

**BIOPHEN™ Factor X**

REF 221705

R1 R2 4 x 2,5 mL, R3 4 x 5 mL

Méthode chromogène pour dosage du Facteur X plasmatique.  
**POUR LA RECHERCHE UNIQUEMENT.**  
**NE PAS UTILISER DANS LES PROCEDURES DE DIAGNOSTIC.**

Français, dernière révision : 01-2021

**UTILISATION:**

Le coffret BIOPHEN™ Factor X est une méthode chromogène pour la détermination quantitative *in vitro* du Facteur X (FX) sur plasma humain citraté, en utilisant une méthode automatisée ou manuelle.

**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<sup>1,2</sup> :**

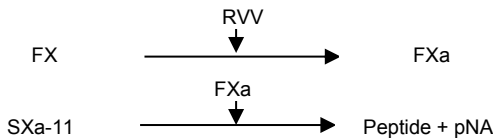
Le FX de la coagulation, ou Facteur Stuart, est un facteur vitamine-K dépendant d'environ 59 KD, synthétisé dans le foie. FX est présent à une concentration d'environ 10 µg/mL dans le plasma et peut être largement variable selon les individus.

Le FX peut être activé par les voies intrinsèque ou extrinsèque de la coagulation. La prothrombine est convertie en thrombine par l'action du FXa, complexé avec le Facteur V en présence de phospholipides et calcium.

**PRINCIPE:**

Dans le dosage BIOPHEN™ Factor X, le FX est mesuré après activation spécifique en Facteur X activé (FXa) par le RVV (Russell's viper venom) une enzyme extraite du venin de serpent. Le FXa hydrolyse ensuite le substrat spécifique Sxa-11 en libérant de la para-nitroaniline (pNA), groupement chromophore mesuré à 405 nm.

Le taux de FX présent dans l'échantillon à doser est donc directement proportionnel à la quantité de FXa formé, déterminée par la quantité de pNA libéré, et mesurée par la densité optique à 405nm.

**REACTIFS:**

**R1 Substrat Sxa-11** : substrat chromogène spécifique du FXa (Sxa-11), lyophilisé.

**R2 RVV (activateur)** : Enzyme hautement purifiée, extraite du RVV, lyophilisée en présence de calcium, et stabilisée, capable d'activer spécifiquement le FX en FXa en présence de calcium. Contient de la BSA.

**R3 Tampon Tris-NaCl** : 10 fois concentré, sous forme liquide. Contient de faibles quantités d'azide de sodium (0,9 g/L).

R1 R2 4 flacons de 2,5 mL

R3 4 flacons de 5 mL

La concentration de RVV est ajustée si nécessaire pour chaque lot afin d'obtenir la réactivité et linéarité optimales pour le dosage.

**MISE EN GARDE ET AVERTISSEMENTS:**

- Certains réactifs de ce coffret contiennent des produits d'origine animale. Ces réactifs d'origine biologique doivent être manipulés avec les précautions d'usage s'agissant de produits potentiellement infectieux.
- L'azide de sodium peut générer des composants explosifs au contact des canalisations en plomb ou en cuivre.
- 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.

**R1 R2** Reconstituer chaque flacon avec exactement **2,5 mL d'eau distillée**.

Agiter vigoureusement jusqu'à dissolution complète, en évitant la formation de mousse et charger directement 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.*

**R3** Agiter le flacon et diluer la solution au **1/10 en eau distillée** (les 5 mL de solution concentrée permettent de préparer 50 mL de solution après dilution).

**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.

**R1** La stabilité du réactif après reconstitution, sous réserve de toute contamination ou d'évaporation, conservé fermé est de :

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

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

- **1 semaine** à 2-8°C.
- **3 jours** à température ambiante (18-25°C).
- **1 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.

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

- **4 semaines** à 2-8°C.
- **7 jours** à 2-8°C, pour la solution diluée.
- **Stabilité à bord de l'automate : se référer à l'application spécifique.**

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

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

- Eau distillée.
- Acide acétique à 20% ou acide citrique à 2% (méthode en point final).
- Etalon et contrôles spécifiques :

Nom du produit	Référence
BIOPHEN™ Plasma Calibrator	222101-RUO
BIOPHEN™ Normal Control Plasma	223201-RUO
BIOPHEN™ Abnormal Control Plasma	223301-RUO

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

**Matériels:**

- Spectrophotomètre, ou automates pour dosage chromogène
- Chronomètre, Pipettes calibrées, tubes pour tests en plastique ou microplaque.

**PRELEVEMENTS ET PREPARATION DES ECHANTILLONS :**

Le sang (9 volumes) doit être collecté sur l'anticoagulant citrate trisodique (1 volume) (0,109M, 3,2%) avec précautions, par ponction veineuse franche. Le premier tube doit être éliminé.

La préparation et la conservation des échantillons doivent être réalisées selon les recommandations locales en vigueur (pour les Etats-Unis, se référer aux recommandations du CLSI H21-A5<sup>3</sup> pour plus d'informations concernant le prélèvement, la manipulation et la conservation). Pour la conservation des plasmas, se référer aux références<sup>4</sup>.

## 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. L'étalonnage peut être réalisé à l'aide d'un pool de plasmas citratés normaux ou d'un plasma étalon à taux de FX connu, soit C qui par définition titre 100% de FX.

