

CE Prothrombin Deficient Plasma

ADP010A

Deficient plasma for the assay of Prothrombin with a clotting assay

For in vitro diagnostic use only

Diagnostic in vitro exclusivement



Manufactured By: HYPHEN BioMed

Last revision / Dernière version: 18/04/2007

ENGLISH

INTENDED USE:

The kit is proposed for the measurement of Factor II (FII or Prothrombin) activity in human citrated plasma using a clotting method, triggered with calcium thromboplastin.

ASSAY PRINCIPLE:

The method is a clotting assay where all the clotting factors are present (constant and in excess, brought by the deficient plasma), excepted for FII, which is brought by the diluted tested plasma, and clotting is triggered with calcium thromboplastin. FII is the limiting factor and clotting time is inversely proportional to the concentration of FII. There is an inverse linear relationship, on a logarithmic graph paper, between the FII concentration and the corresponding clotting time.

ASSAY SPECIMEN:

Human plasma obtained from Trisodium Citrate anticoagulated blood.

REAGENTS:

1 vial of 1 ml of citrated human plasma, deficient for Prothrombin, immuno-depleted, lyophilized in the presence of glycine and stabilizers. This plasma is deficient for Prothrombin (<1%), whereas all the other coagulation factors are within about the normal range (> 50%).

REAGENTS AND MATERIAL REQUIRED, BUT NOT SUPPLIED:

- Pipettes with dispensing volumes of 20 µl, 50 µl and 100 µl; or with a variable dispensing volume from 50 µl to 1,000 µl.
- Semi-automatic or automatic coagulation instrument, or fibrometer or electromagnetic water bath; stop watch.
- Distilled water.
- Owren Koller buffer (ex AAR003A/AAR003K).
- Normal human citrated plasma pool or Factor II calibrator (BIOPHEN Plasma Calibrator - # A222101).
- Normal and Abnormal quality control plasmas, titrated for Factor II (BIOPHEN Normal Control Plasma - #A223201 and BIOPHEN Abnormal Control Plasma - #A223301).
- Calcium Thromboplastin (such as rabbit brain thromboplastin).

REAGENT PREPARATION AND STABILITY:

In the original package, and before any use, when stored at 2-8°C, the reagent is stable until the expiration date printed on the kit.

Reagent Preparation:

Restore the vial with 1 ml of distilled water; mix gently until complete dissolution of the content (vortex), let for 15 min. at room temperature (18-25°C); homogenize before each use.

Reagent stability following reconstitution:

- When opened and protected from any contamination, the reconstituted plasma is stable for:
 - 8 hours at room temperature (18-25°C)
 - 24 hours at 2-8°C
 - 2 months, frozen at -20°C or below, in its original vial, or in a plastic tube (before use, thaw in a water bath at 37°C, for at least 15 min).

Note: Plasmas used for the Deficient Plasma preparation were tested with registered methods and found negative for HIV antibodies, HBs Ag and HVC antibodies. However, no assay may warrant the total absence of infectious agents. Any product of human origin must then be handled with all the required cautions, as being potentially infectious. Note: The stability studies at 30°C show that the reagent can be shipped at room temperature without damage.

SAMPLE COLLECTION AND PREPARATION:

Blood (9 vol.) must be collected on 0.109M trisodium citrate anticoagulant (1 vol.); plasma supernatant is decanted following a 20 min. centrifugation at 2,500 g; citrated plasma must be tested within 4 hours when stored at room temperature (20-25°C), or it can be frozen at -20°C or below for up to 1 month. Just before use, the plasma must be thawed for 15 min. in a water bath at 37°C.

Refer to GEHT or NCCLS guidelines for further instructions on specimen collection, handling and storage. Discard any sample with an unusual aspect.

PROTOCOL:

Calibration curve:

Prepare 1 ml of normal citrated human pooled plasma diluted 1:10 in Owren Koller buffer. By definition, this ten fold dilution of the normal citrated human plasma pool corresponds to a concentration of 100% of FII. Using this preparation, the calibration curve is obtained as follows:

II	6.25%*	12.5%	25%	50%	100%
Dilution	1:160	1:80	1:40	1:20	1:10
Plasma pool 1:10	0.060 mL	0.125 mL	0.250 mL	0.500 mL	1 mL
Owren Koller Buffer	0.900 mL	0.875 mL	0.750 mL	0.500 mL	0 mL

*these complementary dilutions can be used when high accuracy is required for the low range (≤10%).

