

Der Inhalt dieses Dokuments dient lediglich als Beispiel. Die aktuellste Version finden Sie in unserem geschützten Downloadbereich unter https://www.coachrom.com/insert. Bei Bedarf senden wir sie Ihnen aber auch gerne zu, bitte anfordern unter: info@coachrom.com

Mangelplasma zur Bestimmung von VIII:C, IX, XI, XII



REF	DP040A / K	DP	1 x 1 mL / 6 x 1 mL
REF	DP050A / K	DP	1 x 1 mL / 6 x 1 mL
REF	DP070A / K	DP	1 x 1 mL / 6 x 1 mL
REF	DP080A / K	DP	1 x 1 mL / 6 x 1 mL

Mangelplasma zur Bestimmung von Faktor VIII:C, IX, XI oder XII.

Deutsch, letzte Überarbeitung: 01-2021

VERWENDUNGSZWECK:

Das Faktor VIII:C Mangelplasma, das Faktor IX Mangelplasma, das Faktor XI Mangelplasma und das Faktor XII Mangelplasma sind für die jeweilige quantitative Bestimmung der Faktor VIII:C, Faktor IX, Faktor XI und Faktor XII Aktivität in humanen Citratplasma basierend auf der aPTT Gerinnungsmethode mit Cephalin, einem Aktivator (aPTT Reagenz) und Kalziumchlorid als manuelle oder automatisierte Methode vorgesehen.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERLÄUTERUNGEN:

Technisch¹:

Der intrinsische Pfad der Gerinnung wird über die Kontaktaktivierung von FXII ausgelöst. Dies führt im Weiteren zur sequenziell proteolytisch Aktivierung von FXI und FIX. Der aktivierte FIX bildet mit seinem Cofaktor (aktivierter FVIII) auf einer Phospholipidoberfläche den Tenase-Komplex und aktiviert den FX.

Klinisch^{1,2,3}:

Die meisten Patienten mit einem Faktor XII Mangel sind asymptomatisch, in einigen wenigen Fällen kommt es zu einer leichten Blutungsneigung.

Die hämorrhagische Neigung bei Personen mit FXI-Mangel ist selbst bei Patienten mit homozygoter Erkrankung häufig gering, und die Symptome beziehen sich nicht immer auf den gemessenen Faktor XI Spiegel. Die angeborene Blutungsstörung, die durch den Mangel an FVIII oder FIX verursacht wird, wird als Hämophilie A bzw. B bezeichnet. Hämophilie kann basierend auf den Plasmaspiegeln von FVIII oder FIX bei betroffenen Patienten als schwer, mittelschwer oder mild eingestuft werden. Angeborene oder erworbene Mängel der Gerinnungsfaktoren des intrinsischen Systems zeigen eine verlängerte aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT).

TESTPRINZIP:

Diese Methode basiert auf einem Gerinnungstest, bei dem alle Gerinnungsfaktoren, mit Ausnahme von dem zu bestimmenden Gerinnungsfaktor, der aus dem verdünnten Probenplasma stammt, durch das Mangelplasma in konstanter Menge und im Überschuss zur Verfügung gestellt werden. Der zu messende Gerinnungsfaktor ist der begrenzte Faktor und die Gerinnungszeit ist umgekehrt proportional zur Konzentration des zu messenden Gerinnungsfaktors. Auf einem doppelt-logarithmischen Millimeterpapier besteht eine inverse lineare Beziehung zwischen der Gerinnungsfaktorkonzentration und der entsprechenden Gerinnungszeit.

REAGENZIEN:

DP Humanes Citratplasma, Mangel der Faktoren die bestimmt werden sollen (FVIII:C, FIX, FXI oder FXII), lyophilisiert mit Glycin und Stabilisatoren. Im Mangelplasma liegen die zu bestimmenden Faktoren (FVIII :C, FIX, FXI oder FXII) (<1%), alle anderen Gerinnungsfaktoren liegen im Normalbereich (> 50%).

Factor VIII :C Deficient Plasma

REF DP040A → 1 Flaschen zu 1 mL.

REF DP040K → 6 Flaschen zu 1 mL.

Factor IX Deficient Plasma

REF DP050A → 1 Flaschen zu 1 mL.

REF DP050K → 6 Flaschen zu 1 mL.

Factor XI Deficient plasma

REF DP070A → 1 Flaschen zu 1 mL.

