



REPRESENTATIVE INSTRUCTIONS FOR USE

VisuLize™ Factor IX Antigen Kit

96 Test Enzyme Immunoassay Kit for Factor IX antigen.

For *In Vitro* Diagnostic Use.

Product # FIX-AG



Store at 2–8°C. Do not freeze.

INTENDED USE

The VisuLize™ FIX Antigen kit is an Enzyme Immunoassay for the quantitative determination of Factor IX antigen in human plasma and Factor IX concentrates using the double antibody enzyme linked immuno-sorbent assay (ELISA).

SUMMARY

Factor IX (Christmas Factor) is a vitamin K-dependent glycoprotein produced in the liver with a molecular weight of 56,000 daltons.¹ The plasma concentration of Factor IX is normally around 5 µg/ml (87 nM). Factor IX contains two EGF-like domains and an amino-terminal domain containing 12 γ-carboxy-glutamic acid (Gla) residues. These Gla residues allow Factor IX to bind divalent metal ions and participate in calcium-dependent binding interactions.¹ Factor IX can be activated through the intrinsic coagulation pathway by limited proteolysis in the presence of calcium by activated factor XI (FXI^a) and/or through the extrinsic coagulation pathway by a complex of VII^a/tissue factor/phospholipid and activated Factor X.^{1,2} The terminal activated product in either case is Factor IX^a, a two-chain enzyme consisting of a heavy chain (28,000 daltons), a light chain (18,000 daltons) and an activation peptide product of 11,000 daltons.¹ Activated Factor IX, along with Factor VIIIa, calcium ions and a phospholipid membrane, converts Factor X into Xa eventually leading to the formation of a fibrin clot.³

The biological importance of Factor IX is demonstrated in Haemophilia B (Christmas disease), an X-linked congenital bleeding disease resulting from a quantitative (low activity and low antigen) or qualitative (low activity and normal antigen) defect in Factor IX function.⁴ The congenital deficiency of Factor IX may be classified as severe (<1% Factor IX activity), moderate (between 1 and 5% Factor IX activity) or mild (between 5 and 40% Factor IX activity).⁵

The laboratory diagnosis of Factor IX deficiency typically involves quantitative determinations of procoagulant levels i.e. functional activity of Factor IX.⁵ An ELISA for Factor IX antigen may be used in conjunction with functional assays in the area of gene therapy, assessment of Factor IX concentrates, determination of carrier status as well as distinguishing those patients with cross-reactive material i.e. low functional activity but near normal antigen levels of Factor IX.

PRINCIPLE OF ENZYME IMMUNOASSAY

Strip wells are pre-coated with goat polyclonal antibody to human Factor IX. Plasma samples are diluted and applied to the wells. The Factor IX antigen present binds to the coated antibody. After washing away unbound material, peroxidase-labeled goat detecting antibody is applied and allowed to bind to the captured Factor IX. The wells are again washed and a solution of TMB (the peroxidase substrate tetramethylbenzidine) is applied and allowed to react for a fixed period of time. A blue color develops which changes to yellow upon quenching the reaction with acid. The color formed is measured spectrophotometrically in a microplate reader at 450 nm. The absorbance at 450 nm is directly proportional to the concentration of Factor IX. The assay is calibrated using the calibrator plasma provided in the kit.

REAGENTS

A. Description of Reagent Items

- Item 1:** Foil pouch containing 6 strips, each containing 16 wells coated with goat antibody to human Factor IX.
Item 2: 2 vials of Calibrator Plasma, each lyophilized from 1 mL plasma.
Item 3: 2 vials of Control Plasma A, each lyophilized from 1 mL plasma.
Item 4: 2 vials of Control Plasma B, each lyophilized from 1 mL plasma.
Item 5: 1 vial containing 50 mL of 20X Wash Buffer Concentrate.
Item 6: 3 vials, each containing 20 mL of 2X buffered Sample Diluent.
Item 7: 1 vial containing 12 mL peroxidase-labeled goat detecting antibody.
Item 8: 1 vial containing 12 mL of tetramethylbenzidine (TMB) substrate.
Item 9: 1 vial containing 12 mL Stop Solution (0.2 M Sulphuric acid).

B. Caution and Warning

This kit is intended for use by personnel trained in laboratory procedures and universal precautions for the use of chemicals and potentially biohazardous substances. Some items contain human source material. Each unit of source plasma used in the preparation of this product has been tested by FDA approved methods and found negative for HBsAg, syphilis and antibodies to HIV and HCV and non-reactive for HIV-1 rNA and HCV rNA. As no test can offer complete assurance that products derived from human blood will not transmit infectious diseases, this product should be handled as a potentially infectious material.

The substrate TMB (tetramethylbenzidine) has reduced toxicity, but precautions should still be taken to avoid direct contact.

The use of gloves and safety glasses is recommended.

The Stop Solution contains dilute sulphuric acid (0.2 M), which is corrosive. The use of gloves and safety glasses is recommended.

The disposal of waste materials must be carried out according to current local regulations.

For a Material Safety Data Sheet for this product contact Affinity Biologicals Inc.

C. Reagent Preparation

Item 1 (Antibody-coated strips with frame): Just prior to use open pouch and remove strips and frame. Unused strips should be replaced in the pouch and resealed. Strips may be used directly, see section C: Assay Procedure.

Item 2 (Calibrator plasma): Reconstitute one vial with 1.0 mL of reagent grade water. Allow contents to dissolve for 15 minutes at room temperature with occasional swirling. Stability after reconstitution is 4 hours at ambient (18–25°C), or 30 days at –20°C.

Items 3 and 4 (Control plasmas): Reconstitute one vial of each plasma with 1.0 mL of reagent grade water. Allow contents to dissolve for 15 minutes at room temperature with occasional swirling. Stability after reconstitution is 4 hours at ambient (18–25°C), or 30 days at –20°C.

Item 5 (20X Wash Buffer Concentrate): Allow vial to warm to room temperature before use. Ensure any crystals that may have formed are dissolved before proceeding. If necessary the vial can be warmed to 37°C until all crystals have dissolved. Dilute the concentrate 1/20 before use. For every 2 strips (32 wells), add 16 mL concentrate to 304 mL reagent grade water and mix. Stability after dilution is 1 week at 2–8°C.

Item 6 (2X Sample Diluent Concentrate): Allow vial to warm to room temperature before use. Ensure any crystals that may have formed are dissolved. If necessary the vial can be warmed to 37°C until all crystals have dissolved. Dilute the concentrate by adding concentrate to an equal volume of reagent grade water and mix. Stability after dilution is 1 week at 2–8°C.

Items 7-9 are supplied ready to use.

D. Storage and Stability

Intact kits and un-reconstituted reagents are stable until the expiration date stated on the box and individual reagent labels when stored at 2–8°C.

SPECIMEN COLLECTION

Blood is collected into 3.2% Buffered Citrate anticoagulant tubes at a ratio of 9 volumes blood to 1 volume anticoagulant and gently mixed by inversion. Centrifuge at a minimum of 1500 x g for 15 minutes (CLSI Guideline H21-A5⁶). Remove supernatant plasma and use within 4 hours or freeze below –20°C for up to 30 days.

PROCEDURE

A. Material Provided

Foil pouch containing 6 strips of antibody coated wells.
Calibrator Plasma, lyophilized.
Control Plasma A, lyophilized.
Control Plasma B, lyophilized.
20X Wash Buffer Concentrate.
2X Sample Diluent Concentrate.
Detecting antibody solution.
TMB substrate.
Stop Solution.
Adhesive Plate Sealer.

B. Additional Material Required (but not provided)

Reagent grade water for reconstitution and for dilution
Single-channel adjustable volume pipettes
Multi-channel pipettes
Pipette tips
Laboratory timer
Microplate strip-well washer device
Microplate compatible spectrophotometer capable of 450 nm.

C. Assay Procedure

PROCEDURAL NOTES:

- Reconstitute reagents as described in REAGENTS, Section C, Reagent Preparation. Allow reagents to warm to room temperature before use.
- It is recommended that all calibrator, control and test sample dilutions be run in duplicate and that each run include a buffer blank (see Assay Calibration section).
- All dilutions must be made just prior to use in the assay.
- Do not allow the wells to become dry at any time. Keep plate covered during incubations.
- Plasma samples should not be applied at dilutions lower than 1/10.
- Do not use kit components from different lot numbers.
- Incubation temperatures above or below normal room temperature (18-25°C) may contribute to inaccurate results.
- Do not use kit components beyond expiration date.
- Used strips must be discarded and not re-used.

- Preparation of Calibrator Plasma Dilutions:** Dilute the Calibrator Plasma (reconstituted Item 2) into Sample diluent (diluted Item 6) as detailed in Table 1 below:

TABLE 1:

Dilution	Calibrator Plasma	Sample Diluent
100% **	10 µL	990 µL
50%	350 µL of 100%	350 µL
25%	350 µL of 50%	350 µL
12.5%	350 µL of 25%	350 µL
6.25%	350 µL of 12.5%	350 µL
3.13%	350 µL of 6.25%	350 µL

(NOTE: 100% = 1.0 IU/mL)

** Refer to Calibrator plasma vial (Item 2) for FIX antigen value to be used as the concentration of the initial dilution of the calibrator plasma. E.g. If the calibrator has an assigned value of 1.25 IU/ml, follow the dilution scheme above but call the first point of the calibration curve 1.25 IU/ml.

- Control Plasma A** (reconstituted Item 3) and normal test plasmas are diluted 1/200 and 1/400. Add 10 µL plasma into 1990 µL sample diluent (diluted Item 6), mix, then add 350 µL of this 1/200 dilution into 350 µL sample diluent to obtain the 1/400 dilution. **Control Plasma B** (reconstituted Item 4) and samples with expected Factor IX content of <10% (example: Haemophilia-B samples) should be run at lower dilutions of 1/10 and 1/20. Add 70 µL plasma into 630 µL sample diluent (diluted Item 6), mix, then add 350 µL of this 1/10 dilution into 350 µL sample diluent to obtain the 1/20 dilution. Test plasmas with expected Factor IX content of 10-30% should be diluted 1/100 and 1/200. Add 10 µL plasma into 990 µL sample diluent (diluted Item 6), mix, then add 350 µL of this 1/100 dilution into 350 µL sample diluent to obtain the 1/200 dilution.

3. Assay:

PLATE PREPARATION		Place desired number of strips into frame.
STEP		Pipette into each pre-coated well:
Factor IX CAPTURE	Test Sample (run in duplicate)	100 µL
	Cover strips with the plate sealer and incubate 30 minutes at ambient temperature.	
Empty wells and wash with 300 µL diluted wash buffer 3 times.		
DETECTING ANTIBODY	Detecting Antibody Solution (Item 7)	100 µL
	Cover strips with the plate sealer and incubate 30 minutes at ambient temperature.	
Empty wells and wash with 300 µL diluted wash buffer 3 times.		
COLOR DEVELOPMENT	TMB Substrate (Item 8)	100 µL
	Allow color to develop for exactly 10 minutes at ambient temperature.	
	Stop Solution (Item 9)	100 µL (Add to each well in same order in which the TMB was added)
Read plate at a wavelength of 450 nm within 30 minutes of adding Stop Solution If necessary, keep plate frame for use with any unused wells. Discard used wells.		

CALIBRATION

A. Assay Calibration

The Factor IX antigen value stated on the Calibrator Plasma vial has been determined by comparison to a secondary standard that is traceable to the WHO international standard for Factor IX antigen. This antigen value should be used as the concentration of the top point on the reference curve. It is recommended that the plate be blanked on wells that have received Sample Diluent alone instead of diluted sample (reagent blank wells).

B. Reference Curve and Calculation of Results

The reference curve is a log-log plot of the mean absorbance values (y axis) versus the Factor IX concentration (x axis). The Factor IX content of test samples and controls can be read from the reference curve and multiplied by the appropriate dilution factor. Under the conditions described here, a sample diluted 1/100 will have a dilution factor of 1, a dilution of 1/200 will have a dilution factor of 2, and a dilution of 1/400 has a dilution factor of 4. Samples applied at a lower dilution of 1/10 will have a dilution factor of 0.1, and a 1/20 dilution has a dilution factor of 0.2.

Example: Test plasma when diluted 1/200 gives an absorbance corresponding to 45% when read from the reference curve. This value would be multiplied by a dilution factor of 2 to obtain the corrected value of 90%.

QUALITY CONTROL

The supplied Control Plasmas (Item 3 and 4) should be assayed with every series of samples that are run. The Factor IX values obtained for test samples should be considered suspect if the values obtained for the control plasmas fall outside of the range stated on the Control Plasma labels.

LIMITATIONS AND INTERFERENCES

The Factor IX antigen values obtained using this assay should not be used in isolation to diagnose disease. Patient history, clinical presentation and findings from other diagnostic procedures should also be considered. Clinically significant states are known to exist in which plasma Factor IX antigen levels are normal or near-normal in the presence of a significant reduction in Factor IX activity.⁴

This kit has been developed for use with citrated plasma. The use of samples containing anticoagulants other than 3.2% sodium citrate is not recommended.

Assay interference due to the presence of drugs or due to the presence of heterophilic antibodies such as Lupus Anticoagulant (LA) and Rheumatoid factor (RF) has not been reported, however, the potential for interference by high levels of heterophilic antibodies cannot be excluded. The theoretical possibility of test samples containing antibodies to goat immunoglobulin may also interfere in the assay.

EXPECTED VALUES

The normal range for Factor IX as reported in the literature is 0.5-1.5 IU/mL.³ Each laboratory should determine a normal range independently but results from three lots measured in 101 healthy individuals indicate a normal reference interval of 0.69-1.28 IU/mL (mean = 0.987 IU/mL, SD = 0.148). Samples with values outside the range of the reference curve may need to be diluted and re-tested for accurate results.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

A. Specificity

This assay measures Factor IX antigen in human plasma, therapeutic Factor IX concentrates and recombinant Factor IX preparations.

