

BIOPHEN™ Factor IXa

REF 221812

R1 R2 R3 2 x 2,5 mL, R4 2 x 25 mL, CAL 2 x 1 mL

155 rue d'Eragny, 95000 Neuville-sur-Oise, France

Tél : +33 (0)1 34 40 65 10

Fax : +33 (0)1 34 48 72 36

www.hyphen-biomed.com

info@hyphen-biomed.com

Méthode chromogène pour la détermination de l'activité du Facteur IXa.

POUR LA RECHERCHE UNIQUEMENT.

NE PAS UTILISER DANS LES PROCEDURES DE DIAGNOSTIC.

Français, dernière révision : 12-2021

UTILISATION:

Le coffret BIOPHEN™ Factor IXa est une méthode chromogène pour la détermination quantitative *in vitro* de l'activité du Facteur IX activé (FIXa), 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 :

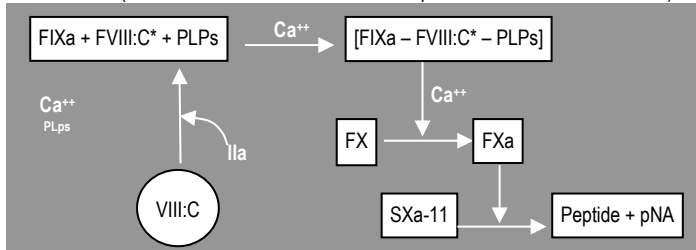
Le Facteur IX (FIX) est une glycoprotéine vitamine K dépendante, intervenant dans les phases intermédiaires de la coagulation. Sa concentration normale dans le plasma humain est d'environ environ 4 à 5 µg/mL¹.

Activé par le FXIa, en présence de calcium, le FIXa forme un complexe actif avec le Facteur VIII:C (FVIII:C), en présence de calcium et phospholipides, qui active le Facteur X en Facteur X activé (FXa)².

PRINCIPE:

En présence de Phospholipides (PLPs) et Calcium, le FIXa, présent dans l'échantillon testé, forme un complexe enzymatique avec le FVIII:C activé par la thrombine, 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 FIXa dans l'échantillon (le FVIII:C et le Facteur X étant en quantité constante et en excès).



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

REACTIFS:

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

R2 Réactif « activateur » : Lyophilisé. Contient de la Thrombine humaine, calcium, imidazole, phospholipides synthétiques, des stabilisants et de la BSA.

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

R4 Tampon : Tampon Tris-BSA. Contient 1% de BSA, PEG, des stabilisants du FVIII:C et des conservateurs.

CAL Etalon FIXa : FIXa humain purifié, lyophilisé, contenant une quantité titrée de FIXa d'approximativement 20 mUI/mL.

R1 R2 R3 2 flacons de 2,5 mL.

R4 2 flacons de 25 mL.

CAL 2 flacons de 1 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.

R1 R2 R3 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.

CAL Reconstituer chaque flacon avec exactement 1 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 15 min à température ambiante (18-25°C), homogénéiser avant utilisation.

R4 Réactif prêt à l'emploi, homogénéiser 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.

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 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.

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.

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).
- Contrôles spécifiques :

Nom du produit	Référence
BIOPHEN™ FIXa Control Set	224601 / 224601-C2

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 en verre siliciné ou microplaque.

ECHANTILLONS:

FIXa en milieu purifié ou concentrés thérapeutiques en Facteur IX.

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 (méthode manuelle):

1. Reconstituer les contrôles comme indiqué dans les notices spécifiques. Pour la courbe de calibration, diluer l'étalon au 1/2 dans du tampon R4 pour obtenir la concentration « C » (d'environ 20 mUI/mL), ensuite, préparer la courbe de calibration comme décrit dans le tableau ci-dessous afin de préparer la gamme de calibration (« C » définit la concentration en FIXa) :

Etalon	C	C/2	C/4	C/10	C/20	0
Volume d'étalon à C	1mL	0,5mL	0,25mL	0,125mL	0,050mL	0mL
Volume de tampon R4	0mL	0,5mL	0,75mL	0,875mL	0,950mL	1mL

Préparer la courbe de calibration juste avant utilisation pour éviter toute dégradation du FIXa.

