

BIOPHEN Faktor IXa (ACT.FIX)

Ref. 221812

Chromogener Test zur Bestimmung der Faktor IXa-Aktivität

Nur für *In-vitro*-Forschungszwecke

www.hyphen-biomed.com
 155, rue d'Eragny, F. 95000 Neuville-sur-Oise
 Tel. +33-1-3440 6510 | Fax +33-1-3448 7236
Vertrieb: www.coachrom.com
 CoaChrom Diagnostica GmbH
 Stolzenthalergasse 6, A 1080 Wien
 Kostenfreie Nummern für Deutschland:
 Tel. 0800-24 66 33-0 | Fax 0800-24 66 33-3
 Tel. +43-1-699 97 97 | Fax +43-1-699 18 97

Revision: 13/04/2010

VERWENDUNGSZWECK:

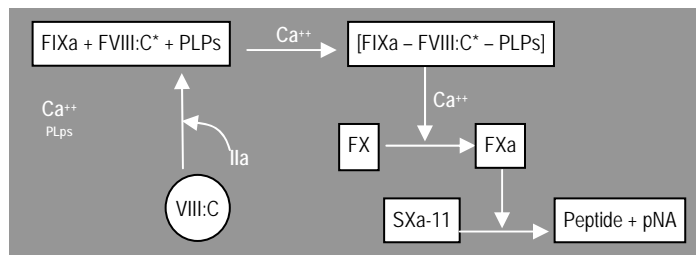
BIOPHEN Faktor IXa (ACT.FIX) ist ein Test zur chromogenen Bestimmung der Aktivität von aktiviertem Faktor IX (FIXa) mit manuellen oder automatisierten Methoden.

ANWENDUNG:

Bestimmung der Faktor IXa-Aktivität in allen therapeutischen Konzentraten oder gereinigten Systemen, in denen die Faktor IXa-Aktivität bestimmt werden soll.

TESTPRINZIP:

In Gegenwart von Phospholipiden (PLPs) und Calcium bildet der in der Probe vorhandene aktivierte Faktor IX (Faktor IXa) einen Enzymkomplex mit Thrombin-aktiviertem Faktor VIII:C (im Testansatz in konstanter Konzentration und im Überschuss vorhanden). Dieser Enzymkomplex aktiviert anschließend ebenfalls im Testansatz vorhandenen Faktor X zu Faktor Xa. Die gebildete Menge Faktor Xa ist direkt abhängig von der Menge Faktor IXa in der Probe, die den limitierenden Faktor darstellt. Der gebildete Faktor Xa kann dann durch die spezifische Aktivität für das chromogene Faktor Xa-Substrat SXa-11 exakt bestimmt werden. Die Menge des durch die Spaltung des Substrates freigesetzten para-Nitroanilin (pNA) ist direkt proportional zur Faktor IXa-Aktivität. Letztendlich besteht ein direkter Zusammenhang zwischen dem Faktor IXa-Gehalt in der Probe und der gebildeten Faktor Xa-Aktivität, die über die freigesetzte Menge pNA bestimmt und durch die Farbentwicklung bei 405nm gemessen wird.



Anmerkung: FVIII:C*: Thrombin-aktivierter Faktor VIII:C

REAGENZIEN:

R1: Reagenz 1: Humaner Faktor X und Faktor VIII:C

Humaner Faktor X und Faktor VIII:C; in Gegenwart eines Fibrinpolymerisations-Inhibitors und Stabilisatoren lyophilisiert.

2 Flaschen (mit je 2,5 ml Aqua dest. rekonstituieren).

R2: Reagenz 2: „Aktivierungsreagenz“ (Thrombin-Calcium-Phospholipide)

Humanes Thrombin, Calcium und synthetische Phospholipide, in Gegenwart von Stabilisatoren lyophilisiert.

