



FIX Deficient Plasma

ADP050A

Deficient plasma for the assay of FIX with a clotting assay



Manufactured By: HYPHEN BioMed

For in vitro diagnostic use only

Diagnostic in vitro exclusivement

Last revision / Dernière version: 18/04/2007

ENGLISH

INTENDED USE:

The kit is proposed for the measurement of Factor IX (FIX) activity in human citrated plasma using a clotting method, in the presence of cephalin, activator and calcium (APTT reagent).

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 FIX, which is brought by the diluted tested plasma, and clotting is triggered with cephalin, activator and calcium (APTT). FIX is the limiting factor and clotting time is inversely proportional to the concentration of FIX. There is an inverse linear relationship, on a bilogarithmic graph paper, between the FIX 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 FIX, immuno-depleted, lyophilized in the presence of glycine and stabilizers. This plasma is deficient for FIX (<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.
- Calcium chloride 0.025M (ex AAR001A/AAR001K)
- Owren Koller buffer (ex AAR003A/AAR003K).
- Normal human citrated plasma pool or FIX calibrator (BIOPHEN Plasma Calibrator - # A222101).
- Normal and Abnormal quality control plasmas, titrated for FIX (BIOPHEN Normal Control Plasma - #A223201 and BIOPHEN Abnormal Control Plasma - #A223301).
- aPTT reagent (cephalin)

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 volumes) must be collected on 0.109 M citrate anticoagulant (1 volume), with great care, in a silicon glass or a plastic tube. Sampling must be performed through a net venipuncture, avoiding any blood activation. Within 2 hours, blood must be centrifuged at 2,500 g for 15 min, and plasma decanted into a plastic tube, using a plastic pipette.

Storage of plasma: up to 4 hours at Room Temperature (18-25°C), or up to 1 month frozen at -20°C or below (before use, thaw 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 FIX. Using this preparation, the calibration curve is obtained as follows:

IX	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 IX activity (C) indicated on the flyer for the lot used.

The calibration curve must be used within 1 hour at room temperature (18-25°C).

FRANCAIS

UTILISATION:

Le coffret est proposé pour la détermination de l'activité du Facteur IX (FIX) présent dans le plasma humain citraté. C'est une méthode coagulante, en présence de céphaline, activateur et calcium (réactif TCA).

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 FIX, qui est apporté par le plasma à tester, dilué, et de la céphaline, avec l'activateur et le calcium (réactif TCA). Le FIX est alors le facteur limitant. Le temps de coagulation obtenu avec le test est inversement proportionnel à la concentration de FIX. Il en résulte une relation linéaire inverse, en coordonnées bilogarithmiques, entre la concentration en FIX 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 FIX, immuno-déplété, lyophilisé en présence de glycine et de stabilisants. Ce plasma est déficient pour le FIX (<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.
- Chlorure de calcium 0,025M (ex AAR001A/AAR001K)
- Tampon Owren Koller (ex. AAR003A/AAR003K).
- Pool de plasma humain citraté normal ou calibrateur titré en FIX (BIOPHEN Plasma Calibrator - Réf. A222101).
- Plasmas de contrôle Normal et Anormal titrés en FIX (BIOPHEN Normal Control Plasma - Réf. A223201 et BIOPHEN Abnormal Control Plasma - Réf. A223301).
- Réactif TCA (céphaline).

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.

PRELEVEMENT:

Le sang (9 volumes) doit être collecté, en tube plastique ou en verre silicé contenant du citrate trisodique 0.109M (1 volume), par ponction veineuse franche, en évitant toute activation. Rejeter les premières gouttes de sang. Centrifuger le prélèvement, au plus tard dans les 2 heures suivantes, pendant 15 minutes à 2500g. Le plasma citraté doit être décanté dans un tube plastique. Conservation du plasma: jusqu'à 4 heures à température ambiante (18-25°C), ou 1 mois congelé à -20°C ou moins (avant utilisation, décongeler le plasma pendant 15 min. 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 FIX. Utiliser cette dilution au 1:10 pour préparer la gamme d'étalonnage suivante:

IX	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 IX du lot utilisé.

La gamme d'étalonnage ainsi préparée est stable pendant 1 heure à température du laboratoire.

D.750.08/DP/050A



6560 Gove Court · Mason, OH 45404

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 1 hour.

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

Assay:

Manual Method:

In a test tube, or a cuvette, introduce:

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

Incubate for 1 min. at 37°C, and then introduce:

- 100 µL of aPTT reagent (cephalin)

Incubate for exactly 3 min. at 37°C, and then introduce (starting the stop watch):

- 100 µl of Calcium Chloride 0.025M 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...

