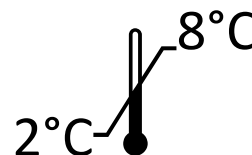
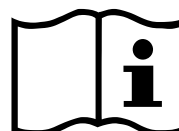


# ACTICHROME® AT III

**REF 838**

*test chromogène pour la mesure de l'activité de  
l'antithrombine III dans le plasma humain*



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

## **USAGE PRÉVU**

ACTICHROME® AT III est destiné à la détermination quantitative de l'activité de l'antithrombine III dans le plasma humain par un test chromogène. Le test est destiné à un usage diagnostic *in vitro*.

## **EXPLICATION DU TEST**

L'antithrombine III est un inhibiteur des protéases à sérine du plasma. L'inhibition de l'activité de la thrombine constitue une fonction importante de l'antithrombine III. Normalement, le taux d'inhibition de la thrombine par l'antithrombine III est lent (activité antithrombotique progressive). Cependant, le taux d'inhibition peut être multiplié par plusieurs milliers en présence d'héparine (activité de cofacteur de l'héparine).

Tolefsen et Blank ont signalé la présence d'un autre inhibiteur rapide de la thrombine dépendant de l'héparine, le cofacteur II de l'héparine, dans le plasma humain. Cette protéine peut interférer avec les déterminations de l'antithrombine III, surtout à des concentrations élevées (2 unités USP/ml) d'héparine. Afin de conférer une spécificité à l'antithrombine III, le présent système de dosage utilise une concentration finale d'héparine plus faible (1,0 unité USP/ml) où l'inactivation renforcée par l'héparine de la thrombine par le cofacteur II de l'héparine est négligeable. En outre, le cofacteur II de l'héparine humaine réagit plus facilement avec la thrombine humaine qu'avec la thrombine bovine (Friberger *et al.*). Ainsi, une spécificité supplémentaire pour l'antithrombine III est conférée dans le présent système de dosage par l'utilisation de thrombine bovine.

## **PRINCIPE DE LA MÉTHODE**

Dans la méthode actuelle en deux étapes (Odegard, *et al.*), la thrombine est ajoutée à une dilution de plasma contenant de l'antithrombine III en présence d'un excès d'héparine. Après une incubation initiale (étape 1), la thrombine résiduelle est déterminée à l'aide d'un substrat chromogène spécifique de la thrombine (étape 2). L'activité résiduelle de la thrombine est inversement proportionnelle à la concentration d'antithrombine III dans le plasma.

## **RÉACTIFS**

Le REF 838 contient suffisamment de réactifs pour réaliser 60 tests en utilisant une méthode manuelle.



**R1 Thrombine Bovine:** 6 flacons (lyophilisés).

**R2 SPECTROZYME® TH:** 6 flacons (lyophilisés).

**R3 Tampon de Test:** 6 flacons, 5 ml, 10X concentré.

## AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS

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.

|                  |  |   |   |      |  |
|------------------|--|---|---|------|--|
| Thrombine bovine | Avertissement  |  | H315, H319; P264, P280, P302 + P352, P305 + P351 + P338, P337 + P313  |      |  |
| SPECTROZYME® TH  | Avertissement  |  | <table border="1"><tr><td>CONT</td><td>Sel de diacétate de H-D-cyclohexylalanyl-alanyl-arginine-para-nitroanilide</td></tr></table><br>H315, H319, H335, P261, P264, P280, P302 + P352, P305 + P351 + P338, P337 + P313 | CONT | Sel de diacétate de H-D-cyclohexylalanyl-alanyl-arginine-para-nitroanilide |
| CONT             | Sel de diacétate de H-D-cyclohexylalanyl-alanyl-arginine-para-nitroanilide |   |   |      |  |
| Tampon de Test   | -  | -   | Observer les bonnes pratiques d'hygiène en laboratoire.   |      |  |

**Mentions de Danger:**

H315 Provoque une irritation cutanée.  
H319 Provoque une sévère irritation des yeux.  
H335 Peut irriter les voies respiratoires.



