

medac Asparaginase-Aktivitäts-Test
MAAT

Français



FABRICANT

medac

Gesellschaft für klinische
Spezialpräparate mbH
Theaterstraße 6
D-22880 Wedel

www.medac-diagnostics.de
E-Mail: diagnostics@medac.de
Tél.: ++49/4103/8006-0
Fax: ++49/4103/8006-359

ADRESSE DE COMMANDE

E-Mail: auftrag@medac.de
Tél.: ++49/4103/8006-111
Fax: ++49/4103/8006-113

medac Asparaginase-Aktivitäts-Test (MAAT)

Trousse pour la détermination de l'activité de l'asparaginase par dosage enzymatique quantitatif dans le sérum et le plasma-EDTA

Réf.: 550

DESTINÉE UNIQUEMENT AU DIAGNOSTIC IN VITRO

INTRODUCTION

L'enzyme L-asparaginase constitue un élément essentiel dans le traitement de la leucémie aiguë lymphoblastique (LAL) chez l'enfant et l'adulte.

Le principe d'action du traitement par l'asparaginase est le clivage enzymatique de l'acide aminé asparagine en acide aspartique et ammoniac, avec pour conséquence une déplétion de l'asparagine dans le plasma sanguin et le liquide céphalo-rachidien (voir aussi principe du dosage, page 2).

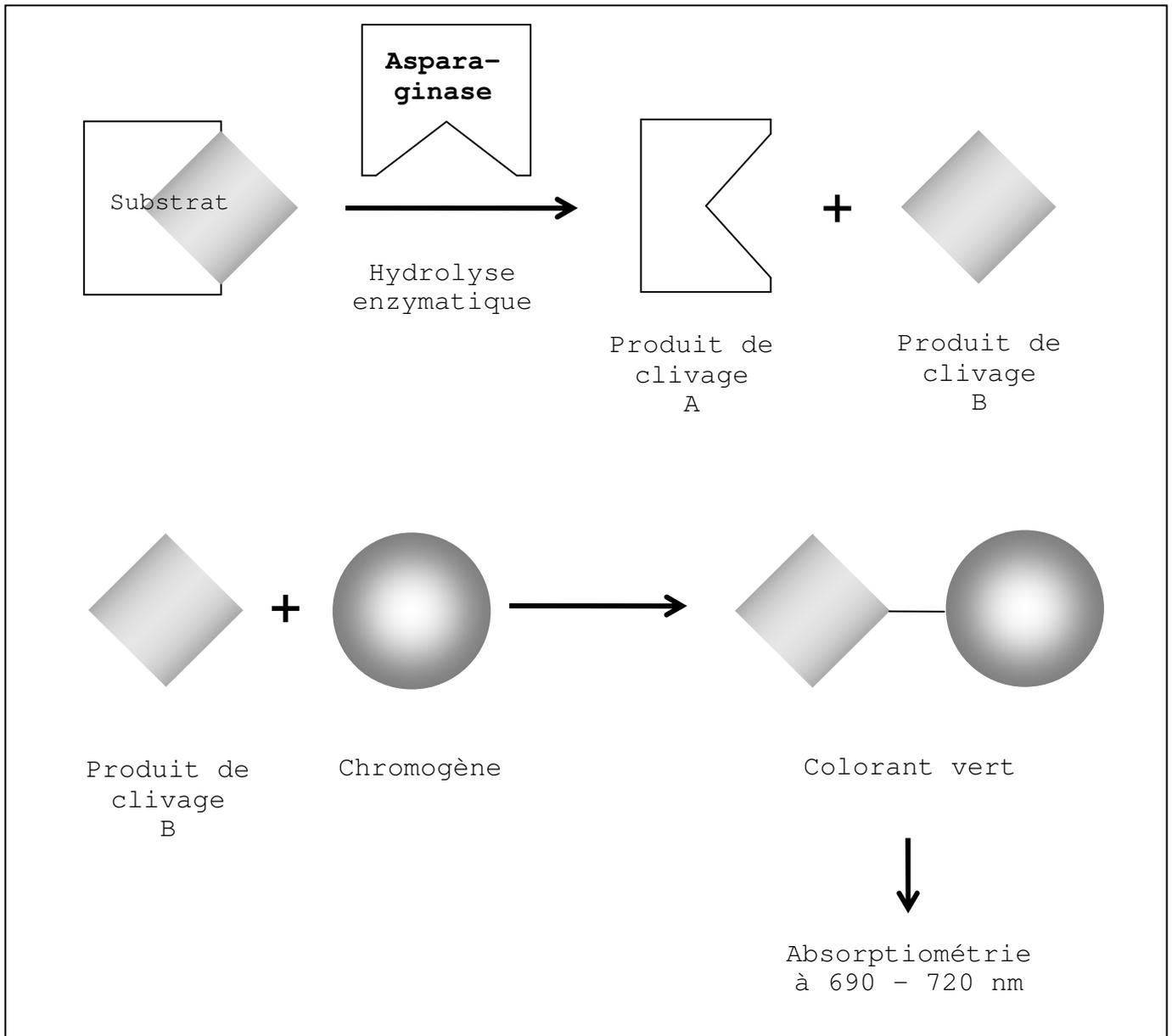
Cette trousse permet de mesurer l'activité de l'asparaginase au décours du traitement, afin d'optimiser le traitement par l'asparaginase.

