



Deficient Plasma for Factors VIII:C, IX, XI, XII

 	REF	DP040A / K	DP	1 x 1 mL / 6 x 1 mL
	REF	DP050A / K	DP	1 x 1 mL / 6 x 1 mL
	REF	DP070A / K	DP	1 x 1 mL / 6 x 1 mL
	REF	DP080A / K	DP	1 x 1 mL / 6 x 1 mL

Plasma déficient pour le dosage des Facteurs VIII :C, IX, XI et XII par méthode coagulante.

Français, dernière révision : 01-2021

UTILISATION:

Les coffrets Factor VIII :C Deficient Plasma, Factor IX Deficient Plasma, Factor XI Deficient plasma et Factor XII Deficient Plasma sont respectivement proposés pour la détermination quantitative de l'activité du Facteur VIII :C (FVIII :C), du Facteur IX (FIX), du Facteur XI (FXI) ou du Facteur XII (FXII) présent dans le plasma humain citraté en utilisant une méthode coagulante, en présence de céphaline, activateur (réactif TCA) et calcium, via une méthode manuelle ou automatisée.

RESUME ET EXPLICATION:

Technique¹ :

La voie intrinsèque est déclenchée par l'activation de contact du facteur XII, qui se traduit par une activation protéolytique séquentielle des FXI et FIX. Le FIX activé forme ensuite, avec son cofacteur (FVIII activé), un complexe tenase à la surface des phospholipides pour activer le Facteur X.

Clinique^{1,2,3} :

La plupart des personnes atteintes d'un déficit en FXII sont asymptomatiques, mais il peut rarement y avoir une légère tendance aux saignements. La tendance hémorragique chez les personnes présentant un déficit en FXI est souvent légère, même chez les patients atteints d'une maladie homozygote, et les symptômes ne sont pas toujours liés au niveau de FXI mesuré. Le trouble de saignement congénital causé par un déficit en FVIII ou FIX est appelé respectivement hémophilie A et B. L'hémophilie peut être classée comme sévère, modérée ou légère, en fonction des taux plasmatiques de FVIII ou de FIX chez les personnes touchées. Les déficits congénitaux ou acquis des facteurs de coagulation du système intrinsèque présentent un temps de céphaline activée prolongé (TCA).

PRINCIPE:

La technique proposée est basée sur une méthode de coagulation où tous les facteurs de coagulation sont présents (constants et en excès, apportés par le plasma déficient), à l'exception du facteur à doser, qui est apporté par le plasma à tester, dilué, et la coagulation est déclenchée par la céphaline, l'activateur (réactif TCA) et le calcium. Le facteur à doser est le facteur limitant et le temps de coagulation est inversement proportionnel à la concentration de facteur à doser. Il en résulte une relation linéaire inverse, en coordonnées bilogarithmiques, entre la concentration en facteur à doser et le temps de coagulation correspondant.

REACTIFS:

DP Plasma humain citraté, déficient en facteur à doser (FVIII :C, FIX, FXI ou FXII), lyophilisé en présence de glycine et de stabilisants. Ce plasma est déficient pour le facteur à doser (FVIII :C, FIX, FXI ou FXII) (<1%), tandis que tous les autres facteurs de coagulation sont autour de la zone normale (> 50%).

Factor VIII :C Deficient Plasma

REF DP040A → 1 flacon de 1 mL.

REF DP040K → 6 flacons de 1 mL.

Factor IX Deficient Plasma

REF DP050A → 1 flacon de 1 mL.

REF DP050K → 6 flacons de 1 mL.

Factor XI Deficient plasma

REF DP070A → 1 flacon de 1 mL.

REF DP070K → 6 flacons de 1 mL.

Factor XII Deficient Plasma

REF DP080A → 1 flacon de 1 mL.

REF DP080K → 6 flacons de 1 mL.

MISE EN GARDE ET AVERTISSEMENTS:

- Certains réactifs de ce coffret contiennent des produits d'origine humaine. Lorsque du plasma humain a été utilisé dans la préparation de ces réactifs, la recherche de l'antigène HBs, des anticorps anti-VHC, 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 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.

DP 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 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.

DP 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 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.

REACTIFS ET MATERIELS REQUIS MAIS NON FOURNIS:

Réactifs:

- Eau distillée.
- Tampon Imidazole (AR021B/AR021K/AR021L/AR021M/AR021N).
- CaCl₂ à 0,025 M (AR001B/AR001K/AR001L).
- Réactif TCA (CEPHEN™, CK511K, CK512K, CK515K, CK515L).
- Etalon et contrôles spécifiques avec titration connue tels que :

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

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

Matériels:

- Bain-Marie électromagnétique, automate de coagulation semi-automatique ou automatique.
- Chronomètre, Pipettes calibrées, tubes pour tests en plastique ou en verre siliciné.

