

BIOPHEN™ FIX

REF 221801 R1 R2 R3 2 x 1 mL; R4 2 x 15 mL

REF 221802 R1 R2 R3 2 x 2,5 mL; R4 2 x 25 mL

REF 221806 R1 R2 R3 2 x 6 mL; R4 4 x 25 mL



Méthode chromogène pour dosage du Facteur IX
 sur plasma ou concentrés thérapeutiques

Français, dernière révision : 06-2021

UTILISATION :

Le coffret BIOPHEN™ FIX est une méthode chromogène proposée pour la détermination quantitative *in vitro* de l'activité du Facteur IX sur plasma humain citraté ou concentrés thérapeutiques, en utilisant une méthode amidolytique, automatisée ou manuelle.

RESUME ET EXPLICATION :

Technique :

Le Facteur IX (FIX) est une glycoprotéine vitamine K dépendante, intervenant dans les phases intermédiaires de la coagulation. Sa concentration normale dans le plasma humain est d'environ 4 à 5 µg/mL¹. Activé par le Facteur XIa, en présence de calcium, le Facteur IX(a) forme un complexe actif avec le Facteur VIII:C, en présence de calcium et phospholipides, qui active le Facteur X en Facteur Xa².

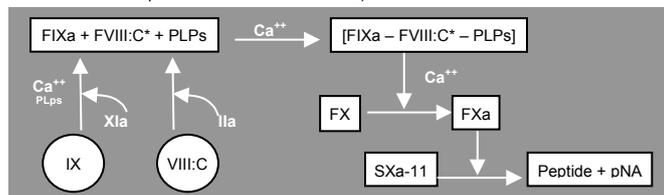
Le coffret BIOPHEN™ FIX est proposé pour le dosage de l'activité du Facteur IX sur plasma ou concentrés thérapeutiques^{3,4}.

Clinique :

Un déficit en Facteur IX (ou facteur anti-hémophilique B) entraîne la pathologie de l'hémophilie B, trouble de la coagulation congénital^{5,6,7,8,9}. Le taux de Facteur IX est diminué chez les patients sous traitement anti-vitamine K, ou dans les pathologies comme les atteintes hépatiques, cirrhose, CIVD. Des concentrations élevées de Facteur IX pourraient être un indicateur de risque accru de thrombose veineuse¹⁰.

PRINCIPE :

La méthode BIOPHEN™ FIX est un dosage chromogène de l'activité du Facteur IX (FIX). En présence de phospholipides (PLPs) et calcium, le Facteur XIa (FXIa) active le FIX, présent dans l'échantillon testé, en Facteur IX activé. Le Facteur VIII:C activé (FVIIIa) par la thrombine forme un complexe enzymatique avec le Facteur IXa pour activer le Facteur X. 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 405nm) est directement proportionnelle à la concentration de Facteur IX dans l'échantillon (le Facteur XIa, le Facteur VIII:C et le Facteur X étant en quantité constante et en excès).



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

REACTIFS :

R1 Réactif 1 : FX(h)-FVIII:C : Facteur X humain, et FVIII:C, lyophilisé. Contient du calcium chlorure dihydrate, du sulfate de cuivre, un inhibiteur de polymérisation de la fibrine et des stabilisants.

R2 Réactif 2 : Réactif activateur : lyophilisé. Contient du Facteur XIa humain, en quantité constante et optimisée, de la thrombine humaine, du calcium chlorure dihydrate, de l'imidazole, des phospholipides synthétiques et des stabilisants.

R3 Réactif 3 : Substrat : Substrat chromogène spécifique du Facteur Xa (SXa-11), lyophilisé. Contient un inhibiteur du Facteur XIa.

R4 Réactif 4 : Tampon : Tampon réactionnel Tris-BSA. Contient 1% de BSA, PEG, des stabilisants du Facteur VIII:C et de faibles quantités d'azide de sodium (0,9 g/L) comme conservateur.

REF 221801 → R1 R2 R3 2 flacons de 1 mL.

R4 2 flacons de 15 mL.

REF 221802 → R1 R2 R3 2 flacons de 2,5 mL.

R4 2 flacons de 25 mL.

REF 221806 → R1 R2 R3 2 flacons de 6 mL.

R4 4 flacons de 25 mL.

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 infectueux.
- 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 de diagnostic *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 R3 Reconstituer chaque flacon avec exactement

REF 221801 → 1 mL d'eau distillée.

