

BIOPHEN™ Faktor X

REF 221705

R1 R2 4x2,5 mL, R3 4x5 mL

Chromogener Test zur Bestimmung von Faktor X im Plasma

Nur für *in-vitro*-Forschungszwecke

VERWENDUNGSZWECK:

BIOPHEN™ Faktor X ist ein *in-vitro*-Test zur quantitativen Bestimmung von Faktor X (FX) in humanem Citratplasma mit automatisierten oder manuellen Methoden.

Der Test darf nur zu Forschungszwecken verwendet werden und nicht der Diagnose oder Behandlung von Patienten dienen.

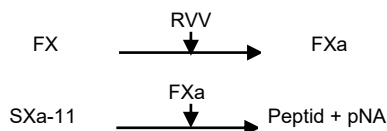
ZUSAMMENFASSUNG:

Technisch:¹⁻²

Gerinnungsfaktor X, auch Stuart Prower Faktor genannt, ist ein Vitamin K-abhängiger Blutgerinnungsfaktor, dessen Molekulargewicht etwa 59 kD beträgt und der in der Leber synthetisiert wird. FX ist im Plasma üblicherweise in einer Konzentration von 10 µg/mL vorhanden, wobei dieser Wert zwischen Einzelpersonen stark variieren kann. FX kann sowohl über den intrinsischen als auch extrinsischen Pfad aktiviert werden. Im Komplex mit aktiviertem Faktor V und in Gegenwart von Phospholipiden und Calcium wandelt aktivierter FX (FXa) Prothrombin in Thrombin um.

TESTPRINZIP:

BIOPHEN™ Faktor X ist eine chromogene Methode, bei der vorhandener FX durch Zugabe von RVV (Russell's Viper Venom, ein aus Schlangengift extrahiertes Enzym), spezifisch aktiviert wird. Der gebildete aktivierte FX kann dann durch Spaltung eines chromogenen Substrates exakt bestimmt werden. Die Menge des durch die Spaltung freigesetzten para-Nitroanilin (pNA) ist direkt proportional zur Faktor X-Konzentration in der Probe. Die Farbentwicklung wird bei 405 nm gemessen.



REAGENZIEN:

R1 SXa-11-Substrat: Chromogenes Substrat, spezifisch für FXa (SXa-11), lyophilisiert. 4 Flaschen mit je 2,5 mL.

R2 RVV: Hochgereinigtes Enzym, extrahiert aus dem Russell's Viper Venom, lyophilisiert in Gegenwart von Calcium und Stabilisatoren, kann in Gegenwart von Calcium FX spezifisch in FXa aktivieren. 4 Flaschen mit je 2,5 mL.

R3 Tris-NaCl-Puffer: 10-fach konzentriert, flüssig. Enthält eine geringe Menge an Natriumazid (0,9 g/L). 4 Flaschen mit je 5 mL.

Die RVV-Konzentration wird für jede Charge bestimmt, um eine optimale Reaktivität und Linearität des Testes zu gewährleisten.

ANMERKUNGEN UND WARNHINWEISE:

- Für die Herstellung eines Teils der Reagenzien wird Material tierischen Ursprungs verwendet. Produkte biologischen Ursprungs müssen mit den erforderlichen Vorsichtsmaßnahmen und als potentiell infektiös gehandhabt werden.
- Natriumazid kann mit Blei- bzw. Kupferarmaturen unter Bildung explosiver Verbindungen reagieren.
- Bei Entsorgung sind die lokalen Richtlinien zu befolgen.
- Nur Reagenzien aus Packungen mit identischer Chargennummer verwenden.
- Stabilitätsstudien für 3 Wochen bei 30°C haben gezeigt, dass die Packungen ohne Beeinträchtigung bei Raumtemperatur versendet werden können.
- Zur *in-vitro*-Nutzung in professionellem Laborgebrauch.

VORBEREITUNG DER REAGENZIEN:

Die Gummistopfen der Flaschen sind vorsichtig zu öffnen, um einen Verlust an Reagenz zu vermeiden.

R1 R2 Den Inhalt jeder Flasche mit exakt 2,5 mL aqua dest. rekonstituieren. Bis zur vollständigen Auflösung des Inhalts gut durchmischen und dabei Schaumbildung vermeiden, gemäß Applikationsanleitung auf den Gerinnungsautomaten laden.

Manuelle Methode: 30 Minuten bei Raumtemperatur (18-25°C) inkubieren. Den Inhalt vor jedem Gebrauch homogenisieren.

