

Université Claude Bernard



Lyon 1



Hôpitaux de Lyon

**Rapport de mission
Faculté de Pharmacie
et Centre Hospitalier Universitaire
hôpital Ali Abad & Maiwand**

du 20 octobre au 3 novembre 2007

**Dr Jean-Pierre ARNOULD
Biologiste - Toxicologue
Faculté de Pharmacie - Amiens
Service de Biologie - Centre Hospitalier, Châteaudun**

**François CRINIS
Technicien
Service de Biologie - Centre Hospitalier, Châteaudun**



Liberté • Égalité • Fraternité
RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

Avec le soutien de l'Ambassade de France en Afghanistan

Objectifs

Cette mission comporte deux volets :

- une intervention dans les hôpitaux universitaires de Kaboul : Hôpital Ali Abad et Hôpital Maïwand,
- une intervention à la Faculté de Pharmacie de Kaboul dans le cadre d'une collaboration entre la Faculté de Kaboul et la Faculté de Pharmacie de Lyon.

MISSION DANS LES HOPITAUX

Accueil

Une réunion de travail a été organisée le mardi 23 octobre, à l'Hôpital Maïwand par le Dr Thomas Kesteman, interne à Kaboul. Cette première rencontre avait pour but d'établir le programme de la mission dans les différents hôpitaux de Kaboul.

Les principaux thèmes à développer étaient les suivants :

- Contrôles de qualité interne
- Contrôles de qualité externe
- Contrôles des pipettes
- Mise en place de techniques d'hémostase =
Taux de Prothrombine et Temps de céphaline activée
- Développement de techniques biochimiques =
LDH et CK-MB

Par ailleurs, il nous a été demandé de revoir le fonctionnement d'un compteur hématologique actuellement indisponible.

Planning

Le mercredi 24 octobre, nous nous sommes rendus à l'Hôpital Ali Abad afin d'expliquer aux techniciens du laboratoire l'intérêt des contrôles de qualité et leur mise en œuvre.

Nous avons profité de notre présence pour :

- contrôler un spectrophotomètre qui était instable et donnait des résultats aléatoires. Ce spectrophotomètre devait être utilisé lors de la réalisation des techniques biochimiques car il était le seul appareil offrant la possibilité de suivre les variations d'absorbance,
- vérifier le fonctionnement d'un appareil à distiller pour produire de l'eau distillée : le dysfonctionnement provenait de l'absence d'un détartrage régulier.
- d'expliquer le dysfonctionnement d'un autre appareil, neuf, de production d'eau distillée.

Le mercredi après-midi, nous avons pris contact avec le responsable d'une société locale de distribution de produits chimiques et de réactifs de laboratoire. Nous avons pu constater que l'approvisionnement notamment en coffrets de réactifs pour l'hémostase (Temps de Quick, Temps de céphaline activé) et la biochimie (LDH, CK-MB) pouvait se faire sans problème à Kaboul.

Le jeudi 25 octobre, nous nous sommes rendus au laboratoire de l'Hôpital de Maiwand pour donner des explications sur le « contrôle de qualité » et son intérêt en routine lors de la réalisation des examens biologiques

Nous avons également donné des explications théoriques sur la réalisation de la détermination du *Taux de prothrombine*¹ (*Temps de Quick*).

Nous avons surtout insisté sur l'importance à l'hôpital de la mise en place de ce paramètre dans le cadre d'interventions chirurgicales et de certains suivis en médecine interne.

Nous avons constaté que les contrôles de qualité internes étaient réalisés quotidiennement sur les quatre paramètres : glycémie, urée, cholestérol, triglycérides. Les techniciens ont bien assimilé les objectifs des démarches de qualité, mais ils demandent des explications sur les interprétations des résultats. En cas de résultats discordants, les examens biologiques sont recommencés et contrôlés.

Nous avons également mis en place les contrôles externes de qualité.

Dans le laboratoire (Hôpital Maiwand) nous avons constaté la présence d'un analyseur de biochimie fonctionnant au moyen de réactifs « secs », ce qui offre plusieurs avantages : conservation, contrôles facilités, mais le seul problème est l'absence de réactifs et le coût de ces derniers.

Nous avons fait l'inventaire du matériel pour la réalisation des dosages en hémostase et avons demandé d'acheter deux chronomètres.

Pour clore cette journée, nous nous sommes rendus au siège d'AMI pour découvrir le compteur hématologique (qui, en l'absence de réactifs, n'est pas utilisé). Il s'agit d'un appareil de la marque *Symes* dont les activités (pour certains matériels) ont été reprises par la Société ROCHE.

Nous avons contacté la Société ROCHE qui n'a pas pu nous fournir de réactifs pour le *Symes*. Cependant, cet automate ressemblant beaucoup à un matériel de la Société HORIBA (anciennement *ABX*), nous avons contacté cette Société HORIBA ; celle-ci nous a précisé que les réactifs *ABX-HORIBA* pourraient convenir au fonctionnement de l'automate *Symex*.

Le samedi 27 octobre, à l'Hôpital Ali Abad, nous avons formé les techniciens au *contrôle des micro-pipettes*.

Au cours de cette formation très pratique, nous avons testé des micro-pipettes de 10 et de 1000 microlitres.

Des explications ont été données pour la réalisation et l'exploitation des résultats obtenus à partir de la *fiche de calcul Excel*.

¹ Nous avons apporté pour cette mission des coffrets donnés par la Société STAGO pour la détermination du Temps de Quick et du Temps de céphaline activé.



Vérification de micro-pipettes

Puis, nous avons expliqué l'intérêt de la détermination du Taux de Prothrombine (Temps de Quick). Les techniciens ont eux-mêmes réalisé cette détermination, sous notre encadrement.

A noter que nous sommes intervenus pour remplacer la lampe du spectrophotomètre défectueux : il serait nécessaire de disposer dans chaque laboratoire (Ali Abad et Maïwand) d'une lampe de rechange. Nous avons dû mettre en place une solution de dépannage en nous procurant une lampe (12 Volts 45 Watts) destinée à un autre usage, ce qui nous a obligé à refaire le câblage approprié.

Différentes déterminations ont ensuite été effectuées, montrant toujours une dérive importante de l'absorbance. Le défaut du spectrophotomètre pourrait avoir plusieurs causes : manque de stabilité de l'alimentation 12 Volts ou présence de poussières au niveau de la partie optique du spectrophotomètre.

Cet appareil a besoin absolument d'une révision : c'est en effet le seul moyen de secours dont dispose le laboratoire.

Le dimanche 28 octobre, nous sommes intervenus à la Faculté de Pharmacie et avons profité de la présence de spectrophotomètre convenable pour tester les coffrets de LDH apportés² de France.