B. Detection Limit

When assay is performed as indicated in Section C, Assay Procedure, the detection limit of this assay is 0.005 IU/mL (0.5%) Factor IX. For a given lot, the upper limit of the assay corresponds to two times the value of the Calibrator plasma (Item 2). Samples with values outside the range of the reference curve may need to be diluted and re-tested for accurate results.

C. Accuracy

The VisuLize™ Factor IX Antigen kit was compared to the Asserachrom IX:AG on 134 patient samples containing Factor IX levels ranging across the entire detection range. The correlation co-efficient (r) was 0.987 (R² = 0.974, y=0.8628x +0.0474).

D. Precision

Intra-assay Precision, Method 1: Normal and abnormal plasma samples were tested in 4 assays total in each of three lots with 40 replicates per sample per plate. The mean coefficient of variation (CV) from all results was 4.74%

Intra-assay Precision, Method 2: Three plasmas with different Factor IX concentrations were tested in replicates of 8 in 20 assay events using 3 lots of product. The intra-assay coefficient of variation (CV) was calculated according to NCCLS Guideline EP5-A⁷ and is indicated in the summary below for each Factor IX level. The mean CV from all results by this method was 4.70%.

	Lot 1	Lot 2	Lot 3
1.0-1.3 IU/mL sample	3.30%	3.24%	4.14%
0.5-0.7 IU/mL sample	3.72%	4.22%	8.78%
<0.05 IU/mL sample	4.76%	4.04%	6.14%

Inter-assay Precision: Three plasmas with different Factor IX concentrations were tested in replicates of 8 in 20 assay events using 3 lots of product. The inter-assay coefficient of variation (CV) was calculated according to NCCLS Guideline EP5-A⁷ and is indicated in the summary below for each Factor IX level. The mean CV from all results by this method was 4.88%

	Lot 1	Lot 2	Lot 3
1.0-1.3 IU/mL sample	6.84%	4.23%	3.49%
0.5-0.7 IU/mL sample	6.84%	4.59%	2.96%
<0.05 IU/mL sample	5.27%	6.20%	3.54%

E. Lot-to-Lot Variability

Ten control samples with Factor IX values ranging from 0.28 – 0.87 IU/mL were tested in duplicate on three lots to determine assay precision between lots. The mean lot-to-lot variability was 2.76%.

Coffret VisuLize™ pour la détection de l'antigène du facteur IX

Pour la réalisation de 96 tests par détection immuno-enzymatique de l'antigène du facteur IX.

Conçu uniquement pour une utilisation diagnostique *in vitro*.

Produit n° FIX-AG



A conserver entre +2 et +8 °C. Ne pas congeler.

USAGE PREVU

Le coffret VisuLize™ pour la détection de l'antigène du F IX consiste en un dosage immuno-enzymatique pour déterminer la quantité d'antigènes du facteur IX dans le plasma humain et dans les concentrés de facteur IX utilisant le dosage immuno-enzymatique (ELISA) à double anticorps.

INTRODUCTION

Le facteur IX (facteur antihémophilique B) est une glycoprotéine vitamine K-dépendante produite dans le foie, au poids moléculaire de 56 000 daltons.¹ La concentration en facteur IX dans le plasma est normalement de 5 µg/ml (87 nM) environ. Le facteur IX contient deux domaines proches du EGF et un domaine amino-terminal contenant 12 résidus d'acide γ-carboxy-glutamique (Gla). Ces résidus Gla permettent au facteur IX de lier les ions métalliques divalents et contribuent aux interactions de liaison calcium-dépendantes.¹ Le facteur IX peut être activé à travers la voie de coagulation intrinsèque par protéolyse limitée en présence de calcium par facteur XI activé (F XIa) et/ou à travers la voie de coagulation extrinsèque par un complexe de F VIIa/facteur tissulaire/phospholipide et de facteur X activé.^{1,2} Dans les deux cas, le produit activé terminal est le facteur IXa, une enzyme à deux chaînes comprenant une chaîne lourde (28 000 daltons), une chaîne légère (18 000 daltons) et un peptide d'activation de 11 000 daltons.¹ Avec le facteur VIIIa, des ions calcium et une membrane phospholipidique, le facteur IX activé convertit le facteur X en facteur Xa, pour aboutir finalement à la formation d'un caillot de fibrine.³

L'importance biologique du facteur IX est démontrée en cas d'hémophilie B (appelée maladie de Christmas), hémophilie congénitale liée au chromosome X, résultant d'un trouble quantitatif (activité faible et antigènes faibles) ou qualitatif (activité faible et antigènes normaux) de la fonction du facteur IX.⁴ Cette carence congénitale en facteur IX peut être classée comme aiguë (activité du facteur IX <1 %), modérée (activité du facteur IX entre 1 et 5 %° ou légère (activité du facteur IX entre 5 et 40 %).⁵

Le diagnostic en laboratoire de la carence en facteur IX consiste en général à déterminer quantitativement les niveaux de procoagulants, et ainsi l'activité fonctionnelle du facteur IX.⁵ La méthode ELISA pour détecter les antigènes du facteur IX peut être utilisée conjointement avec des dosages fonctionnels dans le domaine de la thérapie génique, une évaluation des concentrés de facteur IX, la détermination du statut de porteur ainsi que le dépistage des patients qui ont un matériel à réaction croisée, c'est-à-dire une activité fonctionnelle faible mais un niveau d'antigènes du facteur IX presque normal.

PRINCIPE DE LA METHODE IMMUNO-ENZYMATIQUE

Les puits sont pré-sensibilisés à partir d'anticorps polyclonal de chèvre anti-facteur IX humain. Les échantillons de plasma sont dilués et ajoutés dans les puits. L'antigène du facteur IX présent se lie à l'anticorps sensibilisé. Après lavage afin d'évacuer tout matériel non lié, l'anticorps de chèvre de détection marqué à la peroxydase est ajouté et peut se lier au facteur IX capturé. Les puits sont à nouveau lavés, puis on y ajoute une solution de TMB (le tétraméthyl-benzidine, substrat de la peroxydase) qui va réagir pendant une durée déterminée. Une couleur bleue se développe, qui devient jaune lorsque la réaction est arrêtée au moyen d'un acide. La couleur formée est mesurée spectrophotométriquement dans un lecteur de microplaques à 450 nm. L'absorbance à 450 nm est directement proportionnelle à la concentration en facteur IX. Le dosage est étalonné grâce au plasma étalon fourni dans le coffret.

REACTIFS

A. Description des éléments réactifs

Élément 1 : Poche pelable contenant 6 barrettes de 16 puits sensibilisés à partir d'anticorps de chèvre anti-facteur IX humain.

Élément 2 : 2 flacons de plasma étalon lyophilisés à partir de 1 ml de plasma.

Élément 3 : 2 flacons de plasma de contrôle A lyophilisés à partir de 1 ml de plasma.

Élément 4 : 2 flacons de plasma de contrôle B lyophilisés à partir de 1 ml de plasma.

Élément 5 : 1 flacon contenant 50 ml de concentré de tampon de lavage 20X.

Élément 6 : 3 flacons contenant chacun 20 ml de diluant échantillon tamponné 2X.

Élément 7 : 1 flacon contenant 12 ml d'anticorps de chèvre de détection marqué à la peroxydase.

Élément 8 : 1 flacon contenant 12 ml de substrat de tétra-méthyl-benzidine (TMB).

Élément 9 : 1 flacon contenant 12 ml de solution d'arrêt (0,2 M d'acide sulfurique).

B. Avertissement

Ce coffret est conçu pour être utilisé par un personnel formé pour les procédures en laboratoire et les précautions universelles concernant l'utilisation de produits chimiques et de substances potentiellement nocives pour l'organisme. Certains éléments contiennent des matériels humains. Chaque unité de plasma-aphérèse destinée au fractionnement utilisée dans la préparation de ce produit a été testée par des méthodes approuvées par la FDA et confirmée négative pour l'HBsAg, la syphilis et les anticorps dirigés contre les virus HIV et HCV et non réactive à l'ARN du HIV-1 et à l'ARN du HCV. Etant donné qu'aucun test ne permet de garantir complètement que les produits dérivés du sang humain ne transmettront pas de maladies infectieuses, ce produit doit être manipulé comme un matériel potentiellement infectieux.

Le substrat de TMB (tétra-méthyl-benzidine) a une toxicité réduite mais il est toutefois nécessaire de prendre des précautions pour éviter tout contact direct. Il est recommandé d'utiliser des gants et des lunettes de protection.

La solution d'arrêt contient de l'acide sulfurique dilué (0,2 M) corrosif. Il est recommandé d'utiliser des gants et des lunettes de protection.

L'élimination des déchets doit être effectuée en accord avec la réglementation locale.

Pour avoir un exemplaire de la fiche signalétique de ce produit, contactez Affinity Biologicals Inc.

C. Préparation des réactifs

Élément 1 (barrettes sensibilisées à partir d'anticorps, avec support) : Juste avant l'utilisation, ouvrez la poche et retirez barrettes et support. Les barrettes non utilisées doivent être remises dans la poche et refermées. Les barrettes peuvent être utilisées directement, reportez-vous à la section C. Procédure de dosage.

Élément 2 (plasma étalon) : Reconstituez un flacon avec 1,0 ml d'eau pure. Laissez le contenu se dissoudre pendant 15 minutes à température ambiante, en remuant de temps en temps. La stabilité après reconstitution est de 4 heures à température ambiante (18-25 °C) ou 30 jours à -20 °C.

Éléments 3 et 4 (plasmas de contrôle) : Reconstituez un flacon de chaque plasma avec 1,0 ml d'eau pure. Laissez le contenu se dissoudre pendant 15 minutes à température ambiante, en remuant de temps en temps. La stabilité après reconstitution est de 4 heures à température ambiante (18-25 °C) ou 30 jours à -20 °C.

Élément 5 (concentré de tampon de lavage 20X) : Laissez le flacon se réchauffer à température ambiante avant utilisation. Avant de poursuivre, assurez-vous que tous les cristaux qui ont pu se former sont dissous. Si nécessaire, le flacon peut être réchauffé jusqu'à 37 °C jusqu'à ce que tous les cristaux soient dissous. Diluez le concentré au 1/20 avant utilisation. Pour chaque groupe de deux barrettes (32 puits), ajoutez 16 ml de concentré à 304 ml d'eau pure et mélangez. La stabilité après dilution est d'une semaine à 2-8 °C.

Élément 6 (concentré de diluant échantillon 2X) : Laissez le flacon se réchauffer à température ambiante avant utilisation. Assurez-vous que tous les cristaux qui ont pu se former sont dissous. Si nécessaire, le flacon peut être réchauffé jusqu'à 37 °C jusqu'à ce que tous les cristaux soient dissous. Diluez le concentré en y ajoutant un volume équivalent d'eau pure et mélangez. La stabilité après dilution est d'une semaine à 2-8 °C.

Les éléments 7 à 9 sont prêts à l'emploi.

D. Stockage et stabilité

A condition d'être conservés entre +2 et +8 °C, les coffrets intacts et les réactifs non reconstitués sont stables jusqu'à la date d'expiration située sur la boîte et sur les étiquettes individuelles des réactifs.

COLLECTE DES SPECIMENS

Le sang est prélevé dans des tubes d'anticoagulants de citrate tamponné à 3,2 %, selon un rapport de 9 volumes de sang pour 1 volume d'anticoagulant, et mélangé délicatement par inversion. Centrifugez à un minimum de 1500 x g pendant 15 minutes (ligne directrice H21-A5 du CLSI⁶). Retirez le plasma surnageant et utilisez-le dans les 4 heures ou congelez-le à moins de -20 °C pendant une durée maximum de 30 jours.

PROCEDURE

A. Matériel fourni

Poche pelable contenant 6 barrettes de puits sensibilisés à partir d'anticorps.

Plasma étalon, lyophilisé.

Plasma de contrôle A, lyophilisé.

Plasma de contrôle B, lyophilisé.

Concentré de tampon de lavage 20X.

Concentré de diluant échantillon 2X.

Solution d'anticorps de détection.

Substrat de TMB.

Solution d'arrêt.

Ruban adhésif pour recouvrir la plaque.

B. Matériel supplémentaire requis (mais non fourni)

Eau pure pour la reconstitution et la dilution

Pipettes à volume variable à canal unique

Pipettes multi-canaux

Embouts de pipettes

Chronomètre de laboratoire

Appareil de lavage pour les puits des microplaques.

Spectrophotomètre compatible avec les microplaques allant jusqu'à 450 nm.

C. Procédure de dosage

NOTES PROCEDURALES :

- Reconstituez les réactifs comme décrit dans REACTIFS, section C, Préparation des réactifs. Laissez les réactifs se réchauffer à température ambiante avant utilisation.
- Il est recommandé de réaliser en double toutes les dilutions d'étalons, d'échantillons pour essai et de contrôle, et chaque manipulation doit inclure un blanc (reportez-vous à la section Etalonnage du dosage).
- Toutes les dilutions doivent être effectuées juste avant d'être utilisées dans le dosage.
- Ne laissez les puits s'assécher à aucun moment. Laissez les plaques couvertes pendant les incubations.
- Les échantillons de plasma ne doivent pas être ajoutés aux dilutions à moins de 1/10.
- N'utilisez pas des éléments de coffret qui ont un numéro de lot différent.
- Les températures d'incubation supérieures ou inférieures à la température ambiante normale (18 à 25 °C) peuvent fausser les résultats.
- N'utilisez pas les éléments de ce coffret au-delà de la date d'expiration.
- Les barrettes usées doivent être jetées ; vous ne devez pas les réutiliser.

