

BIOPHEN® Faktor X

Art.Nr. 221705

Chromogener Test zur Bestimmung von Faktor X in Plasma

Nur für *In-vitro*-Forschungszwecke

VERWENDUNGSZWECK:

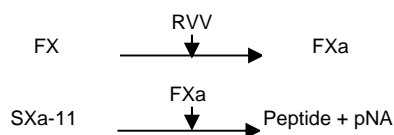
BIOPHEN® Faktor X ist ein *In-vitro*-Test zur quantitativen Bestimmung von Faktor X in humanem Citratplasma mit automatisierten oder manuellen Methoden.

ZUSAMMENFASSUNG:

Ein angeborener oder erworbener Faktor X-Mangel ist ein Risikofaktor für Blutgerinnungsstörungen.

TESTPRINZIP:

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



REAGENZIEN:

R1: Reagenz 1: SXa-11 Substrat

Chromogenes Substrat, spezifisch für Faktor Xa (SXa-11), lyophilisiert:
4 Flaschen mit jeweils etwa 5 mg SXa-11 (mit je 2,5 ml aqua dest. rekonstituieren).

R2: Reagenz 2: RVV

Hochgereinigtes Enzym, extrahiert aus dem Russel's Viper Venom, in Gegenwart von Calcium und Stabilisatoren lyophilisiert; RVV kann in Gegenwart von Calcium Faktor X spezifisch in Faktor Xa aktivieren. 4 Flaschen (mit je 2,5 ml aqua dest. rekonstituieren).

R3: Reagenz 3: Tris-NaCl Puffer, 10-fach Konzentrat

10-fach konzentrierter Tris-NaCl Puffer. Enthält Natriumazid. Vor Gebrauch 1+9 mit aqua dest. verdünnen. 4 Flaschen mit je 5 ml.

Warnhinweise:

- Rinderserumalbumin (BSA) wurde aus Rinderplasma hergestellt und auf die Abwesenheit von Krankheitserregern getestet. Das Plasma wurde von BSE-freien Tieren gesammelt. Allerdings gibt es keinen Test, der die Anwesenheit von Krankheitserregern völlig ausschließen kann. Jegliche Produkte mit biologischem Ursprung sind daher mit allen Vorsichtsmaßnahmen, die im Umgang mit infektiösem Material erforderlich sind, zu handhaben.
- Alle nötigen Vorsichtsmaßnahmen müssen ergriffen werden, um das Verschlucken oder eine sonstige Aufnahme von R1 und R2 zu vermeiden. Bei Kontakt mit der Haut ist die betroffene Stelle gründlich mit Wasser zu reinigen. Bei Kontakt mit einer offenen Wunde wenden Sie sich an einen Arzt und informieren Sie ihn über den Ursprung des Produktes.
- Puffer R3 enthält als Konservierungsmittel Natriumazid, welches mit Blei- bzw. Kupferarmaturen unter Bildung hochexplosiver Metallazide reagieren kann. Bei Entsorgung der Lösung in den Abguss muss mit großen Mengen Wasser nachgespült werden.
- Vermeiden sie Haut- und Augenkontakt. Bitte nicht in der Kanalisation entsorgen. Tragen Sie bitte Arbeitsschutzkleidung.
- Nur für *In vitro*-Forschungszwecke.
- Die RVV Konzentration kann von Charge zu Charge variieren, wird jedoch für jede Charge exakt bestimmt.

ERFORDERLICHE MATERIALIEN, DIE NICHT IN DER PACKUNG ENTHALTEN SIND:

Reagenzien:

- Aqua dest., bevorzugt steril.
- Endpunktmethode: Essigsäure (20%) oder Zitronensäure (2%).
- Plasma Kalibrator (z.B. BIOPHEN® Plasma Kalibrator Art.Nr. 222101).
- Normal- und Abnormal Kontrollplasmen (z.B. BIOPHEN® Kontrollplasma „Normal“, Art.Nr. 223201 und BIOPHEN® Kontrollplasma „Abnormal“, Art.Nr. 223301).

Geräte:

- Spektrophotometer oder Gerinnungsautomaten zur Bestimmung chromogener Tests bei 405 nm.
- Manuelle Methode: Wasserbad oder Inkubator bei 37°C, Reaktionsgefäße, Stoppuhr.
- Geeichte Pipetten.