REF DP070K → 6 Flaschen zu 1 mL.

Factor XII Deficient Plasma

REF DP080A → 1 Flaschen zu 1 mL.

REF DP080K → 6 Flaschen zu 1 mL.

VORSICHTSMASSNAHMEN UND WARNHINWEISE :

- Einige Reagenzien in diesen Kits enthalten Materialien menschlichen Ursprungs. Immer wenn Humanplasma für die Herstellung dieser Reagenzien benötigt wurden, wurden die Plasmen mit zugelassene Verfahren auf Antikörper gegen HIV 1, HIV 2 und HCV und für Hepatitis B-Oberflächenantigen getestet. Alle Ergebnisse waren negativ. Keine Testmethode kann absolute Sicherheit bieten und absolut ausschließen, dass das infektiöse Material nicht vorhanden ist. Daher muss bei der Verwendung von Reagenzien dieser Art mit großer Vorsicht gearbeitet werden und Sicherheitsvorkehrungen einhalten werden, als wären diese Materialien infektiös.
- Bei der Entsorgung von Restmaterial sind die geltenden lokalen Richtlinien zu befolgen.
- Benutzen Sie nur Reagenzien, die aus ein- und demselben Los des Testkits stammen.
- Alterungsstudien zeigen, dass die Reagenzien bei Raumtemperatur versandt werden können und für den Versand bei Raumtemperatur stabil sind.
- Dieses *In-vitro*-Diagnostikum ist für den Einsatz im Labor vorgesehen.

REAGENZENVORBEREITUNG:

Um einen Verlust von Lyophilisat beim Öffnen der Flasche zu vermeiden, muss der Lyophilisationsstopfen vorsichtig abgenommen werden.

DP Den Inhalt jeder Flasche mit exakt 1 mL Aqua dest.

Das Reagenz gut mischen bis es sich vollständig gelöst hat, dabei Schaumbildung vermeiden und danach sofort auf den Analysator platzieren.

Für die manuelle Methode, 30 Minuten bei Raumtemperatur (18-25°C) stabilisieren, vor Gebrauch homogenisieren.

LAGERUNG UND STABILITÄT:

Ungeöffnete Reagenzien müssen bei 2-8°C in der Originalverpackung gelagert werden. Sie können bis zu dem auf dem Set aufgedruckten Verfalldatum verwendet werden.

DP Stabilität der in der Originalflasche gelagerten Reagenzien unter der Voraussetzung, dass diese nicht kontaminiert wurden und keine Verdunstung erfolgte:

- 24 Stunden bei 2-8°C.
- 8 Stunden bei Raumtemperatur (18-25°C).
- 2 Monate tiefgefroren bei -20°C oder weniger*
- On-board Stabilität: siehe die spezifische Anwendung.

*Nur einmal einfrieren und so schnell wie möglich bei 37°C und sofort verwenden.

ERFORDERLICHE, ABER NICHT MITGELIEFERT REAGENZIEN UND AUSTRÜSTUNGEN:

Reagenzien:

- Destilliertes Wasser.
- Imidazole Buffer (AR021B/AR021K/AR021L/AR021M/AR021N).
- CaCl₂ 0.025 M (AR001B/AR001K/AR001L).
- aPTT Reagenz (CEPHEN™, CK511K, CK512K, CK515K, CK515L).
- Spezifische Kalibrations- und Kontrollplasmen mit bekannten Titrierungen wie:

Name des Produkts	Nummer
BIOPHEN™ Plasma Calibrator	222101
BIOPHEN™ Normal Control Plasma	223201
BIOPHEN™ Abnormal Control Plasma	223301

Siehe auch den spezifischen Anwendungsleitfaden des verwendeten Analysators.

Materialien:

- geregeltes Wasserbad, halb- bzw. vollautomatische Gerinnungsmessgeräte.
- Stoppuhr; geeichte Pipetten, silikonisierte Glasröhrchen oder Plastikröhrchen.

GEWINNUNG UND HERSTELLUNG DER PROBEN:

Das Blut (9 Volumenteile) wird vorsichtig in 0,109 M Citrat als Antikoagulans (1 Volumenteil) abgenommen. Die Blutabnahme erfolgt durch Venenpunktion mit einer Nadel. Das erste Röhrchen darf nicht verwendet werden.