- Préparation des dilutions du plasma étalon :** Diluez le plasma étalon (élément 2 reconstitué) dans le diluant échantillon (élément 6 dilué) comme détaillé dans le tableau 1 ci-dessous :

TABLEAU 1 :

Dilution	Plasma étalon	Diluant échantillon
100%**	10 µl	990 µl
50%	350 µl sur 100 %	350 µl
25%	350 µl sur 50 %	350 µl
12,5%	350 µl sur 25 %	350 µl
6,25%	350 µl sur 12,5 %	350 µl
3,13%	350 µl sur 6,25 %	350 µl

(REMARQUE : 100 % = 1,0 IU/ml)

**Consultez sur le flacon de plasma étalon (élément 2) la valeur d'antigène du facteur IX à utiliser comme concentration de la dilution initiale du plasma étalon. Par exemple, si la valeur déterminée du plasma étalon est 1,25 IU/ml, respectez le même dosage dilué ci-dessus, en fixant toutefois le premier point de la courbe d'étalonnage à 1,25 IU/ml.

- Le plasma de contrôle A** (élément 3 reconstitué) et les plasmas de test normaux sont dilués au 1/200 et au 1/400. Ajoutez 10 µL de plasma dans 1990 µL de diluant échantillon (élément 6 dilué), mélangez, puis ajoutez 350 µL de cette dilution au 1/200 dans 350 µL d'échantillon de diluant pour obtenir la dilution au 1/400. **Le plasma de contrôle B** (élément 4 reconstitué) et les échantillons avec une concentration prévue en facteur IX <10 % (exemple : échantillons pour l'hémophilie B) doivent être manipulés à des dilutions inférieures, au 1/10 et au 1/20. Ajoutez 70 µL de plasma dans 630 µL de diluant échantillon (élément 6 dilué), mélangez, puis ajoutez 350 µL de cette dilution au 1/10 dans 350 µL d'échantillon de diluant pour obtenir la dilution au 1/20. Les plasmas de test avec une concentration prévue en facteur IX entre 10 et 30 % doivent être dilués au 1/100 et au 1/200. Ajoutez 10 µL de

plasma dans 990 µL de diluant échantillon (élément 6 dilué), mélangez, puis ajoutez 350 µL de cette dilution au 1/100 dans 350 µL d'échantillon de diluant pour obtenir la dilution au 1/200.

3. Dosage :

Dosage :

PREPARATION DE LA PLAQUE	Placez le nombre souhaité de barrettes sur le support.	
ETAPE	Pipetez dans chaque puits pré-sensibilisé :	
CAPTURER le facteur IX	Echantillon pour essai (manipulé en double)	100 µl
	Couvrez les barrettes avec le ruban adhésif fourni et incubez 30 minutes à température ambiante.	
Videz les puits et lavez-les avec 300 µL de tampon de lavage 3 fois.		
ANTICORPS DE DETECTION	Solution d'anticorps de détection (élément 7)	100 µl
	Couvrez les barrettes avec le ruban adhésif fourni et incubez 30 minutes à température ambiante.	
Videz les puits et lavez-les avec 300 µL de tampon de lavage 3 fois.		
DEVELOPPEMENT DE LA COULEUR	Substrat de TMB (Elément 8)	100 µl
	Laissez la couleur se développer pendant exactement 10 minutes à température ambiante.	
	Solution d'arrêt (Elément 9)	100 µl (Ajoutez à chaque puits dans l'ordre selon lequel la TMB a été ajoutée)
Lisez la plaque à une longueur d'onde de 450 nm dans les 30 minutes après avoir ajouté la solution d'arrêt		
Si nécessaire, conservez le support de la plaque pour l'utiliser avec les puits non utilisés. Jetez les puits qui ont été utilisés.		

ETALONNAGE

A. Etalonnage du dosage

La valeur d'antigène du facteur IX indiquée par le flacon de plasma étalon a été déterminée par comparaison avec un étalon secondaire traçable à l'étalon international de la WHO pour l'antigène du facteur IX. Cette valeur d'antigène doit être utilisée comme concentration du point supérieur sur la courbe de référence.

Il est recommandé que la plaque soit vidée des puits qui ont reçu du diluant échantillon pur au lieu d'échantillon dilué (puits de réactif à blanc).

B. Courbe de référence et calcul des résultats

La courbe de référence est un graphique logarithmique représentant les valeurs d'absorbance moyennes (axe des ordonnées) selon la concentration en facteur IX (axe des abscisses). La concentration en facteur IX des échantillons pour essai et des contrôles peut être lue sur la courbe de référence et multipliée par le facteur de dilution approprié. Dans les conditions décrites ici, un échantillon dilué au 1/100 aura un facteur de dilution de 1, une dilution au 1/200 aura un facteur de dilution de 2, et une dilution au 1/400 aura un facteur de dilution de 4. Les échantillons ajoutés à une dilution inférieure, au 1/10, auront un facteur de dilution de 0,1, et une dilution au 1/20 aura un facteur de dilution de 0,2.

Exemple : Dilué au 1/200, le plasma de test donne une absorbance correspondant à 45 % d'après lecture sur la courbe de référence. Cette valeur serait multipliée par un facteur de dilution de 2 pour obtenir la valeur correcte qui est de 90 %.

CONTROLE QUALITE

Les plasmas de contrôle fournis (éléments 3 et 4) à doivent être dosés avec chaque série d'échantillons manipulés. Les valeurs du facteur IX obtenues dans les échantillons pour essai doivent être considérées comme douteuses si les valeurs obtenues pour les plasmas de contrôle se situent en dehors de la plage indiquée sur l'étiquette des plasmas de contrôle.

LIMITES ET INTERFERENCES

Les seules valeurs d'antigène du facteur IX obtenues par ce dosage ne permettent pas de diagnostiquer une maladie. Les antécédents médicaux du patient, son tableau clinique, et les éléments révélés par d'autres procédures de diagnostic doivent également entrer en considération. Des états cliniques sérieux ont été rapportés, alors que le niveau d'antigènes du facteur XI dans

le plasma était normal ou quasi-normal en présence d'une réduction conséquente de l'activité du facteur IX.⁴

Ce coffret a été élaboré pour être utilisé avec un plasma citraté. Il n'est pas recommandé d'utiliser des échantillons contenant des anticoagulants autres que le citrate de sodium à 3,2 %.

L'interférence de dosage due à la présence de médicaments ou à la présence d'anticorps hétérophiles tels que le lupus anticoagulant (LA) et le facteur rhumatoïde (RF) n'a pas été rapportée, cependant, un risque d'interférence par des niveaux élevés d'anticorps hétérophiles ne peut pas être exclu. La possibilité théorique que des échantillons contiennent des anticorps anti-immunoglobine de chèvre peut aussi interférer sur le dosage.

VALEURS ATTENDUES

La plage normale pour le facteur IX telle qu'indiquée dans la documentation est comprise entre 0,5 et 1,5 IU/ml.³ Chaque laboratoire doit déterminer une plage normale indépendamment, mais les résultats de trois lots mesurés auprès de 101 individus en bonne santé montrent un intervalle de référence normal de 0,69 à 1,12 IU/ml (moy = 0,987 IU/ml, écart-type = 0,148). Les échantillons dont les valeurs se situent en dehors de la plage de la courbe de référence peuvent avoir besoin d'être dilués et testés à nouveau pour obtenir des résultats corrects.

PERFORMANCES DU TEST

A. Spécificité

Ce dosage mesure l'antigène du facteur IX dans le plasma humain, les concentrés de facteur IX thérapeutiques et les préparations de facteur IX recombiné.

B. Limite de détection

Lorsque le dosage est réalisé comme indiqué dans la section C, Procédure de dosage, la limite de détection de ce dosage est de 0,005 IU/ml (0,5 %) de facteur IX. Pour un lot donné, la limite supérieure du dosage correspond au double de la valeur du plasma étalon (élément 2). Les échantillons dont les valeurs se situent en dehors de la plage de la courbe de référence peuvent avoir besoin d'être dilués et testés à nouveau pour obtenir des résultats corrects.

C. Exactitude

Le coffret VisuLize™ a été comparé au coffret Asserachrom IX:AG sur 134 échantillons de patients contenant des niveaux de facteur IX différents à l'intérieur de la plage de détection. Le coefficient de corrélation (r) était de 0,987 (R² = 0,974, y = 0,8628x + 0,0474).

D. Précision

Précision intra-essai, méthode 1 : Les échantillons de plasma normal et anormal ont été testés dans 4 dosages au total dans chacun des trois lots, avec 40 mesures par échantillon et par plaque. Le coefficient de variation moyen (CV) calculé à partir de tous les résultats était de 4,74 %.

Précision intra-essai, méthode 2 : Trois plasmas avec des concentrations de facteur IX différentes ont été testés sur les répliques de 8 dosages sur 20, en utilisant 3 lots de produit. Le coefficient de variation intra-essai (CV) a été calculé conformément à la ligne directrice EP5-A du NCCLS⁷ et est indiqué dans le résumé ci-dessous, pour chaque niveau de facteur IX. Le CV moyen, calculé avec cette méthode à partir de tous les résultats, était de 4,70 %.

	Lot 1	Lot 2	Lot 3
Echantillon de 1,0-1,3 IU/ml	3,30%	3,24%	4,14%
Echantillon de 0,5-0,7 IU/ml	3,72%	4,22%	8,78%
Echantillon <0,05 IU/ml	4,76%	4,04%	6,14%

Précision inter-essai : Trois plasmas avec des concentrations de facteur IX différentes ont été testés sur les répliques de 8 dosages sur 20, en utilisant 3 lots de produit. Le coefficient de variation inter-essai (CV) a été calculé conformément à la ligne directrice EP5-A du NCCLS⁷ et est indiqué dans le résumé ci-dessous, pour chaque niveau de facteur IX. Le CV moyen, calculé avec cette méthode à partir de tous les résultats, était de 4,88 %.

	Lot 1	Lot 2	Lot 3
Echantillon de 1,0-1,3 IU/ml	6,84%	4,23%	3,49%
Echantillon de 0,5-0,7 IU/ml	6,84%	4,59%	2,96%
Echantillon <0,05 IU/ml	5,27%	6,20%	3,54%

E. Variabilität d'un lot à l'autre

Dix échantillons de contrôle avec une concentration de facteur IX comprise entre 0,28 et 0,87 IU/ml ont été testés en double sur trois lots afin de déterminer la précision entre les lots. La variabilité moyenne d'un lot à l'autre était de 2,76 %.

VisuLize™ Faktor IX Antigen-Kit

Enzym-Immunoassay-Komplettkit zur Bestimmung von Faktor IX-Antigen (96 Bestimmungen).

In-Vitro-Diagnostikum.

Artikel-Nr.: FIX-AG



Bei 2 – 8 °C lagern. Nicht einfrieren.

VERWENDUNGSZWECK

Der VisuLize™ FIX Antigen-Kit ist ein Enzym-Immunoassay (Sandwich-ELISA) zur quantitativen Bestimmung von Faktor IX-Antigen in humanem Plasma und Faktor IX-Konzentraten.

ZUSAMMENFASSUNG

Faktor IX (Christmas-Faktor) ist ein in der Leber synthetisiertes, Vitamin K-abhängiges Glycoprotein mit einem Molekulargewicht von 56.000¹. Die normale Plasmakonzentration von Faktor IX liegt bei ca. 5 µg/ml (87 nM). Faktor IX enthält zwei EGF-ähnliche Domänen und eine aminoterminal Glu-Domäne mit 12 γ-Carboxy-Glutaminsäure-(Glu-)Resten. Die Glu-Reste ermöglichen Faktor IX, zweiwertige Metallionen zu binden und an Calcium-abhängigen Bindungs-Wechselwirkungen teilzunehmen.¹ Faktor IX wird durch den intrinsischen Gerinnungsmechanismus durch limitierte Proteolyse in Anwesenheit von Calciumionen durch aktivierten Faktor XI (FXIa) und/oder durch den extrinsischen Gerinnungsmechanismus durch den FVIIa/Tissue Faktor/Phospholipid-Komplex zusammen mit aktiviertem Faktor X (FXa) aktiviert.^{1,2} Das terminale Aktivierungsprodukt ist in beiden Fällen das zweikettige Enzym Faktor IX_{ab}, das aus einer schweren Kette (28.000 Dalton), einer leichten Kette (18.000 Dalton) und dem Aktivierungspeptid mit 11.000 Dalton zusammengesetzt ist.¹ Faktor IXa aktiviert zusammen mit Faktor VIIIa, Calciumionen und einer Phospholipid-Membran Faktor X zu Faktor Xa, was in der Folge zur Bildung eines Fibringerinnsels führen kann.³

Die biologische Bedeutung von Faktor IX wird im Auftreten der Hämophilie B (Christmas disease) deutlich, einer X-chromosomal vererbten, kongenitalen Blutungsneigung, die durch einen quantitativen Defekt (erniedrigte Aktivität und erniedrigtes Antigen) oder qualitativen Defekt (erniedrigte Aktivität und normales Antigen) der Faktor IX-Funktion gekennzeichnet ist.⁴ Beim kongenitalen Mangel von Faktor IX werden eine schwere Form (< 1 % Faktor IX-Aktivität), eine moderate Form (zwischen 1 und 5 % Faktor IX-Aktivität) oder eine milde Form (zwischen 5 und 40 % Faktor IX-Aktivität) unterschieden.⁵

Die Labordiagnostik eines Faktor IX-Mangels umfasst in der Regel die quantitative Bestimmung des prokoagulatorischen Spiegels, d.h. der funktionellen Aktivität von Faktor IX.⁵ Ein ELISA zur Bestimmung des Faktor IX-Antigens kann in Verbindung mit funktionellen Testen im Bereich der Gentherapie, bei der Messung von Faktor IX-Konzentraten, zur Bestimmung des Überträgerstatus wie auch zur Unterscheidung derjenigen Patienten mit kreuz-reaktivem Material d.h. erniedrigter funktioneller Aktivität bei nahezu normalem Faktor IX-Antigen Spiegel, eingesetzt werden.