2 Flaschen (mit je 2,5 ml Aqua dest. rekonstituieren).

R3: Reagenz 3: SXa-11 (Peptidsequenz: Suc-Ile-Glu-(γPip)Gly-Arg-pNA • HCl)

Chromogenes Substrat, spezifisch für Faktor Xa (SXa-11), lyophilisiert.

2 Flaschen SXa-11 mit Faktor Xa-Inhibitor (mit je 2,5 ml Aqua dest. rekonstituieren).

R4: Reagenz 4: Tris-BSA-Puffer

Tris-BSA-Puffer, gebrauchsfertig. Enthält 1% BSA, Faktor VIII:C-Stabilisatoren und Natriumazid.

2 Flaschen mit je 25 ml.

Cal: Faktor IXa-Kalibrator (kalibriert gegen den Internationalen Standard)

Gereinigter humaner Faktor IXa, lyophilisiert. Nach Rekonstitution mit 1 ml Aqua dest. erhält man eine Lösung mit einer Konzentration „C“ (ausgedrückt in milli-Internationalen Einheiten pro ml (mIU/ml)) von humanem Faktor IXa. Diese Konzentration (in der Regel im Bereich von 25-30 mIU/ml) wird für jede Reagenzcharge exakt bestimmt.

2 Flaschen (mit je 1,0 ml Aqua dest. rekonstituieren).

Die exakte Faktor IXa-Konzentration ist auf einem Datenblatt angegeben, das jeder Testpackung beigelegt ist. Die Kalibrationskurve deckt einen Bereich von 0 bis ca. 30 mIU/ml ab (1 mIU/ml entspricht annähernd 1 ng/ml Faktor IXa).

Warnhinweise:

- Faktor X und Thrombin wurden aus humanem Plasma gewonnen, das mit registrierten Methoden getestet und als negativ für HIV-Antikörper, HBs-Ag und HCV-Antikörper eingestuft wurde. Bovines Serumalbumin (BSA) wurde aus bovinem Plasma hergestellt, das auf die Abwesenheit infektiöser Substanzen getestet und aus BSE-freien Tieren gewonnen wurde. Kein Test kann jedoch mit absoluter Sicherheit die Anwesenheit infektiöser Substanzen ausschließen. Jegliche Produkte mit biologischem Ursprung sind daher mit allen Vorsichtsmaßnahmen, die im Umgang mit potenziell infektiösem Material erforderlich sind, zu handhaben.
- Natriumazid (0,9 g/l) kann mit Blei oder Kupferarmaturen unter Bildung hochexplorier Metallazide reagieren. Bei Entsorgung der Lösung in den Abfluss muss mit großen Mengen Wasser nachgespült werden.

ERFORDERLICHE MATERIALIEN, DIE NICHT IN DER TESTPACKUNG ENTHALTEN SIND:

Reagenzien:

- Aqua dest., bevorzugt steril.
- Endpunkt-Methode: Essigsäure (20%) oder Zitronensäure (2%).
- Qualitätskontrollen mit niedrigen bzw. hohen Faktor IXa-Spiegeln.
- Alternativ: Referenzmaterialien für Faktor IXa (Internationaler oder Interner Standard).

Geräte:

- Spektrophotometer oder Gerinnungsautomaten zur Bestimmung chromogener Teste (Messwellenlänge: 405nm).
- Stoppuhr.
- Geeichte Pipetten.

LAGERUNG:

Die BIOPHEN Faktor IXa-Reagenzien müssen bei 2-8 °C in der Originalverpackung gelagert werden und sind dann bis zu dem auf dem Etikett aufgedruckten Verfalldatum haltbar.

REKONSTITUTION UND STABILITÄT DER REAGENZIEN:

R1: Reagenz 1: Humaner Faktor X, Faktor VIII:C und Fibrinpolymerisations-Inhibitor

- Den Inhalt jeder Flasche mit exakt 2,5 ml Aqua dest. rekonstituieren und gut durchmischen.
- Für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren (18-25°C).
- Vor Gebrauch vorsichtig mischen.