**Conseils de Prudence:**

P261 Éviter de respirer les poussières.  
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.  
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 flacons intacts de réactifs sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette lorsqu'ils sont conservés entre 2°C et 8°C.



**R1 Thrombine Bovine:** reconstituer avec 2 ml d'eau désionisée filtrée. La thrombine bovine reconstituée est stable pendant:

|   |           |        |
|---|-----------|--------|
|  | 1 semaine | 1 mois |
|  | 2°C – 8°C | -20°C  |

**R2 SPECTROZYME TH:** reconstituer avec 2 ml d'eau purifiée filtrée ou désionisée. Le substrat reconstitué est stable pendant:

|   |           |        |
|---|-----------|--------|
|  | 1 semaine | 1 mois |
|  | 2°C – 8°C | -20°C  |

**R3 Tampon de Test:** diluer le Tampon de Test à 50 ml avec de l'eau désionisée filtrée. La concentration de travail du tampon de test est stable pendant :

|   |           |        |
|---|-----------|--------|
|  | 1 semaine | 1 mois |
|  | 2°C – 8°C | -20°C  |

## PRÉLÈVEMENT ET PRÉPARATION DE L'ÉCHANTILLON

Le plasma pauvre en plaquettes collecté sur citrate peut être utilisé pour ce test. Voir «Collection, Transport and Processing of Blood Specimens for Testing Plasma-based Coagulation Assays and Molecular Hemostasis Assays; Approved Guideline» (Collecte, transport et traitement des échantillons de sang pour les tests de coagulation plasmatique et les tests d'hémostase moléculaire: Directives approuvées), Document CLSI H21-A5, Vol. 28, N°5, Janvier 2008. Le prélèvement de plasma doit être effectué comme suit:

1. Prélevez 9 parts de sang dans 1 part de solution anticoagulante de citrate trisodique à 3,2% (0,109M).
2. Centrifugez l'échantillon de sang à 1500 x g pendant 15 minutes.

3. 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 maximum.
4. Le plasma congelé doit être décongelé rapidement à 37°C. Les plasmas décongelés doivent être conservés à une température comprise entre 2°C et 8°C et analysés dans les 24 heures.

## **PROCÉDURE**

**Matériel Fourni** — Voir Réactifs

### **Matériaux Requis Mais Non Fournis**

Eau désionisée de type 1 ou eau distillée.

Calibrateur de Coagulation Spécial, REF C.BMD.SCC030-01ML-A.

Contrôle de Coagulation Spécial Normal, REF C.BMD.SCCN180-01ML-A.

Contrôle de Coagulation Spécial Anormal, REF C.BMD.SCCA180-01ML-A.

Pipettes individuelles 0–200 µl, 200–1000 µl

Tubes à essai en plastique, minuterie de laboratoire, bain humide ou sec à 37°C

Acide acétique glacial à 50%

Spectrophotomètre pouvant fonctionner à 405 nm, analyseur de coagulation

### **Calibration du Test**

Le Calibrateur de Coagulation Spécial, REF C.BMD.SCC030-01ML-A, ou un plasma humain normal mélangé (au moins 10 donneurs normaux) ayant été prélevé de la même manière que les plasmas à tester, peut être utilisé pour la préparation des étalons d'antithrombine III. Les contraceptifs oraux et autres préparations à base d'œstrogène/progestérone pouvant affecter les taux d'antithrombine III, le plasma des utilisatrices de ces préparations doit être exclu du mélange.

Préparez les étalons d'antithrombine III, les contrôles et les échantillons de plasma du patient comme suit. Analysez les étalons, les contrôles et les échantillons immédiatement après leur préparation.

| <b>Étalon*</b>                         | <b>Volume du Calibrateur de Coagulation Spécial</b> | <b>Volume du Tampon de Test</b> |
|--|---|---------------------------------|
| 100%                                   | 25 µl   | 1000 µl                         |
| 50%                                    | 500 µl de l'étalon à 100%                           | 500 µl                          |
| 0%                                     | 0 µl  | 1000 µl                         |
|  |   |                                 |
| <b>Échantillon de Patient/Contrôle</b> | <b>Volume de l'Echantillon de Patient/Contrôle</b>  | <b>Volume du Tampon de Test</b> |
|  | 25 µl   | 1000 µl                         |

\* La valeur réelle des étalons d'antithrombine III dépendra de la valeur spécifique du lot du calibrateur de coagulation spécial.

