

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



Chromogenní metoda pro stanovení aktivity Faktor IX v plazmě nebo léčebných koncentrátech.



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

Revize: 12_2018

POUŽITÍ:

BIOPHEN FIX je souprava pro in vitro kvantitativní chromogenní stanovení aktivity Faktoru IX v lidské citrátové plazmě nebo v léčebných koncentrátech. Tato metoda je založena na amidolytické metodě manuální nebo automatizované.

SHRNUTÍ:

Technické:

Faktor IX (FIX) je přibližně 55kDa glycoprotein závislý na vitamínu K, který se účastní procesu koagulace. Jeho normální koncentrace v lidské plazmě je 4 až 5 µg/ml¹. FIX se aktivuje za přítomnosti vápníku Faktorem XIa. Aktivovaný Faktor IX (FIXa) tvoří za přítomnosti vápníku a fosfolipidů aktivovaný komplex s Faktorem VIII:C. Tento komplex dále aktivuje Faktor X na FXa².

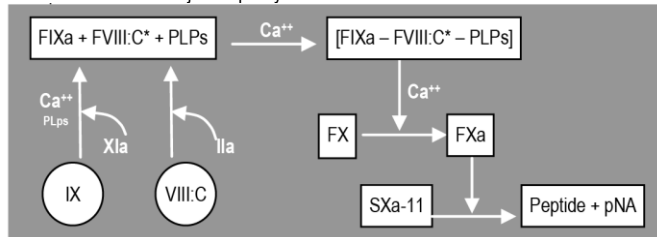
BIOPHEN™ FIX souprava je použita pro testování aktivity Faktoru IX v plazmě, léčebném koncentrátu nebo jakékoli jiné biologické tekutině.

Klinické:

Deficit faktoru IX (nebo antihemofilického faktoru B) vede k hemofilii B, vrozené poruše koagulace^{6,7,8,9}. Hladina faktoru IX je snížena u pacientů podstupujících anti-vitamin K léčbu, s poruchou jater, cirhózou nebo DIC. Vysoká koncentrace faktoru IX může ukazovat na zvýšené riziko žilní trombózy¹⁰.

PRINCIP:

BIOPHEN™ FIX metoda zahrnuje chromogenní test aktivity Faktoru IX (FIX). Za přítomnosti fosfolipidů (PLP) a vápníku Faktor XIa aktivuje FIX přítomný ve vzorku na aktivovaný Faktor IX. Thrombinem aktivovaný Faktor VIII:C (FVIIIa) vytváří s FIXa enzymatický komplex a společně aktivují Faktor X. Výsledný Faktor Xa hydrolyzuje chromogenní substrát, který uvolní paranitroanilin (pNa). Množství pNa (měřená absorbance při 405 nm) je přímo úměrná koncentraci Faktoru IX ve vzorku. Faktor XIa, Faktor VIII:C a Faktor X jsou v přebytku.



Pozn.: FVIII:C* : Thrombinem aktivovaný FVIII:C

REAGENCIE:

R1 Reagencie 1: Lidský FX-FVIII:C:

Lidský FX a lyofilizovaný FVIII:C. Obsahuje dihydrát chloridu vápenatého, sulfát měďnatý a polymerizační inhibitory fibrinu a stabilizační látky.

R2 Reagencie 2: Aktivační reagencie: Lyofilizováno. Obsahuje lidský Faktor XIa v konstantním a optimalizovaném množství, lidský thrombin, dihydrát chloridu vápenatého, imidazol, syntetické fosfolipidy a stabilizační látky.

R3 Reagencie 3: Substrát: Lyofilizovaný chromogenní substrát specifický Faktoru Xa (SXa-11).

R4 Reagencie 4: Pufr: Tris-BSA reakční pufr. Obsahuje 1% BSA, PEG, stabilizační látky Faktoru VIII:C a Azid Sodný (0,9g/l) jako konzervans.

REF 221801 → R1 R2 R3 2 lahvičky po 1 ml.

R4 2 lahvičky po 15 ml.

REF 221802 → R1 R2 R3 2 lahvičky po 2,5 ml.

R4 2 lahvičky po 25 ml.

REF 221806 → R1 R2 R3 2 lahvičky po 6 ml.

R4 4 lahvičky po 15 ml.

