

BIOPHEN™ Factor Xla

REF 220412

R1A **R1B** **R2** **R3** 2 x 3 mL, **R4** 2 x 25 mL, **CAL** 2 x 2 mL

Méthode chromogène pour le dosage de l'activité du Facteur Xla.
POUR LA RECHERCHE UNIQUEMENT.
NE PAS UTILISER DANS LES PROCEDURES DE DIAGNOSTIC.

Français, dernière révision : 10-2023

UTILISATION:

Le coffret BIOPHEN™ Factor Xla est une méthode chromogène pour la détermination quantitative *in vitro* de l'activité du Facteur XI activé (FXIa), en milieu purifié, en utilisant une méthode manuelle ou automatisée.

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

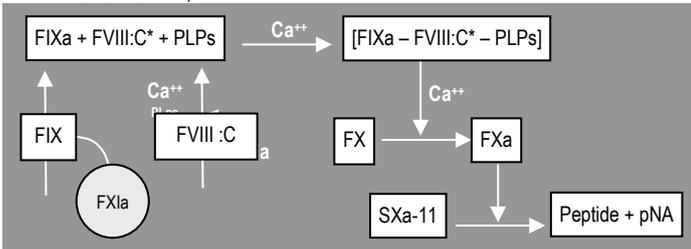
RESUME ET EXPLICATION:

Technique :

La concentration normale de Facteur XI (FXI) dans le plasma humain est d'environ 3 à 7 µg/mL. Le FXI est présent dans le plasma sous forme zymogène et lorsqu'il est activé (par le FXIIa, la thrombine ou auto-activation), il devient une sérine protéase de type trypsine qui participe à la phase contact de la coagulation sanguine.

PRINCIPE:

En présence de Phospholipides (PLPs), de calcium et de thrombine le FXIa, présent dans l'échantillon testé est capable d'activer le FIX en FIXa. Le FIXa forme un complexe enzymatique avec le Facteur VIII:C (FVIII:C) activé par la thrombine, pour activer le Facteur X (FX). Le Facteur Xa ainsi formé hydrolyse le substrat chromogène qui libère de la paranitroaniline (pNa). La quantité de pNa libérée (mesurée par l'absorbance à 405 nm) est directement proportionnelle à la concentration de FXIa dans l'échantillon (les FIX, FVIII:C et FX étant en quantité constante et en excès).



Note: FVIII:C*: FVIII:C activé par la thrombine.

REACTIFS:

R1A Facteur X humain et FVIII:C : lyophilisé. Contient du calcium chlorure dihydrate, du sulfate de cuivre, un inhibiteur de la polymérisation de la fibrine, des stabilisants et de la BSA.

R1B Facteur IX humain (sans FIXa) : lyophilisé. Contient des stabilisants et de la BSA.

R2 Réactif d'Activation (Thrombine-Calcium-Phospholipides), lyophilisé. Contient de la Thrombine humaine, du calcium, de l'imidazole, des phospholipides synthétiques, des stabilisants et de la BSA.

R3 Substrat SXa-11 : Substrat chromogène spécifique au FXa (SXa-11), lyophilisé. Contient un inhibiteur du FXIa.

R4 Tampon Tris-BSA spécifique : Tampon de réaction, prêt à l'emploi. Contenant 1% de BSA, du PEG.

CAL Etalon FXIa : FXIa humain purifié, lyophilisé, contenant une quantité titrée de FXIa d'approximativement 45 mUI/mL. Contient des stabilisants et de la BSA.

R1A **R1B** **R2** **R3** 2 flacons de 3 mL

R4 2 flacons de 25 mL

CAL 2 flacons de 2 mL

Les concentrations des étalons peuvent légèrement varier de lot à lot. Pour le dosage, se référer aux valeurs exactes fournies sur le papillon du coffret utilisé.