La gamme d'étalonnage peut également être réalisée à partir d'un matériel de référence titré en FIXa (standard international ou standard interne). Prédiluer ce matériel au moins au 1/2 en tampon R4 pour obtenir une solution à « C » (mUI/mL) de FIXa, puis effectuer à partir de cette solution une gamme d'étalonnage en tampon R4 comme expliqué précédemment.

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

Echantillons	Référence	Dilution
Contrôle	224601 / 224601-C2	1/2
Echantillons	N.A.	1/2

Pour doser le FIXa dans les concentrés de Facteur IX, l'échantillon à tester doit être pré-dilué au moins au 1/2 en tampon R4. Si nécessaire, il est recommandé d'effectuer une pré-dilution, afin d'amener la concentration théorique de FIXa entre 3 et 15 mUI/mL en R4, puis une dilution 1/2 en R4 pour la réalisation du test. La concentration ainsi 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:

	Microplaque	Volume
Echantillons, contrôles et étalons dilués en R4	50 µL	200 µL
R1 FX(h)-VIII:C préincubé à 37°C	50 µL	200 µL
Mélanger et incuber 2 minutes à 37°C, puis introduire :		
R2 Réactif « activateur »	50 µL	200 µL
Mélanger et incuber 3 minutes à 37°C, puis introduire :		
R3 Substrat Sxa-11 préincubé à 37°C	50 µL	200 µL
Mélanger et incuber exactement 3 minutes à 37°C :		
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%), 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 si l'échantillon présente une coloration différente des étalons.

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

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 (soit ΔA405). Dans ce cas il n'est pas nécessaire de soustraire le blanc échantillon, ni d'arrêter la réaction.

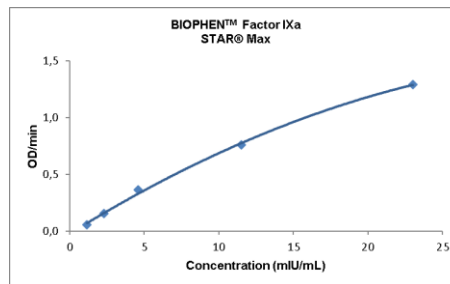
Pour une méthode automatisée, les guides d'applications sont disponibles sur demande. Se référer aux guides d'application et aux précautions spécifiques pour chaque automate.

CALIBRATION:

Le test BIOPHEN™ Factor IXa peut être calibré pour le dosage de FIXa. L'étalon peut être utilisé pour générer la courbe de calibration.

- La zone de calibration est environ de 1 à 20 mUI/mL (sur STAR).

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 FIXa de l'étalon FIXa fourni dans le kit est exactement définie par rapport à l'International Standard de référence pour FIXa, 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 FIXa en mUI/mL.
- Quand la méthode cinétique est utilisée, utiliser les ΔDO 405 au lieu des DO 405.
- La concentration de FIXa (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 de 1 à 20 mUI/mL de FIXa sur STA-R®-series).
- La limite de détection est déterminée en mesurant sur la courbe d'étalonnage le « taux apparent » de FIXa, correspondant à la DO moyenne obtenue pour un taux réactionnel sans FIXa incriminée de 3 écart-types (SD). Cette limite de détection est d'environ 0,1 mUI/mL (soit environ 0,1 ng/mL).
- Les études de performances ont été réalisées en interne sur STA-R® Max. Les résultats suivants ont été obtenus :

Contrôles	Intra-essai			
	N	Moy.	CV%	SD
Contrôle 1	10	8,8	2,9	0,3
Contrôle 2	10	19,1	0,9	0,2

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.
- Taran LD. Factor IX of the blood coagulation system: a review. Biochemistry (Mosc.) 1997.
- 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.

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.