



# Factor IX

## Deficient Plasma

Para a determinação coagulométrica em um estágio do fator IX

### SIGNIFICADO CLÍNICO

O fator IX (FIX) é uma serina-protease vitamina K dependente sintetizada no fígado.

A anomalia congênita do FIX é associada a um distúrbio hemorrágico conhecido como hemofilia B de herança recessiva ligada ao sexo.

A deficiência adquirida pode ser isolada, como na presença de inibidores específicos ou pode estar associada à deficiência de outros fatores como no caso de tratamento com antagonistas da vitamina K, hipovitaminose K, doença hepática, coagulação intravascular disseminada, etc.

### FUNDAMENTOS DO MÉTODO

A determinação quantitativa do fator IX envolve a medição do tempo de coagulação de uma amostra diluída contendo o fator a determinar, utilizando um plasma deficiente que fornece os fatores restantes em níveis apropriados com exceção do fator IX, em presença de fosfolípidios, superfícies carregadas negativamente e cálcio (tempo de tromboplastina parcial ativada: aPTT). O tempo de coagulação obtido é inversamente proporcional à atividade do fator IX na amostra. O método pode ser utilizado com qualquer instrumento capaz de realizar provas de valorações de fatores baseados no tempo de tromboplastina parcial ativada.

### REAGENTES FORNECIDOS

**A. Reagente A:** plasma humano liofilizado deficiente em fator IX obtido por imunoabsorção, com uma atividade de coagulação < 1% de FIX.

### INSTRUÇÕES DE USO

Dissolver o Reagente A com o volume de água destilada indicado no frasco. Deixar repousar por até 30 minutos a temperatura ambiente e depois homogeneizar a solução por agitação suave antes de usar.

### REAGENTES NÃO FORNECIDOS

- Água destilada
- Imidazole Buffer da Wiener lab.
- APTT ellagic da Wiener lab.
- Coagulation Control N e Coagulation Control P da Wiener lab.
- Coagulation Calibrator da Wiener lab.

### PRECAUÇÕES

O reagente é para uso diagnóstico "in vitro".

O Reagente A foi preparado partindo de material não reativo para HBsAg, HCV e HIV. No entanto, o reagente e todas as amostras de sangue devem ser manipuladas como material

potencialmente contaminado.

Utilizar os reagentes observando as precauções habituais de trabalho no laboratório de análises clínicas.

Todos os reagentes e as amostras devem ser descartadas conforme à regulação local vigente.

### ESTABILIDADE E INSTRUÇÕES DE ARMAZENAMENTO

O **Factor IX Deficient Plasma** é estável sob refrigeração (2-10°C) até a data de vencimento indicada na embalagem. Uma vez reconstituído o reagente é estável 3 horas a temperatura ambiente (< 25°C) ou 1 mês congelado (-20°C). Evite congelamento e descongelamento repetido.

O reagente congelado deve ser descongelado durante pelo menos 10 minutos a 37°C e homogeneizado antes de usar.

### AMOSTRA

Plasma citratado

**a) Coleta:** obter sangue cuidadosamente (evitando estase ou trauma), e colocar num tubo com anticoagulante na proporção 9 + 1 exata (exemplo: 4,5 ml de sangue + 0,5 ml de anticoagulante). Misturar suavemente. Centrifugar durante 15 minutos e separar o plasma antes de 30 minutos. É recomendável proceder à extração com seringas plásticas.

**b) Aditivos:** para obter o plasma deve-se utilizar citrato de sódio 130 mmol/l (3,8%) ou 109 mmol/l (3,2%).

**c) Estabilidade e instruções de armazenamento:** o plasma deve ser conservado a temperatura ambiente até o momento de realizar a prova. Este período não deve prolongar-se mais que 4 horas. Caso não seja possível realizar a prova na hora, o plasma pode ser conservado por até 2 semanas a -20°C. Neste caso, a amostra deve ser congelada imediatamente e descongelada rapidamente a 37°C, não devendo prolongar este período mais que 10 minutos.

### INTERFERÊNCIAS

Não deve ser utilizado EDTA ou heparina para obter plasma. As contaminações, visíveis ou não, são a causa de tempos falsamente prolongados.

Hemólise e lipemias visíveis dificultam a medição foto-óptica dos resultados.

Referência bibliográfica de Young para efeitos de drogas neste método.

### MATERIAL NECESSÁRIO (não fornecido)

- Tubos de hemólise.
- Pipetas e micropipetas para medir os volumes indicados.
- Banho-maria a 37°C.

- Cronômetro.
- Espectrofotômetro ou analisador de coagulação.

## PROCEDIMENTO

### I- CURVA DE CALIBRAÇÃO

Utilize Coagulation Calibrator da Wiener lab. e Imidazole Buffer como diluente.

1- Realize uma diluição 1:10 do Coagulation Calibrator misturando 1 parte do calibrador + 9 partes de Imidazole Buffer e a partir desta última, as seguintes diluições geométricas no Imidazole Buffer: 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32. O Calibrador diluído 1:20 representa o 100% do valor estabelecido para o fator IX. Veja como calcular o restante das atividades para cada ponto de calibração na tabela mostrada abaixo.