The calibration curve can also be established with the BIOPHEN Plasma Calibrator (#A222101), using the factor II activity (C) indicated on the flyer for the lot used.

The calibration curve must be used within 2 hours at room temperature (18-25°C).

FRANCAIS

UTILISATION:

Le coffret est proposé pour la détermination de l'activité du Facteur II (FII ou Prothrombine) présent dans le plasma humain citraté. C'est une méthode coagulante, utilisant la thromboplastine calcique.

PRINCIPE:

La technique proposée est basée sur une méthode de coagulation où tous les facteurs sont présents (constants et en excès, apportés par le plasma déficient), à l'exception du FII, qui est apporté par le plasma à tester, dilué, et la coagulation est initiée par la thromboplastine calcique. Le FII est alors le facteur limitant. Le temps de coagulation obtenu avec le test est inversement proportionnel à la concentration de FII. Il en résulte une relation linéaire inverse, en coordonnées bilogarithmiques, entre la concentration en FII et le temps de coagulation correspondant.

ECHANTILLON:

Plasma humain prélevé sur anticoagulant citraté.

RÉACTIFS:

1 flacon de 1 ml de plasma humain citraté, déficient en Prothrombine, immuno-déplété, lyophilisé en présence de glycine et de stabilisants.

Ce plasma est déficient pour la Prothrombine de la coagulation (<1%), tandis que tous les autres facteurs sont sensiblement dans la zone normale (> 50%).

MATERIEL NECESSAIRE ET NON FOURNI:

- Pipettes à volume fixe de 20 µl, 50 µl et 100 µl, et variable de 50 µl à 1000 µl.
- Appareils de coagulation semi-automatiques ou automatiques, fibromètre ou Bain-Marie électromagnétique le cas échéant; chronomètre.
- Eau distillée.
- Tampon Owren Koller (ex. AAR003A/AAR003K).
- Pool de plasma humain citraté normal ou calibrateur titré en FII (BIOPHEN Plasma Calibrator - Réf. A222101).
- Plasmas de contrôle Normal et Anormal titrés en FII (BIOPHEN Normal Control Plasma - Réf. A223201 et BIOPHEN Abnormal Control Plasma - Réf. A223301).
- Thromboplastine calcique (comme celle extraite de cerveau de lapin, par exemple).

PREPARATION, CONSERVATION ET STABILITE DES REACTIFS:

Dans l'emballage d'origine, et avant toute utilisation, conservé à 2-8°C, le réactif est stable jusqu'à la date d'expiration indiquée sur le coffret.

Préparation:

Reconstituer le réactif avec 1 ml d'eau distillée, homogénéiser jusqu'à dissolution complète du contenu (vortex), et laisser stabiliser pendant au moins 15 min. à température du laboratoire (18-25°C). Agiter délicatement pour homogénéiser totalement le réactif, avant chaque utilisation.

Stabilité du réactif après reconstitution:

Après ouverture, et protégé de toute contamination, le plasma ainsi reconstitué est stable :

- 8 heures à température ambiante (18-25°C)
- 24 heures à 2-8°C
- 2 mois, conservé congelé à -20°C ou moins, dans son flacon d'origine ou dans un tube plastique (avant utilisation, le décongeler pendant 15min dans un bain-marie à 37°C).

Note: Les plasmas utilisés pour la préparation de ce réactif ont été testés par des méthodes enregistrées et sont certifiés exempts pour l'anticorps VIH, le Hbs Ag et l'anticorps VCH. Toutefois, aucune méthode ne permettant d'exclure totalement le risque d'agent pathogène, ces produits doivent être manipulés avec toutes les précautions requises pour l'utilisation de produits potentiellement infectés.

PRÉLÈVEMENT:

Le sang (9 vol.) doit être prélevé sur du citrate trisodique 0.109M (1 vol.); le plasma est obtenu par décantation du surnageant après 20 min. de centrifugation à 2,500 g.

Le plasma citraté doit être utilisé : dans les 4 heures s'il est maintenu à température du laboratoire (20-25°C), ou il peut-être conservé congelé, à -20°C ou moins, jusqu'à 1 mois. Juste avant utilisation, décongeler le plasma pendant 15 minutes dans un bain-marie à 37°C.