TESTPRINZIP DES ENZYM-IMMUNOASSAYS

Die Vertiefungen von Mikrotiterstreifen sind mit polyklonalen Ziege-Anti-(h)-Faktor IX-Antikörpern beschichtet. Nach Zugabe verdünnter Plasmaproben in die Vertiefungen bindet in der Probe vorhandenes Faktor IX-Antigen an die immobilisierten Antikörper. Nach einem Waschschriff zur Entfernung ungebundener Substanzen wird ein Peroxidase-konjugierter Nachweisantikörper (Ziege) zugegeben und bindet an den gebundenen Faktor IX. Nach einem weiteren Waschschriff wird TMB-(Tetramethylbenzidin-)Substratlösung zugegeben und die Reaktion schließlich nach einer festgelegten Zeit unterbrochen. Während der Reaktion entwickelt sich ein blauer Farbstoff, der durch Abstoppen der Reaktion mit Säure in einen gelben Farbstoff umgewandelt wird. Die gebildete Farbe wird in einem Mikrotiterplattenleser spektrophotometrisch bei 450 nm gemessen und ist direkt proportional zum Faktor IX-Spiegel. Der Test wird unter Verwendung des in der Testpackung enthaltenen Kalibrationsplasmas kalibriert.

REAGENZIEN

A. Beschreibung der Reagenzien

Artikel 1: Folienbeutel; enthält 6 Mikrotiterstreifen mit je 16 Mikrotitervertiefungen, die mit Ziege-Anti-(h)-Faktor IX-Antikörpern beschichtet sind.

Artikel 2: 2 Flaschen mit je 1 ml lyophilisiertem Kalibrationsplasma.

Artikel 3: 2 Flaschen mit je 1 ml lyophilisiertem Kontrollplasma A.

Artikel 4: 2 Flaschen mit je 1 ml lyophilisiertem Kontrollplasma B.

Artikel 5: 1 Flasche mit 50 ml 20-fach Waschpufferkonzentrat.

Artikel 6: 3 Flaschen mit je 20 ml 2-fach Probenpufferkonzentrat.

Artikel 7: 1 Flasche mit 12 ml Peroxidase-konjugiertem Anti-Ziege-Nachweisantikörper.

Artikel 8: 1 Flasche mit 12 ml TMB-(Tetramethylbenzidin-)Substrat.

Artikel 9: 1 Flasche mit 12 ml Stopplösung (0,2 M Schwefelsäure).

B. Vorsichtsmaßnahmen und Warnhinweise

Dieser Test ist nur für die Anwendung durch Laborpersonal bestimmt, welches für die sachgemäße Durchführung von Laborarbeiten und die Einhaltung der erforderlichen Vorsichtsmaßnahmen beim Umgang mit chemischen und potentiell biogefährlichen Substanzen unterwiesen ist. Einige der Reagenzien enthalten Material humanen Ursprungs. Jede Quelle des Ausgangsplasmas, das bei der Herstellung dieses Produkts verwendet wurde, wurde gemäß den von der FDA zugelassenen Verfahren getestet und erwies sich als negativ auf Oberflächenantigene für Hepatitis B (HBsAg), Syphilis-Erreger und Antikörper gegen HIV und HCV und als nicht-reaktiv auf HIV-1 rNA und HCV rNA. Kein Test kann jedoch mit absoluter Sicherheit die Übertragung infektiöser Erkrankungen durch Produkte, die aus humanem Blut hergestellt werden, ausschließen. Jedes Produkt humanen Ursprungs muss daher mit allen erforderlichen Vorsichtsmaßnahmen gehandhabt und als potentiell infektiös betrachtet werden.

Das TMB-(Tetramethylbenzidin-)Substrat besitzt verringerte Toxizität, es sind jedoch Vorsichtsmaßnahmen zu treffen, um einen direkten Kontakt zu vermeiden. Es wird empfohlen, beim Umgang Schutzhandschuhe und eine Sicherheitsbrille zu tragen.

Die Stopplösung enthält verdünnte Schwefelsäure (0,2 M), die korrosiv wirkt. Es wird empfohlen, beim Umgang Schutzhandschuhe und eine Sicherheitsbrille zu tragen.

Die Entsorgung von Abfällen hat ordnungsgemäß und entsprechend der gültigen Vorschriften zu erfolgen. Ein Sicherheitsdatenblatt (Material Safety Data Sheet, MSDS) für dieses Produkt wird auf Anfrage durch Affinity Biologicals Inc. zur Verfügung gestellt.

C. Rekonstitution der Reagenzien

Artikel 1 (Antikörper-beschichtete Mikrotiterstreifen mit Rahmen): Den Aufbewahrungsbeutel kurz vor Gebrauch öffnen und die Mikrotiterstreifen mit Rahmen entnehmen. Nicht verwendete Mikrotiterstreifen in den Aufbewahrungsbeutel zurückgeben und diesen wieder dicht verschließen. Die Mikrotiterstreifen können direkt für die Testdurchführung eingesetzt werden, siehe Abschnitt C: Testdurchführung.

Artikel 2 (Kalibrationsplasma): Den Inhalt einer Flasche mit 1,0 ml dest. Wasser rekonstituieren. Zum Lösen des Inhalts 15 min bei Raumtemperatur stehen lassen und gelegentlich vorsichtig mischen. Nach Rekonstitution ist das Reagenz für 4 Stunden bei Raumtemperatur (18-25°C) bzw. 30 Tage bei -20°C haltbar.

Artikel 3 und 4 (Kontrollplasmen): Den Inhalt einer Flasche des jeweiligen Kontrollplasmas mit 1,0 ml dest. Wasser rekonstituieren. Zum Lösen des Inhalts 15 min bei Raumtemperatur stehen lassen und gelegentlich vorsichtig mischen. Nach Rekonstitution ist das Reagenz für 4 Stunden bei Raumtemperatur (18-25°C) bzw. 30 Tage bei -20°C haltbar.

Artikel 5 (20-fach Waschpufferkonzentrat): Vor Gebrauch den Inhalt der Flasche auf Raumtemperatur temperieren. Vor der weiteren Verwendung ist darauf zu achten, dass sich evtl. vorhandene Kristalle gelöst haben. Falls erforderlich, kann die Flasche bis zur vollständigen Auflösung der Kristalle auf 37°C erwärmt werden. Vor Gebrauch ist das Waschpufferkonzentrat 1+19 zu verdünnen. Für die Messung von 2 Mikrotiterstreifen (32 Vertiefungen) z.B. werden 16 ml Waschpufferkonzentrat zu 304 ml dest. Wasser geben und gemischt. Der verdünnte Waschpuffer ist bei 2-8°C 1 Woche stabil.

Artikel 6 (2-fach Probenpufferkonzentrat): Vor Gebrauch den Inhalt der Flasche auf Raumtemperatur temperieren. Vor der weiteren Verwendung ist darauf zu achten, dass sich evtl. vorhandene Kristalle gelöst haben. Falls erforderlich, kann die Flasche bis zur vollständigen Auflösung der Kristalle auf

37°C erwärmt werden. Vor Gebrauch ist das Probenpufferkonzentrat 1+1 zu verdünnen. Dazu wird Probenpufferkonzentrat zum gleichen Volumen dest. Wasser gegeben und gemischt. Der verdünnte Probenpuffer ist bei 2-8°C 1 Woche stabil.

Artikel 7-9 sind gebrauchsfertig.

D. Lagerung und Stabilität

Unbeschädigte Testpackungen und nicht-rekonstituierte Reagenzien sind bei 2-8°C bis zum Verfalldatum, das auf der Testpackung bzw. den Etiketten der Reagenzien angegeben ist, haltbar.

PROBENGEWINNUNG

Blut wird in Röhrchen mit 3,2%iger gepufferter Citrat-Antikoagulanzlösung abgenommen (Verhältnis Blut/Antikoagulanze = 9/1) und vorsichtig gemischt. Zur Plasmagewinnung 15 Minuten bei mindestens 1.500 x g zentrifugieren (CLSI Guideline H21-A5⁶). Den Plasmaüberstand abnehmen und innerhalb von 4 Stunden für die Messung verwenden oder für bis zu 30 Tage bei < -20°C tiefgefroren lagern.

DURCHFÜHRUNG

A. Im Kit enthaltene Materialien

Folienbeutel mit 6 Antikörper-beschichteten Mikrotiterstreifen.
Kalibrationsplasma, lyophilisiert.
Kontrollplasma A, lyophilisiert.
Kontrollplasma B, lyophilisiert.
20-fach Waschpufferkonzentrat.
2-fach Probenpufferkonzentrat.
Immunokonjugatlösung.
TMB-Substrat.
Stopplösung.
Selbstklebende Abdeckfolie.

B. Zusätzlich erforderliche Materialien (nicht im Kit enthalten)

Dest. Wasser zur Rekonstitution und Verdünnung
Einkanal-Pipetten mit verstellbaren Volumina
Mehrkanal-Pipetten verstellbaren Volumina
Pipettenspitzen
Stoppuhr
Mikrotiterplatten-Washer
Mikrotiterplatten-Photometer zur Messung bei 450 nm.

C. Testdurchführung

Anmerkungen zur Testdurchführung:

- Die Reagenzien wie bei REAGENZIEN, Abschnitt C, Rekonstitution der Reagenzien, beschrieben, rekonstituieren. Die Reagenzien vor Gebrauch auf Raumtemperatur temperieren.
- Es wird empfohlen, alle Kalibrator-, Kontroll- und Probenverdünnungen in Doppelbestimmung zu messen und in jeder Analysenserie einen Puffer-Blank mitzuführen (siehe Abschnitt Kalibration).
- Alle Verdünnungen sind erst unmittelbar vor der Testdurchführung anzusetzen.
- Die Mikrotitervertiefungen dürfen niemals vollständig austrocknen. Während der Inkubationsschritte sind die Mikrotiterstreifen abzudecken.
- Plasmaproben sollten nicht in Verdünnungen kleiner als 1/10 eingesetzt werden.
- Die Komponenten unterschiedlicher Produktchargen dürfen nicht ausgetauscht werden.
- Inkubationstemperaturen über bzw. unter der normalen Raumtemperatur (18-25°C) können zu falschen Ergebnissen führen.
- Testkomponenten dürfen nach dem Verfalldatum nicht mehr verwendet werden.
- Gebrauchte Mikrotiterstreifen müssen verworfen und dürfen nicht wieder verwendet werden.

- Herstellung der Kalibratorverdünnungen für die Standardkurve:** Das Kalibrationsplasma (rekonstituiertes Reagenz 2) wird mit Probenpuffer (verdünntes Reagenz 6) entsprechend des Verdünnungsschemas in Tabelle 1 (siehe unten) verdünnt:

TABELLE 1

Verdünnung	Kalibrationsplasma	Probenpuffer
100 %**	10 µl	990 µl

50 %	350 µl aus 100 %	350 µl
25 %	350 µl aus 50 %	350 µl
12,5 %	350 µl aus 25 %	350 µl
6,25 %	350 µl aus 12,5 %	350 µl
3,13 %	350 µl aus 6,25 %	350 µl

(ANMERKUNG: 100% = 1,0 U/ml)

**Als Konzentration der Ausgangsverdünnung des Kalibratorplasmas ist der Wert für FIX-Antigen für das Fläschchen mit Kalibratorplasma (Artikel 2) zu verwenden. Wenn beispielsweise der Kalibrator einen zugewiesenen Wert von 1,25 IE/ml hat, ist oben dasselbe Verdünnungsschema zu verwenden, jedoch mit dem Wert 1,25 IE/ml als erstem Punkt auf der Kalibrationskurve.

- Kontrollplasma A** (rekonstituiertes Reagenz 3) und Probenplasmen werden 1/200 und 1/400 verdünnt. Dazu 10 µl Plasma zu 1990 µl Probenpuffer (verdünntes Reagenz 6) pipettieren und mischen. Anschließend 350 µl dieser 1/200-Verdünnung mit 350 µl Probenpuffer mischen, um die 1/400-Verdünnung zu erhalten. **Kontrollplasma B** (rekonstituiertes Reagenz 4) und Proben mit erwarteten Faktor IX-Spiegeln von < 10% (z.B. Hämophilie B-Plasmen) sollten in Verdünnungen von 1/10 und 1/20 zur Messung eingesetzt werden. Dazu 70 µl Plasma zu 630 µl Probenpuffer (verdünntes Reagenz 6) pipettieren und mischen. Anschließend 350 µl dieser 1/10-Verdünnung mit 350 µl Probenpuffer mischen, um die 1/20-Verdünnung zu erhalten. Probenplasmen mit erwarteten Faktor IX-Spiegeln von 10-30% sollten in Verdünnungen von 1/100 und 1/200 zur Messung eingesetzt werden. Dazu 10 µl Plasma zu 990 µl Probenpuffer (verdünntes Reagenz 6) pipettieren und mischen. Anschließend 350 µl dieser 1/100-Verdünnung mit 350 µl Probenpuffer mischen, um die 1/200-Verdünnung zu erhalten.

3. Testschema:

VORBEREITUNG DER PLATTE	Die benötigte Anzahl Mikrotiterstreifen in den Rahmen einlegen.	
SCHRITT	In jede beschichtete Mikrotitervertiefung pipettieren:	
FAKTOR IX- BINDUNG	Probenplasma (Doppelbestimmung)	100 µl
	Mikrotiterstreifen mit Klebefolie abdecken und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.	
Mikrotitervertiefungen ausleeren und 3 x mit je 300 µl Waschpuffer waschen		
IMMUNOKONJUGAT	Immunokonjugat- lösung (Reagenz 7)	100 µl
	Mikrotiterstreifen mit Klebefolie abdecken und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.	
Mikrotitervertiefungen ausleeren und 3 x mit je 300 µl Waschpuffer waschen		
FARBENTWICKLUNG	TMB-Substrat (Reagenz 8)	100 µl
	Farbentwicklung für exakt 10 Minuten bei Raumtemperatur ablaufen lassen.	
	Stopplösung (Reagenz 9)	100 µl (Zugabe in die Vertiefungen in der gleichen Reihenfolge, wie TMB-Substrat)
Die Färbung der Vertiefungen innerhalb von 30 Minuten nach Zugabe der Stopplösung bei 450 nm ablesen. Falls erforderlich, den Rahmen zur Verwendung mit unbenutzten Mikrotiterstreifen aufbewahren. Gebrauchte Mikrotiterstreifen werfen		

KALIBRATION

A. Testkalibration

Der auf Flasche des Kalibrationsplasmas angegebene Faktor IX-Antigenkonzentration wurde gegen einen Sekundärstandard ermittelt, der auf den Internationalen WHO-Standard für die Faktor IX-Antigen rückführbar ist. Diese Antigenkonzentration sollte als Konzentration des höchsten Kalibrationspunktes der Referenzkurve verwendet werden.