2- Pré-aqueça o cloreto de cálcio 25 mM (Reagente B APTT ellagic de Wiener lab) a 37°C.

3- Em um tubo de hemólise coloque:

Reagente A	100 ul
Diluições do Calibrador	100 ul
Reagente aPTT (Reagente A)	100 ul

4- Misture e incube por até 3 minutos a 37°C.

5- Dispare o cronômetro quando adicionar 100 ul de cloreto de cálcio 25 mM pré-aquecido e registre o tempo de formação do coágulo.

6- Calcule o tempo médio de coagulação para cada diluição, em duplicado.

7- Grafique a curva de calibração representando os tempos de coagulação vs. atividade do fator IX, em papel log-log. Uma através de uma linha reta os pontos representados. A reta resultante deve conter pelo menos 3 pontos consecutivos.

A atividade de fator IX em cada diluição é determinada multiplicando o % FIX do Coagulation Calibrator pelo fator de diluição indicado na tabela. Exemplo para um valor estabelecido de 110% no Coagulation Calibrator:

Diluição do Coagulation Calibrator	Diluição Final	Cálculo de FIX (%)	Atividade 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- AMOSTRAS DE PACIENTES

1- Prepare diluições 1:20 dos plasmas de pacientes com Imidazole Buffer (1 parte de amostra + 19 partes de Imidazole Buffer).

2- Pré-aqueça o cloreto de cálcio 25 mM (Reagente B APTT ellagic de Wiener lab.) a 37°C.

3- Em um tubo de hemólise coloque:

Reagente A	100 ul
Amostra diluída	100 ul
Reagente aPTT (Reagente A)	100 ul

4- Misture e incube por até 3 minutos a 37°C

5- Dispare o cronômetro quando adicionar 100 ul cloreto de cálcio 25 mM pré-aquecido e registre o tempo de formação do coágulo.

6- Repita a determinação e promedie o resultado para cada amostra.

## CALCULO DOS RESULTADOS

Os valores das amostras de plasma diluídas 1:20 devem ser interpoladas na curva de calibração.

## INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Se a atividade do fator IX obtido por interpolação direta da curva de calibração é menor do que o ponto mais baixo da curva, deve repetir a determinação com uma diluição menor (1:10) e multiplicar o resultado por 0,5.

Se a atividade do fator IX obtido por interpolação direta da curva de calibração é maior do que o ponto mais alto da curva, deve repetir a determinação com uma diluição maior (1:40) e multiplicar o resultado por 2.

## MÉTODO DE CONTROLE DE QUALIDADE

Coagulation Control N e Coagulation Control P de Wiener lab. O controle deve ser processado da mesma maneira do que as amostras.

## VALORES DE REFERÊNCIA

50-150 %

Cada laboratório deve estabelecer os seus próprios valores de referência de acordo com as técnicas e equipamento utilizado.

## LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

Vide Estabilidade e instruções de armazenamento em AMOSTRA e INTERFERÊNCIAS.

Conservar as amostras de plasma a temperatura ambiente para evitar a ativação por baixa temperatura.

É recomendável respeitar o tempo de incubação das amostras com o Reagente A.

O manuseio inadequado das amostras pode causar ativação parcial de fatores de coagulação que causaria um resultado errôneo na determinação.

O anticoagulante lúpico pode afetar a determinação da atividade do fator.

Se houver suspeita a presença de inibidores de FIX, devem ser processadas várias diluições diferentes da amostra.

Uma nova calibração é necessária para cada lote de reagentes e para cada instrumento utilizado.

## DESEMPENHO

a) **Reprodutibilidade:** foi determinada com diferentes amostras (em série e dia a dia). Os seguintes resultados foram obtidos:

### Precisão intra-ensaio

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

### Precisão inter-ensaio

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

b) **Faixa de medição:** 5-180%

## PARÂMETROS PARA ANALISADORES AUTOMÁTICOS

Para a programação consultar o manual de uso do analisador a ser utilizado.

## APRESENTAÇÃO


- 5 x 1 ml (Cód. 1705018)

## REFERÊNCIAS

- 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, 5<sup>th</sup> 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, 4<sup>th</sup> ed. 2001.

## SÍMBOLOS

Os seguintes símbolos são utilizados nos kits de reagentes para diagnóstico da Wiener lab.

 Este produto preenche os requisitos da Diretiva Europeia 98/79 CE para dispositivos médicos de diagnóstico "in vitro"


 Representante autorizado na Comunidade Europeia

 Uso médico-diagnóstico "in vitro"

 Conteúdo suficiente para <n> testes


 Data de validade

 Limite de temperatura (conservar a)

 Não congelar

 Risco biológico

 Volume após a reconstituição

 Conteúdo


 Número de lote

 Elaborado por:


 Nocivo

 Corrosivo / Caústico

 Irritante

 Consultar as instruções de uso

 Calibrador

 Controle

 Controle Positivo

 Controle Negativo

 Número de catálogo

 **Wiener lab.**

2000 Rosario - Argentina