



HEMOCLLOT™ Faktor VIIa Ref CK092K

IVD

Koagulační měření kvantitativního stanovení
aktivity FVIIa v purifikovaném nebo plazmatickém
médiu.



www.hyphen-biomed.com

155, rue d'Eragny
95000 NEUVILLE SUR OISE
FRANCE
Tel. : +33 (0)1 34 40 65 10
Fax : +33 (0)1 34 48 72 36
info@hyphen-biomed.com

Poslední revize: 01/2021

POUŽITÍ:

HEMOCLLOT™ Faktor VIIa souprava je určena pro kvantitativní stanovení aktivity aktivovaného Faktoru VII (VIIa) pomocí koagulační metody. Tento test se provádí na purifikovaném médiu nebo citrátové plazmě manuální nebo automatizovanou metodou.

SHRNUTÍ:

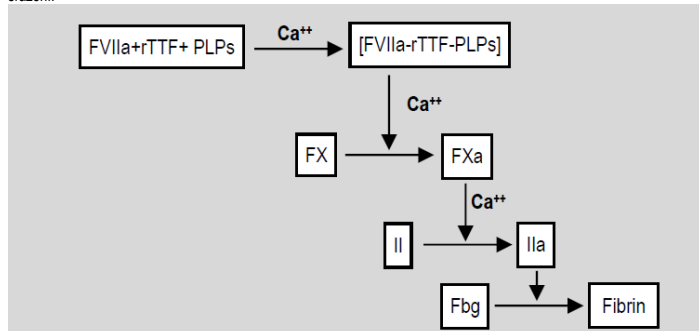
FVIIa je serine-estráza vnější koagulační cesty. V přítomnosti fosfolipidů a vápníku tvoří s Tkáňovým Faktorem (TF) komplex, který aktivuje Faktor X na FXa.

HEMOCLLOT™ Faktor VIIa je koagulační test pro aktivitu FVIIa a není citlivý k Faktoru VII.

PRINCIP:

VIIa tvoří enzymatický komplex s rekombinantní zkráceným lidským Tkáňovým Faktorem (rTTF). Takto zkrácený protein nepodporuje aktivaci² Faktoru VII. Koagulace je zahájena přidáním Vápníku (Ca²⁺). Srážecí čas je zaznamenán.

FVIIa je limitujícím faktorem reakce, a proto je zde přímá úměrnost mezi koncentrací FVIIa a získaným časem srážení.



REAGENCE:

R1: Faktor VII deficitní plazma: Citrátová lidská plazma deficitní na Faktor VII, připraveno imuno-deplecí, lyofilizováno v přítomnosti glycerinu a stabilizátorů.
3 lahvičky po 2 ml.

R2: Faktor VIIa Cof-Plps: Lidský rekombinantní zkrácený TF (rTTF) a syntetické fosfolipidy v koncentraci nastavené pro test. Lyofilizováno v přítomnosti stabilizátorů. Obsahuje BSA.
3 lahvičky po 2 ml.

R3: Hepes BSA pufr: Specifický Hepes-BSA pufr, pH 7,40. Připraven k použití. Obsahuje BSA.
3 lahvičky po 25 ml

Reagent 3 obsahuje malé množství azidu sodného (0,9 g/l), viz část UPOZORNĚNÍ a VAROVÁNÍ.

UPOZORNĚNÍ a VAROVÁNÍ:

- S biologickými produkty musí být zacházeno jako s potenciálně infekčními.
- Reagencie obsahuje azid sodný, který může reagovat s olovnatými nebo měďnými částmi odpadu za vzniku vysoce explozivních azidů kovů.
- Odpad likvidujte ve shodě s lokálními předpisy.
- Používejte pouze reagencie ze stejné šarže, nezměňujte jednotlivé reagenty mezi různými šaržemi. Reagencie jsou vždy optimalizovány v rámci jedné šarže.
- S reagentii zacházejte tak, aby bylo zabráněno odpařování během používání. Minimalizuje možnost odpaření reagencie snížením plochy kontaktu reagencie se vzduchem. Odpařování snižuje stabilitu reagencie v přístroji.
- Pro dobrou stabilitu uzavírejte lahvičky s reagentii vždy jejich originálními zátkami.
- Studie stability provedené po dobu 3 týdnů při teplotě 30°C prokázaly, že reagentii je možné bez poškození přepravovat po krátkou dobu při pokojové teplotě.
- Lidská plazma použitá k přípravě deficitní lidské plazmy byla testována registrovanou metodou a shledána negativní na přítomnost antigenu Hepatitidy B, protilátek HIV a HCV. Hovězí plazma použitá k přípravě BSA byla testována registrovanou metodou a shledána negativní na přítomnost infekčních činitelů, hlavně pak boviní spongiformní encefalitidu (BSE).
- Pouze pro stanovení In Vitro

PŘÍPRAVA A STABILITA REAGENCIÍ:

Reagencie jsou lyofilizované pod vakuem v jejich originálních lahvičkách. Vyvarujte se ztráty lyofilizátu při otevření lahvičky s lyofilizovanou reagentii. Zátka odstraňujte opatrně.