Stabilität des rekonstituierten Reagenz R1 in der Originalflasche:

- 24 Stunden bei 2-8°C.
- 8 Stunden bei Raumtemperatur (18-25°C).
- 2 Monate bei -20°C oder kälter.

R2: Reagenz 2: Thrombin, Phospholipide und Calcium

- Den Inhalt jeder Flasche mit 2,5 ml Aqua dest. rekonstituieren und bis zur vollständigen Auflösung des Inhalts gut schütteln (Vortex).
- Für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren (18-25°C) und dabei gelegentlich schütteln.
- Den Inhalt vor jedem Gebrauch homogenisieren.

Stabilität des rekonstituierten Reagenz R2 in der Originalflasche:

- 24 Stunden bei 2-8°C.
- 8 Stunden bei Raumtemperatur (18-25°C).
- 2 Monate bei -20°C oder kälter.

R3: Reagenz 3: Faktor Xa-spezifisches chromogenes Substrat (SXa-11)

- Den Inhalt jeder Flasche mit 2,5 ml Aqua dest. rekonstituieren und bis zur vollständigen Auflösung des Inhalts gut schütteln (Vortex).
- Für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren (18-25°C) und dabei gelegentlich schütteln.
- Den Inhalt vor jedem Gebrauch homogenisieren.

Stabilität des rekonstituierten Reagenz R3 in der Originalflasche:

- 1 Monat bei 2-8°C.
- 7 Tage bei Raumtemperatur (18-25°C).
- 2 Monate bei -20°C oder kälter.

R4: Reagenz 4: Tris-BSA-Puffer

- Gebrauchsfertig.
- Vor Gebrauch schütteln.

Stabilität des Puffers, unter Vermeidung jeglicher bakterieller Kontamination:

- In der Originalflasche, bei 2-8°C, bis zu dem auf dem Etikett aufgedruckten Verfalldatum.
- Nach Öffnen 7 Tage bei 2-8°C

Cal: Faktor IXa-Kalibrator

- Den Inhalt jeder Flasche mit 1,0 ml Aqua dest. rekonstituieren und bis zur vollständigen Auflösung des Inhalts gut schütteln (Vortex). Man erhält eine gebrauchsfertige Lösung mit einer Faktor IXa-Konzentration von „C“ (angegeben in mIU/ml)
- Für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren (18-25°C) und dabei gelegentlich schütteln.
- Den Inhalt vor jedem Gebrauch homogenisieren.

Stabilität des rekonstituierten Kalibrators in der Originalflasche:

- 24 Stunden bei 2-8°C.
- 8 Stunden bei Raumtemperatur (18-25°C).
- Nicht einfrieren.

Vorsichtsmaßnahmen:

- Um die Stabilität zu erhöhen, müssen die Reagenzien nach jedem Gebrauch mit der Original-Schraubkappe verschlossen werden (weiße Kappen für R1 und R2, gelbe Kappe für R3, weiße Kappe für Puffer R4 und blaue Kappe für Cal).
- Die Reagenzien sind sorgfältig zu handhaben, um jegliche Kontamination während des Gebrauchs zu vermeiden.
- Eine Gelbfärbung des Substrates deutet auf Kontamination hin. Die betroffene Flasche muss verworfen und eine neue Flasche verwendet werden.

