



BIOPHEN® Faktor IX 3

Ref.Nr. 221806

Testkit zur chromogenen Bestimmung der Faktor IX-Aktivität in Plasma oder Konzentraten

In vitro-Diagnostikum



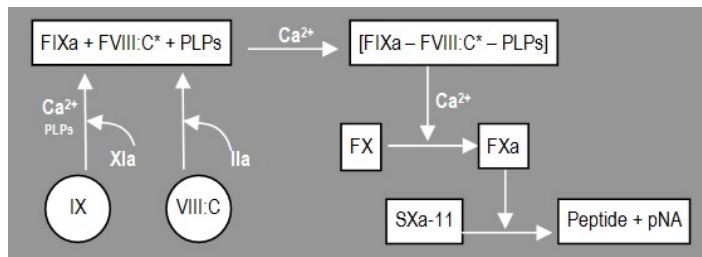
Vertrieb und Support:
CoaChrom Diagnostica GmbH
 www.coachrom.com | info@coachrom.com
 Tel. +43-1-236 222 1 | Fax +43-1-236 222 111
 Kostenfreie Nummern für Deutschland:
 Tel. 0800-24 66 33-0 | Fax 0800-24 66 33-3

VERWENDUNGSZWECK:

BIOPHEN® Faktor IX ist ein Testkit zur chromogenen Bestimmung der Faktor IX (FIX)-Aktivität in humanem Citratplasma, Flüssigkeiten biologischen Ursprungs oder FIX-Konzentrat und ist zur manuellen oder automatisierten Durchführung geeignet.

TESTPRINZIP:

In Gegenwart von Thrombin (FIIa), Phospholipiden (PLPs) und Calcium (Ca^{2+}) wird zunächst der in der Probe vorhandene FIX durch Faktor XIa (FXIa), der dem Testansatz in konstanter und überschüssiger Menge zugegeben wird, zu Faktor IXa (FIXa) aktiviert. Darauf bildet FIXa einen Enzymkomplex mit Thrombin-aktiviertem Faktor VIII:C (FVIII:C*), der ebenfalls in konstanter und überschüssiger Menge zugegeben wird. In Gegenwart von PLPs und Ca^{2+} aktiviert dieser Enzymkomplex schließlich ebenfalls in konstanter und überschüssiger Menge vorhandenen Faktor X (FX) zu Faktor Xa (FXa), der das FXa-spezifische chromogene Substrat SXa-11 spaltet. Da die gebildete Menge an FXa direkt abhängig von der Menge an FIX in der Probe ist, die den limitierenden Faktor im Testansatz darstellt, ist die bei der Spaltung von SXa-11 freigesetzte Menge an para-Nitroanilin (pNA), die durch Messung der Farbentwicklung bei 405 nm bestimmt wird, direkt proportional zur FIX-Aktivität in der Probe.



IM TESTKIT ENTHALTENE REAGENZIEN:

- **R1:** 2 Flaschen **humaner FX** und **humaner FVIII:C**, in Gegenwart eines Fibrinpolymerisations-Inhibitors und Stabilisatoren lyophilisiert. Mit je **6 ml aqua dest.** zu rekonstituieren.
- **R2:** 2 Flaschen **Aktivierungsreagenz (humaner FXIa, humanes Thrombin, synthetische PLPs und Ca^{2+})**, in Gegenwart von Stabilisatoren lyophilisiert. Mit je **6 ml aqua dest.** zu rekonstituieren.
- **R3:** 2 Flaschen **FXa-spezifisches chromogenes Substrat SXa-11**, in Gegenwart eines FXIa-Inhibitors lyophilisiert. Mit je **6 ml aqua dest.** zu rekonstituieren.
- **R4:** 4 Flaschen mit je 25 ml **Tris-BSA-Puffer**, gebrauchsfertig. Enthält 1% bovines Serumalbumin (BSA), PEG, FVIII:C-Stabilisatoren und 0,9 g/l Natriumazid.

Warnhinweise:

- FXIa, FX und Thrombin wurden aus humanem Plasma gewonnen, das mit validierten Methoden auf HIV-Antikörper, HBs-Ag und HCV-Antikörper untersucht und für negativ befunden wurde. BSA wurde aus dem Plasma BSE-freier Tiere gewonnen, das auf die Abwesenheit von Infektionserregern getestet wurde. Kein Test kann jedoch die Abwesenheit von Infektionserregern mit absoluter Sicherheit garantieren. Sämtliche Produkte biologischen Ursprungs müssen deshalb unter Beachtung aller erforderlichen Vorsichtsmaßnahmen als potenziell infektiös behandelt werden.
- Natriumazid kann mit Blei- oder Kupferarmaturen unter Bildung hochexplosiver Metallazide reagieren. Bei Entsorgung von R4 in den Abfluss muss mit großen Wassermengen nachgespült werden.