REF 221802 → 2,5 mL d'eau distillée.

REF 221806 → 6 mL d'eau distillée.

Agiter vigoureusement jusqu'à **dissolution complète** (vérifier l'absence de dépôt sur le fond du flacon R3), 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.

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.

REF 221802 / 221806 :

R1 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. Procéder à une nouvelle calibration avec le réactif congelé.

REF 221801 :

R1 R2 R3 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).
- Stabilité à bord de l'automate : se référer à l'application spécifique.

REF 221801 / 221802 / 221806 :

R4 Dans son emballage d'origine, et conservé à 2-8°C, le réactif est stable jusqu'à la date de péremption indiquée sur le coffret, sous réserve de toute contamination ou d'évaporation.

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).
- Matériel de référence pour dosage des concentrés thérapeutiques en Facteur IX (international ou interne).
- Etalons et contrôles spécifiques avec titration connue tels que :

Nom du produit	Reference
BIOPHEN™ Plasma Calibrator	222101
BIOPHEN™ Normal Control Plasma	223201
BIOPHEN™ Abnormal Control Plasma	223301

- Pour réaliser l'étalonnage en gamme basse, diluer l'étalon en plasma déficient Facteur IX (DP050A/K).

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

Matériels :

- Spectrophotomètre ou automates pour dosage chromogène.
- Chronomètre, Pipettes calibrées.

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-A5¹¹ pour plus d'informations concernant le prélèvement, la manipulation et la conservation).

Pour la conservation des plasmas, se référer aux références¹².

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 évaluée à 405nm.

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.

Méthode de dosage :

1. Reconstituer les étalons et les contrôles comme indiqué dans les notices spécifiques. Les étalons doivent être dilués dans du tampon R4 comme décrit ci-dessous afin d'effectuer la gamme de calibration ("C" définit la concentration en Facteur IX):

Gamme haute (5 à 200%) :

Lorsque la gamme de calibration est réalisée à l'aide d'un plasma étalon commercial (ex : BIOPHEN™ Plasma Calibrator), la dilution au **1/100** correspond à la concentration (C) en Facteur IX indiquée, et le **1/50** à deux fois cette concentration. Pour un étalon titrant C, le taux de 200% (dans les conditions du dosage) est obtenu en diluant cet étalon par le facteur suivant : **50x(C)/100**.

La gamme de calibration peut également être réalisée à l'aide d'un pool de plasma citratés normaux (au moins 30 individus normaux, hommes et femmes, de 18 à 55 ans, sans traitement ou pathologie connus), qui par définition titre **100%** de Facteur IX. Le dosage intègre une dilution du plasma au **1/100**, qui représente par définition le taux 100% de Facteur IX. La gamme de calibration va de **5 à 200%** de Facteur IX. La dilution au **1/50** en tampon R4 représente **200%** de Facteur IX.

Préparer **2 mL** de la dilution **1/50** du pool de plasmas normaux, ou une dilution (**50x(C)/100**) du plasma étalon tiré en Facteur IX (soit C1). Cette solution titre 200% Facteur IX ; préparer la gamme d'étalonnage suivante par dilutions successives dans le tampon R4 comme décrit dans le tableau ci-dessous afin d'effectuer la gamme de calibration:

Etalon FIX(%)	C1	C2	C3	C4	C5	0
	200	100	50	25	5	0
Volume Etalon	1000µL de C1	500µL de C1	500µL de C2	500µL de C3	100µL de C4	0µL
Volume Tampon R4	0µL	500µL	500µL	500µL	400µL	500µL

La gamme d'étalonnage peut également être réalisée à partir d'un matériel de référence titré en Facteur IX (standard international ou standard interne).

Prédiluer ce matériel en tampon R4 pour obtenir une solution à **1 UI/mL** puis effectuer une dilution au **1/50** en R4 pour obtenir une solution à **200%** (2UI/mL) de Facteur IX. Effectuer à partir de cette solution une gamme d'étalonnage en tampon R4 comme expliqué précédemment.