R3 Durchmischen und die erforderliche Menge 1:10 in aqua dest. verdünnen (die in der Flasche enthaltenen 5 mL ermöglichen die Herstellung von 50 mL gebrauchsfertigem Puffer)

LAGERUNG UND STABILITÄT:

Die ungeöffneten Reagenzien müssen bei 2-8°C in der Originalverpackung gelagert werden. Sie sind dann bis zu dem auf dem Etikett aufgedruckten Verfalldatum stabil.

R1 Stabilität des geschlossen gelagerten Reagenz nach Rekonstitution unter der Voraussetzung, dass dieses nicht kontaminiert wurde und keine Verdunstung erfolgte:

- 1 Monat bei 2-8°C
- 3 Tage bei Raumtemperatur (18-25°C)
- 1 Monat bei ≤ -20°C*
- On Board-Stabilität – siehe gerätespezifische Applikation

R2 Stabilität des geschlossen gelagerten Reagenz nach Rekonstitution unter der Voraussetzung, dass dieses nicht kontaminiert wurde und keine Verdunstung erfolgte:

- 1 Woche bei 2-8°C
- 3 Tage bei Raumtemperatur (18-25°C)
- 1 Monat bei ≤ -20°C*
- On Board-Stabilität – siehe gerätespezifische Applikation

*Kann einmalig bei 37°C aufgetaut werden und muss umgehend verwendet werden.

R3 Stabilität des geschlossen gelagerten Reagenz nach dem Öffnen unter der Voraussetzung, dass dieses nicht kontaminiert wurde und keine Verdunstung erfolgte:

- 4 Wochen bei 2-8°C
- 7 Tage bei 2-8°C (verdünnte Lösung)
- On Board-Stabilität – siehe gerätespezifische Applikation

Eine Gelbfärbung des Substrats deutet auf Kontamination hin. Die betroffene Flasche muss entsorgt und eine neue verwendet werden.

ERFORDERLICHE MATERIALIEN, DIE NICHT IM KIT ENTHALTEN SIND:

Reagenzien:

- Aqua dest.
- 20% Essigsäure oder 2% Zitronensäure (Endpunkt-Methode)
- Spezifische Kalibratoren und Kontrollen:

Artikelbezeichnung	Art.Nr.
BIOPHEN™ Kalibrationsplasma Gerinnung	222101
BIOPHEN™ Kontrollplasma Gerinnung „Normal“	223201
BIOPHEN™ Kontrollplasma Gerinnung „Abnormal“	223301

Außerdem ist die spezifische Applikationsanleitung des verwendeten Gerinnungsautomaten zu beachten.

Geräte:

- Spektrophotometer oder Gerinnungsautomat für chromogene Tests
- Stoppuhr, kalibrierte Pipetten, Kunststoff-Teströhrchen oder Mikrotiterplatte

PROBENGEWINNUNG:

Blut (9 Volumenteile) wird vorsichtig in 0,109 M Citrat als Antikoagulant (1 Volumenteil) abgenommen. Die Blutabnahme erfolgt durch Venenpunktion. Das erste Röhrchen ist zu verwerfen.

Die Gewinnung und Lagerung der Proben hat gemäß aktuellen lokalen Vorschriften zu erfolgen (Vorschriften für die Probengewinnung, -handhabung und -lagerung sind im CLSI-Dokument H21-A5³ veröffentlicht). In Bezug auf die Lagerung des Plasmas sind die Referenzen zu beachten.⁴

TESTDURCHFÜHRUNG:

Der Testkit BIOPHEN™ Faktor X kann sowohl als automatisierbare kinetische Methode wie auch als manuelle Endpunktmethode durchgeführt werden. Der Test wird bei einer kontrollierten Temperatur von 37°C durchgeführt und die Farbentwicklung bei 405 nm gemessen.

Testmethode:

1. Die Kalibrationskurve kann mit einem normalen Citratplasma-Pool oder Kalibrationsplasma mit bekannter FX-Konzentration C erstellt werden. C entspricht gemäß Definition einem FX-Gehalt von 100%.

Der Test verwendet standardmäßig eine Plasmaverdünnung von 1:10 und der Kalibrationsbereich umfasst 0 bis 200% FX. Ein FX-Gehalt von 200% entspricht somit einer 1:5-Verdünnung des Plasmapools (im verdünnten Tris-BSA-Puffer).