Anmerkung: Zur Testdurchführung dürfen ausschließlich Reagenzien aus Testkits mit übereinstimmender Chargennummer verwendet werden.

ERFORDERLICHE MATERIALIEN, DIE NICHT IM TESTKIT ENHALTEN SIND:

Reagenzien:

- aqua dest., vorzugsweise steril
- Kalibrationsplasma (z.B. **BIOPHEN® Kalibrationsplasma**, Ref.Nr. 222101) oder sonstiges Referenzmaterial (interner oder internationaler Standard) mit bekannter FIX-Aktivität
- Normal- und Abnormalkontrollplasmen (z.B. **BIOPHEN® Kontrollplasma „Normal“**, Ref.Nr. 223201, und **BIOPHEN® Kontrollplasma „Abnormal“**, Ref.Nr. 223301) oder sonstiges Referenzmaterial (interne Kontrollen) mit bekannter FIX-Aktivität
- Endpunktmethode: 20% Essigsäure oder 2% Zitronensäure

Geräte:

- Kalibrierte Pipetten
- Stoppuhr
- Manuelle Durchführung: Wasserbad, Spektrophotometer
- Automatisierte Durchführung: Gerinnungsautomat

VORBEREITUNG, LAGERUNG UND STABILITÄT DER REAGENZIEN:

- **R1:** Den Inhalt einer Flasche mit **6 ml aqua dest.** rekonstituieren und bis zu seiner vollständigen Auflösung mischen. Für **30 min bei Raumtemperatur (18-25°C)** inkubieren und dabei gelegentlich schütteln. Vor jedem Gebrauch nochmals durchmischen. In der Originalflasche gelagert ist **R1** nach Rekonstitution **8 h bei Raumtemperatur (18-25°C)**, **24 h bei 2-8°C** und **2 Monate bei $\leq -20^\circ\text{C}$** stabil.
- **R2:** Den Inhalt einer Flasche mit **6 ml aqua dest.** rekonstituieren und bis zu seiner vollständigen Auflösung mischen. Für **30 min bei Raumtemperatur (18-25°C)** inkubieren und dabei gelegentlich schütteln. Vor jedem Gebrauch nochmals durchmischen. In der Originalflasche gelagert ist **R2** nach Rekonstitution **8 h bei Raumtemperatur (18-25°C)**, **24 h bei 2-8°C** und **2 Monate bei $\leq -20^\circ\text{C}$** stabil.
- **R3:** Den Inhalt einer Flasche mit **6 ml aqua dest.** rekonstituieren und bis zu seiner vollständigen Auflösung mischen. Für **30 min bei Raumtemperatur (18-25°C)** inkubieren und dabei gelegentlich schütteln. Vor jedem Gebrauch nochmals durchmischen. In der Originalflasche gelagert ist **R3** nach Rekonstitution **7 Tage bei Raumtemperatur (18-25°C)**, **1 Monat bei 2-8°C** und **2 Monate bei $\leq -20^\circ\text{C}$** stabil.
- **R4:** Gebrauchsfertig. Vor jedem Gebrauch durchmischen. In der Originalflasche bei 2-8°C gelagert ist das ungeöffnete Reagenz **R4** bis zu dem auf dem Etikett gedruckten Verfalldatum stabil.

Anmerkungen:

- Die ungeöffneten Reagenzien sind bei 2-8°C gelagert bis zum auf dem Etikett gedruckten Verfalldatum stabil.
- Stabilitätsstudien bei 30°C haben gezeigt, dass die Testkits ohne Beeinträchtigung der darin enthaltenen Reagenzien bei Raumtemperatur (18-25°C) versendet werden können.
- R1, R2 und R3 sind unter Vakuum verschlossen. Um einen Verlust von deren Inhalt beim Öffnen zu vermeiden, sind die Verschlüsse vorsichtig zu entfernen.
- Bei der automatisierten Durchführung können die Rekonstitutionsvolumina je nach verwendetem Gerinnungsautomaten von obigen Angaben abweichen und sind den jeweiligen Applikationsvorschriften zu entnehmen.
- Um eine Kontamination zu vermeiden, sind die Reagenzien während ihres Gebrauchs sorgfältig zu handhaben. Bei Gelbfärbung ist R3 kontaminiert und muss verworfen werden.
- Um die Stabilität der Reagenzien zu gewährleisten, sind diese nach jedem Gebrauch mit der jeweiligen Originalschraubkappe (weiße Kappen für R1, R2 und R4, gelbe Kappe für R3) zu verschließen und nach obigen Angaben zu lagern.
- Die Reagenzien sind 30 min vor jedem Gebrauch auf Raumtemperatur (18-25°C) zu bringen.