Les objectifs de cette surveillance de l'activité de l'asparaginase sont:

- * Le contrôle de l'activité de l'asparaginase pendant le traitement, comme mesure indirecte de la déplétion d'asparagine.
- * La détection d'une „silent inactivation“ provoquée par une réponse immunitaire, susceptible d'entraîner un raccourcissement de la durée d'action de la préparation d'asparaginase.
- * L'établissement d'une base rationnelle pour décider s'il faut éventuellement changer de préparation d'asparaginase ou ajuster la posologie.

Le dosage MAAT est un test homogène destiné à mesurer l'activité de l'asparaginase. Il permet d'atteindre complètement les objectifs de la surveillance de l'activité de l'asparaginase.

PRINCIPE DU DOSAGE



L'asparaginase clive un substrat analogue à l'asparagine en deux produits de clivage A et B.

Le produit de clivage B libéré forme, dans une réaction complexe avec un chromogène, un complexe coloré vert qui peut être mis en évidence par absorptiométrie.

La densité optique est mesurée à 690 - 720 nm et l'activité de l'asparaginase des sérums est établie à l'aide d'une courbe de référence.

AVANTAGES DU DOSAGE

- ◆ Manipulation souple grâce à des cavités séparées sécables
- ◆ Manipulation facile, vu l'absence d'étapes de lavage et de centrifugation
- ◆ Durée du dosage de seulement 2,5 heures environ
- ◆ Précision élevée des résultats avec l'Asparaginase medac®

CONTENU DE LA TROUSSE:

Réf.: 550

1. Microplaque: 6 x 8 puits en U (avec support dans un sachet d'aluminium sous vide), sécables, spécialement traités.
2. Contrôle: 2 flacons de 0,5 ml, contenant de l'Asparaginase medac® issue d'*E. coli* dans du sérum humain, lyophilisé.
3. Etalons: 2 flacons de 0,5 ml, contenant de l'Asparaginase medac® issue d'*E. coli* dans du sérum humain, lyophilisé:
 - 3a. Etalon 1: 600 U/l
 - 3b. Etalon 2: 300 U/l
 - 3c. Etalon 3: 50 U/l
 - 3d. Etalon 4: 0 U/l
4. Diluant pour échantillons: 1 flacon de 110 ml, contenant une solution tamponnée 0,01 M PBS/TWEEN/BSA, pH 7,2 - 7,4, prêt à l'emploi, contient du ProClin™ 300 (0,008 % CMIT/MIT)¹.
5. Substrat: 2 flacons de 0,75 ml, prêts à l'emploi, contient du ProClin™ 300 (< 0,0015 % CMIT/MIT)^{1,2}.
6. Chromogène: 2 flacons de 1,0 ml, concentré.
Nocif pour les organismes aquatiques, entraîne des effets néfastes à long terme.
Éviter le rejet dans l'environnement. Éliminer le contenu/réceptacle conformément à la réglementation locale et nationale
7. Diluant de chromogène: 2 flacons de 2,0 ml, prêts à l'emploi.
Fiche de données de sécurité disponible sur demande.



