

ZYMUTEST Factor V

Référence RK009A

(Facteur V antigène)

(Dosage ELISA du Facteur V)

POUR LA RECHERCHE UNIQUEMENT.

NE PAS UTILISER DANS LES PROCÉDURES DE DIAGNOSTIC

Dernière révision : 17/11/2022

MÉTHODE :

La trousse ZYMUTEST Factor V est un dosage ELISA sandwich du Facteur V antigène, utilisable sur plasma humain, ou tout autre milieu où le Facteur V doit être mesuré.

Ce coffret est à usage de recherche uniquement et ne doit pas être utilisé pour le diagnostic ou le traitement du patient.

PRINCIPE :

Le dosage du Facteur V antigène, avec le coffret ZYMUTEST Factor V, est réalisé à l'aide d'une plaque ELISA sensibilisée par un anticorps monoclonal, spécifique du Facteur V, et stabilisée.

Le plasma ou l'échantillon à tester sont introduits dans l'un des puits de la plaque sensibilisée. Le Facteur V se fixe sur l'anticorps immobilisé. Après lavage, le Facteur V, fixé sur la plaque, est révélé par l'immunoconjugué, anticorps polyclonal de cheval couplé à la peroxydase (HRP), qui réagit avec les épitopes libres du Facteur V. Après lavage, le substrat, Tetraméthylbenzidine (TMB) en présence d'eau oxygénée (H₂O₂), est introduit dans les puits de la plaque et une coloration bleue se développe. L'arrêt de la réaction par l'acide sulfurique fait virer la coloration au jaune. Cette coloration est proportionnelle au taux de Facteur V antigène présent dans le plasma ou dans l'échantillon testé.

ECHANTILLONS :

- Plasma humain prélevé sur anticoagulant citraté ou Na₂ EDTA.
- Tout autre échantillon biologique où le Facteur V antigène doit être mesuré.

REACTIFS :

1. **COAT : Microplaque ELISA** (Micro ELISA plate), contenant 12 barrettes de 8 puits, sensibilisée par un anticorps monoclonal spécifique du **Facteur V**, et stabilisée, emballée dans un sachet aluminium en présence d'un déshydratant.
2. **SD** : 2 flacons de 50 ml de **diluant échantillon (Factor V Sample Diluent)**, prêt à l'emploi.
3. **CAL** : 3 flacons de **plasma d'étalonnage** (plasma normal humain calibré par rapport à un pool de plasmas de référence), titré en Facteur V (Plasma Factor V calibrator), lyophilisé, pré-dilué. Chaque flacon doit être reconstitué par **2 ml** de diluant échantillon (Factor V Sample Diluent) afin d'obtenir un plasma titré en Facteur V, **pré-dilué au 1/50**. Le titre du plasma étalon est indiqué pour chaque lot.
4. **CI** : 1 flacon lyophilisé contenant **0.5 ml** de **Contrôle I** (Plasma Factor V Control I, plasma humain, haut).
5. **CII** : 1 flacon lyophilisé contenant **0.5 ml** de **Contrôle II** (Plasma Factor V Control II, plasma humain, bas).
La concentration en Facteur V et l'intervalle de confiance des contrôles sont indiqués sur le papillon fourni dans le Kit.
6. **IC** : 3 flacons **d'immunoconjugué** (Anti-(h)-Factor V-HRP immunoconjugué), anticorps polyclonal de cheval, spécifique du Facteur V et couplé à la peroxydase, lyophilisé.
7. **CD** : 1 flacon de 25 ml de **diluant pour immunoconjugué** (Factor V Conjugate Diluent), prêt à l'emploi.
8. **WS** : 1 flacon de 50 ml de **solution de lavage** (Wash Solution), 20 fois concentrée.
9. **TMB** : 1 flacon de 25 ml de substrat : 3,3',5, 5' – **Tetraméthylbenzidine**, contenant de l'eau oxygénée. Prêt à l'emploi.
10. **SA** : 1 flacon de 6 ml **d'acide sulfurique** 0.45M (Stop solution). Prêt à l'emploi.

Nota :

Utiliser uniquement les réactifs provenant de coffrets d'un même lot. Ne pas mélanger les réactifs de différents lots de kits pour effectuer un dosage.