Le lundi 29 octobre, nous avons effectué une deuxième session de formation, cette fois au Laboratoire de l'Hôpital Maïwand, sur l'utilisation et le contrôle des micro-pipettes avec la

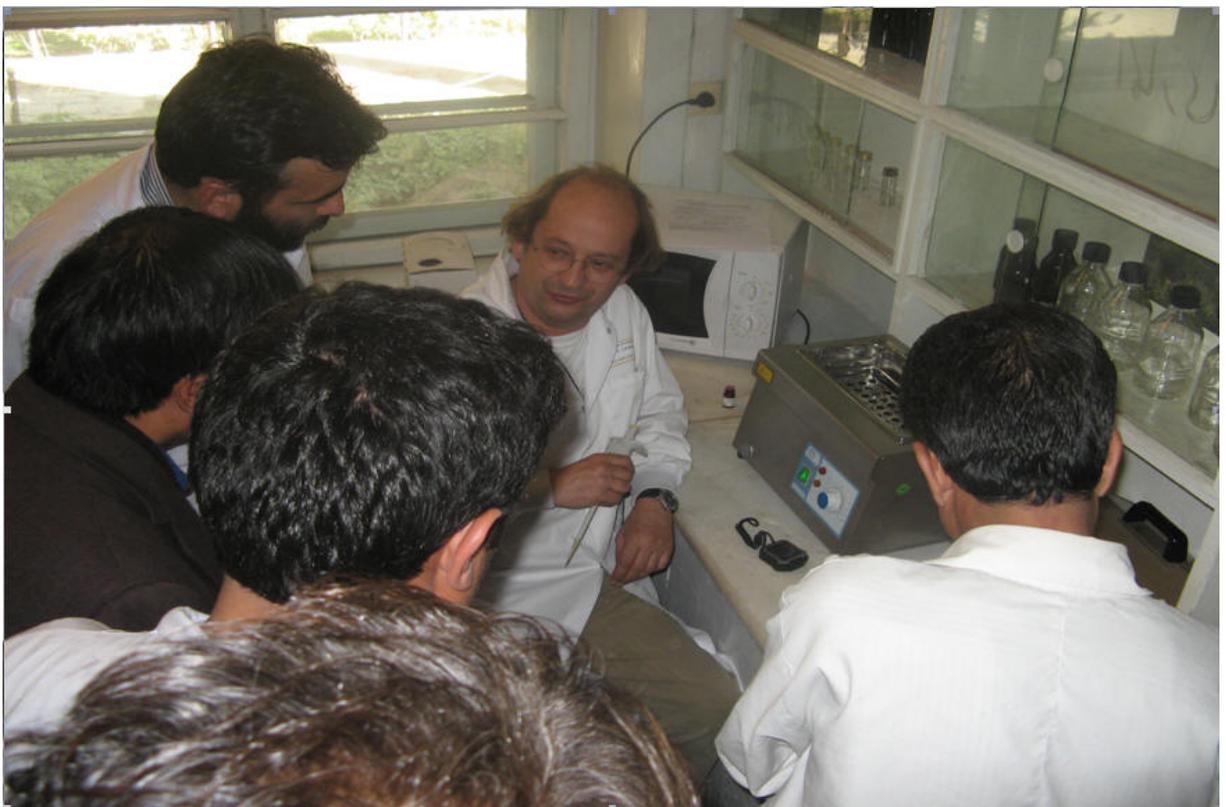
² En effet les laboratoires RANDOX France nous ont offert pour notre mission des coffrets de LDH et de CKM-B.

saisie informatique (fichier Excel) des résultats obtenus. Nous avons noté que les techniciens étaient très attentifs et avides de mettre en œuvre les « Bonne Pratiques » de réalisation des actes de biologie médicale.

Notre intervention s'est poursuivie par des explications théoriques sur l'intérêt du Temps de céphaline activé dans l'exploration de l'hémostase. Après une première démonstration, les techniciens ont réalisé eux-mêmes la détermination de ce paramètre.

Le mardi 30 octobre, nous nous sommes rendus à l'Hôpital Ali ABAD pour réaliser le contrôle de micro-pipettes, la détermination de la LDH, la détermination du taux de prothrombine et du temps de céphaline activé.

Parallèlement, nous avons résolu un problème de numération des réticulocytes : il s'agissait simplement d'un problème de composition du réactif préparé pour cette détermination. Nous avons également donné des conseils pour la numération d'éléments dans le liquide céphalo-rachidien.



Mise en place des test d'hémostase

Le mercredi 31 octobre, François CRINIS est intervenu à l'Hôpital Maïwand pour revoir le dosage de la LDH, JP Arnould intervenant à la Faculté de Pharmacie.

Le jeudi premier novembre, nous sommes intervenus au laboratoire (Hôpital Maïwand) pour expliquer à nouveau la réalisation du taux de prothrombine, du temps de céphaline activé et de la détermination de la CK-MB.

L'après-midi a été consacrée à la réalisation de la CK-MB au laboratoire de l'Hôpital Ali Abad.



Explications et mise en place de tests de biochimie : la LDH

Lors de notre mission nous avons remarqué que les techniciens des laboratoires des deux hôpitaux étaient très désireux d'améliorer leurs connaissances théoriques et pratiques. Leurs responsables souhaitent développer d'autres paramètres biochimiques et immunologiques.

En ce qui concerne le matériel, nous pensons que la dotation en micro-pipettes doit être améliorée. Il serait, en effet, souhaitable de disposer pour certains volumes de micro-pipettes non réglables (exemple : pipettes de faibles volumes 10 – 20 - 50 microlitres). En effet, des pipettes variables de 10 microlitres, par exemple, sont employées très fréquemment pour prélever des échantillons de plasma : dans ces conditions des erreurs (mauvais réglage) ou décalages internes du réglage peuvent se produire.

Les cônes en plastique adaptés sur les micro-pipettes ne sont pas toujours d'excellente qualité (défaut de fixation) ce qui peut être une source d'erreurs (volume prélevé non correct).

Au laboratoire de l'hôpital Ali Abad, le spectrophotomètre SECOMAM PRIM utilisé actuellement pour la routine pose un problème pour la réalisation des déterminations de LDH et de CK-MB en mode cinétique.

Nous pensons pouvoir trouver une solution pratique (ajout d'une imprimante) pour la réalisation de ces deux paramètres (cela sera précisé dans le rapport définitif).

Il est à noter que nous avons rédigé des modes opératoires pour la détermination du taux de prothrombine, du taux de céphaline activée, de la LDH et de la CK-MB. Ces documents sont joints au rapport et seront traduits en dari.

Par ailleurs, nous pensons également qu'une mutualisation des moyens devrait être envisagée entre les deux laboratoires des hôpitaux universitaires. Cette collaboration pourrait également concerner des rencontres fréquentes entre les techniciens des deux laboratoires ce qui permettrait un échange d'idées, de conseils pour améliorer certaines déterminations (exemple : l'utilisation d'appareil produisant de l'eau distillée).

