

1 INTERET DU COFFRET

Détermination du facteur IX (FIX) activité dans le plasma et les concentrés de FIX.

2 BIOCHIMIE

Le facteur IX est une glycoprotéine simple chaîne, vitamine K dépendante, d'un poids moléculaire d'environ 55 KDa qui est activée par le FXIa ou facteur tissulaire / VIIa. Le facteur IX activé (FIXa) active le FX en FXa en présence de FVIII, de phospholipides et d'ions calcium.

3 PRINCIPE DE MESURE

L'activité du FIX est déterminée par méthode chromogène, dans laquelle le FIX humain est activé par le FXIa humain et où le FIXa humain active le FX humain en présence de FVIII humain, d'ions calcium et de phospholipides. De façon similaire aux conditions *in vivo*, le FVIII est activé par la thrombine générée pendant l'incubation. La quantité de FXa formée est reliée à l'activité du FIX et est déterminée à partir de l'hydrolyse d'un substrat chromogène du FXa. L'activité du FIX de l'échantillon est assignée par rapport à un FIX plasmatique ou par rapport à un étalon concentré de FIX exprimé en Unités Internationales (UI).

4 COMPOSITION DU COFFRET

Réactif A (2 flacons) – REF 9010

Le réactif A contient les facteurs lyophilisés humains FVIII et FX, du FV bovin ainsi qu'un inhibiteur de la polymérisation de la fibrine.

Réactif B (2 flacons) – REF 9020

Le Réactif B contient les facteurs humains lyophilisés FXIa et FII, du chlorure de calcium et des phospholipides.

Substrat FXa, 6 mL (1 flacon) – REF 9080

Solution liquide de substrat chromogène FXa (Z-D-Arg-Gly-Arg-pNA), 2,5 mmol/L, contenant un inhibiteur de la thrombine.

Tampon de Dilution FIX, Solution Mère, 20 mL (1 flacon) – REF 9050

Solution liquide concentrée de tampon de dilution, contenant un antagoniste de l'héparine.

5 PRECAUTIONS ET AVERTISSEMENTS

Les réactifs sont assortis – associez uniquement les réactifs du même lot de coffret.

ATTENTION: Chaque unité de donneur utilisée dans les réactifs a été testée selon les méthodes approuvées par la FDA pour la présence de l'antigène de surface de l'hépatite B et les anticorps VIH 1 et 2 et de l'hépatite C et se sont révélés négatifs. Toutefois, comme aucun test ne peut complètement exclure la présence récentes de ces maladies dans le sang, la manipulation et l'élimination de ces réactifs d'origine humaine doivent être effectuées avec les précautions nécessaires, et traités comme étant potentiellement infectieux.

6 PREPARATION

Réactif A

Reconstituer avec 1.4 mL d'eau. Laisser reposer 5 min à 20-25°C en mélangeant de temps en temps pour une reconstitution complète.

Réactif B

Reconstituer avec 8.0 mL d'eau. Laisser reposer 5 min à 20-25°C en mélangeant de temps en temps pour une reconstitution complète.

Substrat FXa, 6 mL

Prêt à l'emploi. Préchauffer à 37°C

Tampon de Dilution FIX, Solution Mère, 20 mL

Diluer 1 volume de solution mère + 9 volume d'eau (voir note) pour obtenir une solution de travail de Tris-HCl à 0.025 mol/L, pH 7.9, contenant 1% de BSA (albumine sérique bovine) et un antagoniste de l'héparine. NB: Le volume du flacon est légèrement plus important. Vérifier toujours le volume souhaité avant dilution de la solution mère par de l'eau.

Note: Toutes les reconstitutions et dilutions devraient être faites avec de l'eau d'une qualité minimum NCCLS Type II ou avec de l'eau Ph Eur pour injection.

7 CONSERVATION ET STABILITE

Les composants non ouverts sont stables à 2-8°C jusqu'à la date d'expiration indiquée sur l'emballage. Eviter toute contamination des réactifs par des micro-organismes.

- **Réactif A:** La stabilité après reconstitution est de 72 heures à 2-8°C, de 8 h à 20-25°C et de 12 mois si la température < -70°C.
- **Réactif B:** La stabilité après reconstitution est de 72 heures à 2-8°C, de 8 h à 37°C et de 12 mois si la température < -70°C.
- **Substrat Chromogène FXa:**
- Un flacon entamé est stable pendant 1 mois à 2-8°C et pendant 12 mois si la température < -20°C.

Tampon de Dilution FIX

Solution Mère : Un flacon entamé est stable pendant 1 mois à 2-8°C

La solution tampon de travail doit être utilisée le jour où elle a été préparée.