Um bei Verwendung eines Kalibrationsplasmas mit bekannter FX-Konzentration C im Test eine FX-Konzentration von 200% zu erzielen, wird der Verdünnungsfaktor wie folgt berechnet: $5 \times C:100$

Die Kalibrationskurve wird anschließend mit dem Puffer [R3] wie folgt erstellt:

Probe	2C	C	C:2	0
FX (%)	200	100	50	0
Kalibrator	500 µL	250 µL	125 µL	0 µL
Puffer	0 µL	250 µL	375 µL	500 µL

2. Proben und Kontrollen werden 1:10 in Puffer [R3] verdünnt.

Die Kalibrationskurve ist zu erstellen und mittels Qualitätskontrollen zu überprüfen. Verdünnte Proben sollten, wenn sie bei Raumtemperatur (18-25°C) gelagert werden, rasch getestet werden. Die exakten chargenspezifischen Werte der Kalibratoren und Kontrollen sind einem der Packung beiliegenden Datenblatt zu entnehmen.

3. In Mikrotiterplatten oder Teströhrchen, die jeweils bei 37°C präinkubiert sind, wird nach folgendem Schema zugegeben:

	Mikrotiterplatte	Teströhrchen
Verdünnte Proben, Kalibratoren und Kontrollen	50 µL	200 µL
1 bis 2 Minuten bei 37°C inkubieren und dann zugeben:		
[R1] SXa-11-Substrat, präinkubiert bei 37°C	50 µL	200 µL
1 bis 2 Minuten bei 37°C mischen und inkubieren, dann zugeben:		
[R2] RVV, präinkubiert bei 37°C	50 µL	200 µL
Mischen und exakt 2 Minuten bei 37°C inkubieren		
Stoppen der Reaktion durch Zugabe von:		
Zitronensäure (2%)*	50 µL	200 µL
Mischen und die Absorption bei 405 nm gegen den Probenleerwert messen.		

*Oder Essigsäure (20%). Die Gelbfärbung ist für 2 Stunden stabil.

Der Probenleerwert wird durch Mischung der Reagenzien in umgekehrter Reihenfolge erzeugt, d.h. Zitronensäure (2%), RVV, chromogenes Substrat, verdünnte Probe.

Die Absorption wird bei 405 nm (A405) gemessen und anschließend der Probenleerwert des Testes vom A405-Wert subtrahiert. Bei lipämischen, ikterischen oder hämolytierten Plasmen oder falls die Färbung des Plasmas von der gewöhnlichen Färbung abweicht, ist ein Probenleerwert durchzuführen.

Falls die verwendete Methode andere Reagenzvolumente als die oben beschriebenen erfordert, müssen die Verhältnisse der Reagenzkonzentrationen genau eingehalten werden, um den Erhalt der Leistungsmerkmale des Tests zu gewährleisten.

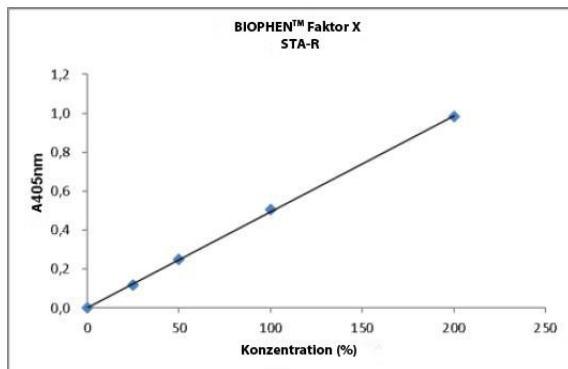
Es liegt in der Verantwortung des Anwenders, alle Veränderungen und sämtliche Auswirkungen auf die Testergebnisse zu überprüfen.

Für die automatisierte Durchführung sind Applikationsanleitungen für die gängigsten Gerinnungsautomaten auf Anfrage erhältlich. Die gerätespezifische Applikation und die spezifischen Vorsichtsmaßnahmen des jeweiligen Gerinnungsautomaten sind zu beachten.

KALIBRATION:

BIOPHEN™ Faktor X kann für die Messung von FX in humanem Plasma kalibriert werden. Entsprechende Kalibrationsplasmen, die den Kalibrationsbereich abdecken, sind von HYPHEN BioMed erhältlich (siehe Abschnitt ERFORDERLICHE MATERIALIEN, DIE NICHT IM KIT ENTHALTEN SIND) und können für die Erstellung der Kalibrationskurve verwendet werden.

Die nachfolgend gezeigte Kalibrationskurve dient lediglich als Beispiel. Zur Ergebnisberechnung von Proben darf ausschließlich die für die jeweilige Analysenserie gemessene Kalibrationskurve verwendet werden.