Dans l'avenir, il serait souhaitable de doter les deux laboratoires de compteur automatique d'hématologie de la même marque.

Nous remercions le Dr Thomas Kesteman et les Responsables médicaux de AMI/Kaboul pour leur accueil.



Accueil chaleureux des collègues biologistes afghans

MISSION A LA FACULTE DE PHARMACIE

Objectifs

Cette mission s'inscrit dans le cadre de la collaboration entre la Faculté de Pharmacie de Kaboul et la Faculté de Pharmacie de Lyon.

Dans cadre et au cours de cette nouvelle mission, nous avons privilégié des démonstrations pratiques de toxicologie destinées aux enseignants de cette discipline.

Accueil

Le lundi 22 octobre, une réunion de travail a été organisée par le Professeur M. JAKFAR, Chargé des fonctions de Doyen et par notre collègue, Mme le Dr HAFIZA, en compagnie de plusieurs enseignants de la faculté.

Dans les jours suivants, nous avons rencontré le nouveau Doyen, M le Professeur SEDDIQUI que nous avons félicité pour son élection.



En compagnie de M le Professeur M. JAKFAR

Planning

Les séances de Travaux Pratiques ont été programmées le dimanche 28 octobre, le lundi 29 octobre, le mardi 30 et le mercredi 31 octobre.

Pour mener à bien les démonstrations, j'ai bénéficié de l'aide très précieuse de M Hussein ZADA pour la traduction et pour la réalisation pratique de M François CRINIS et des techniciens afghans (Mr Saïd et Mme Marouba).

Le Dr Hafiza Hamid, le Dr Shaficq Mashal et Karim Aadel participaient à ces démonstrations.

Les manipulations se déroulaient dans la salle commune aux enseignements de toxicologie et de chimie analytique (où se trouvent les différents produits chimiques, les balances et les spectrophotomètres), avec des impératifs d'horaire à respecter pour laisser libre la salle pour les enseignements de chimie analytique.....

Programme des démonstrations pratiques de toxicologie

- Dosage de l'arsenic urinaire selon la méthode de Vasak
- Dosage des cyanures par distillation
- Dosage de l'alcool par distillation
- Dosage spectrophotométrique de l'acide delta amino-levulinique urinaire
- Dosage spectrophotométrique du paracétamol

Pour le dosage de l'arsenic urinaire et des cyanures, j'avais envoyé depuis plusieurs mois le matériel nécessaire à la réalisation de ces dosages, avec la traduction (par M Hussein ZADA) des modes opératoires.



Dosage des cyanures par distillation

Remarques concernant le matériel de laboratoire

Le dimanche 28 octobre, j'ai effectué l'inventaire des différents colis de matériels et de fournitures de laboratoire offerts, au titre de la collaboration « LYON-KABOUL ». Il est à noter que la livraison comportait un nombre trop important de gants : il conviendra donc, comme je l'ai conseillé, de les stocker à l'abri de la chaleur et des UV....Il en est de même pour le nombre et la variété de goupillons.....

Dans l'avenir, ces différentes fournitures pourraient être achetées par la Faculté de KABOUL chez un revendeur afghan mais le seul problème sera essentiellement le financement de ces achats.....

Dans le cadre des Travaux-Pratiques, il serait utile d'acheter un complément de matériel de distillation.

Il existe à la Faculté de Pharmacie une chaîne CLHP avec plusieurs détecteurs : j'aurais aimé en faire profiter les enseignants et les étudiants, malheureusement, le local est resté inaccessible.....

Une bonne nouvelle pour utiliser cette chaîne : j'ai découvert, à KABOUL, un revendeur qui peut fournir différents solvants pour CLHP.



L'équipe de toxicologues afghans

Conclusion

La mission s'est déroulée sans aucun problème. Les objectifs pédagogiques vis-à-vis des Enseignants ont été atteints. Le programme prévu a été réalisé.

Les échanges avec mes collègues Enseignants de Toxicologie se sont révélés fructueux. Il est à noter qu'une continuité devra être mise en place : les enseignements pratiques que nous avons développés devront être poursuivis en notre absence.

Les étudiants en pharmacie effectuent actuellement une cinquième année et auront la possibilité de choisir une filière officinale ou biologique. En ce qui concerne l'orientation biologique, les futurs biologistes formés pourront, à l'hôpital, renforcer les équipes de techniciens en biologie médicale.

Avant notre départ, nous avons rencontré M le Professeur SEDDIQUI, Doyen de la Faculté de Pharmacie qui nous a demandé une poursuite, un renfort de la coopération française.

ANNEXES TECHNIQUES

Mission du 20 octobre - 3 novembre 2007
Hôpital ALI ABAD & MAIWAND

Dr Jean-Pierre ARNOULD, Biologiste des Hôpitaux
François CRINIS, Technicien-Biologiste des Hôpitaux

DETERMINATION DU TEMPS DE QUICK OU TAUX PROTHROMBINE (TP) PROTHROMBINE TIME (PT)

1) INTERET

Le temps de Quick permet d'étudier globalement l'activité des facteurs de la coagulation de la voie extrinsèque (facteurs du complexe prothrombinique) notamment :

- Facteur II (prothrombine)
- Facteur V (proaccéléline)
- Facteur VII (proconvertine)
- Facteur X (facteur Stuart)

2) PRINCIPE DU TEST

Le principe du temps de Quick consiste à comparer en présence de *thromboplastine calcique* le temps de coagulation du plasma à étudier à celui d'un témoin normal servant de référence.

2) REACTIFS

- Réactif 1 = Thromboplastine lyophilisée conservation 2° à 8°C jusqu'à la date de péremption
- Réactif 2 = solvant contenant du calcium

3) ECHANTILLON (MALADE)

- Prélèvement de sang sur :

TUBE contenant du CITRATE TRISODIQUE 0,109 M
Le tube doit être complètement rempli et non hémolysé

➔ **Traitement du prélèvement :**

Centrifugation 15 minutes à 3000 tours/minute = obtention du PLASMA

Conservation du plasma : 8 heures entre 15 et 25°C

4) PREPARATION DES REACTIFS

➔ **Agiter le contenu d'un flacon de réactif R2 et le transvaser dans le flacon de réactif R1**

- **Laisser impérativement 30 minutes à température ambiante**

- **Homogénéiser les réactif par agitation modérée (retournements)**

- **Conservation :**

- **Réactif reconstitué : 8 heures à 37°C**

24 heures entre 15 et 25°C

8 jours entre 2° et 8°C

NE PAS CONGELER

➔ **Calibrateurs : *En l'absence de calibrateur*, prendre le contrôle normal (C1) et le diluer au $\frac{1}{2}$ - $\frac{1}{3}$ - $\frac{1}{4}$**

