

**ZYMUTEST Factor IX**

REF RK032A

96 tests

Coffret ELISA pour le Facteur IX

POUR LA RECHERCHE UNIQUEMENT.

NE PAS UTILISER DANS LES PROCEDURES DE DIAGNOSTIC.

Français, dernière révision : 02-2021

UTILISATION :

Le coffret ZYMUTEST Factor IX est une méthode ELISA en une étape, destinée à la mesure du Facteur IX (FIX) dans le plasma humain, ou tout autre milieu biologique où le FIX est présent.

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

RESUME ET EXPLICATION :

Le Facteur IX (FIX) est une glycoprotéine vitamine K-dépendante qui participe aux étapes intermédiaires de la cascade de la coagulation. Quand il est activé par le Facteur XI, en présence de calcium et de phospholipides, le Facteur IX activé (FIXa) forme, avec le Facteur VIII, un complexe activateur du Facteur X en Facteur Xa.

PRINCIPE :

Dans un premier temps, l'immunoconjugué, un anticorps polyclonal de lapin spécifique du FIX et couplé à la peroxydase (HRP), est introduit dans les puits de la plaque ELISA sensibilisée par un anticorps polyclonal spécifique du FIX. Immédiatement après, l'échantillon à tester dilué est introduit et la réaction immunologique débute. Le FIX présent dans l'échantillon se fixe sur la phase solide par un de ses épitopes, et réagit avec le second anticorps polyclonal couplé à la peroxydase par ses épitopes libres. Après une étape de lavage, le substrat de la peroxydase, 3,3',5,5' - Tetraméthylbenzidine (TMB) en présence d'eau oxygénée (H₂O₂), est introduit dans les puits et une coloration bleue se développe. Lorsque la réaction est arrêtée avec l'acide sulfurique, une couleur jaune est obtenue. Cette coloration est proportionnelle à la quantité de FIX présent dans l'échantillon testé.

REACTIFS :

- COAT** : Microplaque ELISA (Micro ELISA plate), contenant 12 barrettes de 8 puits, sensibilisée par un anticorps polyclonal de lapin spécifique du FIX humain, stabilisée, et emballée dans un sachet aluminium en présence d'un déshydratant. Contient de la BSA.
- SD** : 2 flacons contenant 50 mL de **tampon de dilution pour échantillons (Sample Diluent)**, prêt à l'emploi. Contient de la BSA.
- CAL** : 3 flacons d'**étalon FIX (plasma calibrator)**, lyophilisé. Chaque flacon doit être reconstitué par 2 mL de diluant échantillon (Sample Diluent) afin d'obtenir un étalon contenant une concentration « C », exprimée en %, de FIX. Ce taux « C » est supérieur ou égal à 100% selon les lots. Cet étalon est relié au standard international du NIBSC. Contient de la BSA.
- CI** : 1 flacon lyophilisé contenant 0,5 mL de **Plasma Control I haut** (Plasma humain). Contient de la BSA.
- CII** : 1 flacon lyophilisé contenant 0,5 mL de **Plasma Control II bas** (Plasma humain). Contient de la BSA.
- IC** : 3 flacons d'**immunoconjugué (Anti-(h)-FIX-HRP immunoconjugate)**, anticorps polyclonal de lapin couplé à la peroxydase (HRP), lyophilisé. Contient de la BSA.
- CD** : 1 flacon de 25 mL de **tampon de dilution pour l'immunoconjugué (Conjugate Diluent)** prêt à l'emploi. Contient de la BSA.
- WS** : Un flacon de 50 mL de **solution de lavage (Wash Solution)**, 20 fois concentrée.
- TMB** : Un flacon de substrat : 3,3', 5,5' - Tetraméthylbenzidine, contenant de l'eau oxygénée, prêt à l'emploi.
- SA** : Un flacon de 6 mL d'**acide sulfurique 0,45 M (Stop Solution)** prêt à l'emploi.