R1: Reagencie 1: Faktor VII deficitní plazma

Nañedě každou lahvičku s přesně 2 ml destilované vody a promíchejte, dokud se obsah zcela nerozpustí. Nechte stabilizovat po dobu 30 minut při pokojové teplotě (18-25°C) za občasného promíchání.

Těsně před použitím jemně promíchejte.

Stabilita ředěné reagencie, při zabránění kontaminaci nebo odpařování a uchování v původních lahvičkách:

- 3 dny při 2-8°C.
- 48 hodin při pokojové teplotě (18-25°C).
- 2 měsíce při -20°C a méně*

R2: Reagencie 2: Faktor VIIa Cof-Plps

Rozpusťte každou lahvičku s přesně 2 ml destilované vody, opatrně míchejte, dokud se obsah zcela nerozpustí. Nechte reagenci inkubovat po dobu 30 minut při pokojové teplotě (18-25°C) za občasného promíchání.

Distributor: Diagnostica s.r.o., Za Tratí 686, Praha 9, Česká republika, tel.+420 266 315 909, Fax.+420 266 316 000, e-mail: info@diagnostica.cz, www.diagnostica.cz

Těsně před použitím jemně promíchejte.

Stabilita naředěné reagencie, pokud je zabráněno kontaminaci a odpařování a uchování v původních lahvičkách:

- 3 dny při 2-8°C.
- 48 hodin při pokojové teplotě (18-25°C).
- 2 měsíce při -20°C a méně*

*Rozmrazujte pouze jednou co nejrychleji při 37°C, upravte dobu objemu reagencie. Stabilita reagencie po rozmražení by měla být testována v laboratorních podmínkách.

R3: Reagencie 3: Hepes-BSA pufr

Čirá lahvička, připravena k použití. Nechte stabilizovat 30 minut při pokojové teplotě (18-25°C) před použitím.

Před použitím promíchejte.

Stabilita reagencie po otevření, pokud je zabráněno kontaminaci a odpařování a pokud je skladována v originálním obalu:

- Do data expirace v originální lahvičce při 2 – 8°C

SKLADOVÁNÍ:

Neotevřené reagencie by měly být skladovány při 2-8°C v jejich originálních baleních. Za těchto podmínek jsou stabilní do data uvedeného na obalu.

REAGENCE A MATERIÁL POTŘEBNÝ, ALE V KITU NEOBSAŽENÝ:

Reagencie:

- Destilovaná voda, pokud možno sterilní.
- CaCl₂ 0,025M (AR001B/K/L).
- Specifické kalibrátory a kontroly se známou koncentrací, jako je Mezinárodní Standard pro FVIIa (NIBSC)³ nebo národní referenční přípravy pro FVIIa.
- Specifické kalibrátory a kontroly se známou hladinou, jako např.

Produkt	Katalog. číslo
BIOPHEN™ Calibrator Factor VIIa	226301
BIOPHEN™ FVIIa Control Set	224901

Materiál:

- Vodní lázeň, semi-automatický nebo automatický analyzátor pro koagulaci.
- Stopy, kalibrované pipety, plastové zkumavky nebo mikrotitrační destičky.

PŘÍPRAVA PLAZMY a ODBĚR VZORKU:

Vzorek by měl být připraven a skladován ve shodě s doporučeními (v USA CLSI H21-A5⁴)

- Vzorek:**
- Lidská citrátová plazma.
- Odběr:**
- Krev (9 objemu) musí být odebrána do citrátu sodného (1 objem, 0,109 M) přímou venepunkcí. První odběrová zkumavka by měla být znehodnocena.
- Centrifugace:**
- Během 2 hodin musí být krev odstředěna pro získání plazmy chudé na destičky, např. 15 minut při 2500 g za pokojové teploty (18-25°C). Plazma může být přenesena do plastových zkumavek.
- Skladování plazmy:**
- 4 hodiny při pokojové teplotě (18-25°C).
- 1 měsíc zamrzena při -20°C.
- 18 měsíců zamrzena při -70°C⁵

Zmrazená plazma by měla být rozmrazena rychle při 37°C, poté opatrně promíchána a okamžitě testována. Případný precipitát před testováním rozmíchejte.