➔ **Contrôle Pathologique (C2)**

5) MATERIEL

➔ **Bain-marie à 37°C**

➔ **Pipette de 100 µl et de 200 µl**

➔ **chronomètre**

6) MODE OPERATOIRE

➔ **Etalonnage**

-Conversion des temps de Quick (secondes) en taux de prothrombine exprimés en pourcentage (droite de Thivolle)

-La gamme d'étalonnage est réalisée à l'aide des plasmas **CALIBRATEURS**

→ **ATTENTION** = le réactif **R1** doit être maintenu à 37°C

Dans un tube à hémolyse en verre (5ml) à 37°C

- | | |
|---|-------------|
| 1) Plasma pur (malade, étalon, contrôle) | → 0,1 ml |
| 2) Incuber environ | → 2 minutes |
| 3) En déclenchant le chronomètre ajouter le réactif <u>R1</u> préincubé à 37°C | → 0,2 ml |

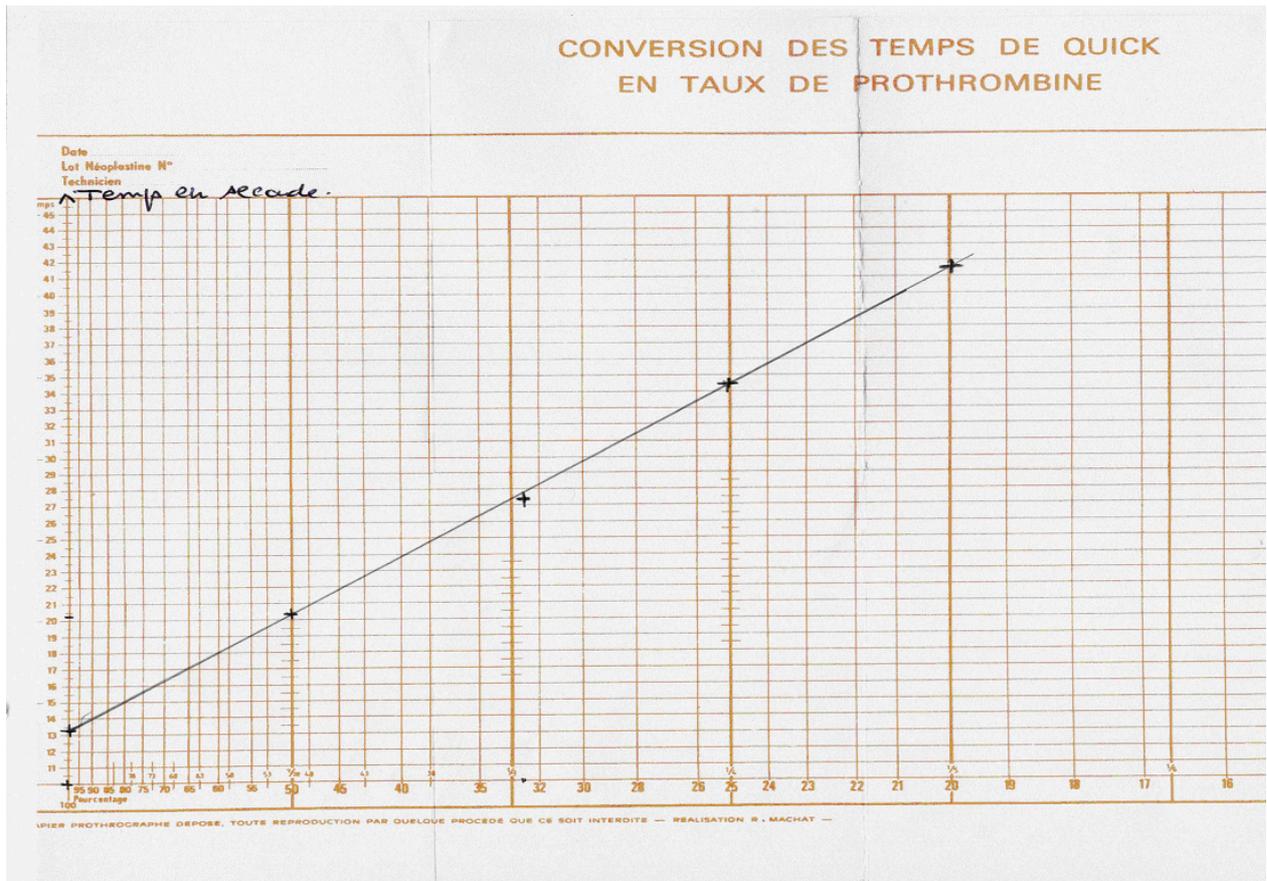
Agiter par des mouvements pendulaires (= mouvements doux, non brutaux) et arrêter le chronomètre à la formation du caillot :
noter précisément le temps (de coagulation) en secondes.

7) RESULTATS

→ Tracer la droite d'étalonnage (droite de Thivolle) sur du papier avec une échelle logarithmique (en abscisse) représentant les pourcentages de 100% à 10%.

→ Mettre en ordonnée le temps de coagulation correspondant (en secondes)

Chez un sujet normal, le taux de prothrombine est normalement supérieur à 70%



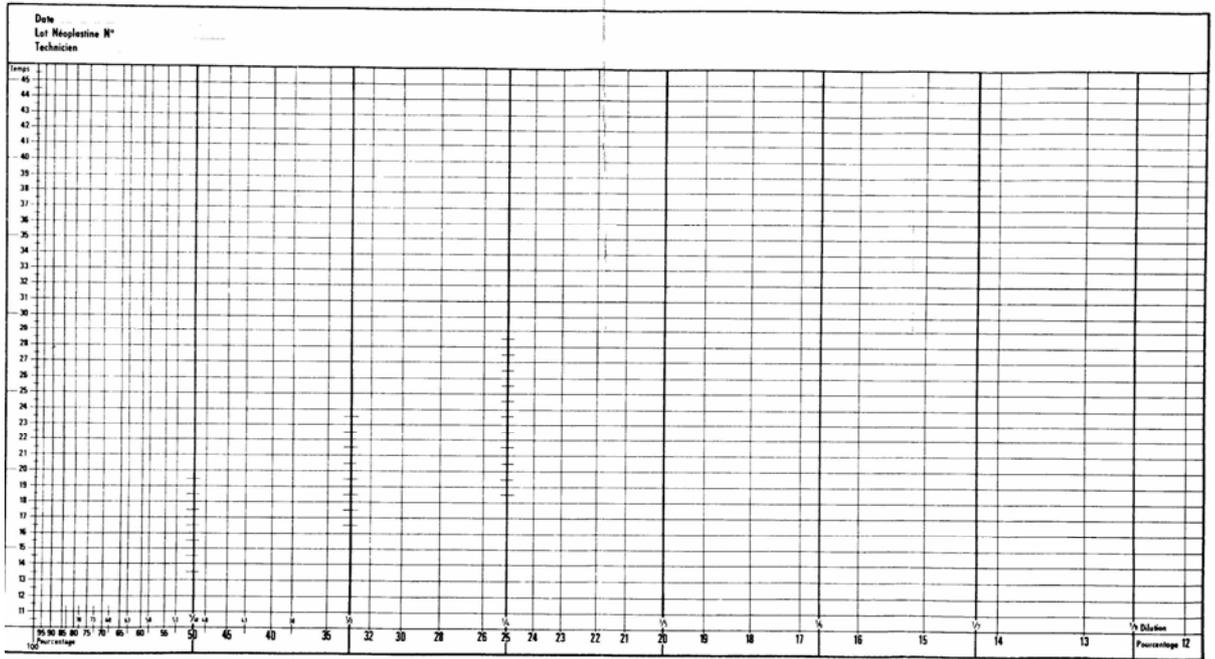
Exemple de courbe d'étalonnage : Conversion des Temps de Quick en Taux de Prothrombine.