¹ Mélange de: 5-chloro-2-méthyl-2H-isothiazol-3-one et 2-méthyl-2H-isothiazol-3-one (3:1).

² Peut produire une réaction allergique. Fiche de données de sécurité disponible sur demande (voir CD-ROM).

1. CONSERVATION ET STABILITE

Matériel/Réactif	Etat	Conservation	Stabilité
Trousse	non ouvert	2...8 °C	jusqu'à la date de péremption
Microplaque	ouvert	2...8 °C dans le sachet avec dessiccateur	jusqu'à la date de péremption
Contrôle	ouvert, dissous	2...8 °C	4 semaines
Etalons	ouvert, dissous	2...8 °C	4 semaines
Diluant échantillon	ouvert	2...8 °C	8 semaines
Substrat	ouvert	2...8 °C	4 semaines
Chromogène	ouvert	2...8 °C	4 semaines
Diluant de chromogène	ouvert	2...8 °C	4 semaines

Ne pas utiliser les réactifs après expiration de la date de péremption.

2. REACTIFS ET MATERIEL NECESSAIRES MAIS NON FOURNIS

2.1. Micropipettes réglables.

2.2. Récipients propres en plastique ou en verre pour la dilution des échantillons et du chromogène.

2.3. Lecteur de plaque avec filtre à 690 - 720 nm.

3. PREPARATION DES REACTIFS

Avant de démarrer la procédure de dosage, tous les composants de la trousse doivent être amenés à température ambiante.

Calculer le nombre de puits nécessaires.

3.1. Microplaque

Le sachet d'aluminium avec le dessiccateur doit être soigneusement rescellé, après avoir retiré les puits. La conservation et la durée de vie des puits sont indiqués dans le tableau de la page 28.

3.2. Etalons et contrôle

Reconstituer le contrôle lyophilisé et les étalons avec respectivement 0,5 ml de diluant échantillon. Agiter doucement les flacons fermés, afin de mettre aussi en solution les particules adhérant au bouchon.

3.3. Solution de chromogène

Mélanger le chromogène avec le diluant de chromogène dans un rapport de 1 pour 2. Il faut 800 µl de solution de chromogène pour 8 puits.

Exemples :

Nombre de puits	Chromogène (µl)	Diluant de chromogène (µl)	Σ (µl)	Volume à pipetter nécessaire (µl)
6	240	480	720	600
7	280	560	840	700
8	320	640	960	800
9	360	720	1080	900
10	400	800	1200	1000
11	440	880	1320	1100
12	480	960	1440	1200
13	520	1040	1560	1300
14	560	1120	1680	1400
15	600	1200	1800	1500
16	640	1280	1920	1600

Remarque : Un réchauffement de la solution de chromogène se produit lors du mélange.

Le mélange de chromogène et de diluant de chromogène ne se conserve pas et doit être utilisé immédiatement.

Ne pas mélanger les réactifs de différents lots ou de différents fabricants.

Des résultats valides et reproductibles sont obtenus uniquement en suivant strictement la notice d'emploi et en utilisant les réactifs spécifiques de la trousse.