POSTUP STANOVENÍ:

Souprava může být použita pro koagulační metodu, automatickou nebo manuální (end-point). Testujte při 37°C a měřte čas srážení, který je způsoben CaCl₂.

Automatizované metody:

Aplikace pro různé analyzátoři jsou k dispozici na vyžádání. Viz specifické aplikace a doporučení pro každý analyzátor.

Manuální metoda:

- Rekonstruujte kalibrátory a kontroly (doporučené 2 hladiny kolem 75 a 250mIU/ml), dle jejich specifických instrukcí.

Připravte kalibrační body v rozmezí 12,5 – 500mIU/ml. Rozpusťte reagencie v R3 pufru v poměru 1:10.

- Nañedě zkoumaný vzorek, kontroly a kalibrační roztoky v R3 pufru, jak je uvedeno níže:

Vzorek	Předředění	Ředění
Kontrola	Ne	1:10
Vzorek (plazma)	Ne	1:10
Vzorek (FVIIa v purifikovaném prostředí)	Nastavte do optimálního rozmezí 25-400 mIU/ml v R3 pufru	1:10

Sestavte kalibrační křivku a validujte ji kontrolami kvality. Při skladování za pokojové teploty (18-25°C) testuje naředěné vzorky do 1 hodiny. Přesné koncentrace kalibrátorů a kontrol jsou vždy uvedeny na letáku přiloženém do každého balení.

Informace odpovídající mezi ng/ml a IU/ml:

Koncentrace v ng/ml	Koncentrace v IU/ml
20ng/ml	1IU/ml
1ng/ml	50IU/ml

Reagencie	Objem
Kalibrátory, kontroly nebo vzorky (1:10 ředění v R3)	50 µl
R1: FVII deficitní plazma, předinkubovaná při 37°C	50 µl
Míchejte a inkubujte při 37°C po 1 minutu, pak přidejte:	
R2: rTTF + Fosfolipidy, předinkubované při 37°C	50 µl
Míchejte a inkubujte při 37°C po 2 minuty, pak přidejte:	
CaCl ₂ 0,025M (inkubované při 37°C a míchané)	50 µl
Mějte čas srážení	CT (sec)

Pokud jsou reakční objemy jiné než je uvedeno, musí být striktně zachován poměr objemů. Uživatel je zodpovědný za validaci jakýchkoliv změn a jejich vliv na výsledek.

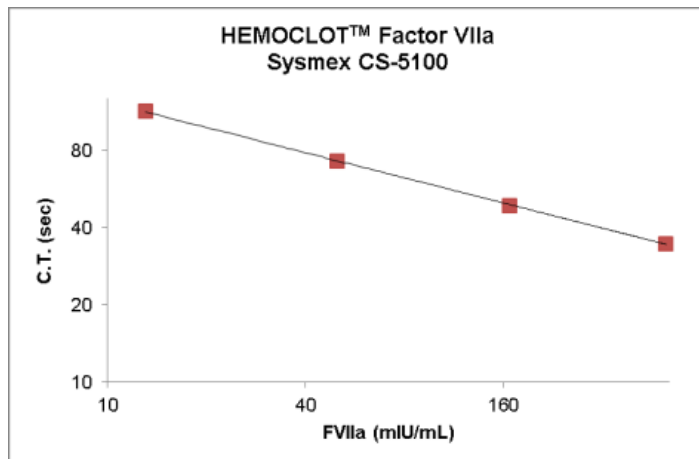
KALIBRACE:

HEMOCLLOT™ Factor VIIa test může být kalibrován pro testy FVIIa v plazmě nebo purifikovaném prostředí. Kalibrátor pokrývající dynamické rozmezí metody je dostupná od HYPHEN BioMed (viz REAGENCIE A MATERIÁL POŽADOVANÝ, V KITU NEPŘÍTOMNÝ) a může být použit pro stanovení kalibrační křivky.

Pro bi-logaritmickou škálu:

- Test je lineární do 500mIU/ml (do 1000mIU/ml na analyzátoch Sysmex® CS série a STA-R®).

Kalibrační křivky uvedené níže, byla získána s mezinárodním standardem NIBSC pro FVIIa koncentrát na přístroji Sysmex® CS-5100 a je uvedena pouze jako příklad. Kalibrace by měla být provedena pro každou sérii testů.



KONTROLA KVALITY:

Použití kontrolních plazem umožňuje jak validaci shodnosti metody, tak i kontrolu homogenity v sérii a mezi sériemi při použití stejné šarže reagentie.

Začněte kontrolu kvality do každé série testů, dle doporučení pro laboratorní práci, aby byly výsledky testu validní. Nová kalibrace by měla být provedena přednostně před každou sérii testů, nejméně však pro každou novou šarži reagentie, po významné opravě nebo údržbě používaného přístroje, nebo když jsou hodnoty kontrolních plazem mimo přijatelné meze.