8) INTERET CLINIQUE

→ **permet de dépister un allongement du temps de Quick :**

- 1) **Dans les déficits congénitaux en facteurs du complexe prothrombinique : déficit en facteurs II V VII X.**
- 2) **En cas d'insuffisance hépatique :**
 - cirrhose
 - hépatite
 - ictère
- 3) **En cas d'administration d'antivitamines K**
- 4) **En cas de maladie hémorragique du nouveau-né**
- 5) **En cas de fibrinolyse**
- 6) **En cas de coagulation intravasculaire disséminée (CIVD)**

CONVERSION DES TEMPS DE QUICK
EN TAUX DE PROTHROMBINE



MARQUE PROTHROMBOGRAPHE DÉPOSÉE. TOUTE REPRODUCTION PAR QUELQUE PROCÉDÉ QUE CE SOIT INTERDITE — RÉALISATION R. MACHAT —

 **DIAGNOSTICA STAGO**
8, rue des Frères Chausson
92000 ASNIÈRES-SUR-SEINE (FRANCE)
Téléphone : (33) (0) 1 46 88 20 20
Fax : (33) (0) 1 47 91 08 91

Modèle de feuille pour la conversion des Temps de Quick en Taux de Prothrombine

REMARQUE TRES IMPORTANTE :

La technique mise en oeuvre à KABOUL a été réalisée avec les réactifs de la société STAGO.

Si vous utilisez des réactifs distribués par d'autres sociétés, il est indispensable de se reporter à la notice jointe dans le coffret pour la reconstitution des réactifs et pour la réalisation de la technique.

Mission du 20 octobre - 3 novembre 2007
Hôpital ALI ABAD & MAIWAND

Dr Jean-Pierre ARNOULD, Biologiste des Hôpitaux
François CRINIS, Technicien-Biologiste des Hôpitaux

DETERMINATION DU TEMPS DE CEPHALINE ACTIVEE TCA

1) INTERET

Il permet d'étudier l'activité des facteurs de la coagulation de la voie intrinsèque de la coagulation :

→ Facteurs XII XI IX VIII ainsi que la fonction des facteurs X V II (et I = fibrinogène) à l'exception des plaquettes.

2) PRINCIPE DU TEST

C'est le temps de recalcification plasmatique en présence de :

→ Céphaline = substitut plaquettaire

→ Activateur particulaire (silice) = activation standardisée du facteur XII

3) REACTIFS

→ Réactif 1 = céphaline lyophilisée conservation 2° à 8°C

→ Réactif 2 = activateur conservation 2° à 8°C

→ CaCl₂ 0,025 M

4) ECHANTILLON (MALADE)

→ Prélèvement de sang sur :

- TUBE contenant du CITRATE TRISODIQUE 0,109 M

Ce tube doit être bien rempli de sang et le sang ne doit pas être hémolysé.

→ Traitement du prélèvement :

Centrifugation 15 minutes à 3000 tours/minute
= obtention du PLASMA

Conservation du plasma : 2 heures entre 15 et 25°C

5) CONTROLES

→ Contrôle NORMAL = C1 conservation 2° à 8°C
Ce contrôle normal sera utilisé comme témoin

→ Contrôle PATHOLOGIQUE = C2 conservation
2° à 8°C

6) PREPARATION DES REACTIFS

→ Agiter le réactif R2 et le transvaser dans le flacon de
réactif R1

- Laisser 30 minutes à température ambiante

- Homogénéiser le réactif par agitation modérée
(retournements)

- Conservation : 48 heures à température
7 jours entre 2° à 8°C
NE PAS CONGELER

→ CaCl₂ : prêt à l'emploi, doit être préincubé à 37°C,
dans un tube à hémolyse, selon les besoins.

→ Contrôles Normal (C1) et Pathologique (C2) :

- à reconstituer avec 1 ml (mesure très précise) d'eau distillée

- laisser 30 minutes à température ambiante

- homogénéiser avant emploi

- Conservation : 4 heures à température ambiante

7) MATERIEL

→ Bain-marie à 37°C

→ Pipette de 100 µl

→ chronomètre

8) MODE OPERATOIRE

Dans un tube à hémolyse en verre (5ml)	
1) Plasma pur (malade, témoin, contrôle)	→ 0,1 ml
2) Réactifs R1 + R2	→ 0,1 ml
3) Mélanger, incuber exactement	→ 3 minutes
4) En déclenchant le chronomètre ajouter le CaCl ₂ préincubé à 37°C	→ 0,1 ml

Agiter modérément (mouvement pendulaire), arrêter le chronomètre à l'apparition du caillot :
noter précisément le temps (de coagulation) en secondes.

9) RESULTATS

→ Temps de coagulation du malade = ----- secondes

→ Temps de coagulation du témoin « normal » = ----- secondes

→ Faire un ratio = Temps malade

Temps Témoin

Valeurs normales < 1,3

10) INTERET CLINIQUE

→ permet de dépister un allongement du temps de coagulation :

-1) Dans les déficits congénitaux :

→ si le temps de Quick est normal :

- on recherchera un déficit :
 - en facteur VIII
 - en facteur IX
 - en facteur XI
 - en facteur XII
 -

- 2) En cas d'anomalies ou de déficits acquis :
- affections hépatiques
 - anticoagulants circulants
 - traitement anticoagulant :
(héparine, antivitamine K)

Hôpital ALI ABAD

**Dr Jean-Pierre ARNOULD, Biologiste des Hôpitaux
François CRINIS, Technicien-Biologiste des Hôpitaux**

**DOSAGE DE L'ACTIVITE «CREATININE KINASE-MB»
(CKM-B)**

Réactif utilisé : RANDOX = CK NAC-Activé (CK-NAC)

1) INTERET

La Créatinine Kinase (CK) est principalement présente dans muscles striés, le cerveau et le cœur. L'activité CK dans le plasma ou le sérum est un marqueur sensible pour la détection des pathologies des muscles squelettiques.

L'activité CK est également utilisée dans le diagnostic de l'infarctus du myocarde et des accidents cérébrovasculaires.