Les concentrations exactes des contrôles et de l'étalon, ainsi que l'intervalle de concentration acceptable pour les contrôles sont indiquées sur le papillon fourni dans le coffret. Les concentrations varient de lot à lot. Pour le dosage, se référer aux valeurs fournis sur le papillon du coffret.

Les réactifs **SD**, **CD** et **WS** contiennent 0.05% Kathon CG et le réactif SA contient de l'acide sulfurique, voir MISE EN GARDE ET AVERTISSEMENTS.

MISE EN GARDE ET AVERTISSEMENTS :

- Tout produit d'origine biologique doit être manipulé avec toutes les précautions nécessaires, et considéré comme étant potentiellement infectieux.
- L'élimination des déchets doit être effectuée conformément aux réglementations locales en vigueur.
- Utiliser uniquement les réactifs d'un même lot de coffret. Ne pas mélanger les réactifs de différents lots de coffrets pour réaliser un dosage, ils sont optimisés pour chaque lot de coffrets.
- Les réactifs doivent être manipulés avec précautions afin d'éviter toute contamination lors de leur utilisation. Éviter autant que possible toute évaporation des réactifs lors de leur utilisation, en limitant la surface d'échange liquide-air.
- Pour conserver la stabilité des réactifs, refermer les flacons après chaque utilisation avec leurs bouchons respectifs.
- Les études de vieillissement, réalisées à 30°C pendant 3 semaines, montrent que les réactifs peuvent être expédiés à température ambiante pendant une période courte, sans aucun dommage.
- Le plasma humain utilisé pour la préparation de l'étalon et des contrôles I et II a été testé par des méthodes enregistrées et est certifié exempt d'anticorps VIH, de Hbs Ag et d'anticorps VHC.
- Le plasma bovin utilisé pour la préparation de la BSA a été testé par des méthodes enregistrées et est certifié exempt de maladies infectieuses, notamment de l'encéphalopathie spongiforme bovine.
- L'acide sulfurique, même dilué à 0,45 M, est caustique. Comme pour tout réactif chimique semblable, manipuler l'acide sulfurique avec précaution, en particulier en utilisant des gants et en portant des lunettes de protection. Éviter tout contact avec la peau et les yeux.
- Pour usage *in vitro*.

CD SD WS

H317 : Peut provoquer une allergie cutanée.

PREPARATION ET STABILITE DES REACTIFS:

Ramener le coffret à température ambiante, au moins 30 min avant le dosage. Conserver les réactifs non utilisés à 2-8°C. Retirer délicatement le bouchon de lyophilisation des réactifs lyophilisés, pour s'affranchir de toute perte du produit à l'ouverture du flacon.

Lorsque les réactifs sont utilisés et conservés de façon appropriée, en conformité avec le protocole et les précautions recommandés, le coffret peut être utilisé sur une période de 1 mois, et barrette par barrette, si nécessaire.