MISE EN GARDE ET AVERTISSEMENTS:

- Certains réactifs de ce coffret contiennent des produits d'origine humaine et animale. Lorsque du plasma humain a été utilisé dans la préparation de ces réactifs, la recherche de l'antigène HBs, des anticorps anti-HCV, anti-HIV 1 et anti-HIV 2 a été effectuée et trouvée négative. Cependant aucun test ne peut garantir de façon absolue l'absence de tout agent infectieux. Aussi, ces réactifs d'origine biologique doivent être manipulés avec les précautions d'usage s'agissant de produits 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.
- Les études de vieillissement montrent que les réactifs peuvent être expédiés à température ambiante sans aucun dommage.
- Ce dispositif *in vitro* est destiné à une utilisation professionnelle en laboratoire.

PREPARATION DES REACTIFS:

Retirer délicatement le bouchon de lyophilisation, pour s'affranchir de toute perte de produit à l'ouverture du flacon.

R1A **R1B** **R2** **R3** Reconstituer chaque flacon avec exactement 3 mL d'eau distillée.

Agiter vigoureusement jusqu'à dissolution complète, en évitant la formation de mousse et charger sur l'automate en suivant les instructions du guide d'application.

Pour la méthode manuelle, laisser stabiliser pendant 30 min à température ambiante (18-25°C), homogénéiser avant utilisation.

CAL Reconstituer chaque flacon avec exactement 2 mL d'eau distillée.

Agiter vigoureusement jusqu'à dissolution complète, en évitant la formation de mousse et charger sur l'automate en suivant les instructions du guide d'application.

Pour la méthode manuelle, laisser stabiliser pendant 15 min à température ambiante (18-25°C), homogénéiser avant utilisation.

R4 Réactif prêt à l'emploi, homogénéiser et charger sur l'automate en suivant les instructions du guide d'application.

Pour la méthode manuelle, laisser stabiliser pendant 30 min à température ambiante (18-25°C), homogénéiser avant utilisation.

STOCKAGE ET STABILITE:

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.

R1A **R1B** **R2** La stabilité du réactif après reconstitution, sous réserve de toute contamination ou d'évaporation, conservé fermé est de :

- 24 heures à 2-8°C.
- 8 heures à température ambiante (18-25°C).
- 2 mois congelé à -20°C ou moins*
- Stabilité à bord de l'automate : se référer à l'application spécifique.

R3 La stabilité du réactif après reconstitution, sous réserve de toute contamination ou d'évaporation, conservé fermé est de :

- 1 mois à 2-8°C.
- 7 jours à température ambiante (18-25°C).
- 2 mois congelé à -20°C ou moins*
- Stabilité à bord de l'automate : se référer à l'application spécifique.

*Décongeler une seule fois le plus rapidement possible à 37°C et utiliser immédiatement.

Si le substrat devient jaune, cela indique une contamination. Le flacon doit être jeté et un nouveau utilisé.

R4 La stabilité du réactif après ouverture, sous réserve de toute contamination ou d'évaporation, conservé fermé est de :

- 7 jours à 2-8°C.
- Stabilité à bord de l'automate : se référer à l'application spécifique.

CAL La stabilité du réactif après reconstitution, sous réserve de toute contamination ou d'évaporation, conservé fermé est de :

- 24 heures à 2-8°C.
- 8 heures à température ambiante (18-25°C).
- Ne pas congeler.
- Stabilité à bord de l'automate : se référer à l'application spécifique.

REACTIFS ET MATERIELS REQUIS MAIS NON FOURNIS:

Réactifs:

- Eau distillée.
- Acide acétique à 20% ou acide citrique à 2% (méthode en point final).
- Alternativement, matériel de référence pour FXIa (préparation de référence interne ou internationale).
- Contrôles spécifiques :

Nom du produit	Référence
BIOPHEN™ FXIa Control Set	224801

Se référer également au guide d'application spécifique de l'automate utilisé.

Matériels:

- Spectrophotomètre, ou automates pour dosages chromogènes.
- Chronomètre, pipettes calibrées, tubes pour tests en plastique ou microplaque.

ECHANTILLONS:

FXIa en milieu purifié ou en concentré thérapeutique en FXI.

PROCEDURE:

Le coffret peut être utilisé en méthode cinétique, automatisée, ou en méthode manuelle (point final). Le test est réalisé à 37°C et l'intensité de la coloration est mesurée à 405nm.