2) PRINCIPE DU TEST



3) REACTIFS

→ Réactif « 1 » = Tampon/Glucose

Ce réactif est prêt à l'emploi

Tampon imidazole = 0,10 mol/l pH = 6,70

Glucose = 20 mmol/l

Mg-Acétate = 10 mmol/l

EDTA = 2 mmol/l

Ce réactif est stable jusqu'à la date de péremption s'il est conservé entre + 2 et +8°C

→ Réactif « 2 » = Enzymes/Coenzyme/substrat

Reconstituer un flacon de réactif 2 avec le volume approprié de Tampon/Glucose « 1 »

ADP = 2 mol/l

AMP = 5 mmol/l

Diadénosine pentaphosphate = 10 µmol/l

NADP = 2 mmol/l

HK > 2,5 U/ml

G6P-DH > 1,5 U/ml

N-acétylcystéine = 20 mmol/l

Créatine phosphate = 30 mmol/l

Ce réactif est stable pendant 3 semaines entre + 2 et +8°C

4) MATERIEL

→ Bain-marie à 37°C

→ Pipettes de 20 µl, 1000 µl

→ Chronomètre

→ Spectrophotomètre : PRIM 500 : ce spectrophotomètre présente l'avantage d'avoir une cuve thermostatée à 37°C.

La température de 37°C est atteinte 5 minutes après le démarrage du spectrophotomètre.

5) PROCEDURE

Longueur d'onde $\lambda = 340 \text{ nm}$

Régler le zéro du spectrophotomètre sur l'eau distillée

Dans un tube à essais en plastique (5 ml), introduire :	
Echantillon (sérum, plasma hépariné, ou plasma EDTA) ou contrôle	20 µl (0,02 ml)
Réactif « 2 » <u>Enzymes/Coenzyme/substrat</u>	1 ml
	<i>Puis mélanger</i>

Attention : un échantillon hémolysé donne de faux résultats

Ensuite :

- aspirer aussitôt le contenu du tube à essais
- attendre 1 minute
- lire aussitôt l'absorbance initiale
- puis, lire alors les absorbances après 1 minute, 2 minutes et 3 minutes
- Calculer le Δ des absorbances puis en faire la moyenne, soit A

Il est à noter que ce dosage présente des absorbances croissantes

Calcul : pour calculer l'activité CK, utiliser la formule suivante :

A la température de 37°C, le calcul se fait de la façon suivante

$$\text{Activité CK (U/l)} = 8095 \times A$$

6) VALEURS NORMALES DANS LE SERUM

→ **Adultes = 24 – 195 U/l (pour un dosage effectué à 37°C)**

7) LINEARITE

Si le changement d'absorbance par minute dépasse :
0,25 à 340 nm

- **alors effectuer une dilution au 1/10 = prendre 0,10 ml de sérum et ajouter 0,90 ml d'une solution de NaCl à 0,9% (NaCl à 0,9% = sérum physiologique) et multiplier le résultat par 10.**

Pour tout renseignement sur ce protocole :
contacter → jeanpierrearnould@yahoo.fr

ANNEXE

Programmation du PRIM 500

- $\lambda = 340$ nm
- délai = 60
- Tp inter = 60
- Intervalles = 3

- Sélectionner « facteur » ou « étalon » à l'aide des flèches « gauche » et « droite ». Valider le choix par « VAL ». Mettre comme valeur le chiffre « 1 » et valider « VAL ».

- Pour « facteur négatif » = répondre « NON » car pour le dosage de la CK-MB, il s'agit d'une réaction croissante en ce qui concerne les absorbances.
- Puis mémoriser ces données de programmation en appuyant sur « MEM »
- Ensuite, mettre le nom de la technique (= CK-MB) en faisant défiler l'alphabet avec les flèches droite et gauche.

Mission du 20 octobre - 3 novembre 2007
Hôpital MAIWAND

Dr Jean-Pierre ARNOULD, Biologiste des Hôpitaux
François CRINIS, Technicien-Biologiste des Hôpitaux

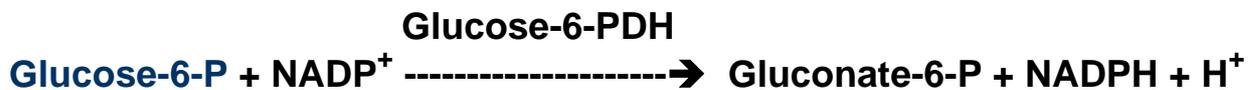
DOSAGE DE L'ACTIVITE «CREATININE KINASE-MB» (CKM-B)
Réactif utilisé : RANDOX = CK NAC-Activé (CK-NAC)

1) INTERET

La Créatinine Kinase (CK) est principalement présente dans muscles striés, le cerveau et le cœur. L'activité CK dans le plasma ou le sérum est un marqueur sensible pour la détection des pathologies des muscles squelettiques.

L'activité CK est également utilisée dans le diagnostic de l'infarctus du myocarde et des accidents cérébrovasculaires.

2) PRINCIPE DU TEST



3) REACTIFS

→ Réactif « 1 » = Tampon/Glucose

Ce réactif est prêt à l'emploi

Tampon imidazole = 0,10 mol/l pH = 6,70

Glucose = 20 mmol/l

Mg-Acétate = 10 mmol/l

EDTA = 2 mmol/l

Ce réactif est stable jusqu'à la date de péremption s'il est conservé entre + 2 et +8°C

→ Réactif « 2 » = Enzymes/Coenzyme/substrat

Reconstituer un flacon de réactif 2 avec le volume approprié de Tampon/Glucose « 1 »

**ADP = 2 mol/l
AMP = 5 mmol/l
Diadénosine pentaphosphate = 10 µmol/l
NADP = 2 mmol/l
HK > 2,5 U/ml
G6P-DH > 1,5 U/ml
N-acétylcystéine = 20 mmol/l
Créatinine phosphate = 30 mmol/l**

Ce réactif est stable pendant 3 semaines entre + 2 et +8°C

4) MATERIEL

- Attention : Bain-marie réglé à 30°C**
- Pipettes de 40 µl, 1000 µl**
- *Chronomètre***
- *Spectrophotomètre***

5) PROCEDURE

Longueur d'onde $\lambda = 340 \text{ nm}$

Régler le zéro du spectrophotomètre sur l'air sans cuve :

Dans un tube à essais en plastique (5 ml), introduire :	
Echantillon (sérum, plasma hépariné, ou plasma EDTA) ou contrôle	40 µl (0,04 ml)
Réactif <u>« 2 »</u>	1 ml
<u>Enzymes/Coenzyme/substrat</u>	<i>Puis mélanger Et incuber pendant 2 minutes à</i>

	<u>30°C</u>
--	-------------

Attention : un échantillon hémolysé donne de faux résultats

→ Puis lire l'absorbance initiale et déclencher le chronomètre.