UPOZORNĚNÍ:

- Některé reagencie v soupravě obsahují materiál lidského a zvířecího původu. Každá dárcovská jednotka lidské krve použita na výrobu byla testována registrovanými metodami a shledána negativní na přítomnost protilátek k HIV 1, HIV 2, HCV a antigenu hepatitidy B. Přesto žádná metoda nemůže plně zaručit nepřítomnost infekčních agens. Proto musí být s produkty biologického původu zacházeno s opatrností, jako s potenciálně infekčními.

- Azid sodný může reagovat s olověným a měděným potrubím za vzniku vysoce explozivních azidů kovů.
- Odpadní materiál zlikvidujte dle lokálních směrnic o zacházení s odpadem.
- Studie stability prokázaly, že reagencie mohou být přepravovány za pokojové teploty bez poškození.
- Pouze pro použití In Vitro.

PŘÍPRAVA REAGENCIE:

Reagencie jsou v lahvičkách lyofilizovány pod vakuem. Abyste předešli ztrátě produktu, otevírejte lahvičky opatrně.

R1 R2 R3 Rozpusťte obsah lahvičky s přesně:

REF 221801 → 1 ml destilované vody

REF 221802 → 2,5 ml destilované vody

REF 221806 → 6 ml destilované vody

Dobře promíchejte, dokud se obsah nerozpustí (zajistěte, že u R3 nejsou deposity na dně lahvičky), zabraňte tvorbě pěny. Po promíchání vložte do analyzátoru dle aplikačního protokolu.

Pro manuální metodu nechte stabilizovat 30 minut za pokojové teploty (18-25°C) za občasného promíchání. Před použitím promíchejte.

R4 Reagencie je připravena k použití. Homogenizujte obsah a vložte do analyzátoru dle aplikačního protokolu.

Pro manuální metodu nechte stabilizovat 30 minut za pokojové teploty (18-25°C) za občasného promíchání. Před použitím promíchejte.

PODMÍNKY SKLADOVÁNÍ A STABILITA:

Neotevřené reagencie skladované při 2 – 8°C v originálním balení jsou stabilní do data expirace uvedeného na obalu.

REF 221802 / 221806:

R1 R2 Stabilita rozpuštěné, uzavřené reagencie, pokud je zabráněno kontaminaci a odpařování, je:

- 24 hodin při 2 – 8°C
- 8 hodin při pokojové teplotě (18 – 25°C)
- 2 měsíce při -20°C a méně*
- Stabilita v analyzátoru: viz specifická aplikace.

R3 Stabilita rozpuštěné, uzavřené reagencie, pokud je zabráněno kontaminaci a odpařování, je:

- 1 měsíc při 2 – 8°C
- 7 dní při pokojové teplotě (18 – 25°C)
- 2 měsíce při -20°C a méně*
- Stabilita v analyzátoru: viz specifická aplikace.

*Rozmrazte pouze jednou co nejdříve při 37°C a ihned použijte. Proveďte novou kalibraci pro zmražené reagencie.

REF 221801:

R1 R2 R3 Stabilita rozpuštěné, uzavřené reagencie, pokud je zabráněno kontaminaci a odpařování, je:

- 24 hodin při 2 – 8°C
- 8 hodin při pokojové teplotě (18 – 25°C)
- Stabilita v analyzátoru: viz specifická aplikace.

REF 221801 / 221802 / 221806:

R4 V originálním balení, skladována při 2 – 8 °C, pokud je zamezeno kontaminaci a odpařování, je reagencie stabilní až do data expirace uvedeného na obale.

Nažloutlé zbarvení je známkou kontaminace substrátu. Takový substrát nepoužívejte a načněte novou lahvičku.

REAGENCIE A MATERIÁL POTŘEBNÝ, V KITU NEPŘÍTOMNÝ:

Reagencie:

- Destilovaná voda.
- Kyselina octová (20%) nebo citronová (2%) – pro End-Point metodu



- Referenční materiál pro Faktor IX test v léčebných koncentracích (mezinárodní nebo národní).
- Specifické kalibrátory a kontroly se známou hladinou, např.:

Jméno produktu	Referenční číslo
BIOPHEN™ Plasma Calibrator	222 101
BIOPHEN™ Normal Control Plasma	223 201
BIOPHEN™ Abnormal Control Plasma	223 301

- Pro kalibraci nízkého rozmezí, rozpusťte kalibrátor ve Faktor IX deficitní plazmě (DP050A/K).

Odkážete se na specifický aplikační protokol pro použitý analyzátor.

Materiál:

- Spektrofotometr, fotometr nebo automaty pro chromogenní testy.
- Stopy. Kalibrované pipety.