Herstellung und Aufbewahrung der Proben müssen in Einklang mit den gültigen örtlichen Vorschriften erfolgen (für die USA: Bitte beziehen Sie sich auf die Empfehlungen den CLSI H21-A5⁴ für weitere Informationen über Probengewinnung, Handhabung und Aufbewahrung). Zur Plasma-Lagerung verweisen wir auf Referenzen^{4,5,6}.

VORGEHENSWEISE:

Bestimmungsmethode:

1. Rekonstituieren Sie die Kalibrations- und Kontrollplasmen gemäß deren jeweiligen Anleitungen. Verdünnen Sie 2 mL normalen Citrat-Plasmapool 1:10 mit Imidazol-Puffer. Die 1:10 Verdünnung des normalen Citrat-Plasmapools entspricht einer Konzentration von **100% der Gerinnungsfaktorkonzentration. Mit diesem 1:10 vorverdünnte Material wird, wie in der folgenden Tabelle dargestellt, die Kalibrationskurve erstellt.**

Verdünnung	1/160	1/80	1/40	1/20	1/10
Faktorenkonzentration VIII:C, IX, XI oder XII (%)	6.25*	12.5	25	50	100
Plasmapool 1/10	0.060 mL	0.125 mL	0.250 mL	0.500 mL	1 mL
Imidazol-Puffer	0.900 mL	0.875 mL	0.750 mL	0.500 mL	0 mL

*diese zusätzliche Verdünnung sollte verwendet werden, falls eine hohe Präzision im unteren Messbereich erforderlich ist ($\leq 10\%$).

Die Kalibratorlösungen können ebenfalls mit dem BIOPHEN™ Plasma Calibrator (222101) hergestellt werden, wobei für den zu bestimmenden Gerinnungsfaktor der jeweils verwendeten Charge der angegebene Wert (C) verwendet werden muss. Die Verdünnungen für die Kalibrationskurve müssen direkt vor der Erstellung der Kalibrationskurve hergestellt werden.

Das verdünnte Material für die Kalibrationskurve ist bis zu 2 Stunden bei Raumtemperatur (18-25°C) stabil.

2. Das Patientenplasma und die Kontrollen werden, wie in der folgenden Tabelle aufgeführt, mit Imidazol-Puffer verdünnt.

Material	Referenz	Verdünnung
Kontrolle	223201/223301	1/10
Probe	N.A.	1/10

3. Pipettieren Sie die folgenden Volumina in das Teströhrchen oder in eine Küvette:

	Volumen
Mangelplasma	100 µL
verdünnter Kalibrator oder 1:10 verdünntes Patientenplasma oder 1:10 verdünntes Kontrollmaterial	100 µL
mischen und 1 Minute bei 37°C inkubieren , dann die folgenden Reagenzien zugeben:	
aPTT Reagenz (Cephalin)	100 µL
mischen und genau 3 Minuten bei 37°C inkubieren , dann das folgende Reagenz zugeben und die Stoppuhr starten	
Calcium Chloride 0.025M vorgewärmt bei 37°C.	100 µL
Bestimmen der exakten Gerinnungszeit (CT) (sec)	

Erstellen Sie die Kalibrationskurve und überprüfen Sie diese mit den Qualitätskontrollplasmen. Die verdünnten Proben schnell getestet werden, wenn sie bei Raumtemperatur (18-25°C) aufbewahrt werden. Es müssen die genauen Konzentrationen der Kalibratoren und Kontrollen beachtet werden, die für das jeweilige Los auf dem im Testkit enthaltenen Zertifikat vermerkt sind.

Werden Änderungen vorgenommen, ist der Benutzer für deren Validierung und ihren Einfluss auf alle Ergebnisse verantwortlich.

Für die automatisierte Methode sind Anwendungshandbücher auf Anfrage verfügbar. Siehe spezifische Anwendungshinweise und spezifische Vorsichtsmaßnahmen für jeden Analysator.

KALIBRATION:

Der den dynamischen Testbereich abdeckende Kalibrator ist bei HYPHEN BioMed erhältlich (siehe Absatz ERFORDERLICHE, ABER NICHT MITGELIEFERTE REAGENZIEN UND MATERIALIEN) und kann zur Erstellung der Kalibrationskurve verwendet werden.

QUALITÄTSKONTROLLE:

Die Verwendung von Qualitätskontrollen ermöglicht die Überwachung der Methode sowie die Überprüfung der Homogenität der Messungen von einer Serie zur anderen in derselben Reagenzcharge.