Se référer aux recommandations du GEHT ou du NCCLS pour toute instruction complémentaire sur la collecte, le traitement et le stockage des échantillons. Rejeter tout échantillon suspect.

PROTOCOLE:

Gamme d'étalonnage:

Préparer 1 ml de pool de plasma normal citraté dilué au 1:10 en tampon Owren Koller. Par définition, la dilution au 1:10 de pool de plasma normal citraté correspond à la concentration de 100% de FII. Utiliser cette dilution au 1:10 pour préparer la gamme d'étalonnage suivante :

II	6.25%*	12.5%	25%	50%	100%
Dilution	1:160	1:80	1:40	1:20	1:10
Pool de plasma 1:10	0.060 mL	0.125 mL	0.250 mL	0.500 mL	1 mL
Tampon Owren Koller	0.900 mL	0.875 mL	0.750 mL	0.500 mL	0 mL

*dilutions supplémentaires possibles pour une meilleure précision pour les valeurs ≤10%.

La gamme d'étalonnage peut également être réalisée avec le BIOPHEN Plasma Calibrator - Réf. A222101 en utilisant le taux indiqué (C) pour le facteur II du lot utilisé.

La gamme d'étalonnage ainsi préparée est stable pendant 2 heures à température du laboratoire.

D.750.08/DP/010A



8560 Gove Court • Mason, OH 45040

Phone: 513.770.1991

Toll Free: 866.783.3797

Fax: 513.573.9241

Email: info@aniara.com

www.aniara.com

Preparation of tested plasma:

Tested plasma must be diluted 1:10 with Owren Koller type buffer. The diluted plasma must be tested within 2 hours.

Cautions: to ensure optimal performances of the assay, perform all assays (calibration, samples, controls) extemporaneously and successively without interruption

Assay:

Manual Method:

Preincubate Calcium Thromboplastin at 37°C.

In a test tube, or a cuvette, introduce:

- 100 µl of FII deficient Plasma.
- 100 µL of calibration solution or of tested plasma diluted 1:10.

Incubate for 1 min. at 37°C, and then introduce (starting the stopwatch):

- 200 µl of Calcium Thromboplastin preincubated at 37°C.

Record the clotting time.

Automatic Method:

The assay can be used with the semi-automatic or automatic instruments, such as STA-R, KC-4, KC-10, BCT, BCS, etc...

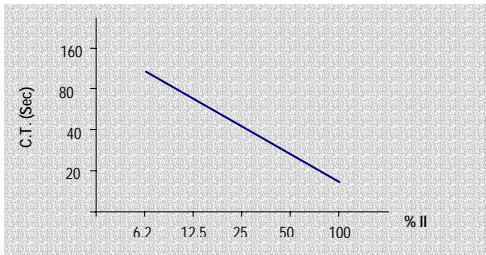
The usual program used for testing the factors involved in the extrinsic pathway with a clotting based calcium thromboplastin method, and a specific deficient plasma, can be applied. The respective specimen and reagent volume ratios indicated for the manual method must be strictly respected. Usually, with automatic methods the volumes used for reagents and tested plasma (diluted 1:10) are half those recommended for the normal method.

With semi automatic or automatic instruments, especially those with a photometric detection of clot formation, clotting times use to be slightly shorter than with the manual method.

EXPRESSION OF RESULTS:

On a bilogarithmic graph paper, plot on abscissae the FII concentrations and on ordinates the corresponding clotting times. On the calibration curve obtained, interpolate directly the corresponding FII concentration for the tested plasma.

Example of Calibration curve: This calibration curve is indicated as an example only. It was obtained with Neoplastin C15 from Diagnostica Stago, using a manual method.



QUALITY CONTROL:

The control is performed using commercially available control plasmas, titrated for FII activity. Various control plasmas are available: BIOPHEN Normal Control Plasma: (ref A223201); BIOPHEN Abnormal Control Plasma: (ref A223301). Use of quality control plasmas allows validating the calibration curve, as well as the homogeneous reactivity of the assay from run to run, and from series to series, when using a same lot of reagents.