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 États-Unis, se référer aux recommandations du CLSI H21-A5⁴ pour plus d'informations concernant le prélèvement, la manipulation et la conservation).

Pour la conservation des plasmas, se référer aux références^{4,5,6}.

PROCEDURE:

Méthode de dosage:

1. Reconstituer les étalons et les contrôles comme indiqué dans les notices spécifiques. Préparer 2 mL de pool de plasma humain normal dilué au 1/10 en tampon Imidazole. Par définition, la dilution au 1/10 de pool de plasma normal citraté correspond à la concentration de **100% de facteur à doser**. Utiliser cette dilution au 1/10 pour préparer la gamme d'étalonnage suivante :

Dilution	1/160	1/80	1/40	1/20	1/10
Facteur VIII:C, IX, XI ou XII (%)	6,25*	12,5	25	50	100
Pool de plasma 1:10	0,060 mL	0,125 mL	0,250 mL	0,500 mL	1 mL
Tampon Imidazole	0,900 mL	0,875 mL	0,750 mL	0,500 mL	0 mL

*dilution supplémentaire recommandée pour une meilleure précision pour les valeurs $\leq 10\%$.

La gamme d'étalonnage peut également être réalisée avec le BIOPHEN™ Plasma Calibrator (222101) en utilisant le taux indiqué (C) pour le facteur à doser sur le papillon du lot utilisé. La courbe de calibration doit être préparée juste avant de commencer le dosage. La gamme d'étalonnage ainsi préparée est stable pendant 2 heures à température ambiante (18-25°C).

2. Diluer les plasmas à doser et contrôles en tampon Imidazole comme décrit ci-dessous :

Echantillon	Reference	Dilution
Contrôle	223201/223301	1/10
Echantillon	N.A.	1/10

3. Dans un tube à hémolyse, ou une cuvette réactionnelle, introduire:

	Volume
Plasma déficient	100 μ L
Point de calibration, ou plasma dilué ou contrôles dilués au 1/10	100 μ L
Mélanger et incuber à 37°C, pendant 1 minute puis introduire :	
Réactif TCA (céphaline)	100 μ L
Mélanger et incuber à 37°C, pendant exactement 3 minutes puis introduire (en déclenchant le chronomètre) :	
Chlorure de Calcium 0,025M préincubé à 37°C.	100 μ L
Noter le temps de coagulation exact (TC) (sec)	

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.

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 :

L'étalon 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.

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, tracer la droite de calibration log-log, en portant en ordonnées le temps de coagulation (sec) et en abscisses la concentration de facteur à doser en %.
- La concentration de facteur à doser (%) dans l'échantillon à doser est déduite directement de la courbe de calibration, lorsque la dilution standard est utilisée.
- Les résultats doivent être interprétés selon l'état clinique et biologique 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.
- Pour une meilleure précision des résultats, les échantillons mesurés $\leq 10\%$, peuvent être testés à la dilution 1/5 et les résultats obtenus divisés par 2 ; pour des échantillons mesurés $>100\%$ (ou C%) la dilution 1/20 peut être utilisée et les résultats obtenus multipliés par 2.
- Pour un échantillon déficient : vérifier le résultat en testant si nécessaire la dilution 1/5 (la concentration obtenue sera divisée par 2), et/ou sur un autre prélèvement et/ou une autre méthode ; vérifier la déficience potentielle en autre(s) facteur(s) associé(s).
- La présence d'inhibiteurs de la thrombine dans l'échantillon à tester est susceptible d'entraîner une sous-estimation de la concentration de facteur à doser.

VALEURS ATTENDUES:

La valeur normale en facteur VIII:C d'un plasma adulte est généralement comprise entre 50 et 150% et les valeurs normales en facteur IX, XI et XII d'un plasma adulte sont habituellement $> 60\%$ ⁷. Cependant, chaque laboratoire doit établir son propre intervalle normal.

REFERENCES:

1. Grover SP. And Mackman N. Intrinsic Pathway of Coagulation and Thrombosis. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2019
2. Winter WE. et al. Coagulation Testing in the Core Laboratory. Lab Medicine. 2017.
3. Peyvandi F. et al. Rare bleeding disorders. Haemophilia. 2008.
4. CLSI Document H21-A5: "Collection, transport, and processing of blood specimens for testing plasma -based coagulation assays and molecular hemostasis assays; approved guideline". 2008.
5. Woodhams B. et al. Stability of coagulation proteins in frozen plasma. Blood coagulation and Fibrinolysis. 2001.
6. Mauge L. and Alhenc-Gelas M. Stabilité pré-analytique des paramètres de la coagulation: revue des données disponibles. Ann Biol Clin. 2014.
7. Monagle P. et al. Impact for clinical haemostasis laboratories. Developmental haemostasis. 2006.

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.*