PROBENMATERIAL:

Humanes Citratplasma oder FIX-Konzentrate.

Gewinnung, Handhabung und Lagerung der Proben:

Blut (9 Volumenteile) wird vorsichtig in 0,109 M Trinatriumcitrat (1 Volumenteil) abgenommen und z.B. für 15 min bei 2.000 g und Raumtemperatur (18-25°C) zentrifugiert. Das aus dem Überstand gewonnene Citratplasma kann **8 h bei Raumtemperatur (18-25°C)**, **24 h bei 2-8°C**, **2 Wochen bei $\leq -20^\circ\text{C}$** und **6 Monate bei $\leq -70^\circ\text{C}$** gelagert werden. Gefrorenes Citratplasma muss vor Gebrauch für 15 min bei 37°C aufgetaut werden.

Anmerkung: Weitere Vorschriften zur Gewinnung, Handhabung und Lagerung der Proben können dem NCCLS/CLSI-Dokument H21-5 entnommen werden.

TESTDURCHFÜHRUNG:

BIOPHEN® Faktor IX kann manuell (als Endpunkt- oder kinetische Methode) oder automatisiert (als kinetische Methode) durchgeführt werden. Applikationsvorschriften für die verschiedenen Gerinnungsautomaten sind auf Anfrage erhältlich.

Vorbereitung der Proben:

Hoher Messbereich (5 bis 200%):

Plasmatische Proben werden **1:100** mit **R4** verdünnt gemessen. Proben biologischen Ursprungs, deren FIX-Aktivität von jener in Citratplasma abweicht, oder FIX-Konzentrate werden mit **R4** auf eine erwartete FIX-Aktivität von **20 bis 200%** bzw. **0,2 bis 2 IE/ml** vorverdünnt. Darauf wird eine **1:100**-Verdünnung mit **R4** für den Testansatz hergestellt.

Niedriger Messbereich (1 bis 20%):

Plasmatische Proben werden 1:20 mit R4 verdünnt gemessen.

Qualitätskontrolle:

Die Qualitätskontrolle ermöglicht die Validierung der Kalibration und der Messungen sowie die Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Messungen von Testansatz zu Testansatz. Sie kann mit kommerziell erhältlichen Normal- und Abnormalkontrollplasmen (z.B. BIOPHEN® Kontrollplasma „Normal“, Ref.Nr. 223201, und BIOPHEN® Kontrollplasma „Abnormal“, Ref.Nr. 223301) oder sonstigem Referenzmaterial (internen Kontrollen) mit bekannter FIX-Aktivität durchgeführt werden. Für den Testansatz werden die Kontrollen gleich wie die Proben vorbereitet.

Kalibration:

Hoher Messbereich (5 bis 200%):

Zur Messung der FIX-Aktivität in Citratplasma kann BIOPHEN® Faktor IX mit gepooltem Normalplasma (bestehend aus den Citratplasmen von mindestens 30 gesunden männlichen und weiblichen Spendern im Alter zwischen 18 und 55 Jahren, die nicht unter Medikation stehen) mit einer FIX-Aktivität von 100% kalibriert werden. Alternativ kann die Kalibration mit einem kommerziell erhältlichen Kalibrationsplasma (z.B. BIOPHEN® Kalibrationsplasma, Ref.Nr. 222101) mit bekannter FIX-Aktivität C erfolgen.

Unmittelbar vor der Kalibration werden 2 ml einer 1:50-Verdünnung des gepoolten Normalplasmas bzw. einer (50x C:100)-Verdünnung des Kalibrationsplasmas mit R4 als Ausgangslösung (C1) hergestellt, die im Testansatz einer FIX-Aktivität von 200% entspricht. Durch serielle Verdünnung dieser Ausgangslösung werden weitere Kalibrationslösungen (C2-C5) wie folgt hergestellt:

Kalibrationslösung	C1	C2	C3	C4	C5
FIX-Aktivität	200%	100%	50%	25%	5%
Volumen C [µl]	1000 (C1)	500 (C1)	500 (C2)	500 (C3)	100 (C4)
Volumen R4 [µl]	0	500	500	500	400

Zur Messung der FIX-Aktivität in FIX-Konzentraten erfolgt die Kalibration mit internen bzw. internationalen Referenzstandards für FIX-Konzentrate. Unmittelbar vor der Kalibration wird der Referenzstandard mit R4 auf eine Aktivität von 1 IE/ml bzw. 100% vorverdünnt. Durch 1:50-Verdünnung mit R4 wird eine Ausgangslösung (C1) hergestellt, die im Testansatz einer FIX-Aktivität von 200% entspricht. Durch serielle Verdünnung dieser Ausgangslösung werden weitere Kalibrationslösungen (C2-C5) nach obiger Tabelle hergestellt.