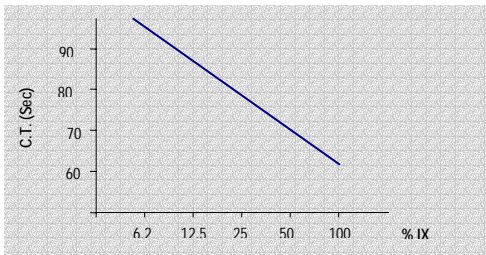
The usual program used for testing the factors involved in the coagulation pathway with a clotting based activated partial thromboplastin time method, and a specific deficient plasma, can be applied. The respective specimen and reagent volume ratios indicated for the manual method must be strictly respected. 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 FIX concentrations and on ordinates the corresponding clotting times. On the calibration curve obtained, interpolate directly the corresponding FIX concentration for the tested plasma.

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



QUALITY CONTROL:

The control is performed using commercially available control plasmas, titrated for FIX 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 FIX concentration.

NORMAL VALUES:

Normal values for Factor IX activity are usually $> 60\%$.

APPLICATIONS:

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

ASSAY VARIATIONS:

The clotting times observed for this assay are obtained with CK Prest® from Diagnostica Stago. They are expected < 80 seconds for the 100% FIX concentration. The obtained clotting times and assay performances can slightly vary according to the cephalin 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:

- van Hylckama Vlieg A, van der Linden IK, Bertina RM, Rosendaal FR, "High levels of factor IX increase the risk of venous thrombosis", Blood, 95(12):3678-82, 2000.
- Taran LD, "Factor IX of the blood coagulation system: a review", Biochemistry (Mosc.), 62(7):685-93, 1997.
- Orstavik KH, Veltkamp JJ, Bertina RM, Hermans J, "Detection of carriers of haemophilia B", Br J Haematol, 42(2):293-301, 1979.
- www.ncbi.nlm.nih.gov, OMIM, Haemophilia B, FIX deficiency, +306900, +134540, +134510, +134520.
- Abrégés "Hémorragies et thromboses – Du Diagnostic au traitement", Samama et coll. Masson, 2004

Plasmas à tester :

Diluer le plasma au 1:10 en tampon type Owren Koller. Le plasma dilué doit être utilisé dans l'heure suivante.

Test :

Méthode Manuelle :

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

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

Incuber pendant 1 min. à 37°C, puis introduire:

- 100 µL de réactif TCA (céphaline)

Incuber pendant exactement 3 min. à 37°C, puis introduire (en déclenchant le chronomètre):

- 100 µl de CaCl₂ 0,025M préincubé 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...

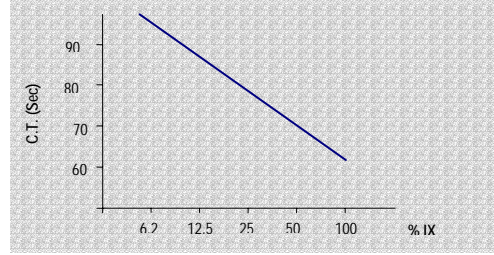
Le programme habituel utilisé pour tester les facteurs de la coagulation par méthode coagulante utilisant de la céphaline activée, et un plasma déficient, peut être appliqué. Cependant, le rapport respectif des volumes indiqué pour la méthode manuelle doit être strictement respecté. En règle générale, 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 FIX et en ordonnées les temps de coagulation correspondants. En fonction du temps de coagulation du plasma à tester, en déduire le taux en Facteur IX.

Exemple de courbe de calibration : La courbe d'étalonnage ci-dessous n'est montrée qu'à titre d'exemple. Elle est obtenue en utilisant du réactif CK Prest® 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 IX, 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 : (réf A223201) ; Biophen Abnormal Control Plasma : (réf 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 FIX.

VALEURS USUELLES

Les valeurs normales du facteur IX sont habituellement $> 60\%$.

APPLICATIONS:

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

VARIATIONS :

Les temps de coagulation observés avec ce test sont obtenus avec du réactif CK Prest® de Diagnostica Stago. Ils sont de l'ordre de < 80 secondes pour la concentration de 100% en FIX. Les temps de coagulation obtenus et les performances du test peuvent varier légèrement selon le type, le lot de réactif TCA 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 :

- van Hylckama Vlieg A, van der Linden IK, Bertina RM, Rosendaal FR, "High levels of factor IX increase the risk of venous thrombosis", Blood, 95(12):3678-82, 2000.
- Taran LD, "Factor IX of the blood coagulation system: a review", Biochemistry (Mosc.), 62(7):685-93, 1997.
- Orstavik KH, Veltkamp JJ, Bertina RM, Hermans J, "Detection of carriers of haemophilia B", Br J Haematol, 42(2):293-301, 1979.
- www.ncbi.nlm.nih.gov, OMIM, Haemophilia B, FIX deficiency, +306900, +134540, +134510, +134520.
- Abrégés "Hémorragies et thromboses – Du Diagnostic au traitement", Samama et coll. Masson, 2004