## **Procédure de Test**

ACTICHROME AT III peut être réalisé manuellement ou à l'aide d'analyseurs de coagulation semi-automatisés ou automatisés.

BioMedica Diagnostics propose des applications d'instruments pour réaliser l'ACTICHROME AT III 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.

## **Procédure de Test — Méthode Manuelle**

### **Méthode de Point Final**

1. Ajoutez 200 µl de plasma standard ou inconnu dans un tube en plastique.
2. Incubez à 37°C pendant 2 à 4 minutes.
3. Ajoutez 200 µl de Thrombine Bovine.

4. Mélangez et incubez à 37°C pendant 1 minute.
5. Ajoutez 200 µl de SPECTROZYME TH.
6. Mélangez et incubez à 37°C pendant 1 minute.
7. Ajoutez 200 µl d'acide acétique glacial à 50%.
8. Mélangez.
9. Ajoutez 200 µl d'eau\* (facultatif).

Lisez l'absorbance à 405 nm dans une semi-microcuvette de 1 cm par rapport à un blanc préparé dans l'ordre suivant:

- 200 µl d'acide acétique
- 200 µl de dilution standard
- 200 µl de Thrombine Bovine
- 200 µl de SPECTROZYME TH
- 200 µl d'eau\* (facultatif)

(\* Certains spectrophotomètres exigent un volume minimum de 1 ml dans la cuvette)

### **Méthode Cinétique**

Un analyseur cinétique peut être utilisé pour mesurer la vitesse initiale d'hydrolyse du substrat chromogène. La procédure à suivre est la suivante:

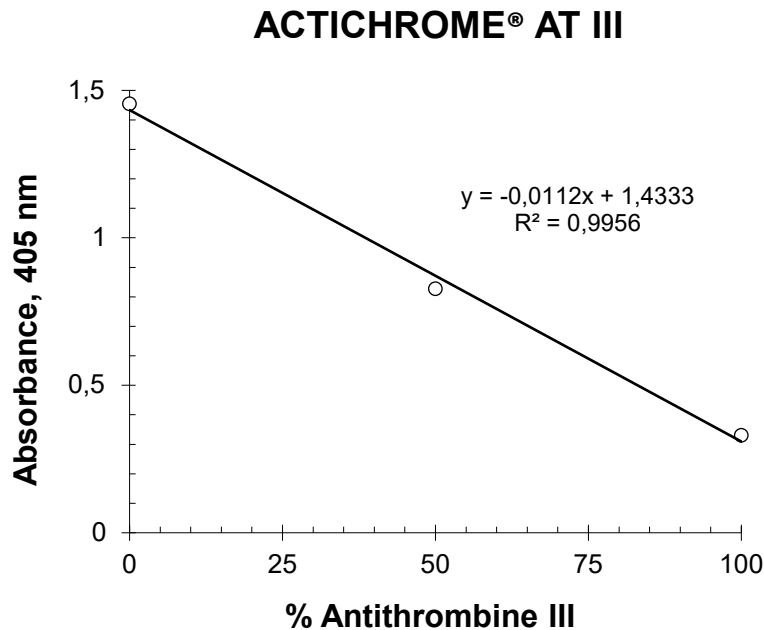
1. Ajoutez 5 µl de plasma standard ou inconnu à 200 µl de Tampon de Test.
2. Incubez à 37°C pendant 2 à 4 minutes.
3. Ajoutez 200 µl de Thrombine Bovine.
4. Mélangez et incubez à 37°C pendant 1 minute.
5. Ajoutez 200 µl de SPECTROZYME TH.
6. Mesurez le taux de changement de l'absorbance à 405 nm.

# RÉSULTATS

## Courbe Standard Représentative

Une courbe standard est créée en traçant l'absorbance moyenne pour chaque étalon d'antithrombine III en fonction de son activité correspondante en pourcentage. Une courbe standard doit être générée à chaque fois que le test est effectué. Tracez 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

Interpolez l'activité antithrombine III de l'échantillon du patient directement à partir de la courbe standard.