Niedriger Messbereich (1 bis 20%):

Im niedrigen Messbereich kann BIOPHEN® Faktor IX ebenfalls mit gepooltem Normalplasma oder einem kommerziell erhältlichen Kalibrationsplasma (z.B. BIOPHEN® Kalibrationsplasma, Ref.Nr. 222101) mit bekannter FIX-Aktivität C kalibriert werden.

Unmittelbar vor der Kalibration wird das gepoolte Normalplasma 1:5 bzw. das Kalibrationsplasma um den Faktor D = 5x C:100 mit R4 oder FIX-Mangelplasma (z.B. Ref.Nr. DP050A/K) auf eine FIX-Aktivität von 20% vorverdünnt. Durch 1:20-Verdünnung mit R4 wird eine Ausgangslösung (C1) hergestellt, die im Testansatz einer FIX-Aktivität von 20% entspricht. Durch parallele Verdünnung dieser Ausgangslösung werden weitere Kalibrationslösungen (C2-C5) wie folgt hergestellt:

Kalibrationslösung	C1	C2	C3	C4	C5
FIX-Aktivität	20%	10%	5%	2,5%	1%
Volumen C1 [µl]	500	250	125	65	25
Volumen R4 [µl]	0	250	375	455	475

Testdurchführung:

Manuelle Endpunktmethode:

Reagenz	Mikrotiterplatte	Teströhrchen
Kalibrationslösungen, Kontrollen und Proben	50 µl	200 µl
R1	50 µl	200 µl
mischen und für 2 min bei 37°C inkubieren		
R2	50 µl	200 µl
mischen und für 3 min bei 37°C inkubieren		
R3 (bei 37°C vorinkubiert)	50 µl	200 µl
mischen und für 2 min bei 37°C inkubieren		
20% Essigsäure oder 2% Zitronensäure	50 µl	200 µl
mischen, die Absorption bei 405 nm (A ₄₀₅) messen und den jeweiligen Probenleerwert abziehen		

Anmerkungen:

- Die nach Stoppen der Reaktion durch Zugabe von Essig- oder Zitronensäure erhaltene Gelbfärbung ist für 2 h stabil.
- Die Probenleerwerte werden durch Pipettierung der Reagenzien in umgekehrter Reihenfolge (Essig- oder Zitronensäure, R3, R2, R1 und jeweilige Probe) hergestellt.

Manuelle kinetische Methode:

Der Test wird nach obiger Tabelle durchgeführt, allerdings wird nach Zugabe von R3 nicht A₄₅₀, sondern ihre Änderung (ΔA₄₅₀) im Zeitraum von 10 bis 100 sec aufgezeichnet. Das Stoppen der Reaktion durch Zugabe von Essig- oder Zitronensäure und die Subtraktion der Probenleerwerte sind nicht erforderlich.

Anmerkung: Bei lipämischen, ikterischen, hämolytischen oder im Allgemeinen ungewöhnlich aussehenden Citratplasmen muss gegen einen Probenleerwert gemessen werden.

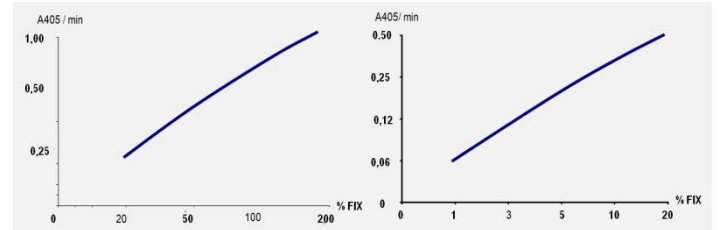
Automatisierte Methoden:

Automatisierte Methoden sind kinetisch. Applikationsvorschriften für die verschiedenen Gerinnungsautomaten sind auf Anfrage erhältlich.

