

ROX FACTOR IX – 90 00 20

For In Vitro Diagnostic Use – 2 x 50 test

CE

ITALIANO – Revisione Inserto 10/2016

1 UTILIZZO

Per la determinazione dell'attività del Fattore IX (FIX) nel plasma e nei concentrati contenenti fattore FIX.

2 BIOCHIMICA

FIX è una glicoproteina vitamina K dipendente di circa 55 kDa, a singola catena, che viene attivata dal FXIa o dal fattore tissutale / FVIIa. Il FIX attivato (FIXa) trasforma il FX in FXa in presenza di FVIII, fosfolipidi e ioni calcio.

3 PRINCIPIO DEL METODO

L'attività del FIX è misurato con il metodo cromogenico, nel quale il FIX umano è attivato dal FXIa umano ed il FIXa che si forma è in grado di attivare il FX umano in presenza di FVIII umano, ioni calcio e fosfolipidi. Analogamente alle condizioni "in vivo", il FVIII è attivato dalla trombina che viene generata durante l'incubazione. La quantità di FXa che si forma è in relazione all'attività del FIX e viene determinata dall'idrolisi del substrato cromogenico (specifico per il FXa). L'attività del FIX del campione in analisi è assegnato verso il FIX plasmatico o rispetto da una concentrazione standard di FIX espressa in Unità Internazionali (IU) o attività percentuale (%).

4 COMPOSIZIONE DEL KIT

Reagente A (2 flaconi) – REF 9010

Il reagente A contiene FVIII umano liofilizzato, FX umano, FV bovino e un inibitore della polimerizzazione della fibrina.

Reagente B (2 flaconi) – REF 9020

Il Reagente B contiene FXIa liofilizzato, FII umano, calcio cloruro e fosfolipidi.

Substrato Cromogenico per FXa, 6 mL (1 flacone) – REF 9080

Soluzione liquida di substrato cromogenico per FXa (Z-D-Arg-Gly-Arg-pNA), 2.5 mmol/L, contenente un inibitore della trombina.

FIX Diluente Buffer Concentrato, 20 mL (1 flacone) – REF 9050

Soluzione liquida concentrata di diluente buffer, contenente un inibitore dell'eparina.

5 PRECAUZIONI E AVVERTENZE

I reagenti sono abbinati – usare solo reagenti dello stesso kit e lotto. ATTENZIONE: ogni unità di donatore utilizzata nei reagenti è stata testata con metodi approvati FDA per la presenza di antigene di superficie della Epatite B e anticorpi contro HIV 1 e 2 e per l'Epatite C ed è risultata negativa. Tuttavia, dato che nessun test è in grado di escludere completamente la presenza di queste malattie trasmissibili per via ematica, la manipolazione e lo smaltimento di questi reagenti di origine umana devono essere maneggiati con la cautela necessaria, e considerati come potenzialmente infetti.

6 PREPARAZIONE

Reagente A

Sciogliere il contenuto con 1.4 mL con acqua*. Mantenere il reagente per 5 minuti a 20-25°C (con il tappo chiuso) e miscelare delicatamente sino a completa ricostituzione.

Reagente B

Sciogliere il contenuto con 8 mL con acqua*. Mantenere il reagente per 5 minuti a 20-25°C (con il tappo chiuso) e miscelare delicatamente sino a completa ricostituzione.

Substrato Cromogenico per FXa, 6 mL: pronto all'uso

FIX Diluente Buffer Concentrato, 20 mL

Diluire 1 + 9 con acqua deionizzata così da ottenere una Soluzione di Lavoro a 0.025 mol/L Tris-HCl, pH 7.9 (a 20°C), all'1% albumina di siero bovino ed un inibitore dell'eparina.

Nota: il contenuto all'interno del flacone è lievemente sovra riempito.

Si consiglia sempre di misurare il volume desiderato prima di effettuare la diluizione (1+9) con acqua deionizzata.

** Nota: tutte le ricostituzioni e le diluizioni devono essere eseguite con acqua di tipo CLRW secondo il documento CLSI (ex NCCLS) oppure con acqua Ph Eur per iniezione.*

7 CONSERVAZIONE E STABILITA'

I reagenti sigillati sono stabili a 2-8°C fino alla data di scadenza stampata sull'etichetta. Fare attenzione per evitare la contaminazione dei reagenti da microrganismi.

- Reagente A, stabilità dopo ricostituzione: 72 ore a 2-8°C, 8 ore a 20-25°C e 12 mesi a ≤ -70°C.

- Reagente B, stabilità dopo ricostituzione: 72 ore a 2-8°C, 8 ore a 37°C e 12 mesi a ≤ -70°C.

