



Factor IX

Deficient Plasma

Para la determinación coagulométrica en una etapa del factor IX

SIGNIFICACION CLINICA

El factor IX (FIX) es una serino-proteasa, vitamina K dependiente, de síntesis hepática.

La alteración congénita del FIX se asocia a un desorden hemorrágico conocido como hemofilia B de herencia recesiva ligada al sexo.

El déficit adquirido puede ser aislado como ante la presencia de inhibidores específicos o déficit asociado al de otros factores como en el caso de tratamiento con antagonistas de vitamina K, hipovitaminosis K, daño hepático, coagulación intravascular diseminada, etc.

FUNDAMENTOS DEL METODO

La determinación cuantitativa del FIX consiste en medir el tiempo de coagulación de una muestra diluida que contiene el factor a determinar, con un plasma deficitario que aporta el resto de los factores en niveles adecuados excepto el FIX, en presencia de fosfolípidos, superficies de cargas negativas y calcio (tiempo de tromboplastina parcial activada: aPTT). El tiempo de coagulación obtenido es inversamente proporcional a la actividad del FIX presente en la muestra. Este método puede usarse con cualquier instrumento capaz de realizar pruebas de valoraciones de factores basadas en el Tiempo de tromboplastina parcial activada.

REACTIVOS PROVISTOS

A. Reactivo A: plasma humano liofilizado deficiente en factor IX, obtenido por inmuoadsorción, con una actividad de coagulación < 1% de FIX.

INSTRUCCIONES PARA SU USO

Disolver el Reactivo A en el volumen de agua destilada indicado en el rótulo. Dejar reposar durante 30 minutos a temperatura ambiente y luego, homogeneizar la solución por agitación suave antes de su uso.

REACTIVOS NO PROVISTOS

- Agua destilada
- Imidazole Buffer de Wiener lab
- APTT elláigic de Wiener lab.
- Coagulation Control N y Coagulation Control P de Wiener lab.
- Coagulation Calibrator de Wiener lab.

PRECAUCIONES

Los reactivos son para uso diagnóstico "in vitro".

El Reactivo A ha sido preparado a partir de material no reactivo para HBsAg, HCV y HIV. Sin embargo, al igual que

las muestras de sangre, debe manejarse como si se tratara de material infectivo.

Utilizar los reactivos guardando las precauciones habituales de trabajo en el laboratorio de análisis clínicos.

Todos los reactivos y las muestras deben descartarse de acuerdo a la normativa local vigente.

ESTABILIDAD E INSTRUCCIONES DE ALMACENAMIENTO

El **Factor IX Deficient Plasma** es estable en refrigerador (2-10°C) hasta la fecha de vencimiento indicada en la caja. Una vez reconstituido el reactivo es estable 3 horas a temperatura ambiente (< 25°C) o 1 mes congelado (-20°C). Evitar los congelamientos y descongelamientos reiterados. El reactivo congelado deberá descongelarse durante al menos 10 minutos a 37°C y homogeneizarse antes de usar.

MUESTRA

Plasma citratado

a) Recolección: obtener sangre cuidadosamente (evitando estasis o trauma) y colocar en un tubo con anticoagulante en proporción 9 + 1 exacta (ejemplo: 4,5 ml de sangre + 0,5 ml de anticoagulante). Mezclar suavemente. Centrifugar durante 15 minutos y separar el plasma antes de los 30 minutos. Es recomendable efectuar la extracción con jeringas plásticas.

b) Aditivos: para obtener el plasma debe emplearse Anticoagulante TP de Wiener lab. o citrato de sodio 130 mmol/l (3,8%) o 109 mmol/l (3,2%).

c) Sustancias interferentes conocidas:

- No debe emplearse EDTA o heparina para obtener plasma.
- Las contaminaciones, visibles o no, son causa de tiempos falsamente prolongados
- Hemólisis y lipemias visibles dificultan la medición fotométrica de los resultados

Referirse a la bibliografía de Young para los efectos de las drogas en el presente método.

d) Estabilidad e instrucciones de almacenamiento: el plasma debe mantenerse a temperatura ambiente hasta el momento de efectuar la prueba. Este período no debe prolongarse más de 4 horas. En caso de no poder procesarse en este lapso, el plasma puede congelarse hasta 2 semanas a -20°C. En este caso la muestra debe ser congelada inmediatamente y deberá ser descongelada rápidamente a 37°C, no prolongando más de 10 minutos este período.