PŘÍPRAVA A ODBĚR PLASMY:

Krev (9 dílů) by měla být opatrně odebrána do antikoagulantu - citrátu sodného (1 díl; 0,109 M, 3,2%) přímou venepunkcí. První zkumavka by měla být znehodnocena.

Příprava a skladování vzorků se provádí dle lokálních doporučení (v USA směrnice CLSI H21-A5¹¹, doporučení a další informace týkající se odběru vzorku, jeho skladování a zacházení s ním).

Pro informace o skladování plazmy odkazujeme na referenci¹².

PROVEDENÍ:

Tato souprava může být použita pro automatické a manuální (Endpoint) metody. Test provádějte při 37°C. Absorbance je měřena při 405nm.

Pro automatickou metodu, aplikační protokoly pro analyzátor jsou dostupné na vyžádání. Odkážete se na specifické aplikace a opatření pro každý analyzátor.

Přběh měření:

1. Rekonstituuje kalibrátory a kontroly podle jejich specifických instrukcí. Pro kalibrační křivku ředte kalibrátory R4 puřem, viz níže („C“ je definována jako koncentrace Faktoru IX):

Vysoké rozmezí (5 – 200%):

Pokud je pro kalibraci použita komerčně dostupná kalibrační plazma (např.: BIOPHEN Plasma Calibrator) se známou hladinou FIX (C), pak ředění 1:100 odpovídá této dané hodnotě a ředění 1:50 dvojnásobku této hodnoty.

Použití kalibrační plazmy s koncentrací FIX hodnoty C umožní získat výsledek až do 200% FIX (dle podmínek testu) použitím následujícího dilučního faktoru:

50 x (C):100

Kalibrační křivka může být též stanovena poolovanou citrátovou plazmou (připravenou od nejméně 30-ti zdravých osob, mužů a žen ve věku mezi 18 a 55 lety, kteří neužívají žádné léky). Hodnota této plazmy se uvádí 100% FIX. Test se provádí při ředění plazmy 1:100 a takto naředěná plazma reprezentuje v testu 100% aktivity FIX. Dynamické rozmezí kalibrační křivky je 5 – 200% FIX. 200% aktivity FIX je získáno ředěním poolované plazmy 1:50 (Tris puřem R4).

Připravte 2 ml ředění normální poolované plazmy v poměru 1:50 nebo (50x C:100) referenčního materiálu, kalibrátoru. To odpovídá 200% FIX (označeno C1). Kalibrační řada se pak získá sériovým ředěním dle následujícího vzoru:

Kalibrátor	C1	C2	C3	C4	C5	0
%FIX	200	100	50	25	5	0
Objem kalibrátoru	1000 µl C1	500 µl C1	500 µl C2	500 µl C3	100 µl C4	0 µl
Objem R4 puřu	0 µl	500 µl	500 µl	500 µl	400 µl	500 µl

Kalibrační křivka může být též sestavena za použití referenčního materiálu pro FIX (mezinárodní nebo národní standard).

Předředte tento přípravek (se známou hladinou FIX) pomocí R4 puřu tak, aby byla koncentrace 1 IU/ml a potom ředte 1:50 puřem R4 pro získání koncentrace 200% FIX (2 IU/ml). Připravte kalibrační řadu stejně jako s poolovanou, viz výše.

Nízké rozmezí (0 – 20%):

Kalibrace může být provedena poolovanou lidskou citrátovou plazmou nebo komerční kalibrační plazmou s určenou hladinou FIX (C). Ředte tuto plazmu v FIX deficitní plazmě (DP050A/K) tak, abyste dosáhli 20% koncentrace (ředící poměr s deficitní plazmou je 5 pro poolovanou plazmu a 5x C/100 pro kalibrátor s koncentrací C).

Metoda zahrnuje ředění plazmy 1/20. Dynamické rozmezí kalibrační křivky je 1 až 20% Faktoru IX. Rozpuštění 1/20 v R4 puřu reprezentuje 20% Faktoru IX.

Stanovte kalibrační křivku pomocí této směsi v R4 puřu:

FIX(%)	20	10	5	2,5	1	0
Objem 20% FIX kalibrátoru	500 µl	250 µl	125 µl	65 µl	25 µl	0 µl
Objem R4 puřu	0 µl	250 µl	375 µl	455 µl	475 µl	500 µl

Kalibrační křivku stanovte těsně před použitím, abyste předešli degradaci Faktoru IX.