Méthode de dosage:

1. Reconstituer les étalons et les contrôles comme indiqué dans les notices spécifiques ou selon la pratique interne. L'étalon doit être dilué dans du tampon [R4] comme décrit dans le tableau ci-dessous afin de préparer la gamme de calibration ("C" définit la concentration en FXIa) :

Etalon	C	C/2	C/4	C/8	0
Volume d'étalon à C	1mL	0,5mL	0,25mL	0,125mL	0mL
Volume de tampon [R4]	0mL	0,5mL	0,75mL	0,875mL	1mL

La courbe de calibration peut également être réalisée à partir d'un matériel de référence titré en FXIa (standard international ou interne).

Diluer ce matériel avec le tampon [R4], pour obtenir la concentration « C » d'environ 45 mUI/mL, et préparer la gamme de calibration en tampon [R4] comme expliqué précédemment.

2. Les échantillons testés et les concentrés doivent être dosés non dilués ou dilués en [R4] afin d'avoir une concentration en FXIa ≤ 45 mUI/mL dans la dilution testée.

Comme le dosage est effectué en présence de calcium (R2), une attention particulière est requise si l'échantillon analysé contient du citrate ou du Na₂EDTA (exemple : échantillon dilué suffisamment pour ne pas interférer avec le calcium nécessaire pour le dosage. Alternativement, la neutralisation des ions citrate et EDTA peut être réalisée. Le choix est fait sous la responsabilité de chaque laboratoire).

Pour doser le FXIa dans les concentrés de FXI, l'échantillon à tester doit être pré-dilué en tampon [R4] pour cibler une concentration en FXIa dans l'intervalle d'environ 5 à 35 mUI/mL.

La concentration mesurée doit ensuite être multipliée par le facteur de « pré-dilution ».

Réaliser la gamme de calibration et la tester avec les contrôles de qualité. Les échantillons dilués doivent être testés rapidement, s'ils sont conservés à température ambiante (18-25°C). Les concentrations exactes des étalons et des contrôles sont indiquées pour chaque lot sur le papillon fourni avec le coffret.

3. Introduire dans les puits d'une microplaque ou dans un tube plastique incubé à 37°C:

Réactifs	Microplaque	Volume
Etalon, échantillons testés dilués ou contrôles en [R4]	50 μ L	200 μ L
[R1A] Facteur X humain et FVIII:C	50 μ L	200 μ L
[R1B] Facteur IX humain	50 μ L	200 μ L
Mélanger et incubé pendant 2 min. à 37°C, puis ajouter:		
[R2] Réactif d'Activation	50 μ L	200 μ L
Mélanger et incubé pendant 2 min. à 37°C, puis ajouter:		
[R3] Substrat Sxa-11 préincubé à 37°C	50 μ L	200 μ L
Mélanger et incubé pendant précisément 5 min à 37°C		
Arrêter la réaction en ajoutant:		
Acide citrique (2%)	50 μ L	200 μ L
Mélanger et mesurer l'absorbance à 405 nm contre le blanc correspondant.		

*Ou acide acétique (20%). La couleur jaune est stable pendant 2 heures.

Le blanc échantillon est obtenu par mélange des réactifs dans l'ordre inverse à celui du test : Acide Citrique (2%), R3, R2, R1B, R1A, échantillon dilué.

Mesurer la densité optique à 405 nm. La valeur du blanc mesurée doit être soustraite de l'absorbance mesurée pour le test correspondant.

Faire un blanc si l'échantillon présente une coloration différente des étalons.

Si un volume réactionnel différent de celui indiqué ci-dessus est requis pour la méthode utilisée, le rapport des volumes doit être strictement respecté afin de garantir les performances du dosage. L'utilisateur est responsable de la validation des modifications et de leur impact sur tous les résultats.

Méthode cinétique :

Le dosage peut être réalisé par méthode cinétique en mesurant le changement d'absorption entre 10 et 100 secondes après l'addition du substrat (ΔA_{405}). Dans ce cas, il n'est pas nécessaire de soustraire le blanc échantillon, ni d'arrêter la réaction.