MATERIEL NECESSAIRE ET NON FOURNI :

- Pipettes à 8 canaux permettant de distribuer des volumes de 50 à 300 µl.
- Pipettes à volume variable de 0 à 20 µl, de 20 à 200 µl et de 200 à 1000 µl.
- Matériel de lavage pour microplaques et agitateur.
- Lecteur de microplaques ELISA réglée à une longueur d'ondes de 450 nm.
- Eau distillée.

PREPARATION, CONSERVATION ET STABILITE DES REACTIFS :

Dans leur emballage d'origine, avant toute utilisation et conservés à 2-8°C, les réactifs sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur le coffret.

1. **Micro ELISA plate** : Ouvrir le sachet aluminium et sortir le nombre de barrettes de 8 puits nécessaire pour la série de dosages à effectuer. Les barrettes sorties du sachet aluminium doivent être utilisées dans les 30 minutes. Les barrettes non utilisées peuvent être conservées jusqu'à **4 semaines** dans leur emballage d'origine, hermétiquement fermé, en présence du déshydratant, à l'abri de l'humidité, à **2-8°C**, dans le sachet plastique minigrup fourni.
2. **Factor V Sample Diluent** : Le réactif est prêt à l'emploi. Après ouverture, il peut être conservé à **2-8°C**, pendant **4 semaines**, en prenant soin d'éviter toute contamination lors de l'utilisation. Ce réactif contient 0.05% de Kathon CG.
3. **Plasma Facteur V calibrator** : Chaque flacon doit être reconstitué par **2 ml** de "Factor V Sample Diluent" afin d'obtenir le plasma étalon, titré en Facteur V, **pré-dilué au 1/50**. Après reconstitution, ce flacon est stable au moins **8 heures** à température du laboratoire.
4. **Plasma Factor V Control I** (plasma humain, haut) : à reconstituer par **0.5 ml** d'eau distillée.
5. **Plasma Factor V Control II** (plasma humain, bas) : à reconstituer par **0.5 ml** d'eau distillée.

Nota :

Les contrôles I et II, après reconstitution, sont stables au moins **8 heures** à température ambiante, **24 heures** à **2-8°C**, ou **2 mois** congelés à **-20°C** ou en dessous.

Précautions :

Le calibrateur (3) et les contrôles (4&5) sont préparés à partir de plasmas humains. Ces derniers ont été testés par des méthodes enregistrées et sont certifiés exempts pour l'anticorps VIH, le Hbs Ag et l'anticorps VCH. Toutefois, aucune méthode ne permettant d'exclure totalement le risque d'agent pathogène, ces produits doivent être manipulés avec toutes les précautions requises pour l'utilisation de produits potentiellement infectés.

6. **Anti-(h)-Factor V-HRP immunoconjugué** : Chaque flacon d'immunoconjugué doit être reconstitué par **7.5 ml** de "**Factor V Conjugate Diluent**" au moins 15 minutes avant utilisation. Laisser la galette se dissoudre et agiter délicatement pour homogénéiser. L'immunoconjugué reconstitué est stable au moins **24 heures** à la température du laboratoire et **4 semaines** à **2-8°C**.
7. **Factor V Conjugate Diluent** : Le réactif est prêt à l'emploi. Après ouverture, il peut être conservé à **2-8°C**, pendant **4 semaines**, en prenant soin d'éviter toute contamination lors de l'utilisation. Ce réactif contient 0.05% de Kathon CG.
8. **Wash Solution** : Incuber, si nécessaire, le flacon de solution de lavage dans un bain-marie à **37°C** jusqu'à totale dissolution des cristaux. Agiter le flacon et diluer la solution de lavage au 1/20 en eau distillée. Les 50 ml de solution concentrée permettent de préparer 1 litre de solution de lavage après dilution. Après ouverture, le flacon est stable **4 semaines** à **2-8°C**, à l'abri de toute contamination. La solution de lavage diluée peut être utilisée jusqu'à **7 jours** après préparation, lorsqu'elle est protégée de toute contamination et conservée à **2-8°C**. Ce réactif contient 0.05% de Kathon CG.
9. **TMB substrate** : Substrat TMB prêt à l'emploi. Après ouverture, il peut être conservé à **2-8°C**, pendant **4 semaines**, en prenant soin d'éviter toute contamination bactériologique lors de l'utilisation.
10. **Stop solution** : Solution contenant 0,45 M d'acide sulfurique, prête à l'emploi.