MATERIAL REQUERIDO (no provisto)

- Tubos de hemólisis.
- Pipetas o micropipetas para medir los volúmenes indicados.

- Cronómetro.
- Baño de agua a 37°C.
- Coagulómetro semiautomático o automático.

PROCEDIMIENTO

I- CURVA DE CALIBRACION

Emplear Coagulation Calibrator de Wiener lab e Imidazole Buffer como diluyente.

1-Realizar una dilución 1:10 del Coagulation Calibrator, mezclando 1 parte de calibrador + 9 partes de Imidazole Buffer y a partir de esta última, las siguientes diluciones geométricas en Imidazole Buffer: 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 y 1:32. El calibrador diluido 1:20 representa el 100% del valor asignado a FIX. Ver cómo calcular el resto de las actividades para cada punto de calibración en la tabla que se muestra más abajo.

2- Precalear el cloruro de calcio 25 mM (Reactivo B de APTT ellagic de Wiener lab) a 37°C.

3- En un tubo de hemólisis colocar:

Reactivo A	100 µl
Diluciones del Calibrador	100 µl
Reactivo aPTT (Reactivo A)	100 µl

4- Mezclar e incubar durante 3 minutos a 37°C

5- Disparar el cronómetro con el agregado de 100 µl de cloruro de calcio 25 mM precalentado y registrar el tiempo de formación del coágulo.

6- Calcular el tiempo promedio de coagulación para cada dilución, por duplicado.

7- Construir la curva de calibración representando los tiempos de coagulación en función de la actividad del FIX, sobre papel log-log. Unir a través de una recta la mayoría de los puntos representados. La recta final debe contener por lo menos 3 puntos consecutivos.

La actividad de FIX en cada dilución de la curva se determina multiplicando el %FIX del Coagulation Calibrator por el factor de dilución que se indica en la tabla. Ejemplo para un valor asignado de 110% al Coagulation Calibrator:

Dilución del Coagulation Calibrator	Dilución Final	Cálculo de FIX (%)	Actividad FIX (%)
2:1	2.0	110 x 2.0	220
1:1	1.0	110 x 1.0	110
1:2	0.5	110 x 0.5	55
1:4	0.25	110 x 0.25	27.5
1:8	0.125	110 x 0.125	13.8
1:16	0.063	110 x 0.063	6.9

II- MUESTRAS DE PACIENTES

1- Preparar diluciones 1:20 de los plasmas de pacientes en Imidazole Buffer (1 parte de muestra + 19 partes de Imidazole Buffer).

2- Precalear el cloruro de calcio 25 mM (Reactivo B de APTT ellagic de Wiener lab) a 37°C.

3- En un tubo de hemólisis colocar:

Reactivo A	100 µl
Muestra diluida	100 µl
Reactivo aPTT (Reactivo A)	100 µl

4- Mezclar e incubar durante 3 minutos a 37°C

5- Disparar el cronómetro con el agregado de 100 µl de cloruro de calcio 25 mM precalentado y registrar el tiempo de formación del coágulo.

6- Repetir la determinación y promediar el resultado para cada muestra.

CALCULO DE LOS RESULTADOS

Los valores de las muestras de plasma diluidas 1:20 se interpolan en la curva de calibración.

INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS

Si la actividad del FIX obtenido por interpolación directa de la curva de calibración es menor al punto más bajo de la curva, es conveniente repetir la determinación de la muestra con una dilución menor (1:10), multiplicando el resultado por 0.5. Si la actividad del FIX obtenido por interpolación directa de la curva de calibración es mayor al punto más alto de la curva, es conveniente repetir la determinación de la muestra con una dilución mayor (1:40), multiplicando el resultado por 2.

METODO DE CONTROL DE CALIDAD

Coagulation Control N y Coagulation Control P de Wiener lab. El control deberá procesarse de la misma manera que las muestras.

VALORES DE REFERENCIA

50-150 %

Cada laboratorio debe establecer sus propios valores de referencia a partir de las técnicas e instrumental empleado.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Ver Sustancias interferentes conocidas y Estabilidad e instrucciones de almacenamiento en MUESTRA.

Conservar las muestras de plasma a temperatura ambiente para evitar la activación por baja temperatura.

Se recomienda respetar el tiempo de incubación de las muestras con el Reactivo A.

La manipulación incorrecta de las muestras puede ocasionar la activación parcial de los factores de coagulación lo que ocasionaría un resultado erróneo en la determinación.

El anticoagulante lúpico puede afectar la determinación de la actividad del factor.

Si se sospecha la presencia de inhibidores de factor IX, deben procesarse varias diluciones diferentes de la muestra. Se requiere una nueva calibración para cada lote de reactivos y para cada instrumento utilizado.

PERFORMANCE

a) **Reproducibilidad:** se determinó con diferentes muestras (en series y día a día). Se obtuvieron los siguientes resultados:

Precisión intra-ensayo:

Nivel	D.S.	C.V.
52,5 seg	0,69 seg	1,31%
60,3 seg	0,42 seg	0,70%

Precisión inter-ensayo

Nivel	D.S.	C.V.
52,5 seg	1,04 seg	1,98%
60,3 seg	1,14 seg	1,88%

b) **Rango de medición:** 5 -180%

PARAMETROS PARA ANALIZADORES AUTOMATICOS

Referirse a las adaptaciones específicas de cada analizador.

PRESENTACION


- 5 x 1 ml (Cód. 1705018)

BIBLIOGRAFIA

- White G - Definitions in Hemophilia, Thromb Haemost 85:560, (2001).
- Kasper C - Hemophilia B: Characterization of Genetic Variants and detection of carriers, Blood, 50 (3): 351:366, (1977).
- Barrowcliffe T - Standardization of FIX & FIX assays, Haemophilia, 9: 397-402, (2003).
- Collection, Transport and Processing of Blood Specimens for Testing Plasma-Based Coagulation Assays and Molecular Haemostasis Assays: Approved Guideline, 5th ed. CLSI: H21-A5.
- Triplett DA - New Methods in Coagulation, Crit Rev Clin Lab Sci. 1981;15 (1):25-84, (1981).
- Young, D.S. - "Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests", AACC Press, 4th ed. 2001.

SIMBOLOS

Los siguientes símbolos se utilizan en todos los kits de reactivos para diagnóstico de Wiener lab.

 Este producto cumple con los requerimientos previstos por la Directiva Europea 98/79 CE de productos sanitarios para el diagnóstico "in vitro"

 Representante autorizado en la Comunidad Europea

 Uso diagnóstico "in vitro"

 Contenido suficiente para <n> ensayos

 Fecha de caducidad

 Límite de temperatura (conservar a)

 No congelar

 Riesgo biológico

 Volumen después de la reconstitución

 Contenido

 Número de lote

 Elaborado por:

 Nocivo

 Corrosivo / Cáustico

 Irritante

 Consultar instrucciones de uso


 Calibrador

 Control

 Control Positivo

 Control Negativo

 Número de catálogo

 Wiener Laboratorios S.A.I.C.
Riobamba 2944
2000 - Rosario - Argentina
<http://www.wiener-lab.com.ar>
Dir. Téc.: Viviana E. Cétola
Bioquímica
Producto Autorizado A.N.M.A.T.
PM-1102-118



Wiener lab.

2000 Rosario - Argentina