CAUTIONS AND LIMITATIONS:

- Sampling must be performed with great care, avoiding any blood activation. Discard any plasma presenting an unusual aspect, or any sign of activation or clotting.
- It is recommended to perform all assays of fresh calibration points, specimen and controls successively without interruption, to obtain optimal performances of the assay.
- For a better accuracy, samples measured $\leq 10\%$ can be tested at the 1:5 dilution, and obtained results divided by 2; for samples measured $>100\%$ (or C%), the 1:20 dilution can be used and obtained results multiplied by 2.
- For a deficient sample: check the result by testing if necessary the 1:5 dilution (the obtained concentration must then be divided by 2), and/or another sample and/or method for the patient plasma; check potential associated factor(s) deficiency.
- Thrombin inhibitors present in the tested sample may lead to an underestimation of the FII concentration.

NORMAL VALUES:

Normal values for Factor II activity are usually $> 70\%$.

APPLICATIONS:

- The reagent is proposed for measuring Factor II activity, by clotting assay.
- Lyophilized, human citrated plasma, deficient for Prothrombin, for any in vitro protocol or research study where a source of human Prothrombin deficient plasma is required.

ASSAY VARIATIONS:

The clotting times observed for this assay are obtained with Calcium Thromboplastin from Biomérieux (Calcic Thromboplastin) or from Diagnostica Stago (Neoplastin). They are expected <30 seconds for the 100% FII concentration. The obtained clotting times and assay performances can slightly vary according to the thromboplastin reagent type and lot, and the instrument used in the laboratory. Performances, as well as target values and acceptance ranges for each new lot of quality controls used, and the normal range, must then be confirmed (and adjusted if necessary) in the laboratory working conditions.

REFERENCES:

- Soulier JP, Larrieu MJ. Etude analytique des temps de Quick allongés. Dosage de prothrombine, de proconvertine et de proaccélélerine. Sang 1952; 23: 549-559.
- Favre-Gilly J, Belleville J, Croizat P, Revel L. Les états hémorragiques acquis par trouble plasmatique de coagulation. Cah Med Lyonnais 1967; 43 (28): 2611-2668.
- Gjonnaess H, Fagerhol MK. Studies on coagulation and fibrinolysis in pregnancy. Acta Obstet Gynecol Scand 1975; 54: 363-367.
- Andrew M, Paes B, Milner R, Hohnston M, Mithell L, Tollefsen DM, Powers P. Development of the human coagulation system in the full-term infant. Blood 1987; 70: 165-172.
- Abrégés "Hémorragies et thromboses – Du Diagnostic au traitement", Samama et coll. Masson, 2004.

D.750.08/DP/010A

Plasmas à tester :

Diluer le plasma au 1:10 en tampon type Owren Koller. Le plasma dilué doit être utilisé dans les 2 heures.

Précaution : dans la mesure du possible, pour obtenir les performances optimales du dosage, tous les essais (gamme, échantillons et contrôles) seront réalisés extemporanément et simultanément.

Test :

Méthode Manuelle :

Préincuber la thromboplastine calcique à 37°C.

Dans un tube à hémolyse, ou une cuvette réactionnelle, introduire:

- 100 µl de Plasma Déficient en FII.
- 100 µL de point d'étalonnage ou de plasma à tester dilué au 1:10.

Incuber pendant 1 min. à 37°C, puis introduire (en déclenchant le chronomètre):

- 200 µl de thromboplastine calcique préincubée à 37°C.

Noter le temps de coagulation.

Méthode automatique :

Le test peut être réalisé sur les instruments de coagulation semi-automatiques ou automatiques, comme : STA-R, KC-4, KC-10, BCT, BCS, etc...

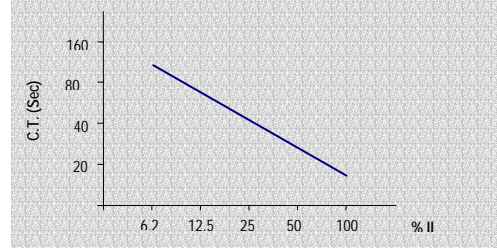
Le programme habituel utilisé pour tester les facteurs de la voie extrinsèque par méthode coagulante utilisant de la thromboplastine calcique, et un plasma déficient, peut être appliqué. Cependant, le rapport respectif des volumes indiqué pour la méthode manuelle doit être strictement respecté. En règle générale, par méthode automatique les volumes de réactifs utilisés et de prise d'essai sont la moitié de ceux utilisés pour la méthode manuelle.

