

1 VERWENDUNGSZWECK

Für die Bestimmung der Faktor IX (FIX) Aktivität in Plasma und in Konzentraten, die FIX enthalten.

2 BIOCHEMISCHE GRUNDLAGEN

Faktor IX ist ein einkettiges, Vitamin K abhängiges Glycoprotein mit einem Molekulargewicht von ca. 55 kDa, welches vom Faktor XIa in Anwesenheit von Calciumionen aktiviert wird. Aktivierter FIX (FIXa) wiederum bildet zusammen mit FVIII, Phospholipiden und Calciumionen FXa aus FX.

3 MESSPRINZIP

Die FIX Aktivität wird mittels der chromogenen Methode bestimmt, wobei zunächst humaner FIX durch humanen FXIa aktiviert wird. So gebildeter FIXa aktiviert in Anwesenheit von humanem FVIII, Calciumionen und Phospholipiden FX zu FXa. Ähnlich dem in vivo Prozess wird FVIII durch Thrombin, welches während der Inkubation generiert wird, aktiviert. Die Menge des generierten FXa ist somit proportional zur FIX Aktivität und wird durch die Hydrolyse eines chromogenen FXa Substrates bestimmt. Die FIX Aktivität der Probe wird entweder gegen einen Plasmakalibrator oder ein FIX Konzentrat, dessen Aktivität in Internationalen Einheiten (IE oder IU) angegeben ist, kalibriert.

4 INHALT

Reagenz A (2 Flaschen) – REF 9010

Enthält lyophilisierten humanen FVIII, humanen FX, bovinen FV und einen Fibrinpolymerisationsinhibitor.

Reagenz B (2 Flaschen) – REF 9020

Enthält lyophilisierten humanen FXIa, humanen FII, Calciumchlorid und Phospholipide.

FXa Substrat, 6 ml (1 Flasche) – REF 9080

Chromogenes FXa Substrat (Z-D-Arg-Gly-Arg-pNA), flüssig, 2,5 mmol/L, enthält einen Thrombininhibitor.

FIX Verdünnungspuffer, Stammlösung, 20 ml (1 Flasche) – REF 9050

Stammlösung des Verdünnungspuffers, enthält einen Heparin-Antagonisten.

5 WARNHINWEISE

Die Reagenzien sind auf einander abgestimmt – daher nur Reagenzien derselben Kitcharge verwenden.

ACHTUNG: Jeder Spender wurde mittels der FDA genehmigten Verfahren auf Hepatitis B Oberflächenantigene und Antikörper gegen HIV 1 und 2 sowie Hepatitis C getestet. Auch wenn alle Proben ein negatives Resultat zeigten, kann kein Test absolut sicher Krankheitserreger ausschließen. Daher sollten Produkte, welche aus humanem Material hergestellt wurden in Bezug auf Verwendung und Entsorgung stets als potenziell infektiös angesehen werden!

6 VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

Reagenz A

Mit 1,4 ml sterilem Wasser rekonstituieren. 5 min bei 20-25° C inkubieren. Gelegentlich vorsichtig schwenken.

Reagenz B

Mit 8,0 ml sterilem Wasser rekonstituieren. 5 min bei 20-25° C inkubieren. Gelegentlich vorsichtig schwenken.

FXa Substrat, 6 ml

Gebrauchsfertig

FIX Verdünnungspuffer, Stammlösung, 20 ml

1 + 9 mit sterilem Wasser verdünnen um eine 0,025 mol/L Tris-HCl Arbeits-Pufferlösung zu erhalten (pH 7,9 (20°C), 1% Rinder Serum Albumin, Heparin-

Antagonist). NB: Das gewünschte Volumen vor der 10-fach Verdünnung genau abmessen, da ein geringer Volumenüberschuss bei der Lieferung einkalkuliert ist.

Achtung: Alle Rekonstitutionen und Lösungen mit Wasser herstellen, welches mindestens der Qualität von NCCLS Type II Wasser oder Ph. Eur. Wasser für Injektionen entspricht.

7 LAGERUNG UND STABILITÄT

Die verschlossenen Reagenzien sind bei 2-8° C bis zum angegebenen Verfallsdatum haltbar. Kontamination durch Mikroorganismen sollte vermieden werden.

- **Reagenz A:** Nach Rekonstitution stabil für 72 Stunden bei 2-8° C, 8 Stunden bei 20-25° C und 12 Monate bei <-70° C.
- **Reagenz B:** Nach Rekonstitution stabil für 72 Stunden bei 2-8° C, 8 Stunden bei 37° C und 12 Monate bei <-70° C.
- **Chromogenes FXa Substrat:** Nach Öffnung stabil für 1 Monat bei 2-8° C und 12 Monate bei <-20° C.
- **FIX Verdünnungspuffer**
Stammlösung: Geöffnet haltbar für 1 Monat bei 2-8° C.
Die Arbeits-Pufferlösung täglich frisch ansetzen.