2. Ředte vzorky v R4 puřu, viz níže:

Vzorky	Referenční číslo	Rozmezí	Diluce
Kontroly	223201/223301	Vysoké	1/100
		Nízké (po 1/10 předředění v FIX deficitní pl.)	1/20
Vzorky	-	Vysoké	1/100
		Nízké	1/20

Pro léčebné koncentráty Faktoru IX (a jiné biologické tekutiny, pro které je test prováděn) ředte vzorky (pro vysoké rozmezí) v R4 tak, abyste dosáhli koncentrace FIX přibližně 1 IU/ml. Doporučuje se připravit předředěný vzorek tak, aby očekávaná naměřená koncentrace FIX byla mezi 0,2 – 2 IU/ml. Tento vzorek je pak v testu dále ředěn 1:100 puřem R4. Pak je koncentrace FIX v rozmezí 20 – 200%. (Změřená koncentrace musí být vždy vynásobena před-dilučním faktorem.)

Stanovte kalibrační křivku a proveďte kontrolu kvality. Pokud jsou ředěné vzorky skladovány za pokojové teploty (18 – 25°C), musí být testovány do dvou hodin po ředění. Přesné koncentrace pro kalibrátory a kontroly jsou uvedeny na letáku přiloženém s jejich balení.

3. Na mikrotitrační destičce nebo v plastové zkumavce inkubované při 37°C:

	Mikrotitrační destička	Zkumavka
Vzorky, kontroly nebo kalibrátory rozpuštěné v R4	50 µl	200 µl
R1: Lidský FX-VIII:C inkubovaný při 37°C	50 µl	200 µl
Promíchat a inkubovat 2 minuty při 37°C, pak přidat:		
R2: Aktivační reagentie inkubované při 37°C	50 µl	200 µl
Promíchat a inkubovat 3 minuty při 37°C, pak přidat:		
R3: Substrát Sxa-11 inkubovaný při 37°C	50 µl	200 µl
Promíchat a inkubovat 2 minuty při 37°C přesně.		
Zastavit reakci přidáním:		
Kyseliny citronové (2%)*	50 µl	200 µl
Promíchat a měřit absorbanci při 405 nm proti korespondujícímu blanku.		

*Nebo kyselinou octovou (20%). Žluté zbarvení je stabilní 2 hodiny.

Vzorek blank – získáme smícháním reagentií v obráceném pořadí, než jak je přidáváme do testu. To je: kyselina citronová (octová), R3, R2, R1, ředěný vzorek.

Absorbance se měří při 405 nm, hodnotu blank odečtete od absorbance testovaných vzorků.

Vytvořte blank vzorek, pokud je plazma ikterická, lipemická, hemolyzovaná nebo pokud je její barva odlišná od standardu.

Pro kinetickou metodu používejte ΔOD 405 místo OD 405.

Kinetická metoda:

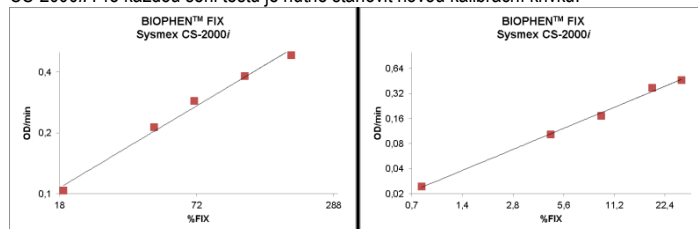
Test může být použit pro kinetickou metodu. V tom případě se měří změna absorbance mezi 10 a 100 sekundou po přidání substrátu. Zde potom není nutné odečítat blank nebo zastavovat reakci. Výsledek je získán jako změna absorbance v čase (ΔA405) pro kalibrátory a vzorky.

Pokud jsou požadovány vyšší nebo nižší reakční objemy než uvedené, je nutné dodržet poměry mezi koncentracemi reagentů a použitými objemy. Uživatel je zodpovědný za validaci změn a jejich dopadu na výsledek testu.

KALIBRACE:

BIOPHEN™ FIX může být kalibrován pro test Faktoru IX v plazmě nebo léčebných koncentrátech. Kalibrační plazma zabírající dynamické rozmezí testu je dostupná od HYPHEN BioMed (viz REAGENCIE A MATERIÁL POTŘEBNÝ, V KITU NEPŘÍTOMNÝ) a může být použita pro stanovení kalibrační křivky.

Níže uvedená kalibrační křivka je pouze příklad a byla získána na analyzátoru Sysmex CS-2000i. Pro každou sérii testů je nutné stanovit novou kalibrační křivku.