ERGEBNISBERECHNUNG:

Bei manueller Testdurchführung werden die gemessenen A₄₅₀- bzw. ΔA₄₅₀-Werte der einzelnen Kalibrationslösungen auf der y-Achse (Ordinate) gegen die jeweiligen errechneten FIX-Aktivitäten auf der x-Achse (Abszisse) im bilogarithmischen Maßstab aufgetragen und zu einer Kalibrationskurve verbunden. Bei automatisierter Testdurchführung erfolgt die Ermittlung der Kalibrationskurve automatisch.

Nachstehende Kalibrationskurven im hohen bzw. niedrigen Messbereich wurden automatisiert (STA-R) erstellt und dienen lediglich als Beispiel:



Anhand der Kalibrationskurve werden ausgehend von den A₄₅₀- bzw. ΔA₄₅₀-Werten der Proben und Kontrollen die jeweiligen FIX-Aktivitäten berechnet. Wurden die Proben und Kontrollen anders als 1:100 (im hohen Messbereich) bzw. 1:20 (im niedrigen Messbereich) verdünnt, müssen die ermittelten FIX-Aktivitäten unter Berücksichtigung des jeweiligen Verdünnungsfaktors D mit D:100 (im hohen Messbereich) bzw. D:20 (im niedrigen Messbereich) multipliziert werden. Wurden die Proben und Kontrollen vorverdünnt, müssen die ermittelten FIX-Aktivitäten mit dem jeweiligen Vorverdünnungsfaktor multipliziert werden.

ERWARTETE BEREICHE:

Bei gesunden Erwachsenen liegt die FIX-Aktivität zwischen 70 und 130%. Bei einem angeborenen FIX-Mangel (< 25%) spricht man von Hämophilie B (FIX wird auch als antihämophiler Faktor B bezeichnet). Erniedrigte Plasmaspiegel beobachtet man auch bei disseminierter intravasaler Koagulopathie (DIC), Lebererkrankungen, Zirrhose sowie bei Therapie mit Vitamin K-Antagonisten. Erhöhte Plasmaspiegel könnten einen Indikator für erhöhtes Thromboserisiko darstellen.

BIOCHEMISCHE EIGENSCHAFTEN:

FIX ist ein in der Leber synthetisiertes, Vitamin K-abhängiges Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von ca. 55 kDa. In humanem Normalplasma kommt es in einer Konzentration von 4-5 µg/ml vor. FIX ist an der mittleren Phase der Blutgerinnung beteiligt. Nach Aktivierung durch FXIa in Gegenwart von Ca²⁺ bildet FIXa einen Enzymkomplex mit Thrombinaktiviertem FVIII:C, der in Gegenwart von Ca²⁺ und PLPs FX zu FXa aktiviert.

LEISTUNGSMERKMALE:

Die untere Nachweisgrenze von BIOPHEN® Faktor IX wird durch Messung der scheinbaren FIX-Aktivität bestimmt. Diese entspricht dem mittleren A₄₀₅-Wert einer FIX-freien Probe zusätzlich dreier Standardabweichungen und liegt im hohen Messbereich bei ca. 2% bzw. im niedrigen Messbereich bei ca. 0,5% FIX-Aktivität.

Präzision bei der automatisierten Messung (STA-R) von zwei verschiedenen Citratplasmen:

Probe	% IX	Hoher Messbereich		Niedriger Messbereich			
		Intra-Assay		Inter-Assay			
		N	VK	N	VK		
1	83	12	2,8%	47	3,25%	37	4,76%
2	32	12	3,9%	47	5,85%	37	8,84%

TESTEINSCHRÄNKUNGEN:

Keine signifikante Beeinflussung durch Bilirubin bis zu 0,25 mg/ml, Hämoglobin bis zu 5 mg/ml, Heparine bis zu 2 IE/ml und Triglyzeride bis zu 5 mg/ml.

REFERENZEN:

1. Orstavik *et al.* (1979). Detection of carriers of haemophilia B, *Br. J. Haematol.*, 42:293-301.
2. Parekh *et al.* (1978). Immunological heterogeneity of haemophilia B: a multicentre study of 98 kindreds, *Br. J. Haematol.*, 40:643-55.
3. Taran (1997). Factor IX of the blood coagulation system: a review, *Biochemistry*, 62:685-93.
4. van Hylckama Vlieg *et al.* (2000). High levels of factor IX increase the risk of venous thrombosis, *Blood*, 95:3678-82.
5. Wagenvoord *et al.* (1990). Development of a sensitive and rapid chromogenic FIX assay for clinical use, *Haemostasis*, 20: 276-88.
6. www.ncbi.nlm.nih.gov, OMIM, Haemophilia B, FIX deficiency, +306900, +134540, +134510, +134520.