Nota :

- Sortir le coffret du réfrigérateur, au moins 30 min. avant de réaliser le dosage, afin que les divers réactifs s'équilibrent à température du laboratoire. Conserver les réactifs inutilisés à 2-8°C.
- Les études de vieillissement, réalisées à 30°C pendant 3 semaines, montrent que les réactifs peuvent être expédiés à température ambiante, sans aucun dommage.

MODE OPERATOIRE :

Préparation de l'échantillon :

Le sang (9 volumes) doit être collecté sur du citrate trisodique 0.109 M (1 volume) ; le plasma est obtenu après 20 minutes de centrifugation à 2500 g ; le plasma citraté doit être utilisé dans les 8 heures ou conservé congelé, à -20°C au moins, jusqu'à 6 mois. Juste avant utilisation, décongeler le plasma pendant 15 minutes dans un bain-marie à 37°C. Le plasma décongelé est stable pendant au moins 4 heures à température du laboratoire.

L'utilisation de plasma provenant de sang prélevé sur Na₂ EDTA est possible. Les conditions de conservation sont les mêmes que celles préconisées pour le plasma citraté.

Plasma ou échantillon à tester :

Le plasma ou l'échantillon à tester sont analysés dilués au 1/50 dans le diluant échantillon (Facteur V Sample Diluent). Pour des taux de Facteur V > 100%, diluer au 1/100 ou au 1/200, ou davantage selon le cas (soit D cette dilution). Les taux obtenus devront être corrigés en multipliant par le facteur de dilution complémentaire D:50 (soit x2 pour 1/100, x4 pour 1/200, etc...).

Les contrôles I et II doivent être dilués au 1/50 dans le diluant échantillon.

Gamme d'étalonnage :

Les taux de Facteur V antigène sont exprimés en % d'un pool de plasmas normaux (titrant par définition 100%). La dilution standard pour le dosage plasmatique du Facteur V antigène étant 1/50, le 100% correspond à un pool de plasmas normaux dilués 1:50.

En utilisant le Plasma Facteur V calibrator (2 ml de plasma prédilué au 1/50, ayant un taux "C" de Facteur V, indiqué, pour chaque lot de réactifs, sur le papillon inclus dans le coffret), préparer la gamme d'étalonnage suivante selon le tableau ci-dessous :

Concentration de Facteur V Ag en %	C	C/2	C/4	C/10	C/20	0
Vol. de Plasma Facteur V calibrator	1 ml	0.5 ml	0.25 ml	0.1 ml	0.05 ml	0 ml
Vol. de FV Sample Diluent	0 ml	0.5 ml	0.75 ml	0.9 ml	0.95 ml	1 ml

Agiter délicatement pour homogénéiser.

Les dilutions d'étalonnages sont stables au moins 4 heures à température du laboratoire.

Réalisation du dosage :

Sortir la quantité nécessaire de barrettes de 8 puits du sachet aluminium et les placer dans le cadre fourni. Introduire les réactifs dans les puits des microbarrettes ELISA et réaliser le dosage comme indiqué dans le tableau ci-après :

Réactif	Volume	Procédure
Plasma Facteur V calibrator ou échantillon à doser, ou contrôles, ou diluant échantillon (blanc)	200 µl	Introduire la gamme d'étalonnage ou le plasma dilué dans les puits (1).
Incuber 2 heures à 37°C (2, 3)		
Solution de lavage (diluée 20 fois en eau distillée avant utilisation)	300 µl par puits	Effectuer une série de 5 lavages (1).
Immunoconjugué Anti-(h)-Facteur V-HRP reconstitué par 7.5 ml de diluant pour immunoconjugué	200 µl	Introduire l'immunoconjugué dans les puits (1)
Incuber 2 heures à 37°C (2, 3)		
Solution de lavage (diluée 20 fois en eau distillée avant utilisation)	300 µl par puits	Effectuer une série de 5 lavages.
Substrat TMB / H ₂ O ₂	200 µl	Immédiatement, introduire cette solution dans les puits (1, 4). <i>Nota</i> : la répartition du substrat, barrette par barrette, doit se faire très précisément.
Laisser la coloration se développer pendant 5 minutes à température du laboratoire (18-25°C) (2)		
Acide sulfurique 0.45 M (5)	50 µl	Arrêter la réaction en introduisant 0,45M d'acide sulfurique. Respecter le même temps de répartition, barrette par barrette, que celui utilisé pour le substrat (1).
Attendre 10 minutes pour laisser stabiliser la coloration puis lire la DO obtenue à 450 nm. Soustraire les blancs (5)		