- COAT (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 refermé, en présence du déshydratant, à l'abri de l'humidité, à **2-8°C**, dans le sachet plastique minipig fourni.
- SD (Sample Diluent)** : Prêt à l'emploi. Ce réactif contient 0,05% Kathon CG. La stabilité du réactif, sous réserve de toute contamination ou d'évaporation, conservé dans son flacon d'origine est de :
 - 4 semaines** à 2-8°C.
- CAL (Factor IX Calibrator)** : Reconstituer chaque flacon avec exactement 2 mL de « Sample-Diluent », agiter vigoureusement jusqu'à dissolution complète, afin d'obtenir un étalon contenant un taux « C », exprimé en %, de FIX (**déjà dilué au 1/50**). La stabilité du réactif après reconstitution, exempt de toute contamination ou d'évaporation, conservé dans son flacon d'origine est de :
 - 24 heures** à température ambiante (18-25°C).
 - 72 heures** à 2-8°C.
- CI (Control I (plasma humain, haut))** : Reconstituer chaque flacon avec exactement 0,5 mL d'eau distillée, agiter vigoureusement jusqu'à dissolution complète. La stabilité du réactif après reconstitution, exempt de toute contamination ou d'évaporation, conservé dans son flacon d'origine est de :
 - 24 heures** à température ambiante (18-25°C).
 - 72 heures** à 2-8°C.
 - 2 mois** congelé à -20°C ou moins.
- CII (Control II (plasma humain, bas))** : Reconstituer chaque flacon avec exactement 0,5 mL d'eau distillée, agiter vigoureusement jusqu'à dissolution complète. La stabilité du réactif après reconstitution, exempt de toute contamination ou d'évaporation, conservé dans son flacon d'origine est de :
 - 24 heures** à température ambiante (18-25°C).
 - 72 heures** à 2-8°C.
 - 2 mois** congelé à -20°C ou moins.
- IC (Anti-(h)-FIX-HRP immunoconjugate)** : Reconstituer chaque flacon d'immunoconjugué avec exactement 2 mL de « Conjugate Diluent » au moins 15 minutes avant utilisation. Laisser la galette se dissoudre et agiter pour homogénéiser. La stabilité du réactif après reconstitution, exempt de toute contamination ou d'évaporation, conservé dans son flacon d'origine est de :
 - 24 heures** à température ambiante (18-25°C).
 - 4 semaines** à 2-8°C.
- CD (Conjugate Diluent)** : Prêt à l'emploi. Ce réactif contient 0,05% de Kathon CG. La stabilité du réactif après reconstitution, exempt de toute contamination ou d'évaporation, conservé dans son flacon d'origine est de :
 - 4 semaines** à 2-8°C.
- WS (Wash Solution)** : Incuber, si nécessaire, le flacon dans un bain-marie à 37°C jusqu'à dissolution totale 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). La stabilité de la solution de lavage, exempt de toute contamination ou d'évaporation, conservé dans son flacon d'origine est de :
 - 4 semaines** à 2-8°C.
 La stabilité de la solution de lavage diluée, exempt de toute contamination ou d'évaporation, conservé dans son flacon d'origine est de :
 - 7 jours** à 2-8°C.
 Ce réactif contient 0,05% de Kathon CG.
- TMB** : Prêt à l'emploi. La stabilité du réactif après reconstitution, exempt de toute contamination ou d'évaporation, conservé dans son flacon d'origine est de :
 - 4 semaines** à 2-8°C.
- SA (Stop Solution)** : Solution d'arrêt contenant 0,45M d'acide sulfurique, prête à l'emploi. Voir MISE EN GARDE ET AVERTISSEMENTS. La stabilité du réactif après reconstitution, exempt de toute contamination ou d'évaporation, conservé dans son flacon d'origine est de :
 - 4 semaines** à 2-8°C.

CONDITIONS DE STOCKAGE :

Les réactifs non ouverts doivent être conservés à 2-8°C dans leur emballage d'origine. Ils sont alors utilisables jusqu'à la date de péremption imprimée sur le coffret.

REACTIFS ET MATERIELS REQUIS MAIS NON FOURNIS :**Réactifs:**

- Eau distillée.

Matériels:

- 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** réglé à une longueur d'ondes de 450 nm.

PRELEVEMENTS ET PREPARATION DES ECHANTILLONS:

La préparation et la conservation des échantillons doivent être réalisées selon les recommandations locales en vigueur.

Echantillons :

Plasma humain obtenu à partir de sang anticoagulé (citrate trisodique). L'utilisation de plasma provenant de sang prélevé sur EDTA est possible. Les conditions de conservation sont les mêmes qu'avec le plasma citraté.

Prélèvement :

Le sang (9 volumes) doit être collecté sur l'anticoagulant citrate trisodique (1 volume) (0,109M) avec précautions, par ponction veineuse franche. Le premier tube doit être éliminé.