Gamme basse (0 à 20%) :

L'étalonnage peut être réalisé à l'aide d'un pool de plasmas citratés normaux ou d'un plasma étalon commercial à taux de Facteur IX connu, soit C. Diluer ce plasma avec du plasma déficient en Facteur IX (DP050A/K) de façon à obtenir un taux de **20 %** (le facteur de dilution en plasma déficient est de 5 pour le pool normal, ou de **5x(C)/100** pour un étalon à taux C). Le dosage intègre une dilution du plasma au **1/20**. La gamme de calibration va de **1 à 20%** de Facteur IX. La dilution au **1/20** en tampon R4 représente **20%** de Facteur IX.

A partir de cette solution faire la gamme d'étalonnage suivante dans le tampon R4 :

FIX(%)	20	10	5	2,5	1	0
Volume Etalon 20% FIX	500µL	250µL	125µL	65µL	25µL	0µL
Volume Tampon R4	0µL	250µL	375µL	455µL	475µL	500µL

Réaliser la gamme extemporanément afin d'éviter toute dégradation du Facteur IX.

2. Diluer les échantillons dans du tampon R4 comme décrit dans le tableau ci-dessous :

Echantillons	Référence	Gamme	Dilution
Contrôle	223201/223301	Haute	1/100
		Basse (après pré-dilution 1/10 en Déficier IX)	1/20
Echantillons	N.A.	Haute	1/100
		Basse	1/20

Pour les concentrés thérapeutiques de Facteur IX, l'échantillon à tester (**en gamme haute**) doit être pré-dilué en R4 pour cibler une concentration de Facteur IX d'environ 1 UI/mL. Il est recommandé d'effectuer une pré-dilution, afin d'amener la concentration théorique de Facteur IX **entre 0,2 et 2 UI/mL**, puis une dilution **1/100** en R4 pour la réalisation du test. La concentration en Facteur IX attendue se situe ainsi entre 20 et 200%. (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 kit.

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

Echantillons, contrôles ou étalons dilués en R4	Microplaque	Volume
R1 FIX(h)-VIII:C préincubé à 37°C	50 µL	200 µL
Mélanger et incubé à 37°C pendant 2 minutes, puis introduire :		
R2 Réactif activateur préincubé à 37°C	50 µL	200 µL
Mélanger et incubé à 37°C pendant 3 minutes puis introduire :		
R3 Substrat Sxa-11 préincubé à 37°C	50 µL	200 µL
Mélanger et incubé à 37°C, pendant 2 minutes exactement		
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 de celui du test : Acide Citrique (2%), R3, 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 le plasma est icterique, lipémique, hémolysé ou présente une coloration différente des plasmas étalons.

Quand la méthode cinétique est utilisée, utiliser les DDO 405 au lieu des DO 405.

Méthode cinétique :

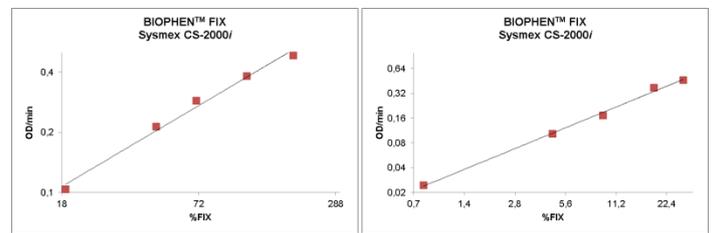
Le dosage peut être réalisé par méthode cinétique en mesurant le changement d'absorbance entre 10 et 100 secondes après l'addition du substrat (soit ΔA405). Dans ce cas il n'est pas nécessaire de soustraire le blanc échantillon, ni d'arrêter la réaction.

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.

CALIBRATION :

Le test BIOPHEN™ FIX peut être calibré pour le dosage du Facteur IX sur plasmas ou concentrés thérapeutiques. L'étalon plasmatique couvrant la zone de test dynamique est disponible chez HYPHEN BioMed (Voir paragraphe REACTIFS ET MATERIEL REQUIS MAIS NON FOURNIS) et peut être utilisé pour générer la courbe de calibration.

Les courbes de calibration ci-dessous sont indiquées à titre d'exemple uniquement. La courbe de calibration générée pour la série de dosages doit être utilisée.



CONTROLE 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 par 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 log-log, en portant en ordonnées la DO à 405 nm et en abscisses la concentration de Facteur IX en pourcentage.
- La concentration de Facteur IX (%) dans l'échantillon à doser est déduite directement de la courbe de calibration, si la dilution standard est utilisée.
- Les résultats doivent être interprétés selon l'état clinique et biologique du patient.
- Si d'autres dilutions sont utilisées, le taux obtenu est le taux mesuré multiplié par le facteur de dilution complémentaire utilisé.