8 MATERIAUX REQUIS NON FOURNIS

- Eau déminéralisée, eau de Type II NCCLS ou Ph. Eur pour préparations injectables ou de qualité supérieure.
- Pour calibration: Plasma humain ou concentré de FIX avec une activité de FIX assignée par l'organisation internationale OMS pour les standards.
- Acide citrique, 2% (pour méthode en point final)
- Pipettes calibrées
- Photomètre, 405 nm (et 490 nm pour méthode en point final)
- Incubateur chauffant à 37°C
- Tube à essai en plastique
- Chronomètre
- Mixeur type Vortex

Pour des tests avec microplaques, s'assurer d'utiliser des microplaques en plastique neutres.

9 SYMBOLES UTILISES



Dispositif médical de diagnostic *In Vitro*



Température limite de conservation



Référence catalogue



Consultez les instructions d'utilisation



Désignation du lot



Risques biologiques



Date de péremption



Fabricant



Marquage CE

10 PRELEVEMENT ET TRAITEMENT

Le prélèvement d'échantillons doit être en conformité avec les recommandations pour les tests de l'hémostase. Du sang veineux fraîchement prélevé (9 volumes) doit être collecté sur une solution anticoagulante de citrate tri sodique de concentration 0.109 M (1 volume). Utilisez des tubes à essai en verre silicé ou en plastique. Centrifuger pendant 15 minutes à 2000-2500 g. Reportez-vous à la directive CLSI H21-A5 pour obtenir des instructions sur la collecte de l'échantillon, la manipulation et le stockage.

11 CONTROLE QUALITE

Des plasmas pour le contrôle qualité avec une valeur de FIX activité sont disponibles et commercialisés et doivent être utilisés pour la validation de la courbe d'étalonnage. Les contrôles normaux et anormaux sont recommandés pour un programme de contrôle qualité complet. Les contrôles doivent être traités comme les échantillons. Chaque laboratoire doit établir ses propres normes de contrôle qualité, soit par l'intermédiaire de valeurs cibles avec des fourchettes fournies par le fabricant des contrôles, soit à l'aide de son propre contrôle de qualité interne bien établi.

12 METHODE - PLASMA

Une courbe d'étalonnage doit être effectuée pour chaque test.

Un plasma humain normal calibré contre un standard international doit être utilisée comme calibrateur.

Préparer des dilutions du calibrateur en solution tampon de dilution de FIX pour obtenir des valeurs de calibrateurs dans les gammes choisies.

Préparer au moins cinq dilutions de calibrateur différentes.

Il est recommandé de préparer des dilutions indépendantes pour chaque gamme.

Toutes les dilutions doivent être préparées dans des tubes à essai en plastique.

12.1 Gamme élevée (25, - 200%) avec dilution des échantillons au 1:80

Exemple - Dilutions de calibrateur, gamme élevée:

Préparation de la courbe d'étalonnage du FIX, GAMME 25 - 200 %			
Calibrateur FIX %	Dilution Totale	Volume	Volume de la solution de tampon de travail
pré-dilution	1:10	100 µL de plasma	900 µL
200%	1:40	100 µL de la pré-dilution	300 µL
150%	1:53.3	100 µL de la pré-dilution	433 µL
100%	1:80	100 µL de la pré-dilution	700 µL
50%	1:160	50 µL de la pré-dilution	750 µL
25%	1:320	50 µL de la pré-dilution	1550 µL
Blanc	-	-	500 µL

NOTE: l'activité à 100% est définie comme l'activité du FIX dans le plasma à 1 UI/mL. Si l'activité du FIX du plasma calibrateur diffère de cette valeur, un facteur de correction approprié doit être utilisé pour le calcul du résultat de l'échantillon. Il est recommandé d'exprimer tous les résultats d'échantillons en UI/mL.

12.2 Dilution de l'échantillon – Gamme élevée

Des échantillons de plasma avec une activité estimée entre 25 - 200 % (0.25 - 2 IU/mL) doivent être analysés dans la gamme élevée, en utilisant une dilution de l'échantillon au 1:80. L'activité du FIX de l'échantillon testé est obtenue directement à partir de la courbe d'étalonnage.