Le dosage intègre une dilution du plasma au 1/10. La gamme de calibration va de 0 à 200% de FX. La dilution au 1/5 représente 200% de FX.

Pour un étalon titrant C, le taux de 200% (dans les conditions du dosage) est obtenu en diluant cet étalon par le facteur suivant :  $5 \times C/100$ .

A partir de cette solution faire la gamme d'étalonnage suivante dans le tampon R3 :

Etalon	2C	C	C/2	0
FX (%)	200	100	50	0
Volume Etalon	500µL	250µL	125µL	0µL
Volume Tampon R3	0µL	250µL	375µL	500µL

2. Diluer les échantillons et contrôles dans le tampon R3 comme décrit dans le tableau ci-dessous :

Echantillons	Référence	Dilution en R3
Contrôles	223201-RUO / 223301-RUO	1/10
Echantillons	NA	1/10

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:

	Microplaque	Tube
Plasma ou contrôle dilué ou étalon	50 µL	200 µL
Incuber à 37°C pendant 1 à 2 minutes, puis introduire :		
R1 Substrat Sxa-11, préincubé à 37°C	50 µL	200 µL
Mélanger et incuber à 37°C pendant 1 à 2 minutes, puis introduire :		
R2 RVV, préincubé à 37°C	50 µL	200 µL
Mélanger et incuber à 37°C pendant exactement 2 minutes		
Arrêter la réaction en introduisant :		
Acide citrique (2%)*	50 µL	200 µL
Mélanger et mesurer la densité optique à 405nm 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%), R2, R1, 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 plasma si l'échantillon est icterique, lipémique, hémolysé ou présente une coloration différente des plasmas étalons.

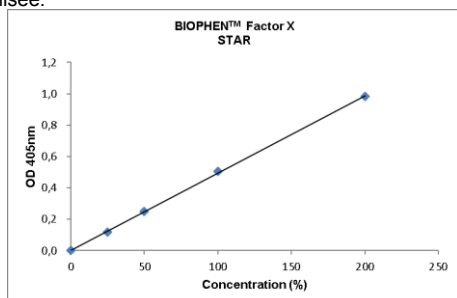
Si un volume réactionnel différent de celui indiqué ci-dessus est requis pour la méthode utilisée, le rapport des volumes doit être strictement respecté afin de garantir les performances du dosage. L'utilisateur est responsable de la validation des modifications et de leur impact sur tous les résultats.

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 X peut être calibré pour le dosage de FX. L'étalon couvrant la zone calibration est disponible chez HYPHEN BioMed (Voir paragraphe REACTIFS ET MATERIEL REQUIS MAIS NON FOURNIS) et peut être utilisé pour générer la courbe de calibration.

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.

### RESULTATS:

- Pour la méthode manuelle, en point final, tracer la droite de calibration lin-lin, en portant en ordonnées la DO à 405 nm et en abscisses la concentration de FX en %.
- Quand la méthode cinétique est utilisée, utiliser les ΔDO 405 au lieu des DO 405.
- La concentration de FX (%) 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 les taux obtenus doivent être multipliés 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.
- La présence d'anticorps anti-FX humain dans le plasma peut interférer sur le dosage.

### PERFORMANCES:

- La limite basse de détection dépend du système analytique utilisé ( $\leq 5\%$  en méthode manuelle).
- La zone de mesure dépend du système analytique utilisé (environ de 5 à 200% de FX en méthode manuelle).
- Dans les conditions décrites, le dosage est strictement spécifique du FX (utilisation de RVV dont l'action est spécifique du FX, absence de phospholipides dans le test, présence d'inhibiteurs spécifiques de la thrombine (hirudine) et de l'héparine (polybrène)).
- Les études de performances ont été réalisées en interne en méthode manuelle. Les résultats suivants ont été obtenus :

Contrôle	Inter-essais			
	n	Moy.	CV%	SD
Echantillon 1	8	101	5,4	5,5
Echantillon 2	8	58	5,4	3,1

- Corrélation avec une autre méthode (BIOPHEN™ Factor X vs FX clotting assay sur KC10) :  
 $n = 47$   $y = 0,87x$   $r = 0,98$
- Interférences : Aucune interférence significative n'a été observée sur le dosage jusqu'à 1UI/mL d'héparine dans le plasma.

### REFERENCES:

1. Bergström K and Egberg N. Determination of vitamin K sensitive coagulation factors in plasma. Studies on three methods using synthetic chromogenic substrates. Thromb. Res. 1978.
2. Lindhout MJ et al. Activation of decarboxy factor X by a protein from Russell's viper venom. Purification and partial characterization of activated decarboxy factor X. Biophys. Acta. 1978.
3. CLSI Document H21-A5: "Collection, transport, and processing of blood specimens for testing plasma-based coagulation assays and molecular hemostasis assays; approved guideline". 2008.
4. Mauge L. and Alhenc-Gelas M. Stabilité pré-analytique des paramètres de la coagulation: revue des données disponibles. Ann Biol Clin. 2014.

### SYMBOLES:

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

**R2** H319 : Provoque une sévère irritation des yeux.

**Changements par rapport à la précédente version.**