Remarques :

- Ne jamais laisser les puits de la plaque ELISA vides entre l'addition des réactifs ou après les étapes de lavage, afin de préserver les protéines insolubilisées. Le réactif suivant doit être ajouté dans les trois minutes afin d'éviter l'assèchement de la plaque. Si nécessaire, garder les puits remplis de solution de lavage et les vider juste avant distribution du réactif suivant. régler le laveur de manière à effectuer un lavage doux. Une vidange trop violente des puits, lors de l'aspiration, peut endommager le coating et réduire la réactivité.
- Eviter de laisser la plaque en pleine lumière lors des incubations et plus particulièrement lors du développement de la coloration. L'utilisation d'un agitateur pour micro-plaques ELISA est possible.
- Afin de faciliter la réaction antigène/anticorps, l'incubation à 37°C est nécessaire pour le dosage ELISA du Facteur V antigène.
- Lors de la distribution du substrat TMB, l'intervalle de temps entre chaque rangée doit être défini et respecté avec précision. Il doit être le même lors de l'arrêt de la réaction par l'acide sulfurique.
- Pour une lecture bichromatique, la longueur d'onde de référence utilisée peut être à 620 nm ou à 690 nm

EXPRESSION DES RESULTATS :

Pour la mesure des taux de Facteur V antigène, seule la courbe d'étalonnage effective réalisée pour la série de dosages doit être utilisée (voir exemple sur le papillon).

- Sur du papier millimétré, porter en abscisses le taux de Facteur V, en %, et en ordonnées les DO 450 correspondantes.
- Sur la courbe obtenue, en déduire directement le taux de Facteur V antigène dans le plasma testé à la dilution standard au 1/50. Lorsque d'autres dilutions sont utilisées (soit D), multiplier la valeur obtenue par le facteur de dilution complémentaire (soit D/50) afin d'obtenir le taux de Facteur V antigène dans l'échantillon testé (ex : x2 pour 1/100).

Les logiciels spécifiques pour test ELISA (DYNEX, BIOLISE, etc...) peuvent être utilisés pour déterminer directement la concentration de Facteur V antigène à partir de la courbe d'étalonnage.

Les résultats obtenus doivent être utilisés à des fins de recherche uniquement et ne sont pas utilisables pour le diagnostic ou le traitement du patient.

BIOCHIMIE :

- Le facteur V est une glycoprotéine monoclénaire de 330 000 Da de poids moléculaire.
- Après activation par la thrombine, le facteur Va se compose de deux chaînes (l'une légère et l'autre lourde), reliées par un ion calcium. Le facteur Va normal est dégradé et inactivé rapidement par la protéine C activée, tandis que le facteur Va muté (R306Q) est résistant à cette dégradation.
- La concentration plasmatique du facteur V est d'environ 10 µg/ml chez l'homme. Il est synthétisé par les hépatocytes et les mégacaryocytes.

CARACTERISTIQUES :

- Zone de mesure : 2 à 200 ng/ml (correspondant à un plasma humain normal dilué de 1:50 à 1:5000).
- Seuil de détection : 2 ng/ml.

LIMITES DE LA METHODE :

- La plaque ELISA étant sensibilisée avec un anticorps monoclonal complet, l'interférence du facteur rhumatoïde, quand il est présent, n'est pas exclue.
- Le facteur Va est mesuré, mais sous-estimé dans le dosage ZYMUTEST Factor V, car il a une taille moléculaire inférieure à celle du facteur V, en raison de la libération de produits de clivage lors de l'activation. Il y a alors moins d'épitopes disponibles pour la fixation de l'immunoconjugué.

Changement par rapport à la précédente version.