Rossix AB
Taljegårdsgatan 3B
SE-431 53 Mölndal, Sweden

info@rossix.com
www.rossix.com

12.3 Gamme basse (0.5 - 25 %) avec dilution de l'échantillon à 1:20

Exemple – Dilutions de calibrateur, gamme basse:

Préparation de la courbe d'étalonnage du FIX, GAMME 0.5 - 25 %			
Calibrateur FIX %	Dilution Totale	Volume	Volume de la solution de tampon de travail
Pré-dilution	1:20	50 µL de plasma	950 µL
25%	1:80	100 µL de la pré-dilution	300 µL
12.5%	1:160	100 µL de la pré-dilution	700 µL
6.25%	1:320	100 µL de la pré-dilution.	1500 µL
3.125%	1:640	50 µL de la pré-dilution	1550 µL
1 %	1:2000	10 µL de la pré-dilution	990 µL
0.5 %	1:4000	10 µL de la pré-dilution.	1990 µL
Blanc	-	-	500 µL

NOTE: l'activité à 100% est définie comme l'activité du FIX dans le plasma à 1 UI/mL. Si l'activité du FIX du plasma calibrateur diffère de cette valeur, un facteur de correction approprié doit être utilisé pour le calcul du résultat de l'échantillon. Il est recommandé d'exprimer tous les résultats d'échantillons en UI/mL.

12.3.1 Dilution de l'échantillon – Gamme basse

Les échantillons de plasma avec une activité estimée de 0.5 - 25% (0.005 - 0.25 IU/mL) doivent être analysés avec la gamme basse, en utilisant une dilution de l'échantillon au 1:20. L'activité du FIX de l'échantillon testé est obtenue directement à partir de la courbe d'étalonnage.

12.3.2 Blanc échantillon

Des blancs échantillons doivent être inclus dans l'analyse des échantillons de plasma hémolytiques, ictériques ou lipémiques en utilisant la méthode en point final. Un blanc échantillon est obtenue en ajoutant de l'acide citrique avant les autres réactifs.

13 METHODE – CONCENTRATIONS

La Pharmacopée européenne recommande l'analyse des droites parallèles pour déterminer l'activité des échantillons biologiques. Les concentrés de facteur IX peuvent être analysés dans la gamme 0,25 à 200mUI / mL en utilisant une courbe à 4 ou 5 paramètres ou dans la gamme 0.5 à 5 mUI/mL en utilisant une transformation log-log et une régression linéaire. Pour l'analyse des droites parallèles, il est recommandé que chaque laboratoire établisse ses propres normes d'activité.

13.1 Dilutions des calibrateurs – FIX contenu dans des concentrés

Une courbe d'étalonnage doit être effectuée pour chaque test. Le calibrateur doit être un standard international pour les concentrés de facteur IX ou un produit commercialement disponible calibré selon ce même standard international.

Préparer des dilutions du calibrateur en solution tampon de travail pour obtenir des calibrateurs dans la gamme 0.25-200mUI/mL. Préparer au moins cinq dilutions différentes de calibrateurs. Toutes les dilutions doivent être préparées dans des tubes à essai en plastique.

13.2 Dilutions d'échantillons – Concentrations en FIX

Il est recommandé de préparer au moins trois dilutions différentes d'échantillon en solution de tampon de travail avec une activité mesurable située dans la gamme standard. Toutes les dilutions doivent être préparées dans des tubes à essai en plastique.

14 PROTOCOLE DE DOSAGE – PLASMA ET CONCENTRATIONS

14.1 Méthode manuelle

La même procédure de dosage doit être utilisée pour le plasma de la gamme haute et de la gamme basse ainsi que pour les concentrés de facteur IX

Echantillon / Dilution standard	25 µL
Réactif A	25 µL
Incubation 3-4 min, 37°C	
Réactif B (37°C)	150 µL
Activation 8 min, 37°C	
Substrat de FXa (37°C)	50 µL
Méthode cinétique: lire $\Delta A_{405}/\text{min}$ à 37°C	
Méthode en point final : hydrolyse à 37 °C pendant 2 min	
Acide citrique, 2% (uniquement méthode en point final)	50 µL

Lecture en cinétique:

Lire l'absorbance à 405 nm et enregistrer les changements d'absorbance. Lorsque vous utilisez la lecture cinétique il n'est pas nécessaire d'inclure des blancs .

Méthode en point final:

Arrêter la réaction avec de l'acide citrique à 2%. Lire l'absorbance à 405nm, en utilisant 490nm comme longueur d'onde de référence. La lecture d'absorbance doit être faite dans les 2 heures suivant la fin de l'hydrolyse du substrat.

14.2 Méthodes automatiques

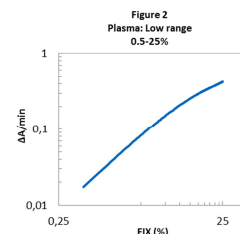
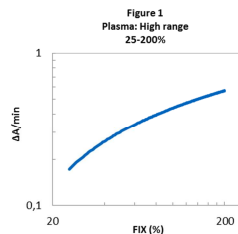
Les protocoles pour différents automates de coagulation sont disponibles sur demande.