- Substrato Cromogenico per FXa: dopo la prima apertura del flacone la stabilità è 1 mese a 2-8°C e 12 mesi a ≤ -20°C.

- FIX Diluente Buffer Concentrato: dopo la prima apertura del flacone la stabilità è 1 mese a 2-8°C.

- La Soluzione di Lavoro deve essere usata lo stesso giorno della preparazione.

8 MATERIALI AUSILIARI NON FORNITI

- Acqua deionizzata, tipo CLRW secondo il documento CLSI (ex NCCLS) oppure con acqua Ph Eur per iniezione

- Per la calibrazione: plasma umano o plasma liofilizzato o concentrato di FIX, con valore assegnato rispetto al WHO International Standard per l'attività del FIX

- Acido Citrico, 2% (per il metodo end-point)

- Pipette calibrate

- Fotometro, 405 nm (a 490 nm per il metodo end-point)

- Incubatore termostato a 37°C

- Provette in plastica

- Cronometro

- Miscelatore tipo Vortex

Per il test in micro-piastra, utilizzare micro-piastra a ridotta capacità di legame.

9 SIMBOLI USATI



In Vitro Diagnostic Medical Device



Temperature limitation



CE Mark



Catalogue number



Consult instruction for use



Batch code



Biological risks



Use by



Manufacturer

10 PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

La raccolta del campione deve essere in conformità con le raccomandazioni per i test in emostasi. Prelievo di sangue venoso fresco (9 parti) raccolto in 0.109 M anticoagulante trisodio citrato (1 parte). Utilizzare provette in vetro silconato o in plastica. Centrifugare per 15 minuti a 1500 g. Riferirsi alla linea guida CLSI H21-A5 per ulteriori informazioni sulla raccolta, manipolazione e conservazione del campione.

11 CONTROLLO DI QUALITA'

Plasmi per il Controllo di Qualità titolati per l'attività del FIX sono disponibili in commercio e dovrebbero essere utilizzati per la verifica della curva di calibrazione. Si raccomanda di utilizzare i controlli a livello Normale e Patologico per un programma completo di Controllo di Qualità. I controlli devono essere analizzati come i campioni. Ogni laboratorio deve determinare i propri valori di riferimento per il controllo di qualità, utilizzando i valori target e intervalli forniti dal produttore dei controlli oppure utilizzando i limiti di confidenza stabiliti dal laboratorio.

12 METODO - PLASMA

Si consiglia di eseguire la curva di calibrazione nella sessione analitica. Un plasma umano normale calibrato contro lo Standard Internazionale dovrebbe essere utilizzato come calibratore.

Preparare le diluizioni utilizzando la Soluzione di Lavoro per ottenere gli standard nell'intervallo selezionato. Preparare cinque differenti diluizioni standard. Si raccomanda di preparare diluizioni indipendenti di ciascun standard. Tutte le diluizioni dovrebbero essere preparate in provette di plastica.

12.1 Intervallo Alto (25 - 200 %) - diluizione campione 1:80

Preparation of FIX Calibration curve, RANGE 25 - 200 %			
FIX Standard %	Total Dilution	Volume	Volume of FIX Diluent Buffer working solution
Predilution	1:10	100 µL of plasma	900 µL
200%	1:40	100 µL of predilution	300 µL
150%	1:53.3	100 µL of predilution	433 µL
100%	1:80	100 µL of predilution	700 µL
50%	1:160	50 µL of predilution	750 µL
25%	1:320	50 µL of predilution	1550 µL
Reagent Blank	-	-	500 µL

NOTA: il 100% in attività è definito come 1 IU/mL di FIX nel plasma. Nel caso in cui l'attività del FIX dello standard plasmatico differisce da questo valore, è necessario utilizzare un fattore di correzione appropriato per il calcolo del risultato del campione analizzato. Si raccomanda di esprimere i risultati come IU/mL o in alternativa come attività percentuale (%).

12.2 Diluizione campione – Intervallo alto

I campioni di plasma con valori stimati tra 25 - 200 % (0.25 - 2 IU/mL) devono essere analizzati nell'intervallo alto, utilizzando la diluizione del campione 1:80. Il valore dell'attività del FIX del campione sotto test è ottenuta direttamente dalla curva di calibrazione.