Bei jeder Testserie müssen den in dem Labor angewendeten Good Practices entsprechende Qualitätskontrollen durchgeführt werden, um den Test zu validieren. Am besten sollte für jede neue Versuchsreihe eine neue Kalibrierkurve erstellt werden, mindestens jedoch für jedes neue Reagenzien-Los sowie nach Wartungsarbeiten an dem Gerinnungsautomaten oder wenn die bei der Qualitätskontrolle gemessenen Werte außerhalb des zu erwartenden Bereiches liegen. In diesem Fall muss das Labor die Vertrauensbereiche festlegen und die erwarteten Leistungsmerkmale in seinem Analysensystem prüfen.

ERGEBNISSE:

- Bei der manuellen Methode wird auf doppelt-log Millimeterpapier auf der x-Achse die zu bestimmende Gerinnungsfaktorkonzentration in % und auf der y-Achse die entsprechenden Gerinnungszeiten aufgetragen; aus diesen Werten ergibt sich die Kalibrationskurve.
- Die Gerinnungsfaktorenkonzentration (%) der zu testenden Probe kann direkt von der Kalibrationskurve abgelesen werden.
- Die Ergebnisse müssen nach dem klinischen Zustand des Patienten interpretiert werden.

EINSCHRÄNKUNGEN:

- Bitte befolgen Sie die von HYPHEN BioMed validierten technischen Anweisungen auf Genaueste, um optimale Testergebnisse zu erzielen und den Spezifikationen zu entsprechen.
- Jedes Reagenz mit einem ungewöhnliches Aussehen oder Anzeichen einer Kontamination, muss verworfen werden.
- Auffällige Proben oder solche, die Anzeichen einer Aktivierung aufweisen, müssen verworfen werden.
- Für eine erhöhte Präzision können Proben mit einem Ergebnis $\leq 10\%$ auch 1:5 verdünnt gemessen werden. Die gemessenen Werte müssen dann durch 2 dividiert werden. Proben mit einem Ergebnis $> 100\%$ (oder C%) können 1:20 verdünnt gemessen werden. Das Ergebnis wird dann mit 2 multipliziert.
- Für Proben mit FIX Mangel gilt: das Ergebnis sollte mit einer Messung der 1:5 Verdünnung (der erhaltene Wert wird in diesem Fall durch 2 geteilt) und/oder einer weiteren Probe und/oder einem alternativen Testsystem überprüft werden. Ein möglicher zusätzlicher Faktorenmangel muss überprüft werden.
- In der Probe vorhandene Thrombin-Inhibitoren können dazu führen, dass das Messergebnis der Gerinnungsfaktorkonzentration der Probe niedriger bestimmt wird als der tatsächliche Gerinnungsfaktorspiegel.

ERWARTETE WERTE:

Der Normalwert der Faktor VIII:C Konzentration von gesunden Erwachsenen liegt normalerweise in einem Bereich von 50 bis 150%. Die Normalwerte der Faktoren IX, XI und XII Konzentration von gesunden Erwachsenen liegen bei $> 60\%$ ⁷. Jedes Labor muss eine eigenen Normalbereich bestimmen.

LITERATUR:

1. Grover SP. And Mackman N. Intrinsic Pathway of Coagulation and Thrombosis. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2019
2. Winter WE. et al. Coagulation Testing in the Core Laboratory. Lab Medecine. 2017.
3. Peyvandi F. et al. Rare bleeding disorders. Haemophilia. 2008.
4. CLSI Document H21-A5: "Collection, transport, and processing of blood specimens for testing plasma-based coagulation assays and molecular hemostasis assays; approved guideline". 2008.
5. Woodhams B. et al. Stability of coagulation proteins in frozen plasma. Blood coagulation and Fibrinolysis. 2001.
6. Mauge L. and Alhenc-Gelas M. Stabilité pré-analytique des paramètres de la coagulation: revue des données disponibles. Ann Biol Clin. 2014.
7. Monagle P. et al. Impact for clinical haemostasis laboratories. Developmental haemostasis. 2006.

SYMBOLE:

Die Symbole und Zeichen sind in der ISO-Norm 15223-1 aufgeführt, bitte beziehen Sie sich auf das Dokument Definition der Symbole.

! Aktualisierung gegenüber der vorherigen Version.