LAGERUNG:

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

REKONSTITUTION UND STABILITÄT DER REAGENZIEN:

R1: Reagenz 1: Faktor Xa spezifisches chromogenes Substrat (SXa-11)

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

Stabilität des rekonstituierten Reagenzes in der Originalflasche:

- 1 Monat bei 2-8°C.
- 3 Tage bei Raumtemperatur (18-25°C)
- 1 Monat bei -20°C (vor Verwendung für 15 Minuten im Wasserbad bei 37°C auftauen).

R2: Reagenz 2: RVV

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

Stabilität des rekonstituierten Reagenzes in der Originalflasche:

- 1 Woche bei 2-8°C.
- 3 Tage bei Raumtemperatur (18-25°C).
- 1 Monat bei -20°C (vor Verwendung für 15 Minuten im Wasserbad bei 37°C auftauen).

R3: Reagenz 3: Tris-NaCl Puffer, 10-fach Konzentrat

10-fach konzentrierter Tris-NaCl Puffer. Verdünnen Sie die erforderliche Menge 1:10 mit destilliertem Wasser (5 ml in der Flasche ergeben somit nach der Verdünnung 50 ml einsatzbereiten Puffer). Der Puffer muss in der Originalflasche bei 2-8°C gelagert werden und nach dem Öffnen innerhalb von 4 Wochen aufgebraucht werden. Der verdünnte Puffer kann 7 Tage verwendet werden, sofern jegliche Verunreinigung ausgeschlossen werden kann und er bei 2-8 ° C gelagert wurde.

Vorsichtsmaßnahmen:

- Um die Stabilität zu erhöhen, müssen die Reagenzien nach jedem Gebrauch mit der Original-Schraubkappe verschlossen werden (gelbe Kappen für SXa-11, weiße Kappen für RVV, weiße Kappe für den Puffer).
- Die Reagenzien sind sorgfältig zu handhaben, um jegliche Kontamination während des Gebrauchs zu vermeiden.
- Eine Gelbfärbung des Substrats deutet auf Kontamination hin. Die betroffene Flasche muss verworfen und eine neue Flasche verwendet werden.
- Die 30-minütige Inkubation bei Raumtemperatur ermöglicht eine Stabilisierung der Reagenzien und gewährleistet eine homogene Reaktivität.
- Um Verdunstung der Reagenzien zu vermeiden, sollten die Flaschen so kurz wie möglich offen stehen oder ein Reduzierstück für den Flaschenhals verwendet werden.

Anmerkung:

- Die Flaschen von R1 und R2 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 und R2 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.

PROBENGEWINNUNG:

Blut (9 Volumenteile) wird vorsichtig in 0,109 M Citrat als Antikoagulant (1 Volumenteil) abgenommen. Die Blutabnahme erfolgt durch Venenpunktion, wobei jegliche Gerinnungsaktivierung vermieden werden muss.

- Innerhalb von 4 Stunden muss das Blut bei 3.000 g für 20 min bei ≤18°C zentrifugiert werden. Das Plasma wird anschließend mit einer Plastikpipette in ein Plastikröhrchen überführt.
- Lagerung der Plasmaproben:
 - Bis zu 8 Stunden bei Raumtemperatur (18-25°C).
 - Bis zu 24 Stunden bei 2-8 °C.
 - Bis zu 1 Monat tiefgefroren bei ≤ -20°C (vor Verwendung für 15 Minuten im Wasserbad bei 37°C auftauen).

Weitere Vorschriften für die Probengewinnung, -handhabung und -lagerung sind im NCCLS Dokument H21-A2 veröffentlicht.

TESTDURCHFÜHRUNG:

Der Testkit BIOPHEN® Faktor X kann sowohl als automatisierbare kinetische Methode wie auch als manuelle Endpunktmethode durchgeführt werden. Anleitungen für verschiedene Gerinnungsautomaten sind auf Anfrage erhältlich. Der Test wird bei einer kontrollierten Temperatur von 37°C durchgeführt und die Farbentwicklung bei 405 nm gemessen.