Note spéciale, Réactif B: Pour des raisons de stabilité, utilisez uniquement des flacons en verre silicé ou en plastique si un flacon de réactif doit être remplacé pour l'adaptation à l'analyseur.

15 CALCUL

Plasma:

- Tracer la variation d'absorbance maximale / minute ($\Delta A_{405_{\text{max}}}/\text{min}$) ou l'absorbance (A405-490) par rapport à l'activité du FIX dans un graphique Log-Log après avoir soustrait le blanc réactif. (Fig 1 & 2). Alternativement, un graphique semi-logarithmique avec une courbe à 4-5 paramètres peut être utilisé.
- L'activité du FIX de l'échantillon testé est obtenue directement à partir de la courbe d'étalonnage. Corriger la valeur obtenue par le facteur de correction approprié si l'activité du FIX du calibrateur plasmatique diffère de 1 UI / mL.
- Ajuster le facteur de dilution, si plusieurs dilutions sont utilisées.
- Exprimer le résultat de l'échantillon en UI/ml ou en %.



Concentrés:

- Tracer la variation d'absorbance maximale / minute ($\Delta A_{405_{\text{max}}}/\text{min}$) ou l'absorbance (A405-490) par rapport à l'activité du FIX dans un graphique Log-Log après avoir soustrait le blanc réactif. Utilisez une courbe à 4-5 paramètres (semi-Log) ou une courbe linéaire (Log-Log)
- déterminer l'activité du FIX de l'échantillon à partir de la courbe d'étalonnage en utilisant le modèle des droites parallèles.
- Ajustez la dilution utilisée et exprimer les résultats de l'échantillon en UI/mL.
- La Pharmacopée européenne recommande l'analyse des droites parallèles. En variante, l'activité du facteur IX de chaque dilution de l'échantillon testé peut être directement obtenu à partir de la courbe d'étalonnage. Le résultat devra dans ce cas être multiplié par la dilution utilisée.

16 VALEURS ATTENDUES

Les taux de facteur IX mesurés sur 25 hommes en bonne santé et 25 femmes en bonne santé, âgés entre 19 et 56 étaient situés entre 0,6 et 1,3 UI/mL.

Une déficience en FIX, connue sous le nom d'hémophilie B, peut être divisée en trois catégories : Faible (0.4 - 0.05 IU/mL), modérée (0.05 - 0.01 IU/mL) et sévère (≤ 0.01 IU/mL). Les niveaux de FIX peuvent être diminués chez les patients atteints d'insuffisance hépatique, cirrhose et CIVD, ainsi que chez les patients sous traitement anti-vitamine K.

17 PERFORMANCES

Limite de détection: 0.1% (0.001 UI/mL), calculée selon le CLSI EP17-A en utilisant la gamme basse et la dilution des échantillons au 1:20.

Limite de quantification: 0.5% (0.005 IU/mL), calculée selon le CLSI EP17-A en utilisant la gamme basse et la dilution des échantillons au 1:20.

Précision:

Répétabilité (CV Intra essai): 3%

En laboratoire (CV Inter essai): 4%

La précision a été déterminée pour les activités du facteur IX à 1%, 25% et 100%.

Les résultats ont été obtenus en utilisant la méthode manuelle de dosage sur microplaques.

Linéarité: 0.5 – 200% (0.005 – 2 IU/mL), calculée selon le CLSI EP06-A

18 INTERFERENCE

Les résultats du FIX ne sont pas affectés par les concentrations plasmatiques de:

Hémoglobine - 5 g/L, **Bilirubine** - 0.4 g/L, **Triglycérides** -5 g/L, **LMW Heparine** - 5 IU/mL, and **Héparine non-fractionnée** - 2 UI/mL.

Il n'y a pas d'interférence du FIXa jusqu'à 50 mUI de FIXa/1 UI de FIX.

19 REFERENCES

- Gray E, Barson H, Hockley J, Rigsby P. Collaborative study for value assignment of the 4th International Standard for Factors II, VII, IX, X, Plasma. WHO/BS/10.2145; 2010: 1-43.
- Pickering WM, Gray E. The effect of activated Factor IX on the Factor IX coagulant and NAPTT activity of high-purity Factor IX concentrates. *J. Thromb Haemost* 2007; **5**, Supplement 2: P-T-156.
- White GC et al. Definitions in Hemophilia. *Thromb Haemost* 2001; **85**: 560.
- Bertina RM. Elevated clotting factor levels and venous thrombosis. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2003/2004; **33**: 395-400.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), www.clsi.org
- 6th Edition of the European Pharmacopoeia, General Chapter 5.3 Statistical analysis of results of biological assays and tests.