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.

VALEURS ATTENDUES :

La valeur normale en Facteur IX d'un plasma adulte est généralement comprise entre 73 et 167% (Sysmex CS-5100). Cependant, chaque laboratoire doit établir son propre intervalle normal.

PERFORMANCES :

- La limite basse de détection sur automate est inférieure à **2% en gamme haute** et inférieure à **0,5% en gamme basse**.
- Le domaine de mesure sur Sysmex CS-2000i est compris entre **1 et 250%** pour la gamme haute, et **0,8 à 30%** pour la gamme basse (et habituellement autour de **5 à 200 %** en gamme haute, et **1 à 20%** en gamme basse).
- Les études de performances ont été réalisées en interne sur 1 lot de réactif sur Sysmex CS-2000i. Les performances ont été évaluées avec les contrôles du laboratoire sur 20 jours, 2 séries par jour et 2 répétitions à chaque série pour un niveau de contrôle. Les résultats suivants ont été obtenus :

Contrôle	Gamme haute				Gamme basse							
	N	Moy.	SD	CV%	n	Moy.	SD	CV%	n	Moy.	SD	CV%
Normal	30	85,7	1,0	1,2	80	83,1	4,1	4,9	80	8,3	0,5	6,2
Anormal	30	36,5	0,9	2,4	80	35,7	2,0	5,6	80	3,6	0,2	6,4

- Corrélation avec une autre méthode (STA® C.K. PREST® sur STA-R vs BIOPHEN™ FIX sur Sysmex CS-5100) :
 $n = 102$ $y = 0,97x - 0,10$ $r = 0,983$

Interférences :

Pas d'interférence jusqu'à (Sysmex CS-2000i, gamme haute) :

Intralipides (mg/dL)	Hémoglobines (mg/dL)	Dabigatran (ng/mL)	Bilirubine (F/C) (mg/dL)	Apixaban (ng/mL)	Héparines (HNF/HBPM) (UI/mL)
1000	1000	500	60	50	2

Se référer au guide d'application spécifique.

REFERENCES :

- Lowe G.D.O. et al. Epidemiology of coagulation factors, inhibitors and activation markers : The third glasgow MONICA survey I. Illustrative reference ranges by age, sex and hormone use. British Journal of Haematology, 1997, 97, 775-784.
- Taran LD. "Factor IX of the blood coagulation system: a review", Biochemistry (Mosc.), 62(7):685-93, 1997.
- Wagenvoord R. et al., "Development of a sensitive and rapid chromogenic FIX assay for clinical use", Haemostasis, 20(5): 276-88, 1990.
- Bowyer A.E. et al. Role of chromogenic assays in haemophilia A and B diagnosis. Haemophilia. 2018; 1-6.
- Parekh V.R. et al., "Immunological heterogeneity of haemophilia B: a multicentre study of 98 kindreds", Br J Haematol, 40(4):643:55, 1978.
- Orstavik KH. et al., "Detection of carriers of haemophilia B", Br J Haematol, 42(2):293-301, 1979.
- www.ncbi.nlm.nih.gov, OMIM, Haemophilia B, FIX deficiency, +306900, +134540, +134510, +134520.
- Kitchen S. et al. A computer-based model to assess costs associated with the use of factor VIII and factor IX one-stage and chromogenic activity assays. J Thromb Haemost 2016; 14 : 757-764.
- Sorensen M.H. et al. Factor IX deficient plasma spiked with N9-GP behaves similarly to N9-GP post administration clinical samples in N9-GP ELISA and FIX activity assays. Haemophilia (2015), 21, 832-836.
- Van Hylckama Vlieg A. et al., "High levels of factor IX increase the risk of venous thrombosis", Blood, 95(12):3678-82, 2000.
- CLSI Document H21-A5 : "Collection, transport, and processing of blood specimens for testing plasma-based coagulation assays and molecular hemostasis assays; approved guideline". Fifth Edition, 28, 5, 2008.
- Mauge L. and Alhenc-Gelas M. Stabilité pré-analytique des paramètres de la coagulation: revue des données disponibles. Ann Biol Clin. 2014.

SYMBLES :

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

R1 H412 : Nocif pour les organismes aquatiques, entraîne des effets néfastes à long terme.

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.