Centrifugation :

Dans les 2 heures, utiliser une méthode validée au sein du laboratoire permettant d'obtenir un plasma pauvre en plaquettes, par exemple un minimum de 15 minutes à 2500g à température ambiante (18-25°C), et le plasma doit décanter dans un tube plastique.

Conservation du plasma :

- 24 heures à température ambiante (18-25°C).
- 6 mois à -20°C.

Les échantillons de plasma congelés doivent être décongelés rapidement à 37°C, puis agités soigneusement et testés immédiatement. Resuspendre tout précipité en agitant vigoureusement immédiatement après décongélation et avant utilisation.

PROCEDURE :

Méthode de dosage :

1. Les contrôles I et II doivent être testés dilués 50 fois (1/50), en Sample Diluent.

2. Le plasma ou l'échantillon à tester sont analysés dilués au 1/50 dans le diluant échantillon (Sample Diluent). Pour des taux attendus de FIX supérieurs à « C », exprimés en %, diluer au 1/100 (D=100) ou plus. Pour de faibles ou très faibles concentrations de FIX, des dilutions moins importantes peuvent être réalisées.

3. En utilisant l'étalon FIX avec une concentration en FIX de « C » (supérieur ou égal à 100% selon les lots) contenu dans le coffret, préparer la gamme d'étalonnage suivante selon le tableau ci-dessous :

Concentration de FIX en %	C	C/2	C/4	C/10	C/20	0
Vol. d'étalon FIX	1 mL	0,5 mL	0,25 mL	0,1 mL	0,05 mL	0 mL
Vol. de Sample Diluent	0 mL	0,5 mL	0,75 mL	0,9 mL	0,95 mL	1 mL

Agiter pour homogénéiser.

Les dilutions de calibration sont stables 8 heures à température ambiante (18-25°C).

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

Réactif	Volume	Procédure
Conjugué anti (h)-FIX-HRP. (reconstitué avec 2 mL de Conjugate Diluent)	50 µL	Introduire l'immunoconjugué Anti-(h)-FIX-HRP dans les puits de la microplaque ELISA
Etalon FIX ou échantillon à tester ou Sample Diluent (blanc)	200 µL	Introduire immédiatement les solutions étalon ou les échantillons à doser dans les puits correspondants sur la micro plaque ELISA (a)
Mélanger délicatement soit manuellement, soit sur un agitateur de microplaques. Incuber 1 heure à température ambiante (18-25°C).		
Solution de lavage [WS] (diluée 20 fois en eau distillée avant utilisation).	300 µL	Effectuer une série de 5 lavages (b).
Substrat [TMB]/H ₂ O ₂	200 µL	Immédiatement, introduire cette solution dans les puits (b). Nota : la répartition du substrat, barrette par barrette, doit se faire très précisément. (c, d)
Incuber pendant exactement 5 minutes à température ambiante (d).		
Acide Sulfurique [SA] 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. (e).
Attendre 10 minutes pour laisser stabiliser la coloration puis lire la DO obtenue à 450 nm. Soustraire les blancs (c) si nécessaire.		

Remarques :

- Effectuer les dépôts de l'étalonnage, des contrôles et des tests, le plus rapidement possible (≤ 10 minutes), pour une cinétique homogène des divers dosages. Un délai trop important entre les premiers et derniers dépôts peut influencer la cinétique immunologique et fausser les résultats.
- 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 et éviter une vidange trop violente des puits, lors de l'aspiration, qui pourrait endommager le coating et réduire la réactivité.
- 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.
- 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 microplaques ELISA est possible. Bien respecter la température d'incubation (18-25°C). Si la température est trop forte ($> 25^\circ\text{C}$) ou trop faible ($< 18^\circ\text{C}$), les résultats sont affectés et les DO mesurées à 450 nm sont trop fortes ou trop faibles. En tenir compte pour l'analyse des résultats. De même, si un agitateur de plaques est utilisé, n'agiter qu'au début de chaque étape (dépôt échantillon, dépôt conjugué, solution d'arrêt), pendant 1 à 2 minutes, afin d'obtenir une bonne homogénéité. L'utilisation continue d'un agitateur augmente sensiblement les DO 450 obtenues dans le test.
- Pour une lecture bichromatique, le filtre 620 nm ou 690 nm peut être utilisé comme longueur d'onde de référence.