4. ECHANTILLONS

- 4.1. Le test est à utiliser avec du sérum ou du plasma-EDTA. Les échantillons de patients peuvent être conservés pendant 7 jours à 2-8 °C. Un stockage à long terme doit être fait à ≤ -20 °C. Des décongélations et congélations des échantillons doivent être évitées.
- 4.2. Il ne faut pas faire de traitement préalable du échantillons, p. ex. d'inactivation. L'échantillon ne doit pas être contaminé par des micro-organismes, ne doit pas être lipémique, ni contenir d'érythrocytes.
- 4.3. Les échantillons doivent être dilués au 1/10 avec le diluant échantillon (par ex. 20 μ l de échantillon + 180 μ l de diluant échantillon). Les échantillons en dehors du domaine de mesure peuvent être encore plus dilués.

5.A. PROCEDURE DE DOSAGE

- 5.1. Couper le sachet d'aluminium au-dessus du zip et extraire le nombre de puits nécessaire (voir 3.1.).
- 5.2. Distribuer respectivement 20 μ l de contrôle, des étalons et des échantillons dans les puits de la plaque.
- 5.3. Puis ajouter 20 μ l de substrat dans chaque puits.

La distribution des étalons, du contrôle, des échantillons et du Substrat doit se faire en moins de 10 minutes. Veiller à obtenir un mélange homogène en agitant prudemment. Il faut ensuite incuber sans délai la plaque.

- 5.4. Incuber la plaque recouverte d'un couvercle 60 min (± 2 min) à température ambiante (22 °C ± 1 °C).
- 5.5. Ajouter la solution de chromogène vers la fin de la période d'incubation (voir 3.3.).
- 5.6. Distribuer 100 μ l de solution de chromogène dans tous les puits.

5.7. Incuber la plaque recouverte d'un couvercle 90 min (± 2 min) à température ambiante ($22\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$).

Veiller à obtenir un mélange homogène en agitant prudemment.

Avant la lecture photométrique, vérifier l'absence de bulles d'air dans les puits.

La lecture doit se faire immédiatement après la dernière étape d'incubation.

5.B. TABLEAU DE DISTRIBUTION DES REACTIFS

	Etalons	Contrôle	Echantillon
Etalons	20 μ l	-	-
Contrôle	-	20 μ l	-
Echantillon	-	-	20 μ l
Substrat	20 μ l	20 μ l	20 μ l
Incuber pendant 60 min, à température ambiante ($22 \pm 1\text{ °C}$)			
Solution de chromogène	100 μ l	100 μ l	100 μ l
Incuber pendant 90 min, à température ambiante ($22 \pm 1\text{ °C}$)			
Lecture photométrique à 690 - 720 nm			

6.A. CALCUL DES RESULTATS (VALIDITE)

- * La lecture photométrique se fait à une longueur d'onde de 690 - 720 nm. La valeur à blanc est mesurée contre l'air.
- * La fourchette des valeurs prescrites est imprimée sur l'étiquette de la boîte.

* Critères de validité

- L'activité du **contrôle** doit se situer dans la **fourchette des valeurs prescrites** (voir l'étiquette de la boîte).
- La valeur D.O. du **étalon 1** doit être **> 1,500**.
- La valeur D.O. du **étalon 4** doit être **< 0,150**.

Le test doit être répété si les critères de validité mentionnés ne sont pas remplis.

* Courbe de référence et quantification des résultats

Les valeurs D.O. des étalons sont inscrites sur le graphique en fonction de l'activité. Il est recommandé pour la courbe de référence d'effectuer une approximation de spline cubique.

Les activités de l'asparaginase correspondant aux valeurs D.O. des échantillons peuvent être lues sur la courbe de référence.

Le domaine de mesure varie entre 30 et 600 U/l. Les échantillons dont les activités se situent en dessous du domaine de mesure doivent être interprétés comme < 30 U/l. Les échantillons au-dessus du domaine de mesure doivent être interprétés comme > 600 U/l. Ces valeurs ne doivent pas être extrapolées, mais redosées à une dilution plus forte.