Sur automates (en particulier avec détection optique), les temps de coagulation sont légèrement plus courts que par méthode manuelle.

EXPRESSION DES RESULTATS :

Tracer la droite d'étalonnage sur papier bilogarithmique, en portant en abscisses les concentrations de FII et en ordonnées les temps de coagulation correspondants. En fonction du temps de coagulation du plasma à tester, en déduire le taux en Facteur II.

Exemple de courbe de calibration : La courbe d'étalonnage ci-dessous n'est montrée qu'à titre d'exemple. Elle est obtenue en utilisant de la Neoplastin C15 de Diagnostica Stago, et avec la méthode manuelle (Bain-Marie électromagnétique).



CONTROLE DE QUALITE :

L'utilisation de plasmas de contrôle disponibles sur le marché, titrés en activité II, permet de valider la courbe d'étalonnage et la réactivité homogène du dosage, dans les différentes séries, pour un même lot de réactifs. Différents plasmas de contrôle sont disponibles: Biophen Normal Control Plasma : (ref A223201) ; Biophen Abnormal Control Plasma : (ref A223301).

PRECAUTIONS ET INTERFERENCES:

- Le prélèvement doit être effectué avec soin, en adhérant strictement aux précautions requises, pour éviter toute activation sanguine. Rejeter tout prélèvement suspect, ou présentant un signe d'activation ou de coagulum.
- Il est recommandé de tester successivement et sans interruption la gamme de calibration fraîchement préparée, les échantillons à tester et les contrôles, pour obtenir les performances optimales du test.
- Pour une meilleure précision des résultats, pour un échantillon mesuré $\leq 10\%$, utiliser la dilution 1:5 et diviser le taux ainsi obtenu par 2 ; pour un échantillon mesuré $>100\%$ (ou C %) utiliser la dilution 1:20 et multiplier le taux ainsi obtenu par 2.
- Pour un échantillon mesuré déficient : vérifier le résultat en testant si nécessaire la dilution 1/5 (le taux obtenu sera divisé par 2), et/ou sur un autre prélèvement et/ou une autre méthode ; s'assurer d'un déficit combiné en autre(s) facteur(s).
- La présence d'inhibiteurs de la thrombine dans l'échantillon est susceptible d'entraîner une sous estimation du taux de II.

VALEURS USUELLES

Les valeurs normales du facteur II sont habituellement $> 70\%$.

APPLICATIONS:

- Le réactif est proposé pour la mesure de l'activité du Facteur II, par méthode coagulante.
- Plasma humain citraté, lyophilisé, déficient en Prothrombine de la coagulation, obtenu par immuno-adsorption, proposé pour tout protocole ou tout travail de recherche in vitro où une source de plasma humain déficient en Prothrombine est nécessaire.

VARIATIONS :

Les temps de coagulation observés avec ce test sont obtenus avec de la thromboplastine calcique de chez Biomérieux (Calcic Thromboplastin) ou de Diagnostica Stago (Neoplastin). Ils sont de l'ordre de <30 secondes pour la concentration de 100% en FII. Les temps de coagulation obtenus et les performances du test peuvent varier légèrement selon le type, le lot de thromboplastine et l'automate utilisés. Ces performances, ainsi que les valeurs cibles et intervalles de confiance, pour chaque nouveau lot de contrôle de qualité utilisé, et la zone normale, doivent, par conséquent, être confirmés (et ajustés si nécessaire), dans les conditions de travail exactes du laboratoire.

REFERENCES :

- Soulier JP, Larrieu MJ. Etude analytique des temps de Quick allongés. Dosage de prothrombine, de proconvertine et de proaccélélerine. Sang 1952; 23: 549-559.
- Favre-Gilly J, Belleville J, Croizat P, Revel L. Les états hémorragiques acquis par trouble plasmatique de coagulation. Cah Med Lyonnais 1967; 43 (28): 2611-2668.
- Gjonnaess H, Fagerhol MK. Studies on coagulation and fibrinolysis in pregnancy. Acta Obstet Gynecol Scand 1975; 54: 363-367.
- Andrew M, Paes B, Milner R, Hohnston M, Mithell L, Tollefsen DM, Powers P. Development of the human coagulation system in the full-term infant. Blood 1987; 70: 165-172.
- Abrégés "Hémorragies et thromboses – Du Diagnostic au traitement", Samama et coll. Masson, 2004.