Es wird empfohlen, die Messwerte mit den Werten der Reagenzien-Leerwerte, die Probenpuffer anstelle von verdünnter Probe enthalten, zu korrigieren.

B. Referenzkurve und Auswertung der Ergebnisse

Die Referenzkurve wird durch Auftragung der mittleren Absorptionswerte (y-Achse) gegen die Faktor IX-Konzentration (x-Achse) im log-log-Maßstab erstellt. Der Faktor IX-Gehalt der Proben und Kontrollen wird aus der Referenzkurve entnommen und mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor multipliziert. Unter den hier beschriebenen Bedingungen entspricht eine Probenvorverdünnung von 1/100 einem Verdünnungsfaktor von 1, eine Probenvorverdünnung von 1/200 einem Verdünnungsfaktor von 2 und eine Probenvorverdünnung von 1/400 einem Verdünnungsfaktor von 4. Proben, die in niedrigerer Verdünnung von 1/10 eingesetzt worden sind, entspricht ein Verdünnungsfaktor von 0,1, eine 1/20 Probenvorverdünnung einem Verdünnungsfaktor von 0,2

Beispiel: Testplasma in einer Verdünnung von 1/200 ergibt eine Absorption entsprechend einer Konzentration von 45 % lt. Referenzkurve. Dieser Wert wird mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor von 2 multipliziert und ergibt einen Faktor IX-Gehalt von 90 %.

QUALITÄTSKONTROLLE

Die mitgelieferten Kontrollplasmen (Reagenzien 3 und 4) sollten bei jeder Analysenserie mitgeführt werden. Die gemessenen Faktor IX-Werte der Proben sollten als nicht-verlässlich betrachtet werden, falls die Werte der Kontrollplasmen außerhalb des angegebenen Bereiches liegen.

EINSCHRÄNKUNGEN UND INTERFERENZEN

Die Faktor IX-Antigenkonzentrationen, die mit diesem Test bestimmt werden, sollten nicht isoliert zur Diagnose einer Erkrankung herangezogen werden. Anamnese, klinischer Zustand des Patienten und Ergebnisse anderer diagnostischer Verfahren sollten darüberhinaus in Betracht gezogen werden. Klinisch signifikante Zustände sind bekannt, bei denen die Plasma-Faktor IX-Antigenspiegel normal bzw. annähernd normal sind, die Faktor IX-Aktivität jedoch stark verringert ist.⁴

Dieser Test wurde für die Verwendung von Citratplasma entwickelt. Die Verwendung von Proben mit anderen Antikoagulanzen als 3,2 % Natriumcitrat wird nicht empfohlen.

Beeinflussungen des Testes durch Medikamente oder heterophile Antikörper wie Lupus Antikoagulanzen (LA) und Rheumafaktor (RF) wurden nicht beobachtet. Eine Beeinflussung durch hohe Titer von heterophilen Antikörpern kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. Die theoretische Möglichkeit von Proben, die Antikörper gegen Ziegen-immunglobuline enthalten, kann den Test ebenso beeinflussen.

ERWARTETE WERTE

Der in der Literatur beschriebene Normalbereich von Faktor IX liegt zwischen 0,5 und 1,5 IU/ml.³ Jedes Labor sollte einen eigenen Normbereich ermitteln. Die Ergebnisse von 101 gesunden Normalpatienten, gemessen mit drei Produktchargen, ergaben einen Referenzbereich von 0,69-1,28 IU/ml (Mittelwert = 0,987 IU/ml, SD = 0,148 IU/ml). Proben mit Werten außerhalb des Bereiches der Referenzkurve können in höherer Verdünnung erneut gemessen werden, um korrekte Ergebnisse zu erhalten.

LEISTUNGSMERKMALE

A. Spezifität

Dieser Test bestimmt Faktor IX-Antigen in humanem Plasma, in therapeutischen Faktor IX-Konzentraten und rekombinanten Faktor IX-Präparationen.

B. Nachweisgrenzen

Bei Durchführung des Testes gemäß Abschnitt C, Testdurchführung, liegt die untere Nachweisgrenze des Testes bei 0,005 IU/ml (0,5 %) Faktor IX. Die obere Nachweisgrenze entspricht dem zweifachen Wert der Faktor IX-Konzentration des Kalibrationsplasmas (Reagenz 2). Proben mit Werten außerhalb des Bereiches der Referenzkurve können in höherer Verdünnung erneut gemessen werden, um korrekte Ergebnisse zu erhalten.

C. Richtigkeit

Der VisuLize™ Faktor IX-Antigentest wurde mit Asserachrom IX:AG an 134 Patientenproben, deren Faktor IX-Spiegel über den gesamten Nachweisbereich verteilt waren, verglichen. Der Korrelationskoeffizient (r) betrug 0,987 ($R^2 = 0,974$, $y = 0,8628x + 0,0474$).

D. Präzision

Intra-assay-Präzision, Methode 1: Normale und pathologische Plasmaproben wurden in 4 Analysenserien unter Verwendung von drei Produktchargen in 40-fach Bestimmung gemessen. Der mittlere Variationskoeffizient (VK) über alle Einzelmessungen betrug 4,74 %.

Intra-assay-Präzision, Methode 2: Drei Plasmen mit unterschiedlichen Faktor IX-Spiegeln wurden in 8-fach Bestimmung in 20 Testserien unter Verwendung von drei Produktchargen getestet. Die intra-assay-Variationskoeffizienten (VK) wurden entsprechend der NCCLS Guideline EP5-A⁷ berechnet und sind in der folgenden Tabelle für jeden Faktor IX-Spiegel zusammengefasst. Der mittlere VK über alle Einzelmessungen nach dieser Methode betrug 4,70 %.

	Charge 1	Charge 2	Charge 3
1,0-1,3 IU/ml-Probe	3,30 %	3,24 %	4,14 %
0,5-0,7 IU/ml-Probe	3,72 %	4,22 %	8,78 %
< 0,05 IU/ml-Probe	4,76 %	4,04 %	6,14 %

Inter-assay-Präzision: Drei Plasmen mit unterschiedlichen Faktor IX-Spiegeln wurden in 8-fach Bestimmung in 20 Testserien unter Verwendung von drei Produktchargen getestet. Die inter-assay-Variationskoeffizienten (VK) wurden entsprechend der NCCLS Guideline EP5-A⁷ berechnet und sind in der folgenden Tabelle für jeden Faktor IX-Spiegel zusammengefasst. Der mittlere VK über alle Einzelmessungen nach dieser Methode betrug 4,88 %.

	Charge 1	Charge 2	Charge 3
1,0-1,3 IU/ml-Probe	6,84 %	4,23 %	3,49 %
0,5-0,7 IU/ml-Probe	6,84 %	4,59 %	2,96 %
< 0,05 IU/ml-Probe	5,27 %	6,20 %	3,54 %

E. Präzision von Charge zu Charge

Zur Bestimmung der Präzision von Charge zu Charge wurden zehn Kontrollproben mit Faktor IX-Spiegeln im Bereich von 0,28 – 0,87 IU/ml in 2-fach Bestimmung unter Verwendung von drei Produktchargen getestet. Die mittlere Charge-zu-Charge-Schwankung betrug 2,76 %.

Kit dell'antigene Fattore IX VisuLize™

Kit di immunodosaggio enzimatico di 96 test per l'antigene Fattore IX.

Per uso diagnostico *In Vitro*.

N. prodotto FIX-AG

Conservare a 2–8 °C. Non congelare.



UTILIZZO PREVISTO

Il kit dell'antigene VisuLize™ FIX è un immunodosaggio enzimatico per la determinazione quantitativa dell'antigene Fattore IX nel plasma umano e di concentrati di Fattore IX mediante la tecnica ELISA (Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay) con doppio anticorpo.

INTRODUZIONE

Il Fattore IX (Fattore di Christmas) è una glicoproteina dipendente dalla vitamina K prodotta dal fegato con un peso molecolare di 56.000 dalton.¹ La concentrazione nel plasma di Fattore IX è in genere di 5 µg/ml (87 nM). Il Fattore IX contiene due domini EGF e un dominio aminoterminale contenente 12 residui di acido γ-carbossigliutamico (Gla). Questi residui Gla consentono al Fattore IX di legare ioni di metallo bivalenti e di partecipare alle interazioni di legame calcio-dipendenti.¹ Il Fattore IX può essere attivato attraverso la via intrinseca della coagulazione mediante proteolisi limitata in presenza di calcio con Fattore XI (FXI^a) attivato e/o attraverso la via estrinseca della coagulazione mediante un complesso di fosfolipide/fattore di tessuto/VII^a e Fattore X.^{1,2} Il prodotto attivato terminale in entrambi i casi è il Fattore IX^a, un enzima a due catene costituito da una catena pesante (28.000 dalton), una catena leggera (18.000 dalton) e un peptide di attivazione di 11.000 dalton.¹ Il Fattore IX attivato, insieme al Fattore VIIIa, agli ioni di calcio e a una membrana fosfolipidica, converte il Fattore X in Xa fino alla formazione di un coagulo di fibrina.³

L'importanza biologica del Fattore IX è dimostrata nell'Emofilia B (malattia di Christmas), una malattia emorragica congenita legata al cromosoma X causata da un difetto quantitativo (scarsa attività e antigene basso) o qualitativo (scarsa attività e antigene normale) della funzione del Fattore IX.⁴

La deficienza congenita del Fattore IX può essere classificata come grave (attività del Fattore IX pari a <1%), moderata (attività del Fattore IX tra l'1 e il 5%) o leggera (attività del Fattore IX compresa tra il 5 e il 40%).⁵

La diagnosi di laboratorio della deficienza di Fattore IX implica in genere la determinazione quantitativa di livelli procoagulanti, ad esempio l'attività funzionale del Fattore IX.⁵ È possibile utilizzare la tecnica ELISA per l'antigene Fattore IX insieme a dosaggi funzionali nell'area della terapia genica, valutazione dei concentrati di Fattore IX, determinazione dello stato del portatore, nonché individuazione dei pazienti con materiale a reazione crociata, ad esempio scarsa attività funzionale, ma livelli quasi normali di Fattore IX.

PRINCIPIO DI IMMUNODOSAGGIO ENZIMATICO

I micropozzetti a striscia sono prerivestiti di un anticorpo policlonale di capra del Fattore IX umano. I campioni di plasma vengono diluiti e applicati ai pozzetti. L'antigene Fattore IX presente si lega all'anticorpo rivestito. Dopo aver rimosso il materiale non legato, viene applicato l'anticorpo di rilevamento di capra marcato con perossidasi affinché si leghi al Fattore IX catturato. I pozzetti vengono nuovamente lavati, dopodiché viene applicata una soluzione di TMB (substrato per la perossidasi di tetrametilbenzidina) e lasciata reagire per un periodo di tempo stabilito. Si sviluppa un colore blu che cambia in giallo in seguito all'arresto della reazione con acido. Il colore che si forma viene misurato spettrofotometricamente in un lettore di micropiastre a 450 nm. L'assorbanza a 450 nm è direttamente proporzionale alla concentrazione di Fattore IX. Il dosaggio viene calibrato mediante il plasma di calibrazione fornito nel kit.

REAGENTI

A. Descrizione degli elementi reagenti

Elemento 1: Sacchetto di alluminio contenente 6 strisce, ognuna delle quali contiene 16 pozzetti rivestiti di anticorpo di capra del Fattore IX umano.

Elemento 2: 2 fiale di plasma di calibrazione, da 1 mL ognuna liofilizzata.

Elemento 3: 2 fiale di plasma di controllo A da 1 mL, ognuna liofilizzata.

Elemento 4: 2 fiale di plasma di controllo B da 1 mL, ognuna liofilizzata.

Elemento 5: 1 fiala contenente 50 mL di tampone di lavaggio concentrato (20X).

Elemento 6: 3 fiale, ognuna delle quali contiene 20 mL di tampone diluente del campione (2X).

Elemento 7: 1 fiala contenente 12 mL di anticorpo di rilevamento di capra marcato con perossidasi.

Elemento 8: 1 fiala contenente 12 mL di substrato di tetrametilbenzidina (TMB).

Elemento 9: 1 fiala contenente 12 mL di soluzione di arresto (acido solforico 0.2 M).

B. Avvertenze

Il kit è destinato a essere utilizzato da personale che ha ricevuto una formazione specifica sulle procedure di laboratorio e sulle precauzioni universali relative all'impiego di sostanze chimiche e sostanze a rischio biologico elevato. Alcuni elementi contengono materiale di origine umana. Ciascuna delle unità di plasma utilizzate per la preparazione del prodotto è stata testata ed è risultata negativa per la sifilide, HbsAg e per gli anticorpi dell'HIV e dell'HCV e non reattiva per l'HIV-1-rNA e HCV rNA, secondo i metodi approvati dalla FDA. Poiché nessun test è in grado di offrire la totale garanzia che i prodotti derivati da sangue umano non trasmetteranno malattie infettive, questo prodotto dovrà essere manipolato come materiale potenzialmente infetto.

La tetrametilbenzidina (TMB) del substrato presenta una ridotta tossicità, tuttavia è necessario adottare delle precauzioni per evitare il contatto diretto. È consigliabile utilizzare guanti e occhiali protettivi.

La soluzione di arresto contiene acido solforico diluito (0,2 M), che è corrosivo. È consigliabile utilizzare guanti e occhiali protettivi.

Lo smaltimento dei rifiuti deve essere svolto in conformità alle normative locali in vigore.

Per una scheda tecnica di sicurezza dei materiali relativa a questo prodotto, contattare Affinity Biologicals Inc.