Anmerkung:

- Die Flaschen von R1, R2 und R3 werden unter Vakuum verschlossen. Die Verschlüsse sind vorsichtig zu entfernen, um einen Verlust von Lyophilisat beim Öffnen zu vermeiden.
- Entsprechend der verwendeten Automatenmethode kann es zu Abweichungen der Rekonstitutionsvolumina der Reagenzien von den empfohlenen Rekonstitutionsvolumina kommen. In jedem Fall müssen jedoch die festgelegten reaktiven Verhältnisse (entsprechende Reagenzkonzentrationen im Testansatz) zwischen R1, R2 und R3 genau eingehalten werden.
- Es dürfen ausschließlich Reagenzien aus Testpackungen mit übereinstimmender Chargennummer verwendet werden. Zur Testdurchführung dürfen keine Reagenzien aus Testpackungen mit unterschiedlichen Chargennummern eingesetzt werden. Die Kombination der Reagenzien R1 und R2 ist in Bezug auf die Testcharge optimiert.
- Stabilitätsstudien bei 30°C zeigen, dass die Reagenzien ohne Beeinträchtigung bei Raumtemperatur versendet werden können.

PROBENMATERIAL:

Gereinigte Faktor IXa-Präparationen oder therapeutische Faktor IX-Konzentrate.

TESTDURCHFÜHRUNG:

BIOPHEN Faktor IXa wurde als automatisierte, kinetische Methode entwickelt, kann jedoch ebenso als manuelle Endpunktmethode durchgeführt werden. Adaptionsvorschriften für die verschiedenen Automaten sind auf Anfrage erhältlich. Der Test wird unter Temperaturkontrolle bei 37°C durchgeführt und die Farbentwicklung bei 405 nm gemessen.

KALIBRATION:

Unter Verwendung des in der Testpackung enthaltenen FIXa-Kalibrators (mit 1 ml Aqua dest. rekonstituiert) mit der Konzentration ‚C‘ (chargenabhängig, in der Regel 25-30 mIU/ml) werden folgende Kalibratorverdünnungen hergestellt:

Faktor IXa-Konzentration (mIU/ml)	C/2	C/4	C/8	C/20	C/40	0
Vol. Faktor IXa-Kalibrator (C)	0,500 ml	0,250 ml	0,125 ml	0,050 ml	0,025 ml	0,000 ml
Vol. Tris-BSA-Puffer (R4)	0,500 ml	0,750 ml	0,875 ml	0,950 ml	0,975 ml	1,000 ml

Zur vollständigen Homogenisierung vorsichtig mischen
Die Kalibratorverdünnungen sind für mindestens 4 Stunden bei Raumtemperatur (18-25°C) stabil.

Die Kalibration kann ebenso mit Faktor IXa-Referenzmaterialien (Internationaler bzw. Interner Standard) durchgeführt werden. Das Referenzmaterial (mit bekanntem Faktor IX-Gehalt) wird mit Tris-BSA-Puffer (R4) mindestens 1:2 auf einen Gehalt von ‚C‘ mIU/ml Faktor IXa verdünnt um daraus anschließend die Kalibratorverdünnungen entsprechend eines Kalibrators mit ‚C‘ mIU/ml Faktor IXa herzustellen.

Für die Bestimmung in Faktor IX-Konzentrationen muss die Probe mindestens 1:2 mit Tris-BSA-Puffer (R4) verdünnt werden, um eine erwartete Faktor IXa-Konzentration von ca. C/2 mIU/ml oder niedriger in der Probe zu erhalten. Falls erforderlich wird empfohlen, die Vorverdünnung mit Tris-BSA-Puffer (R4) so einzustellen, dass die erwartete Faktor IXa-Konzentration im Bereich 3 bis 30 mIU/ml liegt. Diese ist für den Test dann 1:2 mit Tris-BSA-Puffer (R4) zu verdünnen. Die erwartete Faktor IXa-Konzentration in der Probe liegt dann im Bereich 1,5 bis 15 mIU/ml. Die gemessene Konzentration muss dann noch mit den Verdünnungs- und Vorverdünnungsfaktoren multipliziert werden.

Um optimale Testgenauigkeit zu gewährleisten, dürfen die verdünnten Kalibrationslösungen erst kurz vor der Testdurchführung hergestellt werden. Dies verhindert einen Abbau von Faktor IXa, der zu falschen Ergebnissen führen kann.