## CONTRÔLE QUALITÉ

Les plasmas de contrôle doivent être inclus dans le test chaque fois que des réactifs fraîchement reconstitués sont utilisés. Le Contrôle de Coagulation Spécial Normal, REF C.BMD.SCCN180-01ML-A, et le Contrôle de Coagulation Spécial Anormal, REF C.BMD.SCCA180-01ML-A, peuvent être utilisés. Les niveaux obtenus pour ces plasmas de contrôle devraient se situer dans les plages spécifiées. Si ces plasmas de contrôle ne parviennent pas à produire des taux d'antithrombine III dans la plage spécifiée, le test doit

être répété. Contactez BioMedica Diagnostics si les tests répétés de ces plasmas de contrôle continuent à ne pas produire des taux d'antithrombine III dans la plage spécifiée.

## LIMITES DE LA PROCÉDURE

Les échantillons ictériques, lipémiques et hémolysés peuvent interférer avec le test. Si l'échantillon de plasma est très ictérique, il convient de préparer un second blanc contenant la dilution de l'échantillon de plasma au lieu de la dilution standard et de soustraire son absorbance de l'absorbance obtenue pour l'échantillon de plasma.

## VALEURS ATTENDUES

La plage normale d'AT III dans le plasma est de 75%–125%. Des niveaux d'activité de 30 à 60% peuvent être observés chez les patients présentant un déficit héréditaire en AT III. Plusieurs états cliniques sont associés à un déficit acquis en AT III, notamment une maladie du foie, une CIVD, un syndrome néphrotique, une embolie pulmonaire, un accident vasculaire cérébral et une thrombophlébite. De plus, l'utilisation de contraceptifs oraux peut réduire les taux d'AT III.

## CARACTÉRISTIQUES DES PERFORMANCES

### Exactitude

Dans les études cliniques comparant ACTICHROME AT III à plusieurs autres kits d'antithrombine III chromogènes disponibles dans le commerce, la corrélation suivante a été observée:

$$\% \text{ d'AT III (autres dosages)} = 0,93\% \text{ d'AT III (ACTICHROME)} + 5,9 \text{ (n = 53, r = 0,80)}$$

### Précision

Les estimations suivantes de la précision (coefficient de variation) ont été observées en utilisant le mode de point final arrêté semi-micro. La précision peut être considérablement améliorée en utilisant un mode cinétique.

| % d'AT III | Coefficient de variation |                      |
|------------|--------------------------|----------------------|
|            | Intra-test (n = 20)      | Inter-tests (n = 10) |
| 100        | 4,4%                     | 5,8%                 |
| 50         | 3,4%                     | 6,4%                 |

## Sensibilité

ACTICHROME AT III est sensible à 10% d'antithrombine III.

## Spécificité

La spécificité du système de dosage a été établie dans des études utilisant du plasma qui a été sélectivement appauvri en antithrombine III, suivi par l'ajout d'antithrombine III purifiée pour obtenir différentes concentrations d'antithrombine III.




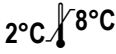








## TRAÇABILITÉ DES CALIBRATEURS ET DES MATÉRIAUX DE CONTRÔLE

Des informations sur la traçabilité des calibrateurs et des matériaux de contrôle sont disponibles sur demande.

## RÉFÉRENCES

1. Odegard, O. R., Lie, M. and Ablidgaard, U. *Thrombosis Research* 1975, **6**: 287-294.
2. Tolefsen, D. M. and Blank, M. K. *Journal of Clinical Investigations* 1981, **68**: 589-596.
3. Friberger, P., Egberg, N., Holmer, E., Hellgren, M. and Blomback, M. *Thrombosis Research* 1982, **25**: 433-436.

## DÉFINITIONS DES SYMBOLES

|   |   |  |   |
|---|---|--|---|
|  | Consulter le mode d'emploi                  |   | Avertissement   |
|  | Dispositif médical pour diagnostic in vitro |   | Limite de température.<br>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 au sein de l'Union Européenne                                |