8 ZUSÄTZLICH BENÖTIGTE MATERIALIEN

- Entionisiertes Wasser, NCCLS Type II Wasser oder Ph. Eur. Wasser für Injektionen oder höherer Qualität
- Für die Kalibration: Humanes Plasma oder FIX Konzentrat, kalibriert gegen den WHO Internationalen Standard für FIX Aktivität
- Zitronensäure, 2% (für die Endpunktmethode)
- Kalibrierte Pipetten
- Photometer, 405 nm (und 490 nm für die Endpunktmethode)
- Inkubator 37°C
- Reaktionsgefäße
- Stoppuhr
- Vortex-Mixer

Verwenden Sie bei Ansätzen in der Mikroplatte, Platten mit niedriger Bindungsaffinität.

9 VERWENDETE ZEICHEN



In-vitro Diagnostikum



Katalognummer



Chargen-Bezeichnung



Verwendbar bis



Festgelegte Temperatur



Beilage beachten



Biogefährdung



Hergestellt von



CE Mark

10 PROBENGEWINNUNG

Die Probengewinnung muss in Übereinstimmung mit den Empfehlungen für Gerinnungsteste durchgeführt werden. Neun Teile frisch gewonnenes venöses Vollblut mit 1 Teil Natriumcitrat mischen und bei 2000-2500 x g für 15 Minuten zentrifugieren. Weitere Anweisungen bezüglich Entnahme, Behandlung und Lagerung von Probenmaterial gemäß NCCLS Dokument H21-A5.

11 QUALITÄTSKONTROLLE

Kontrollplasma mit definierter Aktivität sollte verwendet werden, um die erstellte Kalibrationskurve zu validieren. Für eine vollständige Qualitätskontrolle werden normale und abnormale Kontrollen benötigt. Beide sind kommerziell erhältlich. Die Kontrollen sollten wie Proben verwendet werden. Jedes Labor sollte seinen eigenen Kontrollbereich festlegen, entweder anhand des vom Hersteller festgelegten Ziel, bzw. Wertebereiches oder durch eigene Vertrauenswerte.

12 METHODE - PLASMA

Eine Standardkurve sollte mit jedem Lauf erstellt werden. Als Kalibrator sollte ein gegen Internationalen Standard kalibriertes humanes Normalplasma verwendet werden.

Bereiten Sie die Standardverdünnungen in FIX Arbeits-Pufferlösung vor, um Standards für den gewählten Messbereich zu erhalten. Verwenden Sie mindestens fünf unterschiedliche Standardverdünnungen. Es wird empfohlen, für jeden Standard eigene Verdünnungen anzusetzen.

Alle Verdünnungen sollten in Plastikreaktionsgefäßen vorbereitet werden.

12.1 Hoher Bereich (25 - 200 %) - Probenverdünnung 1:80

Beispiel - Standardverdünnung, hoher Bereich:

Vorbereitung der FIX Kalibrationskurve, BEREICH 25 - 200 %			
FIX Standard %	Gesamte Verdünnung	Volumen	Volumen der FIX Pufferlösung (gebrauchsfertig)
Vorverdünnung	1:10	100 µl Plasma	900 µl
200%	1:40	100 µl Vorverd.	300 µl
150%	1:53.3	100 µl Vorverd.	433 µl
100%	1:80	100 µl Vorverd.	700 µl
50%	1:160	50 µl Vorverd.	750 µl
25%	1:320	50 µl Vorverd.	1550 µl
Blank	-	-	500 µl

Achtung: 100 % Aktivität ist definiert als 1 IU/ml FIX Aktivität im Plasma. Für den Fall, dass die FIX Aktivität des Plasmastandards von diesem Wert abweicht, sollte ein Korrekturfaktor berechnet werden, um den Probenwert zu bestimmen. Es wird empfohlen alle Ergebnisse in IU/ml anzugeben.

12.2 Probenverdünnung – Hoher Bereich

Plasmaproben mit einem erwarteten Wert von 25 - 200 % (0.25 - 2 IU/ml) sollten im hohen Bereich mit einer Probenverdünnung von **1:80** bestimmt werden. Die FIX Aktivität der getesteten Probe kann direkt an der Kalibrationskurve abgelesen werden.