12.3 Intervallo basso (0.5 - 25 %) - diluizione campione 1:20

Esempio – Diluizioni Standard, intervallo basso:

Preparation of FIX Calibration Curve, RANGE 0.5 - 25 %			
FIX Standard %	Total Dilution	Volume	Volume of FIX Diluent Buffer working solution
Predilution	1:20	50 µL of plasma	950 µL
25%	1:80	100 µL of predilution	300 µL
12.5%	1:160	100 µL of predilution	700 µL
6.25%	1:320	100 µL of predilution	1500 µL
3.125%	1:640	50 µL of predilution	1550 µL
1 %	1:2000	10 µL of predilution	990 µL
0.5 %	1:4000	10 µL of predilution	1990 µL
Reagent Blank	-	-	500 µL

NOTA: il 100% in attività è definito come 1 IU/mL di FIX nel plasma. Nel caso in cui l'attività del FIX dello standard plasmatico differisce da questo valore, è necessario utilizzare un fattore di correzione appropriato per il calcolo del risultato del campione analizzato. Si raccomanda di esprimere i risultati come IU/mL o in alternativa come attività percentuale (%).

12.3.1 Diluizione campione – Intervallo basso

I campioni di plasma con valori stimati tra 0.5 - 25% (0.005 - 0.25 IU/mL) devono essere analizzati nell'intervallo basso, utilizzando la diluizione del campione 1:20. Il valore dell'attività del FIX del campione sotto test è ottenuta direttamente dalla curva di calibrazione.

12.3.2 Bianco campione (solo metodo End-point)

Il bianco campione in generale non è necessario ma dovrebbe essere incluso quando si analizzano campioni emolizzati, itterici o lipemici con il metodo end-point. Il bianco campione può essere ottenuto aggiungendo prima Acido Citrico prima di tutti gli altri reagenti.

13 METODO – CONCENTRATI

La Pharmacopoeia Europea raccomanda l'analisi per linee parallele per l'assegnazione del valore ai campioni biologici. I concentrati di FIX possono essere analizzati nell'intervallo 0.25 - 200 mIU/mL utilizzando una curva a 4 o 5 parametri oppure nell'intervallo 0.5 - 5 mIU/mL utilizzando una trasformata log-log ed una curva lineare. Per l'analisi su linee parallele si raccomanda che ogni laboratorio stabilisca i propri intervalli per l'assegnazione dei valori.

13.1 Diluizioni Standard – Concentrati contenenti FIX

Si consiglia di eseguire la curva di calibrazione nella sessione analitica. Un materiale di riferimento internazionale per i concentrati di fattore IX oppure un concentrato di FIX disponibile in commercio, calibrato contro lo Standard Internazionale, dovrebbe essere utilizzato come calibratore. Preparare le diluizioni standard con la Soluzione di Lavoro per ottenere standard all'interno dell'intervallo 0.25 - 200 mIU/mL. Preparare cinque differenti diluizioni standard. Tutte le diluizioni dovrebbero essere preparate in provette di plastica.

13.2 Diluizioni campione – Concentrati contenenti FIX

Si raccomanda di preparare come minimo tre diluizioni del campione con la Soluzione di Lavoro quando le attività sono all'interno degli intervalli standard. Tutte le diluizioni dovrebbero essere preparate in provette di plastica.

14 PROTOCOLLO DEL TEST– PLASMA E CONCENTRATI

14.1 Metodo manuale

La stessa procedura del test deve essere utilizzata sia per il plasma nell'intervallo alto che nell'intervallo basso che per i concentrati.

Campione / Diluizione standard

25 µL

Reagente A

25 µL

Incubare per 3-4 minuti, 37°C

Reagente B (37°C)

150 µL

Attivazione per 8 minuti, 37°C

Substrato Cromogenico per FIX (37°C)

50 µL

Metodo cinetico: leggere a ΔA_{405} /minuto a 37°C

Metodo end-point: idrolisi a 37°C per 2 minuti

Acido citrico, 2% (solo metodo end-point)

50 µL

Lettura in cinetica: leggere le assorbanze a 405 nm e registrare la variazione in assorbanza.

Metodo end-point: stoppare la reazione con acido citrico al 2%. Leggere le assorbanze a 405 nm, usando la lunghezza d'onda a 490 nm come riferimento. Le letture in assorbanza devono essere fatte entro 2 ore dopo che è terminata l'idrolisi del substrato.

14.2 Metodi automatici

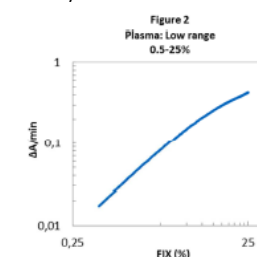
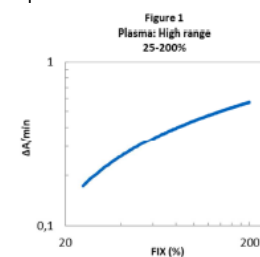
I protocolli per i differenti strumenti di coagulazione sono disponibili a richiesta.

NOTA: nel caso sia necessario per il Reagente B utilizzare un differente contenitore dedicato alla specifica strumentazione, per ottimizarne la stabilità, devono essere usati flaconi in vetro siliconato oppure flaconi di plastica.