VARIANTE : METHODE 2 TEMPS :

- Le dosage du FIX peut également être réalisé en méthode "deux temps". La courbe de calibration va de 0 à C% (comme pour la méthode 1 temps). Le "FIX Calibrator" [CAL] doit être repris par 2 mL de Sample Diluent [SD].
- L'immunoconjugué [IC] doit être reconstitué par 7,5 mL de "Conjugate Diluent" [CD].
- Le plasma à tester est analysé dilué 50 fois (1/50) en "Sample Diluent" [SD], ou davantage si des taux supérieurs à C% sont attendus.
- Dans chaque puits de la plaque ELISA, introduire 200 µL de la gamme d'étalonnage (réalisée comme pour la méthode 1 temps) ou 200 µL de plasma à tester dilué 1/50 (ou plus si nécessaire). Après 1 heure d'incubation à température ambiante (18-25°C), laver la plaque et ajouter 200 µL d'immunoconjugué [IC] par puit. Incuber 1 heure à température ambiante (18-25°C), laver la plaque, et ajouter le substrat [TMB] (200 µL par puit). Arrêter la coloration après exactement 5 min avec de 50 µL d'acide sulfurique 0,45 M [SA] par puit, et mesurer la DO à 450 nm. Pour les lavages, les précautions opératoires, et l'interprétation des résultats, procéder comme indiqué pour la méthode 1 temps.

RESULTATS :

- Pour la méthode manuelle, tracer la courbe de calibration, en portant en abscisses la concentration FIX en %, et en ordonnées les DO 450nm, en choisissant le mode d'interpolation « best fit » (se reporter au papillon contenu dans le coffret).
- La concentration de FIX, pour l'échantillon testé, à la dilution standard (D/50), et exprimée en %, est directement déduite de la courbe de calibration.
- Pour des dilutions plus ou moins importantes, (ex : D), la concentration mesurée doit être multipliée par le facteur de dilution complémentaire (soit D/50; par exemple x2 pour D/100).
- Pour les contrôles I et II, la concentration mesurée est obtenue en lecture directe.
- Alternativement, un logiciel spécifique (ex: Dynex, Biolise, etc...) peut être utilisé pour le calcul des concentrations.

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

LIMITATIONS :

- Pour obtenir les performances optimales du test et répondre aux spécifications, suivre scrupuleusement les instructions techniques validées par HYPHEN BioMed. Il est de la responsabilité du laboratoire de valider toutes les modifications apportées à ces instructions d'utilisation.
- Tout réactif présentant un aspect inhabituel ou des signes de contamination doit être rejeté.
- Tout prélèvement suspect ou présentant des signes d'activation doit être rejeté.
- Tout plasma présentant un coagulum ou des signes de contamination doit être rejeté.

PERFORMANCES :

Limite de détection ≤ 5 %

Intra-essai : 3-8%

Inter-essais : 5-10%.

Aucune interférence significative de l'héparine n'est observée jusqu'à 2UI/mL.

REFERENCES :

- Taran LD, "Factor IX of the blood coagulation system: a review", Biochemistry (Mosc.), 62(7):685-93, 1997.
- Amiral J. et al. "Application of enzyme immunoassays to coagulation testing", Clin Chem, 30(9):1512-6, 1984.

SYMBOLES :

Symboles utilisés et signes énumérés dans la norme ISO 15223-1, se référer au document Définition des symboles.

Changements par rapport à la précédente version.