Si un échantillon a été mesuré à une dilution supérieure à 1/10, l'activité lue à partir de la courbe de référence doit être multipliée par le facteur supplémentaire de dilution (p. ex.: dilution de l'échantillon de 1/40, activité lue de 250 U/l ⇒ activité réelle = 250 U/l x 4 = 1000 U/l).

6.B. INTERPRETATION DES RESULTATS/LIMITES DE LA METHODE

* Le medac Asparaginase-Aktivitäts-Test (MAAT) peut être utilisé pour mesurer dans l'échantillon l'activité de l'asparaginase d'enzymes dégradant l'asparagine. Ceci est valable pour l'activité de l'asparaginase de toutes les préparations d'asparaginase du commerce.

* L'étalonnage du test est réalisé par comparaison à l'Asparaginase medac[®], de telle sorte que des échantillons de patients qui sont traités avec l'Asparaginase medac[®] sont testés correctement. La validation a été réalisée par comparaison avec une méthode de référence (test AHA, voir Lanvers et al., 2007).

- * A cause de la dépendance de l'activité enzymatique sur la méthode de test, il peut en résulter que la mesure d'échantillons qui contiennent d'autres préparations d'Asparaginase aient des déviations systématiques de l'activité mesurée. De manière à déterminer cette déviation pour Oncaspar®, une investigation d'échantillons de patients qui ont été traités par Oncaspar® a été réalisée en comparaison avec la méthode de référence AHA. Les résultats obtenus ont révélé une activité élevée d'une moyenne de 24 % (SD = 10 %; N = 134). Pour l'assurance de qualité et le suivi de l'intensité de la dose prescrite pendant la thérapie, ces déviations normalement marginales peuvent être ignorées.
- * Dans l'état actuel des connaissances scientifiques, il n'est pas possible de définir de valeur limite nette d'activité de l'asparaginase à partir de laquelle une déplétion d'asparagine de 100% est garantie. Chaque utilisateur ou groupe d'étude devra donc définir lui-même sa propre valeur limite selon l'objectif thérapeutique. La publication de Riccardi et al. (1981) indique cependant qu'à partir d'une activité de l'asparaginase de 100 U/l, une déplétion complète de l'asparagine est garantie, si bien qu'une activité de 100 U/l peut être considérée comme „l'activité minimale efficace“.
- * Des concentrations d'hémoglobine et de bilirubine élevées n'influencent pas les résultats du dosage.

7. PERFORMANCE DU DOSAGE

Les performances du dosage ont été déterminées pendant l'évaluation diagnostique de la trousse.

7.A. PREVALENCE

Dans le cadre de l'essai diagnostique, 102 sérums de donneurs de sang ont été dosés. Dans ces sérums, aucune activité de l'asparaginase n'était mesurable. L'activité de l'asparaginase était en générale inférieure à 30 U/l.

Par ailleurs l'activité de l'asparaginase a été étudiée dans 52 sérums d'enfants. Les valeurs étaient là aussi inférieures à 30 U/l.

7.B. PRECISION

Echan- tillon	Variation Intra-essais				Echan- tillon	Variation Inter-essais			
	D.O. Moyenne	E.T.	CV (%)	n		Moyenne U/l	E.T.	CV (%)	n
Et. 1	2,162	0,068	3,1	22	C	91,5	3,7	4,0	9
C	0,530	0,006	1,1	22	N° 3	38,2	1,7	4,5	9
N° 1	0,254	0,006	2,5	22	N° 4	125,5	7,5	6,0	9
N° 2	1,380	0,021	1,5	22	N° 5	420,3	33,7	8,0	9

Et. = étalon ; C = contrôle ; N° = sérum

7.C. RECUPERATION

En ajoutant 3 activités de l'asparaginase définies (asparaginase medac®) à 3 sérums différents, une récupération moyenne de 93,6 % (S = 9,9 %) a été enregistrée.