C. Preparazione dei reagenti

Elemento 1 (strisce rivestite di anticorpo con supporto): Aprire il sacchetto e rimuovere le strisce e il supporto appena prima dell'uso. Riporre nel sacchetto e risigillare le strisce non utilizzate. Le strisce possono essere utilizzate direttamente, vedere la sezione C: Procedura di dosaggio.

Elemento 2 (plasma di calibrazione): Ricostituire una fiala con 1,0 mL di acqua distillata. Attendere 15 minuti per la dissoluzione del contenuto a temperatura ambiente mescolando occasionalmente. La stabilità dopo la

ricostituzione dura 4 ore a temperatura ambiente (18-25°C) o 30 giorni a -20° C.

Elementi 3 e 4 (plasma di controllo): Ricostituire una fiala di ogni plasma con 1,0 mL di acqua distillata. Attendere 15 minuti per la dissoluzione del contenuto a temperatura ambiente mescolando occasionalmente. La stabilità dopo la ricostituzione dura 4 ore a temperatura ambiente (18-25°C) o 30 giorni a -20° C.

Elemento 5 (tampone di lavaggio concentrato (20X)): Attendere che la fiala si riscaldi a temperatura ambiente prima dell'uso. Prima di procedere, assicurarsi che eventuali cristalli che si possono essere formati siano dissolti. Se necessario, è possibile scaldare la fiala a 37°C finché tutti i cristalli non si sono dissolti. Prima dell'uso diluire il concentrato di 1/20. Ogni 2 strisce (32 pozzetti), aggiungere 16 mL di concentrato a 304 mL di acqua distillata e mescolare. La stabilità dopo la diluizione dura 1 settimana a 2-8°C.

Elemento 6 (concentrato di diluente campione (2X)): Attendere che la fiala si riscaldi a temperatura ambiente prima dell'uso. Assicurarsi che eventuali cristalli che si possono essere formati siano dissolti. Se necessario, è possibile scaldare la fiala a 37°C finché tutti i cristalli non siano dissolti. Diluire il concentrato aggiungendolo a un volume uguale di acqua distillata, quindi mescolare. La stabilità dopo la diluizione dura 1 settimana a 2-8°C.

Gli elementi 7-9 vengono forniti pronti all'uso.

D. Conservazione e stabilità

I kit intatti e i reagenti non ricostituiti sono stabili fino alla data di scadenza indicata sulla confezione e sulle etichette dei singoli reagenti se conservati a 2-8°C.

PRELIEVO DI CAMPIONI

Il sangue viene raccolto in provette con soluzione anticoagulante di tampone citrato al 3,2% nella proporzione di 9 volumi di sangue in 1 volume di soluzione anticoagulante e miscelato con cautela per inversione. Centrifugare a una velocità minima di 1500 x g per 15 minuti (CLSI Guideline H21-A5⁶). Rimuovere il plasma sopranatante e utilizzarlo entro 4 ore oppure congelarlo a -20°C per un massimo di 30 giorni.

PROCEDURA

A. Materiale fornito

Sacchetto di alluminio contenente 6 strisce di pozzetti rivestiti di anticorpo.

Plasma di calibrazione, liofilizzato.

Plasma di controllo A, liofilizzato.

Plasma di controllo B, liofilizzato.

Tampone di lavaggio concentrato (20X).

Diluente del campione concentrato (2X).

Soluzione di un anticorpo di rilevamento.

Substrato di TMB.

Soluzione di arresto.

Sigillante per piastre adesivo.

B. Materiale aggiuntivo necessario (non fornito)

Acqua distillata per la ricostituzione e la diluizione

Pipette a singolo canale a volume variabile

Pipette multicanale

Puntali per pipette

Timer da laboratorio

Strumento di lavaggio delle micropiastre a pozzetti

Spettrofotometro compatibile con micropiastre con capacità pari a 450 nm.

C. Procedura di dosaggio

NOTE PROCEDURALI:

- Ricostituire i reagenti come descritto in REAGENTI, Sezione C, Preparazione dei reagenti. Attendere che i reagenti si riscaldino a temperatura ambiente prima dell'uso.
- È consigliabile analizzare in duplicato tutte le diluizioni di calibrazione, controllo e dei campioni di prova e predisporre che ogni analisi includa un campione di tampone bianco (vedere la sezione Calibrazione del dosaggio).
- Tutte le diluizioni devono essere effettuate immediatamente prima dell'uso nel dosaggio.
- Evitare sempre che i pozzetti vadano a secco. Mantenere coperta la piastra durante le incubazioni.
- I campioni di plasma non devono essere impiegati a diluizioni inferiori a 1/10.
- Non utilizzare componenti del kit con numeri di lotto diversi.

- Temperature di incubazione superiori o inferiori alla temperatura ambiente normale (18 -25°C) possono causare risultati imprecisi.
- Non utilizzare componenti del kit scaduti
- Le strisce usate devono essere eliminate e non riutilizzate.

1. **Preparazione delle diluizioni di plasma di calibrazione:** Diluire il plasma di calibrazione (Elemento 2 ricostituito) nel diluente del campione (Elemento 6 diluito) come descritto nella Tabella 1 seguente:

TABELLA 1:

Diluizione	Plasma di calibrazione	Diluente campione
100%**	10 µL	990 µL
50%	350 µL di 100%	350 µL
25%	350 µL di 50%	350 µL
12,5%	350 µL di 25%	350 µL
6,25%	350 µL di 12,5%	350 µL
3,13%	350 µL di 6,25%	350 µL

(NOTA: 100% = 1,0 IU/mL)

**Fare riferimento al flacone di plasma del calibratore (elemento 2) per il valore antigene FIX da usare come concentrazione della diluizione iniziale del plasma del calibratore. Ad esempio, se il calibratore ha un valore assegnato di 1,25 IU/ml, seguire lo stesso schema di diluizione indicato in precedenza ma chiamare il primo punto della curva di calibrazione 1,25 IU/ml.

2. Il **Plasma di controllo A** (Elemento 3 ricostituito) e i plasmi destinati ai test sono diluiti di 1/200 e di 1/400. Aggiungere 10 µL di plasma in 1990 µL di diluente campione (Elemento 6 diluito), miscelare, quindi aggiungere 350 µL di questa diluizione 1/200 in 350 µL di diluente campione per ottenere la soluzione 1/400. Il **Plasma di controllo B** (Elemento 4 ricostituito) e i campioni con contenuto di Fattore IX previsto di <10% (esempio: campioni di Emofilia B) devono essere analizzati a diluizioni inferiori di 1/10 e di 1/20. Aggiungere 70 µL di plasma in 630 µL di diluente campione (Elemento 6 diluito), miscelare, quindi aggiungere 350 µL di questa diluizione di 1/10 in 350 µL di diluente campione per ottenere la diluizione di 1/20. I plasma destinati ai test con contenuto previsto di Fattore IX del 10-30% devono essere diluiti di 1/100 e di 1/200. Aggiungere 10 µL di plasma in 990 µL di diluente campione (Elemento 6 diluito), miscelare, quindi aggiungere 350 µL di questa diluizione di 1/100 in 350 µL di diluente campione per ottenere la diluizione di 1/200.

3. **Dosaggio:**

PREPARAZIONE DELLA PIASTRA	Inserire il numero desiderato di strisce nel supporto.	
FASE	Pipetta in ogni pozzetto prerivestito:	
CATTURA DEL Fattore IX	Campione destinato ai test (analizzare in duplicato)	100 µL
	Coprire le strisce con il sigillante per piastre e incubare per 30 minuti a temperatura ambiente.	
Svuotare i pozzetti e lavarli 3 volte con 300 µL di tampone di lavaggio diluito.		
ANTICORPO DI RILEVAMENTO	Soluzione di un anticorpo di rilevamento (Elemento 7)	100 µL
	Coprire le strisce con il sigillante per piastre e incubare per 30 minuti a temperatura ambiente.	
Svuotare i pozzetti e lavarli 3 volte con 300 µL di tampone di lavaggio diluito.		
SVILUPPO DEL COLORE	Substrato di TMB (Elemento 8)	100 µL
	Attendere lo sviluppo del colore per 10 minuti esatti a temperatura ambiente.	
	Soluzione di arresto (Elemento 9)	100 µL (Aggiungere a ogni pozzetto nello stesso ordine in cui era stata aggiunta la TMB)

Leggere la piastra a una lunghezza d'onda di 450 nm entro 30 minuti dall'aggiunta della soluzione di arresto
Se necessario, conservare il supporto della piastra per utilizzarlo con pozzetti non usati. Smaltire i pozzetti usati.

CALIBRAZIONE

A. Calibrazione del dosaggio

Il valore dell'antigene Fattore IX indicato sulla fiala di plasma di calibrazione è stato determinato eseguendo un confronto con uno standard secondario attribuibile allo standard internazionale WHO per l'antigene del Fattore IX. Questo valore dell'antigene deve essere utilizzato come concentrazione del punto massimo sulla curva di riferimento.

È consigliabile sottrarre i valori relativi ai pozzetti che hanno ricevuto solo diluente campione anziché campione diluito.

B. Curva di riferimento e calcolo dei risultati

La curva di riferimento è un tracciato logaritmo-logaritmo dei valori medi di assorbanza (asse y) rispetto alla concentrazione di Fattore IX (asse x). Il contenuto di Fattore IX dei controlli e dei campioni di prova può essere letto dalla curva di riferimento e moltiplicato per il fattore di diluizione appropriato. Nelle condizioni qui descritte, un campione diluito di 1/100 presenterà un fattore di diluizione di 1, una diluizione di 1/200 presenterà un fattore di diluizione di 2 e una diluizione di 1/400 presenterà un fattore di diluizione di 4. I campioni applicati a una diluizione inferiore di 1/10 presenteranno un fattore di diluizione di 0,1 e una diluizione di 1/20 presenterà un fattore di diluizione di 0,2.

Esempio: Se diluito di 1/200, il plasma destinato ai test offre un'assorbanza corrispondente al 45% quando letto dalla curva di riferimento. Questo valore deve essere moltiplicato per un fattore di diluizione di 2 per ottenere il valore corretto di 90%.

CONTROLLO QUALITÀ

I plasma di controllo forniti (Elementi 3 e 4) devono essere dosati con ogni serie di campioni analizzati. I valori di Fattore IX ottenuti per i campioni destinati ai test devono essere considerati sospetti se i valori ottenuti per i plasma di controllo non rientrano nell'intervallo indicato sulle etichette del plasma di controllo.

LIMITAZIONI E INTERFERENZE

I valori dell'antigene Fattore IX ottenuti utilizzando questo dosaggio non devono essere utilizzati in isolamento per la diagnosi della malattia. È altresì opportuno considerare l'anamnesi del paziente, la presentazione clinica e i risultati di altre procedure diagnostiche. Sono noti stati clinicamente significativi in cui i livelli dell'antigene Fattore IX del plasma sono normali o quasi normali in presenza di una sostanziale riduzione dell'attività del Fattore IX.⁴

Il kit è stato sviluppato per essere utilizzato con plasma citrato. Non è consigliabile utilizzare campioni contenenti anticoagulanti diversi dal citrato di sodio al 3,2%.

Non sono state riscontrate interferenze nel dosaggio dovute alla presenza di farmaci o di anticorpi eterofili quali il Lupus Anticoagulant (LA) e il fattore reumatoide (RF, Rheumatoid factor); tuttavia, non è possibile escludere completamente l'insorgenza di interferenze dovute a livelli elevati di anticorpi eterofili. La possibilità teorica di campioni destinati ai test contenenti anticorpi dell'immunoglobina di capra può essere causa di interferenze nel dosaggio.

VALORI PREVISTI

L'intervallo normale del Fattore IX, come indicato nella letteratura, è 0,5-1,5 IU/mL.³ Ogni laboratorio dovrebbe determinare un intervallo normale in modo indipendente; tuttavia i risultati di tre lotti misurati in 101 individui sani indicano un intervallo di riferimento normale di 0,69-1,28 IU/mL (media = 0,987 IU/mL, SD = 0,148). I campioni con valori non compresi nell'intervallo della curva di riferimento devono essere diluiti e nuovamente testati per ottenere risultati accurati.

PRESTAZIONI

A. Specificità

Il dosaggio misura l'antigene Fattore IX nel plasma umano, i concentrati di Fattore IX a scopo terapeutico e preparazioni di Fattore IX ricombinanti.

B. Limite di rilevamento

Quando il dosaggio viene eseguito secondo quanto indicato nella Sezione C Procedura di dosaggio, il limite di rilevamento è 0,005 IU/mL (0,5%) di Fattore IX. Per un determinato lotto, il limite superiore del dosaggio corrisponde a due volte il valore del plasma di calibrazione (Elemento 2). I campioni con valori

non compresi nell'intervallo della curva di riferimento devono essere diluiti e nuovamente testati per ottenere risultati accurati.

C. Accuratezza

Il kit dell'antigene Fattore IX VisuLize™ è stato confrontato al kit Asserachrom IX:AG su 134 campioni di pazienti contenenti livelli di Fattore IX che coprono l'intero intervallo di rilevamento. Il coefficiente di correlazione (r) è stato di 0,987 ($R^2 = 0,974$, $y = 0,8628x + 0,0474$).

D. Precisione

Precisione intra-assay, Metodo 1: Campioni di plasma normali e anormali sono stati testati in 4 dosaggi in ognuno dei tre lotti con 40 replicati per campione per piastra. Il coefficiente medio di variazione (CV) di tutti i risultati era 4,74%.

Precisione intra-assay, Metodo 2: Tre plasma con concentrazioni diverse di Fattore IX sono stati testati nei replicati di 8 in 20 dosaggi utilizzando 3 lotti di prodotto. Il coefficiente intra-assay di variazione (CV) è stato calcolato secondo la direttiva NCCLS Guideline EP5-A7 ed è indicato nel riepilogo seguente per ogni livello di Fattore IX. Il valore CV medio di tutti i risultati ottenuti con questo metodo era 4,70%.