KONTROLA KVALITY:

Kontrola kvality umožňuje validaci shody metody a testování homogenity mezi sériemi pro danou šarži reagensů.

Začleňte kontrolu kvality do každé série testů, podle správných laboratorních postupů, pro validaci testu. Nová kalibrace musí být provedena nejméně pro každou novou šarži reagensie, po každé významné opravě či údržbě přístroje, nebo když výsledek kontrol je mimo přijatelné meze.

Každá laboratoř musí definovat vlastní přijatelné rozmezí kontrol pro konkrétní analytický systém.

VÝSLEDKY:

- Pro manuální Endpoint metodu tvoří kalibrační křivka bi-logaritmičtí, s OD 405 nm na ose Y a koncentrací Faktoru IX v % na ose X.
- Koncentrace Faktoru IX v testovaném vzorku jsou přímo odečteny z kalibrační křivky, za předpokladu že jsou použity původní ředění.
- Výsledky musí být interpretovány s přihlédnutím k biologickému a klinickému stavu pacienta.
- Při použití jiných ředění musí být výsledek násoben použitým dilučním faktorem "D" a děleno 100 – tedy D/100 pro vysoké rozmezí a 20 – tedy D/20 pro nízké rozmezí.

LIMITY:

- Abyste zajistili optimální výkon testu a specifikací, dodržujte technické pokyny validované HYPHEN BioMed. Laboratoř je zodpovědná za validaci jakýchkoliv změn pokynů použití.
- Jakékoliv reagensie s neobvyklým vzhledem nebo vykazující známky kontaminace musí být znehodnoceny.
- Jakékoliv vzorky s neobvyklým vzhledem nebo vykazující známky aktivace musí být znehodnoceny.

PŘEDPOKLÁDANÉ HODNOTY:

Normální hodnota Faktoru IX pro dospělou plazmu je obecně mezi 73 a 167% (Sysmex CS 5100). Každá laboratoř by si ale měla stanovit vlastní přijatelné rozmezí.

CHARAKTERISTIKA:

- Dolní detekční limit je **méně než 2% pro vysoké rozmezí a méně než 0,5% pro nízké rozmezí.**
- Oblast měření pro Sysmex CS-2000i je mezi **1 a 250%** pro vysoké rozmezí a mezi **0,8 a 30%** pro nízké rozmezí (A obecně mezi **5 a 200%** pro vysoké rozmezí a mezi **1 a 20%** pro nízké rozmezí).
- Studie výkonu byly prováděny vnitřně na 1 šarži reagensů za použití Sysmex CS-2000i.

Výkon byl testován za použití laboratorních kontrol po dobu 20 dní, 2 série denně s duplikacemi v každé sérii pro hladinu kontrol. Výsledná data jsou uvedena v tabulce.

Kontrola	Vysoké rozmezí							
	Intra-série				Inter-série			
	N	Průměr	SD	CV%	n	Průměr	SD	CV%
Normal	30	85,7	1,0	1,2	80	83,1	4,1	4,9
Abnormal	30	36,5	0,9	2,4	80	35,7	2,0	5,6
Kontroly	Nízké rozmezí							
	Inter-série							
	n	Průměr	SD	CV				
Normal	80	8,3	0,5	6,2				
Abnormal	80	3,6	0,2	6,4				

- Korelace s referenční metodou (STA® C.K. PREST® na STA-R vs BIOPHEN™ FIX na Sysmex CS-5100):

$$n = 102 \quad y = 0,97x - 0,10 \quad r = 0,983$$

- Interference:

Žádné interference do (Sysmex CS-2000i, vysoké rozmezí):

Intralipidy (mg/dl)	Hemoglobin (mg/dl)	Dabigatran (ng/ml)	Bilirubin (F/C) (mg/dl)	Apixaban (ng/ml)	Heparin (UFH/LMWH) (IU/ml)
1000	1000	500	60	50	2

Odkáže se na specifický aplikační protokol.

REFERENCE:

- 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.
- Wagenvoort 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 VR. *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.

SYMBOLY:

Použité symboly a značky jsou v ISO 15223-1 standart, viz dokument definice symbolů.

- R1** H315: Dráždí kůži.
H319: Způsobuje vážné podráždění očí.
H335: Může způsobit podráždění dýchacích cest.
H412: Škodlivý pro vodní organismy, s dlouhodobými účinky.
- R2** H314: Způsobuje těžké poleptání kůže a poškození očí.
H318: Způsobuje vážné poškození očí.
H360D: Může poškodit plod v těle matky.