→ Lire les absorbance après 1 - 2 - 3 minutes.

Il est à noter que ce dosage présente des absorbances croissantes

Calcul : pour calculer l'activité CK, utiliser la formule suivante :

A la température de 30°C, le calcul se fait de la façon suivante

$$\text{Activité CK (U/l)} = 4127 \times A$$

6) VALEURS NORMALES DANS LE SERUM

→ **Adultes = 15 – 130 U/l (pour un dosage effectué à 30°C)**

7) LINEARITE

Si le changement d'absorbance par minute dépasse :
0,25 à 340 nm

→ **alors effectuer une dilution au 1/10 = prendre 0,10 ml de sérum et ajouter 0,90 ml d'une solution de NaCl à 0,9% (NaCl à 0,9% = sérum physiologique) et multiplier le résultat par 10.**

**Pour tout renseignement sur ce protocole :
contacter → jeanpierrearnould@yahoo.fr**

Hôpital ALI ABAD

**Dr Jean-Pierre ARNOULD, Biologiste des Hôpitaux
François CRINIS, Technicien-Biologiste des Hôpitaux**

**DOSAGE DE L'ACTIVITE «LACTATE DESHYDROGENASE»
(LDH)**

Réactifs utilisés : RANDOX= LD opt

1) INTERET

La Lactate DésHydrogénase (LDH) joue un rôle important dans le métabolisme des glucides.

Elle catalyse la réaction de transformation :



Elle est présente dans de nombreux tissus des mammifères, principalement dans le myocarde , le rein, le foie, les muscles squelettiques, les hématies, les poumons.

L'activité LDH sérique totale est déterminée pour détecter une souffrance cellulaire, sans indication, à elle seule, sur l'organe atteint. Ce test permet d'obtenir une aide dans le cas de l'infarctus du myocarde et de l'infarctus pulmonaire.

La LDH existe sous 5 formes « isoenzymes » retrouvées dans le plasma, notamment : la sous-unité H (Heart = cardiaque) et la sous-unité M (=muscle) musculaire et hépatique.

**La LDH-1 prédomine dans le myocarde et les hématies,
La LDH-2 prédomine dans le foie,
La LDH-3 prédomine dans le poumon,
La LDH-4 prédomine dans le rein, le placenta et le pancréas,
La LDH-5 prédomine dans le foie et le muscle squelettique.**

En cas d'infarctus du myocarde, la LDH-1 sérique augmente après 8 à 12 heures, présente un pic au bout de 48 heures et se normalise en 7 à 15 jours. Elle reste plus élevée que d'autres marqueurs tels que la CKM-B et la transaminase GOT.

Une augmentation de l'activité sérique LDH totale est observée en cas de :

- affections musculaires et cardiaques
- affections hépatiques
- maladies pulmonaires
- maladies hématologiques
- autres maladies : insuffisance rénale aiguë, tumeur rénale etc.....
- Grossesse : 2^{ème} et 3^{ème} trimestre

2) PRINCIPE DU TEST

Il consiste à déterminer l'activité lactate déshydrogénase totale dans le sérum humain en utilisant comme substrat le pyruvate.



La vitesse de disparition du NAD réduit (NADH) est proportionnelle à l'activité LDH totale dans l'échantillon.

3) REACTIFS

- Réactif « R1a » = Tampon phosphate = 50 mmol/l pH = 7,50
+ Substrat = pyruvate = 0,60 mmol/l

Ce réactif est prêt à l'emploi. Il doit être conservé entre 2 et 8°C

- Réactif « R1b » = NADH = 0,18 mmol/l

Ce réactif doit être reconstitué : prendre un flacon « R1b » et ajouter 3 ml de « R1a ».

Ce réactif est stable 4 jours entre 2 et 8°C ou 5 heures entre 15 et 25°C

Attention : Ce réactif sera placé au bain-marie à 37°C, pendant la réalisation des dosages ⇒ **POUR EVITER DES PERTES = utiliser le volume nécessaire à la stricte réalisation de la série de dosages.**

4) MATERIEL

- Bain-marie à 37°C
- Pipettes de 20 µl, 1000 µl
- *Chronomètre*
- **Spectrophotomètre : PRIM 500 : ce spectrophotomètre présente l'avantage d'avoir une cuve thermostatée à 37°C**

La température de 37°C est atteinte 5 minutes après le démarrage du spectrophotomètre.

5) PROCEDURE

Longueur d'onde $\lambda = 340 \text{ nm}$

Régler le **zéro** du spectrophotomètre **sur l'eau distillée**

Dans un tube à essais en plastique (de 5 ml), introduire :	
Echantillon (sérum, plasma Hépariné, ou plasma EDTA) ou contrôle	20 µl (0,02 ml)
Réactif « <u>R1 B</u> » à placer au Bain-Marie à <u>37°C</u>	1 ml <i>Puis mélanger</i>

Ensuite :

- aspirer aussitôt le contenu du tube à essais
- attendre 30 secondes, puis lire **l'absorbance (DO) initiale** et démarrer simultanément le chronomètre
- Lire alors les absorbances à **1 minute, 2 minutes, 3 minutes**
- Calculer le Δ des absorbances puis en faire la moyenne, soit A

Il est à noter que ce dosage présente des *absorbances décroissantes*

→ Calculer le Δ des absorbances puis en faire la moyenne,
soit A

Calcul :

A la température de 37°C, le calcul se fait de la façon suivante

$$\text{Activité LDH (U/l)} = 8095 \times A$$

6) VALEURS NORMALES DANS LE SERUM

→ **Adultes** = 230 – 460 U/l (pour un dosage effectué à 37°C)

7) LINEARITE

Si le changement d'absorbance par minute dépasse :
0,10 à 340 nm

→ **alors effectuer une dilution au 1/10** = prendre 0,10 ml de sérum et
ajouter 0,90 ml d'une solution de NaCl à 0,9%
(NaCl à 0,9% = sérum physiologique)

Pour tout renseignement sur ce protocole :
contacter → jeanpierrearnould@yahoo.fr

ANNEXE n°1

Programmation du PRIM 500

- $\lambda = 340 \text{ nm}$
- délai = 30
- Tp inter = 60
- Intervalles = 3

- Sélectionner « facteur » ou « étalon » à l'aide des flèches « gauche » et « droite ». Valider le choix par « VAL ». Mettre comme valeur le chiffre « 1 » et valider « VAL ».

- Pour « facteur négatif » = répondre « oui » car pour le dosage de la LDH, il s'agit d'une réaction décroissante en ce qui concerne les absorbances.
- Puis mémoriser ces données de programmation en appuyant sur « MEM »
- Ensuite, mettre le nom de la technique (= LDH) en faisant défiler l'alphabet avec les flèches droite et gauche.