15 CALCOLO

Plasma:

- Tracciare il massimo cambio in assorbanza al minuto (ΔA_{405} max/min) o l'assorbanza (A 405-490) rispetto all'attività del FIX su grafico Log-Log dopo aver sottratto il bianco reagente (Fig 1 e Fig 2). In alternativa, un grafico Semi-Log con 4 o 5 parametri di curva può essere utilizzato.
- L'attività del FIX del campione sotto test è ottenuta direttamente dalla curva di calibrazione. Il valore ottenuto deve essere corretto nel caso in cui l'attività del FIX dello standard differisca da 1 IU/mL.
- Modificare il fattore di diluizione nel caso siano utilizzate diverse diluizioni.
- Esprimere il risultato del campione in IU/mL o %.



Concentrati:

- Tracciare la massima variazione in assorbanza al minuto (ΔA 405 max/min) o l'assorbanza (A 405-490) rispetto all'attività del FIX su grafico Semi-Log o Log-Log dopo aver sottratto il bianco reagente. Usare una curva a 4 o 5-parametri (Semi-Log) o lineare (Log- Log).
- Determinare l'attività del FIX del campione dalla curva di calibrazione utilizzando il modello delle linee parallele.
- Modificare la diluizione usata ed esprimere i risultati del campione in IU/mL.
- La Pharmacopoeia Europea raccomanda l'utilizzo del modello a linee parallele. In alternativa, l'attività del Fattore IX in ciascuna diluizione del campione sotto test può essere direttamente ottenuta sulla curva di calibrazione. Il risultato deve essere moltiplicato per il fattore di diluizione usato.

16 VALORI ATTESI

I livelli di Fattore IX in 25 uomini sani e 25 donne sane, in età tra 19 e 56 anni, sono stati misurati e trovati nell'intervallo 0.6 - 1.3 IU/mL (60 - 130 %). La carenza di FIX, conosciuta come Emofilia B, può essere divisa in tre categorie³: lieve (0.05 - 0.4 IU/mL, 5 - 40 %), moderata (0.01 - 0.05 IU/mL, 1 - 5 %) e severa (≤ 0.01 IU/mL, ≤ 1 %). I livelli di FIX possono essere ridotti nei pazienti con problematiche epatiche, cirrosi e CID (Coagulazione Intravasale Disseminata) così come nei pazienti in terapia con farmaci anti-vitamina K.

17 PRESTAZIONI

Limite di rilevabilità: 0.1 % (0.001 IU/mL), calcolato come suggerito nel documento CLSI EP17-A utilizzando l'intervallo basso e la diluizione campione 1:20.

Limite di quantificazione: 0.5 % (0.005 IU/mL), calcolato come suggerito nel documento CLSI EP17-A utilizzando l'intervallo basso e la diluizione campione di 1:20.

Precisione: Intra-assay CV 3%, Inter-assay CV 4%. La precisione è stata misurata ai livelli di 1 %, 25 % e 100 % dell'attività del Fattore IX. I risultati sono stati ottenuti usando il metodo in micro-piastra manuale.

Linearità: 0.5 - 200% (0.005 - 2 IU/mL), calcolata come suggerito nel documento CLSI EP06-A.

18 INTERFERENZE

I risultati di FIX non sono influenzati in presenza dei livelli plasmatici di: **Emoglobina** sino a 5 g/L, **Bilirubina** sino a 0.4 g/L, **Trigliceridi** sino a 5 g/L, **Eparina a Basso Peso Molecolare** sino a 5 IU/mL e **Eparina Non Frazionata** sino a 2 U/mL.

Non c'è interferenza dovuta al **FIXa** sino a 50 mIU FIXa/1 IU FIX.

19 BIBLIOGRAFIA

1. Gray E, Barson H, Hockley J, Rigsby P. Collaborative study for value assignment of the 4th International Standard for Factors II, VII, IX, X, Plasma. WHO/BS/10.2145; 2010: 1-43.
2. Pickering WM, Gray E. The effect of activated Factor IX on the Factor IX coagulant and NAPTT activity of high-purity Factor IX concentrates. *J. Thromb Haemost* 2007; 5, Supplement 2: P-T-156.
3. White GC et al. Definitions in Hemophilia. *Thromb Haemost* 2001; 85: 560.
4. Bertina RM. Elevated clotting factor levels and venous thrombosis. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2003/2004; 33: 395-400.
5. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), www.clsi.org
6. 6th Edition of the European Pharmacopoeia, General Chapter 5.3 Statistical analysis of results of biological assays and tests.



Rossix AB
Taljegårdsgatan 3B
SE-431 53 Mölndal, Sweden

Rossix