DURCHFÜHRUNG:

Manuelle Methode:

Proben (mit erwarteten Faktor IXa-Konzentrationen im Bereich 3 bis 30 mIU/ml) müssen mindestens in einer 1:2-Verdünnung mit Tris-BSA-Puffer (R4) im Test eingesetzt werden.

Für die Bestimmung in therapeutischen Konzentrationen oder Lösungen, deren Faktor IXa-Konzentration vom Faktor IX-Gehalt im Plasma abweicht, muss die Probe zunächst auf eine erwartete Faktor IXa-Konzentration im Bereich von ca. 3 bis 30 mIU/ml vorverdünnt und dann zur Testdurchführung 1:2 mit Tris-BSA-Puffer (R4) verdünnt werden.

Reagenzien	Mikrotiterplatte	Teströhrchen
Kalibratoren, verdünnte Proben oder Kontrollen	50 µl	200 µl
R1 : Faktor X-VIII:C	50 µl	200 µl
Mischen und 2 min. bei 37°C inkubieren, dann zugeben:		
R2 : Aktivierungsreagenz	50 µl	200 µl
Mischen und 3 min. bei 37°C inkubieren, dann zugeben:		
R3: Substrat SXa-11, bei 37°C vorinkubiert	50 µl	200 µl
Mischen und für exakt 3 min. bei 37°C inkubieren		
Stoppen der Reaktion durch Zugabe von:		
Zitronensäure (2%) oder Essigsäure (20%)	50 µl	200 µl
Mischen und die Absorption bei 405nm gegen einen Probenleerwert messen.		

Die Gelbfärbung ist für 2 Stunden stabil.

Der Probenleerwert wird durch Mischung der Reagenzien in umgekehrten Reihenfolge wie bei den Proben erzeugt, d.h: Zitronensäure (2%), Substrat SXa-11, verdünnte Probe, R1, R2.

Die Absorption wird bei 405 nm (A405) gemessen und anschließend der Probenleerwert des Testes vom A405-Wert subtrahiert.

Kinetische Methode:

Der Test kann auch als kinetische Methode durchgeführt werden. In diesem Fall wird die Änderung der Absorption im Bereich von 10 bis 100 Sekunden nach Zugabe des Substrates aufgezeichnet. Die Subtraktion der Probenleerwerte und das Stoppen der Reaktion ist bei der kinetischen Methode nicht erforderlich. Die Ergebnisse werden anhand der Änderung der Absorption (ΔA_{405}) der Kalibratoren und Proben berechnet.

Automatisierte Methoden:

Adaptionsvorschriften für die verschiedenen Automaten sind auf Anfrage erhältlich. Der Test wird dann kinetisch durchgeführt. Das Stoppen der Reaktion ist nicht erforderlich und die Probenleerwerte werden automatisch subtrahiert.

Anmerkung:

- Falls die verwendete Methode andere Reagenzienvolumina als die oben beschriebenen erfordert, müssen die Verhältnisse der Reagenzienkonzentrationen und Reagenzienvolumina genau eingehalten werden, um den Erhalt der Leistungsmerkmale des Testes zu gewährleisten.
- Bei Proben, deren Färbung von der gewöhnlichen Färbung abweicht, ist ein Probenleerwert durchzuführen.

ERGEBNISSE:

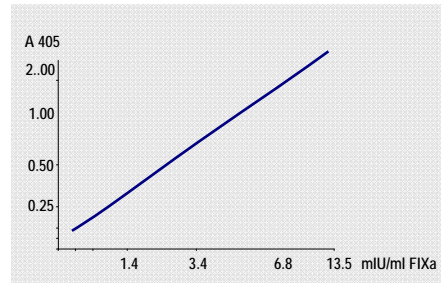
- Bei der Endpunktmethode wird die Faktor IXa-Konzentration (mIU/ml) auf der x-Achse (Abszisse) gegen die korrespondierende Absorption (A405) auf der y-Achse (Ordinate) im bilogarithmischen Maßstab aufgetragen. Die Faktor IXa-Konzentration der Probe kann direkt an der Kalibrationskurve abgelesen werden. Die Ergebnisse werden als mIU/ml Faktor IXa angegeben.
- Die Ergebnisberechnung bei der kinetischen Methode erfolgt entsprechend, durch Auftragung der ΔA_{405} -Werte anstelle der A405-Werte.
- Bei der automatisierten Durchführung werden die Ergebnisse der Proben entsprechend der gemessenen Kalibrationskurve und der Probenverdünnung automatisch berechnet.
- Bei einer Probenverdünnung von 1:2 muss die gemessene Faktor IXa-Konzentration der Probe mit 2 multipliziert werden. Bei abweichenden Probenverdünnungen muss die gemessene Faktor IXa-Konzentration der Probe mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor multipliziert werden, um die Faktor IXa-Konzentration in der Probe zu erhalten.

QUALITÄTSKONTROLLE:

Die Qualitätskontrolle kann mit internen oder kommerziell erhältlichen Kontrolllösungen durchgeführt werden, deren Faktor IXa-Gehalt bestimmt wurde. Die Messung von Qualitätskontrollen ermöglicht eine Validierung der Kalibration und die Überprüfung der gleichbleibenden Qualität von Analysenlauf zu Analysenlauf und von Serie zu Serie bei Verwendung der selben Reagenziencharge.

BEISPIELKALIBRATION:

Bei der gezeigten Kalibrationskurve handelt es sich lediglich um ein Beispiel, das mit der manuellen Endpunkt-Methode gemessen wurde. Zur Bestimmung der Faktor IXa-Konzentration darf ausschließlich eine, zusammen mit der jeweiligen Analysenserie gemessene, Kalibrationskurve verwendet werden.



RÜCKFÜHRBARKEIT AUF REFERENZMATERIALIEN:

Die Faktor IXa-Konzentration des Faktor IXa-Kalibrators, der in der Testpackung enthalten ist, wurde exakt gegen einen Internen Referenzstandard bestimmt, der auf den 1. Internationalen Standard für humanen aktivierten Faktor IX (FIXa) bezogen wurde (NIBSC, code 97/562).

LEISTUNGSMERKMALE:

Die Nachweisgrenze des Testes wird an der Kalibrationskurve durch Messung des scheinbaren Faktor IXa-Gehalts einer Faktor IXa-freien Probe bestimmt und berechnet sich als der mittlere A405-Wert dieser Probe plus 3 x Standardabweichung. Diese Nachweisgrenze liegt bei ca. 0,1 mIU/ml (entsprechend ca. 0,1 ng/ml).

BIOCHEMIE:

Faktor IX (FIX) ist ein einkettiges, Vitamin K-abhängig synthetisiertes Glykoprotein mit einer molekularen Masse von ca. 55 kDa und ist an der mittleren Phase der Blutgerinnung beteiligt. Der normale Faktor IX-Gehalt in humanem Plasma liegt bei ca. 4 bis 5 µg/ml. Nach Aktivierung durch Faktor XIa (in Gegenwart von Calcium) bildet Faktor IXa (in Gegenwart von Calcium und Phospholipiden) einen aktiven Komplex mit Faktor VIII:C, der Faktor X zu Faktor Xa aktiviert.

REFERENZEN:

- Taran LD, "Factor IX of the blood coagulation system: a review", Biochemistry (Mosc.), 62(7):685-93, 1997.
- Wagenvoort R, Hendrix H, Tran T, Hemker HC, "Development of a sensitive and rapid chromogenic FIX assay for clinical use", Haemostasis, 20(5): 276-88, 1990.
- www.ncbi.nlm.nih.gov, OMIM, Haemophilia B, FIX deficiency, +306900, +134540, +134510, +134520.