 M.
6. Démarrer la minuterie de coagulation et noter le temps de coagulation.
7. Obtenir des déterminations en double pour chaque dilution de plasma.

RÉSULTATS

Courbe standard représentative

Une courbe standard est créée en traçant le temps moyen de coagulation pour chaque étalon de protéine C en fonction de son activité correspondante en pourcentage. Une courbe standard doit être générée à chaque fois que le test est effectué. Tracer la ligne de meilleur ajustement entre les points, généralement une équation linéaire, pour l'analyse des données.

La courbe standard suivante est uniquement à titre de démonstration.



CALCUL DES RÉSULTATS

Déterminer le % de protéine C dans l'échantillon test en interpolant à partir de la courbe standard et en multipliant le résultat par deux pour corriger la dilution. Dans le cas de patients présentant un lupus anticoagulant ou une activité anormalement élevée de la protéine C, lorsque plusieurs dilutions de patients ont été testées, il faut corriger le taux de protéine C pour la dilution. Les taux de protéine C corrigés à partir d'au moins deux dilutions doivent correspondre.

CONTRÔLE QUALITÉ

Le plasma de contrôle de la protéine C inclus dans le kit a été évalué par rapport à une matière de référence reconnue au niveau international et peut être analysé dans le cadre du programme de contrôle qualité d'un laboratoire. Le plasma de contrôle doit être inclus dans le test chaque fois que des réactifs fraîchement reconstitués sont utilisés. Le taux obtenu pour le plasma de contrôle doit se situer dans la plage spécifiée par le fournisseur ou le laboratoire. Si le plasma de contrôle ne parvient pas à produire des taux de protéine C dans la plage spécifiée, le test doit être répété. Contacter BioMedica Diagnostics si les tests répétés du contrôle ne permettent pas d'obtenir des taux de protéine C dans des limites acceptables.

LIMITES DE LA PROCÉDURE

Les patients présentant un lupus anticoagulant doivent être testés à de multiples dilutions car des taux élevés de protéine C pourraient être déduits de temps de coagulation prolongés.

Les patients présentant des taux anormalement élevés de FVIII:C peuvent présenter des taux de protéine C inexactement faibles, car il est possible d'obtenir des temps de coagulation plus courts du plasma déficient en protéine C. Ces échantillons doivent être testés à de multiples dilutions.

SUBSTANCES INTERFÉRENTES

Les substances suivantes, aux taux indiqués, peuvent interférer avec ACTICLOT C.

Substance	Concentration
Héparine non fractionnée (HNF)	> 4 unités/ml
Héparine de bas poids moléculaire (HBPM)	> 2 unités/ml
Hémoglobine	> 500 mg/dl
Bilirubine	> 21 mg/dl
Triglycérides	> 900 mg/dl

CARACTÉRISTIQUES DES PERFORMANCES

Exactitude

Dans une étude clinique comparant ACTICLOT C à un test ELISA de la protéine C, les résultats suivants ont été obtenus :

Concentration plasmatique en protéine C (% de la normale, moyenne \pm ET)

État pathologique	N	ACTICLOT C	Test ELISA de la protéine C
Normal	40	89,0 \pm 17,0	94,0 \pm 16,0
CIVD	10	29,4 \pm 11,9	34,2 \pm 13,0
Affection hépatique	10	18,6 \pm 9,6	20,1 \pm 14,6
Déficit en protéine C, congénital	10	37,9 \pm 7,1	45,0 \pm 8,1
Nouveau-nés*	12	21,9 \pm 5,3	19,3 \pm 8,0
Héparine	10	93,7 \pm 16,1	93,5 \pm 14,2
Warfarine	20	23,2 \pm 9,0	57,7 \pm 15,7

* par exemple, le syndrome de détresse respiratoire, la septicémie, la thrombose, l'insuffisance rénale

Corrélation entre ACTICLOT C et le test ELISA de la protéine C (patients sous warfarine non inclus) :

Régression	Coefficient de corrélation	Erreur type d'estimation
$y = 0,93x + 0,0014$	0,952	0,086

Précision




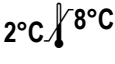








Le coefficient de variation d'ACTICLOT C a été déterminé en utilisant des échantillons préparés en mélangeant du plasma immuno-déplété en protéine C avec du plasma normal mélangé pour obtenir des taux de protéine C de 10 %, 50 % et 100 %.

Taux de protéine C	Variation intra-test	Variation entre les tests
100 %	5,9 %	2,4 %
50 %	4,7 %	3,9 %
10 %	9,1 %	9,3 %

RÉFÉRENCES

1. Stocker, K., Fischer, H., Mejer, J., Brogil, M. and Svendsen, L: Characterization of the protein C activator Protac from the venom of the Southern Copperhead (*Agkistrodon contortrix*) snake. *Toxicol.* 1987, 25: 239-252.
2. Martinoli, J. L. and Stocker, K. Fast functional protein C assay using Protac, a novel protein C activator. *Thromb. Res.* 1986, 43: 253- 264.
3. *Collection, Transport and Processing of Blood Specimens for Testing Plasma-based Coagulation Assays and Molecular Hemostasis Assays; Approved Guidelines-Fifth Edition*, CLSI Document H21-A5, Vol. 28, No. 5, 2008.

DÉFINITIONS DES SYMBOLES

	Consulter le mode d'emploi		Avertissement
	Dispositif médical pour diagnostic <i>in vitro</i>		Limite de température À conserver à une température comprise entre 2 °C et 8 °C
	Numéro de lot		Référence catalogue
	Date de péremption		Fabricant
	Quantité suffisante pour <n> tests		Contient...
	Marquage CE		Représentant agréé dans l'Union européenne