Každá laboratoř si musí definovat vlastní přijatelné rozmezí a ověřit v komplexu celého analytického systému.

VÝSLEDKY:

- Při manuální metodě "End Point" použijte bi-logaritmický grafický papír, vyneste na osu Y naměřený čas srážení (sec) a na osu X korespondující koncentraci FVIIa v mIU/ml.
- Koncentrace FVIIa ve vzorcích je přímo odečtena z kalibrační křivky, pokud byly zachovány standardní ředění. Pokud byly vzorky předředěny, měřená koncentrace FVIIa musí být násobena použitým ředícím faktorem.
- Výsledky jsou vyjádřeny v mIU/ml FVIIa.
- Výsledky z testované plazmy by měly být interpretovány společně s klinickým stavem pacienta.

LIMITY:

- Pro zajištění optimálního průběhu testu by měly být pečlivě dodržovány instrukce validované výrobcem reagentie Hyphen-BioMed. Laboratoř je odpovědná za změny, které provede v těchto instrukcích.
- Každý reagent neobvyklého vzhledu musí být z testování vyřazen pro podezření z kontaminace.
- Každý vzorek jeví známky aktivace musí být vyřazen z testování.
- Každá plazma obsahující koagulum nebo jeví známky kontaminace musí být vyřazena z testování.
- Vzorky měřené při >500mIU/ml mohou být dále ředěny (2krát a více). Naměřené hodnoty pak musí být upraveny podle použitého ředění.
- Pro možné interference se odkáže na specifické aplikace analyzátoru. Na přístroji Sysmex® CS-5100 nebyly zaznamenány významné změny pro koncentrace Heparinu (UFH a LMWH) do 0,5IU/ML, bilirubinu do 30mg/dl, hemoglobinu nebo intralipidů do 1000mg/dl a Apixabanu, Rivaroxabanu nebo Dabigatranu do 50ng/ml.

OČEKÁVANÉ HODNOTY:

Terapeutické rozmezí by mělo být definováno podle místních aktuálních pravidel. Hodnoty zdravých lidí se liší mezi laboratořemi, proto by si každá laboratoř měla stanovit vlastní normální rozmezí.

Ve studii zdánlivě zdravých lidí (n=120) na analyzátoru Sysmex® CS-5100 byl stanoven následující referenční interval (central 90%, 95té procento): 20 – 114 mIU/ml.

CHARAKTERISTIKA:

- Nízký detekční limit na analyzátoru Sysmex® CS-5100 je <1 mIU/ml.
- Pracovní rozmezí testu je od 5 do 500 mIU/ml.
- HEMOCLLOT™ Factor VIIa test není citlivý na FVII při normálních koncentracích.
- Níže uvedená studie byla provedena výrobcem za použití 3 šarží reagentie na přístroji Sysmex® CS-5100. Výkonnost byla zjištěna laboratorními kontrolami ze 40 hodnot (v jedné sérii) nebo mezi sériemi během 20 dní, 2 série za den, 3 duplikáty každé série pro kontrolu. Následující data byla zjištěna:

Kontrola	Intra assay				Inter assay			
	n	Průměr (mIU/ml)	CV%	SD	n	Průměr (mIU/ml)	CV%	SD
QC1	40	82,7	1,9	1,6	120	83,7	4,3	3,6
QC2	40	261,5	2,2	3,6	120	262,9	2,7	7,2

REFERENCES:

- Giansily-Blazit M, et al.. Study group of FVII deficiency. Analysis of biological phenotypes from 42 patients with inherited factor VII deficiency: can biological tests predict the bleeding risk? Haematologica. 2004
- Neuenschwander PF, et al.. Deletion of the membrane anchoring region of tissue factor abolishes autoactivation of factor VII but not cofactor function. Analysis of a mutant with a selective deficiency in activity. J Biol Chem. 1992
- WHO International Standard, Blood Coagulation Factor VIIa, Concentrate, Human, 2nd International Standard, NIBSC 07/228.
- CLSI Document H21-A5: "Collection, transport, and processing of blood specimens for testing plasma -based coagulation assays and molecular hemostasis assays; approved guideline". 2008
- Woodhams B, et al.. Stability of coagulation proteins in frozen plasma. Blood coagulation and Fibrinolysis. 2001.
- Logan AC and Goodnough LT. Recombinant factor VIIa: an assessment of evidence regarding its efficacy and safety in the off-label setting. Hematology. 2010.

SYMBOLY:

Použité symboly jsou uvedeny v ISO 15223-1 standardu, viz dokument definice symbolů