QUALITÄTSKONTROLLE:

Die Verwendung von Qualitätskontrollplasmen ermöglicht bei Verwendung der gleichen Reagenzcharge die Validierung der Kalibrationskurve und der homogenen Reaktivität des Tests von Analyse zu Analyse.

Gemäß guter Laborpraxis ist bei jeder Testserie eine Qualitätskontrolle zu inkludieren, um die generierten Ergebnisse zu überprüfen. Zumindest bei Chargenwechsel, größeren Wartungsarbeiten am Analysenautomaten oder wenn die Kontrollen außerhalb des Vertrauensbereiches liegen, muss eine Neukalibration erfolgen. Jedes Labor sollte die Richtigkeit der Zielwerte und Akzeptanzbereiche unter den eigenen Testbedingungen überprüfen.

ERGEBNISSE:

- Bei der manuellen Methode wird auf Millimeterpapier die FX-Konzentration in % auf der Abszisse (x-Achse) gegen die jeweilige Absorption bei 405 nm auf der Ordinate (y-Achse) aufgetragen.
- Bei der kinetischen Methode ist ΔA_{405} anstelle von A_{405} zu verwenden.
- Sofern die Standardverdünnung verwendet wird, leitet sich die FX-Konzentration in % in der Probe direkt von der Kalibrationskurve ab.
- Falls andere Verdünnungen genutzt wurden, wird die gemessene Konzentration mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor multipliziert.

Die Ergebnisse dürfen ausschließlich zu Forschungszwecken verwendet werden und nicht der Diagnose oder Behandlung von Patienten dienen.

EINSCHRÄNKUNGEN DES TESTES:

- Um eine optimale Leistung zu gewährleisten und die Spezifikationen zu erfüllen, sollten die technischen Anweisungen von HYPHEN BioMed sorgsam beachtet werden.
- Jegliches Reagenz mit unüblicher Erscheinung oder Anzeichen von Kontamination muss verworfen werden. Jegliche verdächtige Proben oder jene mit Anzeichen für Aktivierung müssen verworfen werden.
- Die Anwesenheit von Anti-Human FX-Antikörpern im Plasma kann den Test beeinflussen.

LEISTUNGSMERKMALE:

- Die untere Nachweisgrenze hängt vom verwendeten Analysensystem ab ($\leq 5\%$ bei der manuellen Methode).
- Der Messbereich hängt vom verwendeten Analysensystem ab (zwischen 5 und 200% FX bei der manuellen Methode).
- Unter den vorgegebenen Bedingungen ist der Test streng spezifisch für die Messung der FX-Konzentration: Verwendung von Russell's Viper Venom mit spezifischer Wirkung auf FX, Abwesenheit von Phospholipiden und Gegenwart von spezifischen Inhibitoren für Thrombin (Hirudin) und Heparin (Polybren).
- Leistungsstudien wurden intern unter Einsatz der manuellen Methode durchgeführt. Die folgenden Daten wurden erhalten:

Proben	Inter-Lauf		
	n	Mittelwert	SD
Probe 1	8	101	5,4
Probe 2	8	58	5,4

- Korrelation mit Referenzmethode (BIOPHEN™ Faktor X vs. Faktor X Clotting-Test auf KC10):
 $n = 47$ $y = 0,87x$ $r = 0,98$
- Interferenzen: Es wurde keine signifikante Interferenz durch Heparin-Konzentrationen im Plasma bis zu 1 IE/mL festgestellt.

LITERATUR:

- Bergström K and Egberg N. Determination of vitamin K sensitive coagulation factors in plasma. Studies on three methods using synthetic chromogenic substrates. Thromb. Res. 1978.
- Lindhout MJ et al. Activation of decarboxy factor X by a protein from Russell's viper venom. Purification and partial characterization of activated decarboxy factor X. Biophys. Acta. 1978.
- CLSI Document H21-A5: "Collection, transport, and processing of blood specimens for testing plasma-based coagulation assays and molecular hemostasis assays; approved guideline". 2008
- Mauge L. and Alhenc-Gelas M. Stabilité pré-analytique des paramètres de la coagulation: revue des données disponibles. Ann Biol Clin. 2014.

SYMBOLE:

Verwendete Symbole und Zeichen sind in der ISO-Norm 15223-1 gelistet. Das der Packung beiliegende Symbolerklärungs-Blatt ist zu beachten.

- [R2] H315: Verursacht Hautreizungen
- H319: Verursacht schwere Augenreizung