7.D. LINEARITE DE DILUTION

La linéarité de dilution a été étudiée à l'aide de 10 sérums hautement réactifs, qui ont été testés dans 4 - 5 dilutions différentes (dilutions au 1/2 successives).

	Dilu. 1 U/l	Dilu. 2 U/l	Dilu. 3 U/l	Dilu. 4 U/l	Dilu. 5 U/l	Moyenne U/l	E.T. U/l	CV %
N° 1	1731	1789	1845	1897	-	1815	71	3,9
N° 2	440	446	465	476	-	457	17	3,6
N° 3	1569	1638	1665	1672	-	1636	47	2,9
N° 4	359	357	373	375	-	366	9	2,5
N° 5	373	380	407	404	-	391	17	4,4
N° 6	543	520	546	564	614	557	35	6,3
N° 7	940	945	972	979	-	959	19	2,0
N° 8	8876	8889	9248	8986	9125	9025	160	1,8
N° 9	3609	3775	4025	4273	-	3920	291	7,4
N° 10	1087	1068	1116	1153	-	1106	37	3,4

7.E. EFFET DE HOOK

Aucun effet de Hook n'a été observé pour des activités de l'asparaginase jusqu'à 20 000 U/l.

7.F. LIMITE DE DOSAGE (LIMIT OF QUANTITATION, LOQ)

Le seuil de quantification est de 30 U/l.

INDICATIONS GENERALES

- * Ne pas échanger les flacons et leurs bouchons pour éviter des contaminations croisées.
- * Les flacons des réactifs doivent être refermés immédiatement après leur utilisation pour éviter l'évaporation et la contamination bactérienne.
- * Après emploi, les réactifs doivent être conservés comme indiqué pour garantir leur durée de vie.
- * Après leur utilisation, conserver tous les composants de la trousse dans leur emballage d'origine, afin d'éviter un échange involontaire avec des réactifs d'autres techniques de dosage ou d'autres lots (voir aussi 3.).

PRECAUTIONS D'EMPLOI

- * Il faut appliquer la réglementation en vigueur en matière de sécurité et de santé.
- * Les réactifs d'origine humaine ont été dosés et trouvés négatifs en AgHBs, en anticorps anti-HIV-1/2 et anti-VHC. Néanmoins, il est fortement conseillé de manipuler ces produits, ainsi que ceux d'origine animale (voir contenu de la trousse), comme étant potentiellement infectieux et de les utiliser avec les précautions nécessaires.

CONSEIL D'ELIMINATION

Les résidus des produits chimiques et des préparations sont considérés en général comme des déchets dangereux.

L'élimination de ce type de déchets doit se faire selon la réglementation en vigueur. Il faut consulter les organismes agréés pour connaître le moyen de se débarrasser des déchets.

Date de mise à jour : 01.04.2018

LITTÉRATURE

Boos et al., Monitoring of asparaginase activity and asparagine levels in children on different asparaginase preparations; *European Journal of Cancer*, Vol. 32 A, No. 9, pp. 1544-1559 (1996).

Boos J. medac Asparaginase-Activity-Test (MAAT): A new method to measure asparaginase activity; I-BFM-Meeting, Prag (2001).

Lanvers et al., Analytical validation of a microplate reader-based method for the therapeutic drug monitoring of L-asparaginase in human serum; *Analytical Biochemistry*; 309, 117-126 (2002).

Mueller et al., Pegylated asparaginase (Oncaspar) in children with ALL: drug monitoring in reinduction according to the ALL/NHL-BFM protocols; *British Journal of Hematology*, 110, 379-384 (2000).

Riccardi R, Holcenberg JS, Glaubinger DL, et al., L-Asparaginase pharmacokinetics and asparagine levels in cerebrospinal fluid of rhesus monkeys and humans; *Cancer Res*; 41: 4554-4558 (1981).