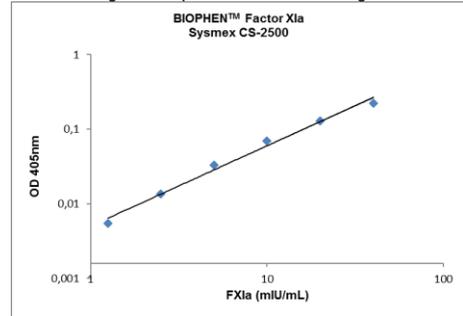
Pour une méthode automatisée, les guides d'applications sont disponibles sur demande. Se référer aux guides d'application et aux précautions spécifiques pour chaque automate.

CALIBRATION:

Le test BIOPHEN™ Factor XIa peut être calibré pour le dosage de FXIa. L'étalon [CAL] peut être utilisé pour générer la courbe de calibration.

- La zone de calibration est environ de 1,25 à 40 mUI/mL (sur Sysmex CS-2400/2500).

La courbe de calibration ci-dessous, est indiquée à titre d'exemple uniquement. La courbe de calibration générée pour la série de dosages doit être utilisée.



CONTRÔLE QUALITE:

L'utilisation de contrôles de qualité permet de valider la conformité de la méthode ainsi que l'homogénéité des dosages entre les différents essais pour un même lot de réactifs.

Inclure des contrôles qualité dans chaque série, selon les bonnes pratiques de laboratoire, afin de valider le test. Une nouvelle courbe de calibration doit être établie, de préférence, pour chaque série d'essai, et au moins pour chaque nouveau lot de réactif ou après chaque maintenance de l'automate, ou quand les valeurs des contrôles de qualité sont mesurées en dehors de la zone d'acceptation définie pour la méthode.

Chaque laboratoire doit établir les zones d'acceptation et vérifier les performances attendues dans son système analytique.

TRACABILITE:

La concentration en FXIa de l'étalon FXIa fourni dans le kit est exactement définie par rapport au Standard international de référence pour FXIa, humain (NIBSC).

RESULTATS:

- Pour la méthode manuelle, en point final, tracer la droite de calibration log-log, en portant en ordonnées la DO à 405 nm et en abscisses la concentration de FXIa en mUI/mL.
- Quand la méthode cinétique est utilisée, utiliser les ΔDO 405 au lieu des DO 405.
- La concentration de FXIa (mUI/mL) dans l'échantillon à doser est déduite directement de la courbe de calibration, lorsque la dilution standard est utilisée.
- Si d'autres dilutions sont utilisées le taux obtenu doit être multiplié par le facteur de dilution complémentaire utilisé.

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.
- Tout réactif présentant un aspect inhabituel ou des signes de contamination doit être rejeté.
- Tout échantillon suspect ou présentant des signes d'activation doit être rejeté.

PERFORMANCES:

- La limite basse de détection dépend du système analytique utilisé.
- La zone de mesure dépend du système analytique utilisé (environ 2,5 à 40 mUI/mL de FXIa sur Sysmex CS-2400/2500).
- Le seuil de détection est évalué sur la courbe d'étalonnage, en mesurant la concentration « apparente » de FXIa correspondant à la DO moyenne obtenue pour un échantillon sans FXIa incrémentée de 3 écart-types (ET). Ce seuil de détection est $< 2,5$ mUI/mL.
- Les études de performances ont été réalisées en interne sur Sysmex CS-2400/2500. Les performances ont été évaluées avec les contrôles du laboratoire. Les résultats suivants ont été obtenus :

Contrôle	Intra-essai			
	N	Moy.	CV%	SD
Niveau 1	10	36,2	0,7	0,27
Niveau 2	10	11,2	2,0	0,22

REFERENCES:

1. Bassem MM. et al. An Update on Factor XI Structure and Function. Thromb. Res. 2018.

SYMBOLES:

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

- [R2] H314 : Provoque des brûlures de la peau et des lésions oculaires graves.
- H318 : Provoque des lésions oculaires graves.
- H360D : Peut nuire au fœtus.

Changements par rapport à la précédente version.