	Lotto 1	Lotto 2	Lotto 3
1,0-1,3 IU/mL di campione	3,30%	3,24%	4,14%
0,5-0,7 IU/mL di campione	3,72%	4,22%	8,78%
<0,05 IU/mL di campione	4,76%	4,04%	6,14%

Precisione inter-assay: Tre plasma con concentrazioni diverse di Fattore IX sono stati testati nei replicati di 8 in 20 dosaggi utilizzando 3 lotti di prodotto. Il coefficiente inter-assay di variazione (CV) è stato calcolato secondo la direttiva NCCLS Guideline EP5-A7 ed è indicato nel riepilogo seguente per ogni livello di Fattore IX. Il valore CV medio di tutti i risultati ottenuti con questo metodo è stato del 4,88%.

	Lotto 1	Lotto 2	Lotto 3
1,0-1,3 IU/mL di campione	6,84%	4,23%	3,49%
0,5-0,7 IU/mL di campione	6,84%	4,59%	2,96%
<0,05 IU/mL di campione	5,27%	6,20%	3,54%

E. Variabilità tra lotti

Dieci campioni di controllo con valori di Fattore IX compresi nell'intervallo tra 0,28 e 0,87 IU/mL sono stati testati in duplicato su tre lotti per determinare la precisione del dosaggio da un lotto a un altro. La variabilità tra lotti media è stata del 2,76%.

Kit para la determinación del antígeno factor IX VisuLize™

Immunoensayo enzimático de 96 test para la detección del antígeno factor IX.

Para diagnóstico *in vitro*.

Ref. de producto FIX-AG



Almacenar a 2–8 °C. No congelar.

USO

El kit de antígeno VisuLize™ FIX es un immunoensayo enzimático para la determinación cuantitativa del antígeno factor IX en plasma humano y concentraciones de factor IX mediante el ensayo inmuno-sorbente ligado a enzimas (ELISA).

RESUMEN

El factor IX (factor Christmas) es una glicoproteína dependiente de la vitamina K que se produce en el hígado y que tiene un peso molecular de 56.000 daltons¹. La concentración plasmática normal de factor IX es de aproximadamente 5 µg/ml (87 nM). El factor IX contiene dos dominios EGF-like y un dominio aminoterminal que contiene residuos de ácido 12 γ-carboxi-glutámico (Gla). Estos residuos de Gla permiten que el factor IX se una a iones metálicos divalentes y participe en las interacciones de conjugación calciodependientes¹. El factor IX se puede activar mediante la vía de coagulación intrínseca por proteólisis limitada, en presencia de calcio, por factor XI activado (FXI^a) y/o mediante la vía de coagulación extrínseca por un complejo de VII^a/tejido factor/fosfolípido y factor X activado^{1,2}. El producto

terminal activado es en ambos casos factor IX^a, una enzima de doble cadena formada por una cadena pesada (28.000 daltons), una cadena ligera (18.000 daltons) y un péptido de activación de 11.000 daltons¹. El factor IX activado, junto con el factor VIIIa, los iones de calcio y una membrana fosfolípida, convierte el factor X en Xa, ocasionando eventualmente la formación de un coágulo de fibrina³.

La importancia biológica del factor IX se demuestra en la hemofilia de tipo B (enfermedad de Christmas), una enfermedad de sangrado vinculada a X que resulta de un defecto cuantitativo (baja actividad y bajo nivel de antígeno) o cualitativo (baja actividad y nivel de antígeno normal) en la función del factor IX⁴. La deficiencia congénita de factor IX se puede clasificar como grave (actividad del factor IX <1%), moderada (actividad del factor IX entre 1 y 5%) o leve (actividad del factor IX entre 5 y 40%)⁵.

Para el diagnóstico en laboratorio de la deficiencia de factor IX se requiere normalmente una determinación cuantitativa de los niveles del procoagulante, es decir, de la actividad funcional del factor IX⁵. Se puede utilizar un ELISA para la determinación del antígeno factor IX junto con ensayos funcionales en el área de terapia genética, evaluación de las concentraciones de factor IX, determinación del estado de portador así como la distinción de aquellos pacientes con material de reactividad cruzada, es decir, con actividad funcional baja pero con niveles del antígeno factor IX casi normales.

PRINCIPIO DEL INMUNOENSAYO ENZIMÁTICO

Las tiras que contienen los pocillos están recubiertas de anticuerpos policlonales de cabra contra el factor IX. Las muestras de plasma se diluyen y se introducen en los pocillos. El antígeno factor IX presente se conjuga con el revestimiento del anticuerpo. Tras lavar el material no conjugado, se aplica anticuerpo de detección de cabra con marcador de peroxidasa, que se conjugará con el factor IX capturado. Los pocillos se lavan otra vez y se aplica una solución de TMB (tetrametilbencidina sustrato peroxidasa) y se deja reaccionar durante un período de tiempo fijo. Aparece un color azul que cambia a amarillo al parar la reacción con ácido. El color que se forma se mide por espectrofotometría en un lector de microplacas a 450 nm. La absorbancia a 450 nm es directamente proporcional a la concentración de factor IX. El ensayo se calibra mediante el plasma calibrador incluido en el kit.

REACTIVOS

A. Descripción de los reactivos

Reactivo 1: Bolsa de papel de aluminio que contiene 6 tiras, cada una de ellas con 16 pocillos revestidos con anticuerpo de cabra contra el factor IX humano.

Reactivo 2: 2 viales de plasma calibrador, cada uno de ellos liofilizado de 1 mL de plasma.

Reactivo 3: 2 viales de plasma control A, cada uno de ellos liofilizado con 1 mL de plasma.

Reactivo 4: 2 viales de plasma control B, cada uno de ellos liofilizado con 1 mL de plasma.

Reactivo 5: 1 vial que contiene 50 mL de concentrado de tampón de lavado 20X.

Reactivo 6: 3 viales, cada uno de ellos con 20 mL de diluyente de muestra de tampón 2X.

Reactivo 7: 1 vial que contiene 12 mL de anticuerpo de detección de cabra con marcador de peroxidasa.

Reactivo 8: 1 vial que contiene 12 mL de sustrato de tetrametilbencidina (TMB).

Reactivo 9: 1 vial que contiene 12 mL de solución de parada (ácido sulfúrico 0,2 M).

B. Precaución y advertencia

Este kit está destinado para su uso por personal con formación en procedimientos de laboratorio y seguridad en el laboratorio, en el uso de sustancias químicas y con riesgo biológico potencial. Algunos elementos contienen material de origen humano. Cada unidad de plasma utilizada en la preparación de este producto ha sido analizada según los métodos aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (FDA), y se ha comprobado que son negativas para el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HbsAg), la sífilis y los anticuerpos del VIH y el HCV y que no reaccionan con el ARN del HIV-1 y el ARN del HCV. Como no existe ninguna prueba que pueda asegurar totalmente que los productos derivados de sangre humana no transmitan enfermedades infecciosas, este producto se debe manipular como un material potencialmente infeccioso.

La toxicidad del TMB sustrato (tetrametilbencidina) es leve, pero se deben adoptar precauciones para evitar un contacto directo. Se recomienda utilizar guantes y gafas de seguridad.

La solución de parada contiene ácido sulfúrico diluido (0,2 M), que es corrosivo. Se recomienda utilizar guantes y gafas de seguridad.

El desecho de materiales se debe realizar de acuerdo a la normativa local vigente.
Si desea obtener una Hoja de datos de seguridad de materiales de este producto, póngase en contacto con Affinity Biologicals Inc.

C. Preparación de los reactivos

Reactivo 1 (tiras recubiertas de anticuerpos y soporte): Justo antes de proceder a su utilización, abra la bolsa y retire las tiras y el soporte. Las tiras no utilizadas se deben volver a colocar en la bolsa, que se debe volver a sellar. Las tiras se pueden utilizar directamente, consulte la sección C: "Procedimiento de ensayo".

Reactivo 2 (plasma calibrador): Reconstituya un vial con 1,0 mL de agua de grado reactivo. Deje que el contenido se disuelva durante 15 minutos a temperatura ambiente, removiendo de vez en cuando. La estabilidad tras la reconstitución es de 4 horas a temperatura ambiente (18-25 °C) o 30 días a -20 °C.

Reactivos 3 y 4 (plasmas control): Reconstituya un vial de cada plasma con 1,0 mL de agua de grado reactivo. Deje que el contenido se disuelva durante 15 minutos a temperatura ambiente, removiendo de vez en cuando. La estabilidad tras la reconstitución es de 4 horas a temperatura ambiente (18-25 °C) o 30 días a -20 °C.

Reactivo 5 (concentrado de tampón de lavado 20X): Deje que el vial se atempere antes de proceder a su utilización. Antes de continuar, asegúrese de que los cristales que se puedan haber formado se hayan disuelto. Si fuese necesario, el vial se puede calentar a 37 °C hasta que se hayan disuelto todos los cristales. Diluya el concentrado en una proporción 1/20 antes de proceder a su utilización. Añada 16 mL de concentrado a 304 mL de agua de grado reactivo por cada 2 tiras (32 pocillos) y mézclelos. La estabilidad tras la dilución es de 1 semana a 2-8 °C.

Reactivo 6 (concentrado de diluyente de muestra 2X): Deje que el vial se atempere antes de proceder a su utilización. Asegúrese de que los cristales que se puedan haber formado se hayan disuelto. Si fuese necesario, el vial se puede calentar a 37 °C hasta que se hayan disuelto todos los cristales. Diluya el concentrado añadiendo un volumen igual de agua de grado reactivo y mézclelos. La estabilidad tras la dilución es de 1 semana a 2-8 °C.

Los reactivos 7-9 se suministran listos para su uso.

D. Almacenamiento y estabilidad

Los kits cerrados y los reactivos sin reconstituir son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la caja y en la etiqueta de cada reactivo, si se almacenan a una temperatura de 2-8 °C.

TOMA DE MUESTRAS

La sangre se recoge mediante tubos anticoagulantes que contienen tampón citrato al 3,2% en una proporción de 9 volúmenes de sangre por cada volumen de anticoagulante y se mezcla suavemente mediante inversión. Centrifúguelos a un mínimo de 1500 x g durante 15 minutos (según la indicación H21-A5 de CLSI)⁶. Retire el plasma sobrenadante y utilícelo en las 4 horas siguientes; de lo contrario, deberá congelarlo a una temperatura inferior a 20 °C durante un máximo de 30 días.

PROCEDIMIENTO

A. Material proporcionado

Bolsa de papel de aluminio que contiene 6 tiras de pocillos recubiertos de anticuerpos.
Plasma calibrador, liofilizado.
Plasma control A, liofilizado.
Plasma control B, liofilizado.
Concentrado de tampón de lavado 20X.
Concentrado de diluyente de muestra 2X.
Solución de anticuerpos de detección.
Sustrato TMB.
Solución de parada.
Sellador de placas adhesivo.

B. Material adicional requerido (pero no suministrado)

Agua de grado reactivo para reconstitución y dilución
Pipetas monocanal con ajuste de volumen
Pipetas multicanal
Puntas de pipeta

Temporizador de laboratorio
Dispositivo para el lavado de microplacas/tiras de pocillos
Espectrofotómetro de microplacas compatible con una longitud de onda de 450 nm.

C. Procedimiento de ensayo

NOTAS SOBRE EL PROCEDIMIENTO:

- Reconstituya los reactivos de la manera indicada en REACTIVOS, Sección C: "Preparación de los reactivos". Deje que los reactivos se atemperen antes de proceder a su utilización.
- Se recomienda realizar por duplicado todas las diluciones de muestras de análisis, calibración y control, y que cada una incluya una muestra tampón blanco (consulte la sección Calibración del ensayo).
- Todas las diluciones se deben realizar justo antes de proceder a su utilización en el ensayo.
- No deje que se sequen los pocillos en ningún momento. Mantenga cubiertas las placas durante las incubaciones.
- Las muestras de plasma no se deben aplicar a diluciones inferiores al 1/10.
- No utilice componentes del kit con distintos números de lote.
- Las temperaturas de incubación superiores o inferiores a la temperatura ambiente normal (18 -25 °C) pueden afectar a la exactitud de los resultados.
- No utilice componentes del kit que hayan caducado.
- Las tiras utilizadas se deben desechar y no se pueden volver a utilizar.

- Preparación de las diluciones de plasma calibrador:** Diluya el plasma calibrador (reactivo reconstituido 2) en el diluyente de muestra (reactivo 6 diluido) de la manera indicada en la tabla 1 siguiente:

TABLA 1:

Dilución	Plasma calibrador	Diluyente de muestra
100%**	10 µL	990 µL
50%	350 µL de 100%	350 µL
25%	350 µL de 50%	350 µL
12,5%	350 µL de 25%	350 µL
6,25%	350 µL de 12,5%	350 µL
3,13%	350 µL de 6,25%	350 µL

(NOTA: 100% = 1,0 UI/mL)

**Consulte el vial del plasma de control (elemento 2) para conocer el valor del antígeno FIX que se debe utilizar como concentración de la dilución inicial del plasma de control. Por ejemplo, si el plasma de control tiene un valor asignado de 1,25 IU/ml, siga el mismo esquema de dilución anterior pero utilice 1,25 IU/ml para el primer punto de la curva de calibración.

- El plasma control A** (reactivo 3 reconstituido) y el plasma de análisis normal se diluyen en proporción 1/200 y 1/400. Añada 10 µL de plasma a 1990 µL de diluyente de muestra (reactivo 6 diluido), mezcle y, a continuación, añada 350 µL de esta dilución 1/200 a 350 µL de diluyente de muestra para obtener la dilución 1/400. **El plasma control B** (reactivo 4 reconstituido) y las muestras cuyo contenido de factor IX se espere que sea <10% (por ejemplo, las muestras de hemofilia B) se deben analizar con diluciones inferiores en proporción 1/10 y 1/20. Añada 70 µL de plasma a 630 µL de diluyente de muestra (reactivo 6 diluido), mezcle y, a continuación, añada 350 µL de esta dilución 1/10 a 350 µL de diluyente de muestra para obtener la dilución 1/20. El plasma de análisis cuyo contenido de factor IX se espere que sea de 10-30% se debe diluir en proporción 1/100 y 1/200. Añada 10 µL de plasma a 990 µL de diluyente de muestra (reactivo 6 diluido), mezcle y, a continuación, añada 350 µL de esta dilución 1/100 a 350 µL de diluyente de muestra para obtener la dilución 1/200.