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

info@rossix.com
www.rossix.com

12.3 Niedriger Bereich (0,5 - 25 %) - Probenverdünnung 1:20

Beispiel – Standardverdünnung, niedriger Bereich:

Vorbereitung der FIX Kalibrationskurve, BEREICH 0,5 - 25 %			
FIX Standard %	Gesamte Verdünnung	Volumen	Volumen der FIX Pufferlösung (gebrauchsfertig)
Vorverdünnung	1:20	50 µl Plasma	950 µl
25%	1:80	100 µl Vorverd.	300 µl
12,5%	1:160	100 µl Vorverd.	700 µl
6,25%	1:320	100 µl Vorverd.	1500 µl
3,125%	1:640	50 µl Vorverd.	1550 µl
1 %	1:2000	10 µl Vorverd.	990 µl
0,5 %	1:4000	10 µl Vorverd.	1990 µl
Blank	-	-	500 µl

Achtung: 100 % Aktivität ist definiert als 1 IU/ml FIX Aktivität im Plasma. Für den Fall, dass die FIX Aktivität des Plasmastandards von diesem Wert abweicht, sollte ein Korrekturfaktor berechnet werden, um den Probenwert zu bestimmen. Es wird empfohlen alle Ergebnisse in IU/ml anzugeben.

12.3.1 Probenverdünnung – Niedriger Bereich

Plasmaproben mit einem erwarteten Wert von 0,5 - 25% (0,005 - 0,25 IU/ml) sollten im niedrigen Bereich mit einer Probenverdünnung von **1:20** bestimmt werden. Die FIX Aktivität der getesteten Probe kann direkt an der Kalibrationskurve abgelesen werden.

12.3.2 Blank

Proben Blankwerte sind im allgemeinen nicht notwendig, sollten aber gemessen werden, wenn hämolytisches, ikterisches oder lipämisches Plasma vorliegt. Den Blankwert erhält man, wenn anstelle der Probe vor Zugabe der übrigen Reagenzien Zitronensäure (2%) zugefügt wird.

13 METHODE – KONZENTRATE

Die European Pharmacopeia¹ empfiehlt die parallel-line Methode für die Bestimmung der Aktivität von biologischen Proben. Faktor IX Konzentrate können in einem Bereich von 0,25 - 200 mIU/ml bei einer 4 oder 5 Punkt Kurve oder in einem Bereich von 0,5 – 5 mIU/ml bei Verwendung einer log-log Transformation mit linearer Anpassung bestimmt werden. Es wird empfohlen, dass jedes Labor seinen eigenen Wertebereich für die parallel-line Methode etabliert.

13.1 Standardverdünnung – FIX enthaltende Konzentrate

Eine Standardkurve sollte mit jedem Lauf erstellt werden. Als Kalibrator sollte Referenzmaterial für FIX Konzentrate, ein internes oder ein erworbenes gegen Internationalen Standard kalibriertes FIX Konzentrat verwendet werden.

Bereiten Sie die Standardverdünnungen in FIX Arbeits-Pufferlösung vor, um Standards für den Messbereich 0,25 – 200 mIU/ml zu erhalten.

Verwenden Sie mindestens sieben (oder fünf) verschiedene Standardlösungen.

13.2 Probenverdünnung – FIX enthaltende Konzentrate

Es wird empfohlen mindestens drei Probenverdünnungen in FIX Arbeits-Pufferlösung mit Aktivität im Standardbereich zu verwenden. Alle Verdünnungen sollten in Plastikreaktionsgefäßen vorbereitet werden.

14 Testdurchführung– PLASMA UND KONZENTRATE

14.1 Manuelle Methode

Sowohl für Plasma (hoher Bereich und niedriger Bereich) als auch für Konzentrate gelten folgende Angaben.

Probe / Standardverdünnung	25 µl
Reagenz A	25 µl
<i>Inkubation 3-4 min, 37°C</i>	
Reagenz B (37°C)	150 µl
<i>Aktivierung 8 min, 37°C</i>	
FXa Substrat (37°C)	50 µl
<i>Kinetische Methode: ΔA405/min bei 37°C</i>	
<i>Endpunktmethode: Hydrolyse bei 37°C für 2 min</i>	
Zitronensäure, 2% (nur Endpunktmethode)	50 µl

Kinetische Methode:

Ablesen der Absorption bei 405 nm. Detektion der Änderung der Absorption.

Endpunktmethode:

Stoppen der Reaktion mit Zitronensäure (2%). Ablesen der Absorption bei 405 nm (490 nm als Referenzwellenlänge verwenden). Das Ablesen der Platte sollte innerhalb von 2 Stunden nach Abstoppen der Substrat-Hydrolyse erfolgen.