ANNEXE n°2

EXEMPLE DE CALCUL

Après 30 secondes → lecture Absorbance initiale
→ T0 = 1,432

Puis lecture de l'absorbance ensuite après 1 minute
→ T1mn = 1,363

Puis lecture de l'absorbance ensuite après 2 minutes
→ T2 = 1,294

Puis lecture de l'absorbance ensuite après 3 minutes
→ T3 = 1,228

Calcul de la différence des absorbances de la façon suivante :

$$\Delta T_0 - T_1 = 1,432 - 1,363 = 0,069$$

$$\Delta T_1 - T_2 = 1,363 - 1,294 = 0,069$$

$$\Delta T_2 - T_3 = 1,294 - 1,228 = 0,066$$

Puis faire la moyenne des différentes absorbances ΔT

$$\rightarrow 0,069 + 0,069 + 0,066 = 0,204/3 = 0,068$$

$$\rightarrow A = 0,068$$

$$\text{Activité LDH (U/l)} = 8095 \times 0,068 = \underline{550,46 \text{ U/l}}$$

Mission du 20 octobre - 3 novembre 2007
Hôpital MAIWAND

Dr Jean-Pierre ARNOULD, Biologiste des Hôpitaux
François CRINIS, Technicien-Biologiste des Hôpitaux

DOSAGE DE L'ACTIVITE «LACTATE DESHYDROGENASE»

Réactifs utilisés : RANDOX= LD opt

1) INTERET

La Lactate DésHydrogénase (LDH) joue un rôle important dans le métabolisme des glucides.

Elle catalyse la réaction de transformation :

Pyruvate \leftrightarrow Lactate

Elle est présente dans de nombreux tissus des mammifères, principalement dans le myocarde , le rein, le foie, les muscles squelettiques, les hématies, les poumons.

L'activité LDH sérique totale est déterminée pour détecter une souffrance cellulaire, sans indication, à elle seule, sur l'organe atteint. Ce test permet d'obtenir une aide dans le cas de l'infarctus du myocarde et de l'infarctus pulmonaire.

La LDH existe sous 5 formes « isoenzymes » retrouvées dans le plasma, notamment : la sous-unité H (Heart = cardiaque) et la sous-unité M (=muscle) musculaire et hépatique.

La LDH-1 prédomine dans le myocarde et les hématies,
La LDH-2 prédomine dans le foie,
La LDH-3 prédomine dans le poumon,
La LDH-4 prédomine dans le rein, le placenta et le pancréas,
La LDH-5 prédomine dans le foie et le muscle squelettique.

En cas d'infarctus du myocarde, la LDH-1 sérique augmente après 8 à 12 heures, présente un pic au bout de 48 heures et se normalise en 7 à 15 jours. Elle reste plus élevée que d'autres marqueurs tels que la CKM-B et la transaminase GOT.

Une augmentation de l'activité sérique LDH totale est observée en cas de :

- affections musculaires et cardiaques
- affections hépatiques
- maladies pulmonaires
- maladies hématologiques
- autres maladies : insuffisance rénale aiguë, tumeur rénale etc.....
- Grossesse : 2^{ème} et 3^{ème} trimestre

2) PRINCIPE DU TEST

Il consiste à déterminer l'activité lactate déshydrogénase totale dans le sérum humain en utilisant comme substrat le pyruvate.



La vitesse de disparition du NAD réduit (NADH) est proportionnelle à l'activité LDH totale dans l'échantillon.

3) REACTIFS

- Réactif « R1a » = Tampon phosphate = 50 mmol/l pH = 7,50
+ Substrat = pyruvate = 0,60 mmol/l

Ce réactif est prêt à l'emploi. Il doit être conservé entre 2 et 8°C

- Réactif « R1b » = NADH = 0,18 mmol/l

Ce réactif doit être reconstitué : prendre un flacon « R1b » et ajouter 3 ml de « R1a ».

Ce réactif est stable 4 jours entre 2 et 8°C ou 5 heures entre 15 et 25°C

4) MATERIEL

- Attention : Bain-marie réglé à 30°C

- Pipettes de 40 µl, 1000 µl
- Chronomètre
- Spectrophotomètre

5) PROCEDURE

Longueur d'onde $\lambda = 340 \text{ nm}$

Régler le zéro du spectrophotomètre sur l'air sans cuve :

Dans un tube à essais en plastique (5 ml), introduire :	
Echantillon (sérum, plasma hépariné, ou plasma EDTA) ou contrôle	40 µl (0,04 ml)
Réactif « <u>R1 B</u> » à placer au Bain-marie à <u>30°C</u>	1 ml
	<i>Puis mélanger</i>

Ensuite :

- verser aussitôt le contenu (40 ml échantillon + 1 ml Réactif « R1 B » du tube à essais dans une cuve du spectrophotomètre
- après 30 secondes, lire l'absorbance (DO) initiale et démarrer simultanément le chronomètre
- Lire alors les absorbances à 1 minute, 2 minutes, 3 minutes
- Calculer le Δ des absorbances puis en faire la moyenne, soit A

Il est à noter que ce dosage présente des *absorbances décroissantes*

Calcul :

A la température de 30°C, le calcul se fait de la façon suivante

$$\text{Activité LDH (UI/l)} = 4127 \times A$$

6) VALEURS NORMALES DANS LE SERUM

→ Adultes = 160 – 320 U/l (pour un dosage effectué à 30°C)

7) LINEARITE

Si le changement d'absorbance par minute dépasse :
0,10 à 340 nm

→ alors effectuer une dilution au 1/10 = prendre 0,10 ml de sérum et
ajouter 0,90 ml d'une solution de NaCl à 0,9%
(NaCl à 0,9% = sérum physiologique)

Pour tout renseignement sur ce protocole :
contacter → jeanpierrearnould@yahoo.fr

ANNEXE n°1

EXEMPLE DE CALCUL

Après 30 secondes → lecture Absorbance initiale
→ T0 = 1,432

Puis lecture de l'absorbance ensuite après 1 minute
→ T1mn = 1,363

Puis lecture de l'absorbance ensuite après 2 minutes
→ T2 = 1,294

Puis lecture de l'absorbance ensuite après 3 minutes
→ T3 = 1,228

Calcul de la différence des absorbances de la façon suivante :

$$\Delta T0 - T1 = 1,432 - 1,363 = 0,069$$

$$\Delta T1 - T2 = 1,363 - 1,294 = 0,069$$

$$\Delta T2 - T3 = 1,294 - 1,228 = 0,066$$

Puis faire la moyenne des différentes absorbances ΔT

$$\rightarrow 0,069 + 0,069 + 0,066 = 0,204/3 = 0,068$$

$$\rightarrow A = 0,068$$

$$\text{Activité LDH (U/l)} = 4127 \times 0,068 = \underline{280,63 \text{ U/l}}$$

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'D. Marcel-Chatelain', written in a cursive style.

Rapport validé par Dominique Marcel-Chatelain
Le 14 mars 2008