- Ensayo:**

PREPARACIÓN DE LAS PLACAS	Colocar el número de tiras deseado en el soporte.	
	Introducir con la pipeta en cada pocillo:	
CAPTURA DE factor IX	Analizar la muestra (por duplicado)	100 µL
	Tapar las tiras con el sellador de placas e incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente.	
Vaciar los pocillos y lavar 3 veces con 300 µL de tampón de lavado diluido.		

DETECCIÓN DE ANTICUERPOS	Solución de anticuerpos de detección (reactivo 7)	100 µL
	Tapar las tiras con el sellador de placas e incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente.	
Vaciar los pocillos y lavar 3 veces con 300 µL de tampón de lavado diluido.		
DESARROLLO DEL COLOR	Sustrato TMB (reactivo 8)	100 µL
	Dejar que se desarrolle el color durante exactamente 10 minutos a temperatura ambiente.	
	Solución de parada (reactivo 9)	100 µL (Añadir a cada pocillo en el mismo orden en que se añadió el TMB)
Realizar una lectura de la placa con una longitud de onda de 450 nm en los 30 minutos siguientes a la adición de la solución de parada. Si fuese necesario, conservar el soporte de placas para utilizarlo con los pocillos restantes que no se hayan utilizado. Desechar los pocillos utilizados.		

CALIBRACIÓN

A. Calibración del ensayo

El valor del antígeno factor IX indicado en el vial de plasma calibrador se ha determinado mediante comparación con un estándar secundario del que se puede realizar un seguimiento conforme al estándar internacional de la OMS para el antígeno del factor IX. El valor de este antígeno se debe utilizar como la concentración en el punto máximo de la curva de referencia.

Se recomienda que la placa se elimine en los pocillos que tengan solo diluyente de muestra en lugar de muestra diluida (pocillos de reactivo en blanco).

B. Curva de referencia y cálculo de resultados

La curva de referencia es un gráfico de registro de los valores de absorbencia medios (eje y) frente a la concentración de factor IX (eje x). El contenido de factor IX de las muestras del análisis y de los controles se puede leer a partir de la curva de referencia y multiplicar por el factor de dilución adecuado. En las condiciones descritas aquí, una muestra en una dilución 1/100 tendrá un factor de dilución de 1, una dilución 1/200 tendrá un factor de dilución de 2 y una dilución 1/400 tendrá un factor de dilución de 4. Las muestras aplicadas a una dilución inferior de 1/10 tendrán un factor de dilución de 0,1, mientras que una dilución 1/20 tendrá un factor de dilución de 0,2.

Ejemplo: El plasma de análisis con dilución 1/200 tiene una absorbencia correspondiente al 45% de la lectura de la curva de referencia. Este valor se multiplicaría por un factor de dilución de 2 para obtener el valor corregido de 90%.

CONTROL DE CALIDAD

El plasma control suministrado (reactivos 3 y 4) se debe analizar con todas las series de muestras que se realicen. Los valores de factor IX obtenidos para las muestras de ensayo se deben considerar dudosos si los valores obtenidos para el plasma de control se encuentran fuera del rango indicado en las etiquetas del plasma control.

LIMITACIONES E INTERFERENCIAS

Los valores del antígeno factor IX obtenidos mediante este ensayo no se deben utilizar aisladamente para el diagnóstico de enfermedades. Se deben tener en cuenta también el historial del paciente, el cuadro clínico y los resultados de otros procedimientos de diagnóstico. Se sabe que existen estados clínicamente significativos en los que los niveles plasmáticos de antígeno factor IX son normales o casi normales en presencia de una reducción significativa de la actividad del factor IX⁴.

Este kit se ha desarrollado para su uso con plasma citrato. No se recomienda utilizar muestras con un contenido de anticoagulante que no sea citrato sódico al 3,2%.

Aunque no se han comunicado interferencias en el ensayo debidas a la presencia de fármaco o de anticuerpos heterofílicos de tipo anticoagulante de lupus (LA) y factor reumatoide (RF), no se puede excluir la posibilidad de interferencia de niveles elevados de anticuerpos heterofílicos. La posibilidad teórica de analizar muestras que contengan anticuerpos contra la inmunoglobulina de cabra también puede interferir en el ensayo.

VALORES ESPERADOS

El rango normal del factor IX indicado en la literatura es de 0,5-1,5 UI/mL³. Cada laboratorio debe determinar un rango normal de manera independiente, pero los resultados de tres lotes medidos en 101 individuos sanos indican un intervalo de referencia normal de 0,69-1,28 UI/mL (media = 0,987 UI/mL, SD = 0,148). Es posible que haya que volver a diluir y analizar las muestras con valores fuera del rango de la curva de referencia para obtener resultados exactos.

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

A. Especificidad

Este ensayo mide el antígeno factor IX en plasma humano, concentraciones terapéuticas de factor IX y preparaciones recombinantes de factor IX.

B. Límite de detección

Si se realiza el ensayo de la manera indicada en la sección C, "Procedimiento de ensayo", el límite de detección del mismo es de 0,005 UI/mL (0,5%) de factor IX. Para un lote determinado, el límite superior del ensayo corresponde al doble del valor del plasma calibrador (reactivo 2). Es posible que haya que volver a diluir y analizar las muestras con valores fuera del rango de la curva de referencia para obtener resultados exactos.

C. Exactitud

El kit de antígeno VisuLize™ Factor IX se ha comparado con el Asserachrom IX:AG en 134 muestras de pacientes con niveles de factor IX en todo el rango de detección. El coeficiente de correlación (r) fue 0,987 (R² = 0,974, y = 0,8628x + 0,0474).

D. Precisión

Precisión intraensayo, método 1: Se analizaron muestras de plasma normales y anormales en un total de 4 ensayos en cada uno de los tres lotes, con 40 repeticiones por muestra y placa. El coeficiente de variación media (CV) de todos los resultados fue de 4,74%.

Precisión intraensayo, método 2: Se analizaron tres muestras de plasma con distintas concentraciones de factor IX en repeticiones de 8 en 20 análisis con 3 lotes de producto. El coeficiente de variación intraensayo (CV) se calculó según las indicaciones EP5-A de NCCLS⁷, cuyos resultados se indican en el resumen siguiente para cada nivel de factor IX. La media del CV de todos los resultados de este método fue de 4,70%.

	Lote 1	Lote 2	Lote 3
Muestra de 1,0-1,3 UI/mL	3,30%	3,24%	4,14%
Muestra de 0,5-0,7 UI/mL	3,72%	4,22%	8,78%
Muestra <0,05 UI/mL	4,76%	4,04%	6,14%

Precisión interensayo: Se analizaron tres muestras de plasma con distintas concentraciones de factor IX en repeticiones de 8 en 20 análisis con 3 lotes de producto. El coeficiente de variación interensayo (CV) se calculó según las indicaciones EP5-A de NCCLS⁷, cuyos resultados se indican en el resumen siguiente para cada nivel de factor IX. La media del CV de todos los resultados de este método fue de 4,88%.

	Lote 1	Lote 2	Lote 3
Muestra de 1,0-1,3 UI/mL	6,84%	4,23%	3,49%
Muestra de 0,5-0,7 UI/mL	6,84%	4,59%	2,96%
Muestra <0,05 UI/mL	5,27%	6,20%	3,54%

E. Variabilidad entre lotes

Para determinar la precisión del ensayo entre lotes se analizaron por duplicado diez muestras de control con valores de factor IX entre 0,28 y 0,87 UI/mL en tres lotes. La variabilidad media entre lotes fue de 2,76%.

REFERENCES/REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES/ REFERENZEN/BIBLIOGRAFIA/REFERENCIAS

1. Limentani SA, Furie BC, Furie B, *Hemostasis and Thrombosis*, 3^{ème} Edition, éd. RW Colman, J Hirsh, VJ Marder et EW Salzman, p. 94-108, J.B. Lippincott Co., Philadelphia PA, USA, 1994.
2. Lawson JH, Mann KG; *Cooperative Activation of Human Factor IX by the Human Extrinsic Pathway of Coagulation*; JBC 266 p. 11317-11327, 1991.
3. van Hylckama Vlieg A, van der Linden IK, Bertina RM, Rosendaal FR. « High levels of Factor IX increase the risk of venous thrombosis », *Blood*, 2000, 95:12, p. 3678-3682.
4. Brettler DB, Levine PH, « Clinical Manifestations and Therapy of Inherited Coagulation Factor Deficiencies », *Hemostasis and Thrombosis*, 3^{ème} Edition, éd. RW Colman, J Hirsh, VJ Marder et EW Salzman, p. 169-183, J.B.

Lippincott Co., Philadelphia PA, USA, 1994.

5. White GC, Rosendaal F, Aledort LM, Lusher JM, Rothschild C, Ingerslev J. « Definitions in Hemophilia, Recommendation of the Scientific Subcommittee on Factor VIII and Factor IX of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis », *Thrombosis and Haemostasis*, 2001, 85, p. 560.

6. Collection, Transport, and Processing of Blood Specimens for Coagulation Testing and General performance of Coagulation Assays; Approved Guideline—Fifth Edition. CLSI Document H21-A5, Vol. 28, No. 5. 2008.

7. *Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices, Approved guideline*, Document EP5-A du NCCLS, Vol.19, No. 2, NCCLS, Wayne, Pennsylvania, USA, 1999.

8. "Medical Devices - Symbols to be used with information to be supplied by the manufacturer - Part 1: General Requirements", ISO 15223-1 Fourth Edition 2021-07.

SYMBOL LEGEND 8 / LEGENDE DES SYMBOLES 8 /

ZEICHENERKLÄRUNG 8 / LEGENDA DEI SIMBOLI 8 /

LEYENDAS DE SÍMBOLOS 8



For *in vitro* diagnostic use/Pour utilisation diagnostique *in vitro*/In vitro-Diagnostikum/Per uso diagnostico *in vitro*/Para uso en diagnóstico *in vitro*



Manufacturer/Fabricant/Hergestellt von/ Fabricado por/
Fabricado por



Batch code/Code du lot/Chargen-Bezeichnung/Codice lotto/
Código de lote



Authorized Representative/Mandataire/Bevollmächtigter/
Representante autorizado/ Representante autorizado



Expiry date/Date d'expiration/Verwendbar bis/ Data di
scadenza/Fecha de caducidad



Catalogue Number/ Référence du catalogue/ Artikel-
Nummer/ Numero di catalogo/ Número de catálogo



Temperature limitation/Limite de température/
Lagerungstemperatur/Limite di temperatura/Límite de
temperatura



Consult instructions for use/ Consulter le mode
d'emploi/ Gebrauchsanweisung beachten/
Consultare le istruzioni per l'uso/ Consulte las
instrucciones de uso



Contains sufficient for <n> tests/ Contient
suffisamment pour <n> tests/ Inhalt ausreichend
für <n> Ansätze/ Contiene sufficiente per <n>
tests/ Contiene suficiente para <n> tests



Biological Risks/ Risques biologiques/ Biologische Risiken/
Rischio Biológico/ Riesgos biológicos



Corrosive/ Corrosif/ Korrosiv/Corrosivo/ Corrosivo



Health Hazard/ Risque pour la santé/
Gesundheitsgefährdung / Pericolo per la salute/
Peligro para la salud

Limited Warranty: This product is warranted to perform in accordance with its labelling and literature. Affinity Biologicals Inc. disclaims any implied warranty of merchantability or fitness for any other purposes, and in no event will Affinity Biologicals Inc. be liable for any consequential damages arising out of aforesaid express warranty.

Limite de garantie : Ce produit est garanti pour une utilisation conforme à son étiquetage et à la documentation qui l'accompagne. Affinity Biologicals Inc. n'offre aucune garantie implicite quant à l'adéquation de ce produit à tout autre usage ou à la commercialisation, et Affinity Biologicals Inc. ne pourra en aucun cas être tenue responsable de dommages indirects survenant dans le cadre de la garantie expresse susmentionnée.

Eingeschränkung der Gewährleistung: Für dieses Produkt wird der Leistungsumfang gemäß der zugehörigen Kennzeichnungen und schriftlichen Informationen garantiert. Affinity Biologicals Inc. lehnt jede weitergehende, stillschweigend angenommene, Gewährleistung für Vermarktung oder Veränderungen des Produktes zu anderen als dem vorgesehene Zweck ab. Affinity Biologicals Inc. ist in keinem Fall für Folgeschäden, die sich aus der oben ausgesprochenen Gewährleistung ergeben, haftbar.

Garanzia limitata: Si garantisce che il prodotto funzionerà in base a quanto stabilito nella documentazione e sulle etichette. Affinity Biologicals Inc. non riconosce alcuna garanzia implicita di commerciabilità o idoneità per ogni altro scopo e in nessun caso Affinity Biologicals Inc. potrà essere ritenuta responsabile di eventuali danni consequenziali connessi alla garanzia espressa di cui sopra.

Garantía limitada: Se garantiza el rendimiento de este producto de acuerdo a su etiquetado y literatura. Affinity Biologicals Inc. no ofrece ninguna garantía para su comercialización o adaptación para cualquier otro fin y no será responsable en ningún caso de ningunos daños y perjuicios excepto en los casos indicados en la garantía expresa anterior.



AFFINITY BIOLOGICALS INC.

1348 Sandhill Drive
Ancaster, ON, CANADA L9G 4V5
Tel: (905) 304-9896
(800) 903-6020
Fax: (905) 304-9897
info@affinitybiologicals.com



Emergo Europe

Westervoortsedijk 60
6827 AT Arnhem
The Netherlands