14.2 Automatisierte Methode

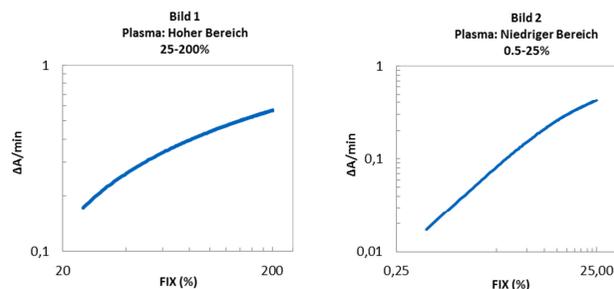
Applikationsvorschriften für verschieden Geräte werden auf Anfrage bereitgestellt.

Achtung: Sollte Reagenz B umgefüllt werden müssen, aus Stabilitätsgründen unbedingt silikonisierte Glasflaschen oder Plastikflaschen verwenden.

15 BERECHNUNG

Plasma:

- Die maximale Absorptionsänderung/Minute ($\Delta A_{405_{max}}/min$) oder Absorption (A405-490) vs. FIX Aktivität in einer Log-Log Grafik auftragen, nachdem der Blankwert abgezogen wurde (Bild 1 und Bild 2). Alternativ, kann ein Semi-Log Graph mit einer 4 oder 5 Parameter Kurvenanpassung verwendet werden.
- Die FIX Aktivität der getesteten Probe kann direkt der Standardkurve entnommen werden. Weicht der FIX – Wert des Normalplasmas von 1 IU/ml ab, sollte ein berechneter Korrekturfaktor verwendet werden.
- Verdünnungsfaktoren einbeziehen.
- Ausgabe der Probenergebnisse in IU/ml oder %.



Konzentrate:

- Die maximale Absorptionsänderung/Minute ($\Delta A_{405_{max}}/min$) oder Absorption (A405-490) vs. FIX Aktivität in einer Semi-Log oder Log-Log Grafik auftragen nachdem der Blankwert abgezogen wurde. Es wird eine 4 oder 5 Parameter Auswertung (Semi-Log) oder lineare Kurvenanpassung (Log-Log) angewandt.
- Bestimmung der FIX Aktivität der Probe mit Hilfe der Kalibrationskurve und der Parallel-Line-Methode.
- Verdünnungsfaktor beachten und Ergebnisse in IU/ml angeben.
- Die European Pharmacopeia empfiehlt die Verwendung des Parallel-Line-Modells. Alternativ kann die FIX Aktivität jeder Verdünnung direkt von der Kalibrationskurve abgelesen werden. Die Ergebnisse müssen dann mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert werden.

16 ERWARTETE WERTE

Der FIX-Level bei 25 gesunden Männern und 25 gesunden Frauen in einem Alter von 19 – 56 Jahren lag in einem Bereich von 0,6 – 1,3 IU/ml.

FIX-Mangel, auch bekannt als Hämophilie B, kann in drei Gruppen unterteilt werden⁴: Mild (0,05 – 0,4 IU/ml), moderat (0,01 – 0,05 IU/ml) und schwer ($\leq 0,01$ IU/ml).

Der FIX-Level kann bei Patienten mit Lebererkrankung, Leberzirrhose und DIC sowie unter Anti-Vitamin-K-Therapie herabgesetzt sein.

17 TESTCHARAKTERISTIKA

Nachweisgrenze: 0,1% (0,001 IU/ml), berechnet gemäß CLSI EP17-A im niedrigen Bereich bei einer Probenverdünnung von 1:20.

Quantifizierungsgrenze: 0,5% (0,005 IU/ml), berechnet gemäß CLSI EP17-A im niedrigen Bereich bei einer Probenverdünnung von 1:20.

Präzision:

Reproduzierbarkeit (Intra assay CV): 3%

Laborintern (Inter assay CV): 4%

Die Präzision wurde bei 1%, 25% und 100% FIX Aktivität bestimmt. Die Ergebnisse wurden mittels manueller Mikroplattenmethode erhalten und sollen nur als Beispiele angesehen werden.

Linearität: 0,5 – 200% (0,005 – 2 IU/ml), berechnet gemäß CLSI EP06-A

18 STÖRFAKTOREN

FIX Ergebnisse werden **nicht beeinflusst** von Plasma Konzentrationen bis: **Hämoglobin** - 5 g/L, **Bilirubin** - 0,4 g/L, **Triglyceride** - 5 g/L, **LMW Heparin** - 5 IU/ml, und **Unfraktioniertes Heparin** - 2 U/ml.

Kein Einfluss auf **FIXa** bis 50 mIU FIXa/1 IU FIX.

19 REFERENZEN

- 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.
- 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.
- White GC et al. Definitions in Hemophilia. *Thromb Haemost* 2001; **85**: 560.
- Bertina RM. Elevated clotting factor levels and venous thrombosis. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2003/2004; **33**: 395-400.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), www.clsi.org
- 6th Edition of the European Pharmacopeia, General Chapter 5.3 Statistical analysis of results of biological assays and tests.