KALIBRATION:

Die Kalibration wird mit einem normalem Citratplasma-Pool (bestehend aus Plasmen von mindestens 30 Normalspendern, männlich oder weiblich, im Alter zwischen 18 und 55 Jahren und ohne Medikation bzw. Erkrankung) mit einem zugeordneten Gehalt von 100% Faktor X durchgeführt. Der Test verwendet standardmäßig eine Plasmaverdünnung von 1:10. Gemäß Definition entspricht diese Verdünnung des Plasmapools einem Faktor X-Gehalt von 100%. Der dynamische Bereich umfasst 0 bis 200% Faktor X. Ein Faktor X-Gehalt von 200% entspricht somit einer 1:5-Verdünnung des Plasmapools (im verdünnten Tris-BSA-Puffer).

BIOPHEN® Faktor X kann ebenso mit kommerziell erhältlichem Kalibrationsplasma mit bekanntem Faktor X-Gehalt bzw. internationalen oder internen Referenzmaterialien für die Bestimmung von Faktor X-Konzentrationen kalibriert werden. Bei Verwendung eines kommerziell erhältlichen Kalibrationsplasmas mit bekannter Faktor X-Konzentration (C) entspricht die 1:10-Verdünnung dem für das Kalibrationsplasma angegebenen Faktor X und die 1:5-Verdünnung dem doppelten Gehalt. Um bei Verwendung eines Kalibrationsplasmas mit einer Faktor X-Konzentration von C im Test eine Faktor X-Konzentration von 200 % zu erzielen, wird der Verdünnungsfaktor wie folgt berechnet: $5 \times C / 100$ (z.B. $5 \times 110 \% / 100 =$ Verdünnungsfaktor 1:5,5).

Die Kalibratorverdünnungen werden wie folgt hergestellt:

% FX	200% FX Kalibrator (µl)	Puffer (R3, verdünnt) (µl)
0	0	500
50	125	375
100	250	250
200	500	0

TESTDURCHFÜHRUNG:

Manuelle Methode:

Proben und Kontrollen werden in 1:10 Verdünnungen in Tris-NaCl Puffer eingesetzt.

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

	Mikrotiterplatte	Teströhrchen
Kalibratoren; Kontrollen und Testplasma 1:10 verd.	50 µl	200 µl
1 bis 2 Minuten bei 37°C inkubieren und dann zugeben:		
R1: Chromogenes 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%) oder Essigsäure (20%)	50 µl	200 µl
Mischen und die Absorption bei 405 nm gegen einen Probenleerwert* messen.		

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.

Automatisierte Methoden:

Ausführliche Anleitungen inklusive Reagenzienvorbereitungen für Gerinnungsautomaten sind auf Anfrage erhältlich.

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 lipämischen, ikterischen oder hämolysierten Plasmen, bzw. falls die Färbung des Plasmas von der gewöhnlichen Färbung abweicht, ist ein Probenleerwert durchzuführen.

QUALITÄTSKONTROLLE:

Die Verwendung von Qualitätskontrollplasmen ermöglicht die Validierung der Kalibration bzw. der homogenen Reaktivität des BIOPHEN® Faktor X Tests von Analyse zu Analyse. Es sind verschiedene Qualitätskontrollen erhältlich:

BIOPHEN® Kontrollplasma "Normal", Art.Nr. 223201

BIOPHEN® Kontrollplasma "Abnormal", Art.Nr. 223301

Jedes Labor sollte für jede neue Kontrollplasma Charge die Richtigkeit der Zielwert und Akzeptanzbereiche unter den eigenen Arbeitsbedingungen überprüfen.

EINSCHRÄNKUNGEN DES TESTS:

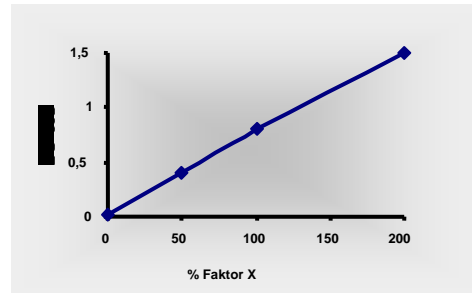
- Der Test ist unempfindlich gegenüber Heparin Konzentrationen von mindestens 1 IE/ml.
- Im Plasma vorhandene humane Anti-Faktor X Antikörper können den Test stören.
- Bei Patienten unter Dicoumarol Therapie werden im Vergleich zu Clotting Methoden leicht erhöhte Faktor X Konzentrationen gemessen.
- Um eine optimale Performance des Tests zu gewährleisten, müssen die Anweisungen strikt eingehalten werden.

ERGEBNISSE:

- Bei der Endpunktmethode wird die Faktor X-Konzentration (%) linear auf der x-Achse (Abszisse) gegen die korrespondierende lineare Absorption (A405) auf der y-Achse (Ordinate) aufgetragen. Die Faktor X Konzentration der Probe kann direkt von der Kalibrationskurve abgelesen werden. Die Ergebnisse werden als % Faktor X angegeben.
- Bei der automatisierten Durchführung werden die Ergebnisse der Proben entsprechend der gemessenen Kalibrationskurve und der Probenverdünnung automatisch berechnet.
- Der dynamische Bereich liegt bei 5 bis 200%.
- Bei einer Probenverdünnung von 1:10 kann die Faktor X Konzentration der Proben direkt an der Kalibrationskurve abgelesen werden. Bei abweichenden Probenverdünnungen müssen die Ergebnisse mit dem Verdünnungsfaktor D, dividiert durch 10, z.B. D/10 multipliziert werden.

BEISPIEL FÜR EINE KALIBRATIONS-KURVE:

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



VALIDIERUNG DER KALIBRATIONS-KURVE:

Die Kalibrationskurve ist akzeptabel, wenn sich die Konzentrationen für die gemessenen Kontrollplasmen innerhalb der angegebenen Vertrauensbereiche befinden.

LEISTUNGSMERKMALE:

- Die Nachweisgrenze wird durch die mittlere Gerinnungszeit eines Faktor X Mangelplasmas plus 3 Standardabweichungen ermittelt. Die Nachweisgrenze liegt bei ≤5%.
- Der Test ist bis zu einer Faktor X-Konzentration von 200 % linear.
- Beispiel der Reproduzierbarkeit (Inter-Assay) für Proben mit variablen Faktor X-Konzentrationen (manuelle Methode):

Proben	FX Konzentration %	Inter-Assay CV %	N
Probe 1	101	5,4	8
Probe 2	58	5,4	8

- BIOPHEN® Faktor X zeigt eine gute Korrelation zu einem Faktor X Clottingtest (manuelle Methode): $Y = 0,87 X$ $n=47$ $r = 0,98$
- In den vorgegebenen Bedingungen ist der Test streng spezifisch für die Messung der Faktor X-Konzentration (Verwendung von Russell's Viper Venom mit spezifischer Wirkung auf Faktor X, Abwesenheit von Phospholipiden und Gegenwart von spezifischen Inhibitoren für Thrombin (Hirudin) und Heparin (Polybren).

ERWARTETE WERTE:

Die Konzentration von 100% Faktor X entspricht dem Gehalt in normalem, humanem Citratplasma, gepoolt aus mehreren, gesunden Plasmen von Männern und Frauen im Alter zwischen 18 und 55 Jahren, welche nicht unter Medikation stehen.

Gewöhnlich liegt die Faktor X-Konzentration bei Erwachsenen zwischen 60 und 130%.

BIOCHEMIE:

Gerinnungsfaktor X, auch Stuart-Prower-Faktor genannt, ist ein Vitamin-K-abhängiger Blutgerinnungsfaktor von etwa 59 kD, welcher in der Leber synthetisiert wird. Die Faktor X Konzentration im Plasma liegt bei etwa 10 µg/ml, variiert jedoch stark zwischen Einzelpersonen. Faktor X kann sowohl intrinsisch als auch extrinsisch aktiviert werden. Faktor Xa aktiviert im Komplex mit Faktor V und in Gegenwart von Calcium und Phospholipiden Prothrombin zu Thrombin.

REFERENZEN:

- "Determination of vitamin K sensitive coagulation factors in plasma. Studies on three methods using synthetic chromogenic substrates", Bergström K and Egberg N, Thromb. Res., 12:531-547, 1978.
- "Activation of decarboxy factor X by a protein from Russell's viper venom. Purification and partial characterization of activated decarboxy factor X", Lindhout MJ, Kop-Klaassen BHM, Hemker MC, Biochim. Biophys. Acta, 533:327-341, 1978.
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>; OMIM; "Coagulation factor X" (+227600).