SIEMENS

Factor VIII Chromogenic Assay / Хромогенный метод определения фактора VIII

FACTOR VIII | CHROMOGENIC

Назначение

Для фотометрического определения активности фактора VIII (антигемолитического фактора) в человеческой плазме.

Краткое описание и принцип метода

Гемофилия — это связанное с полом заболевание крови, вызванное дефицитом фактора циркуляции VIII (F. VIII) или фактора IX (F. IX). Гемофилия A (термин, используемый для обозначения дефицита F. VIII) встречается в 5–7 раз чаще, чем гемофилия B, вызываемая дефицитом фактора IX[1-4].

Оба заболевания передаются как рецессивный, сцепленный с X-хромосомой признак и возникают почти исключительно у мужчин, которые получают дефектный ген от матери — носителя X-хромосомы. У пациентов с гемофилией A степень тяжести нарушения свертываемости крови зависит от степени дефицита F. VIII. Для нормального гемостаза необходимо приблизительно от 10 % до 40 % от нормального уровня активности F. VIII; при значениях ниже этого диапазона наблюдается тенденция к развитию кровотечений.

По показателю активности F. VIII пациенты обычно делятся на три категории: с легкой степенью заболевания — 25 %–5 % от нормы; средней — 5 %–1 % от нормы и тяжелой — менее чем 1 % от нормы. В этом хромогенном исследовании фактор VIII в образце активируется тромбином[5].

Активированный фактор VIII (F. VIIIa) ускоряет преобразование фактора X (F. X) в фактор Xa (F. Xa) в присутствии активированного фактора IX (F. IXa), фосфолипидов (ФЛ) и ионов кальция. Активность F. Xa оценивается по гидролизу субстрата п-нитроанилида, специфичного к F. Xa. Начальная скорость высвобождения п-нитроанилина (pNA), измеряемая при 405 нм, пропорциональна активности F. Xa, а значит и активности F. VIII в образце. Химический анализ
Хромогенный метод определения фактора VIII представлен в виде уравнений ниже.

F. VIII + тромбин ——> F. VIIIa

$$\text{F X} \xrightarrow[\text{F. IXa, ФЛ, } Ca^{2+}]{\text{F. VIIIa}} \text{F. Xa}$$

$$CH_3OCO\text{-D-CHG-Gly-Arg-pNA} \xrightarrow{\text{F. Xa}} CH_3OCO\text{-D-CHG-Gly-Arg-OH} + \text{pNA (желтый)}$$

Реагенты

Примечание. Хромогенный метод определения фактора VIII можно использовать как вручную, так и в автоматических анализаторах гемостаза. Siemens Healthcare Diagnostics предоставляет справочные руководства (краткие инструкции) для ряда анализаторов

гемостаза. Справочные руководства (краткие инструкции) содержат информацию по работе с анализатором и проведению анализа, которая может отличаться от информации, приведенной в настоящей инструкции по применению. В подобном случае информация, приведенная в справочных руководствах (кратких инструкциях), имеет приоритет перед настоящей инструкцией по применению. Также ознакомьтесь с руководством по эксплуатации, предоставленным производителем прибора.

Поставляемые материалы

Хромогенный анализ фактора VIII, REF *B4238–40, включающий следующее:*

2 x → 2 мл REAGENT FX, реагент для определения фактора X

2 x → 2 мл REAGENT FIX, реагент для определения фактора IXa

2 x → 1 мл SUBSTRATE, субстратный реагент

2 x 10 мл SUBSTRATE BUFFER, останавливающий буфер

Состав

Реагент для определения фактора X: лиофилизированный препарат, содержащий приблизительно 2 нмоль бычьего F. X, буфера на основе трис(гидроксиметил)аминометана (трис) с pH 8 и стабилизаторы.

Реагент для определения фактора IXa: лиофилизированный препарат, содержащий приблизительно 0,6 нмоль бычьего F. IXa, приблизительно 0,6 нмоль бычьего тромбина, приблизительно 0,06 ммоль хлорида кальция, приблизительно 0,12 мкмоль фосфолипидов, трис-буфер с pH 8 и стабилизаторы.

Субстратный реагент: лиофилизированный препарат, содержащий приблизительно 3,4 мкмоль CH_3OCO-D-CHG-Gly-Arg-pNA.AcOH, субстрат F. Xa, Nα-(2-нафтилсульфонилглицил)-D, L амидино-фенилаланин-пиперидид (α-NAPAP)[6], ингибитор тромбина, и стабилизаторы.

Останавливающий буфер: раствор, содержащий трис, этилендиаминтетрауксусную кислоту, хлорид натрия и азид натрия 0,02 %.

Предупреждения и меры предосторожности

Только для диагностики *in vitro*.

Содержит азид натрия (< 1 г/л) в качестве консерванта. Азид натрия может вступать в реакцию с медными или свинцовыми трубками дренажных систем, образуя взрывчатые химические соединения. Утилизируйте изделие надлежащим образом согласно местным нормативным актам.

Подготовка реагентов

Примечание. Информацию по подготовке реагентов см. в соответствующих справочных руководствах (кратких инструкциях) по анализатору, предоставляемых Siemens.

REAGENT FX **и** REAGENT FIX:

Растворите содержимое флакона, добавив 2,0 мл дистиллированной или деионизированной воды.

SUBSTRATE:

Растворите содержимое флакона, добавив 1,0 мл дистиллированной или деионизированной воды.

SUBSTRATE BUFFER:

Для использования смешайте 1,0 мл SUBSTRATE с 10,0 мл SUBSTRATE BUFFER в коричневом контейнере SUBSTRATE.

Перед использованием вновь осторожно перемешайте реагенты.

Хранение и стабильность

Если реагенты хранятся при температуре от 2 до 8 °C, они могут использоваться до истечения срока годности, указанного на этикетке.

Стабильность после восстановления (REAGENT FX и смесь REAGENT FIX, SUBSTRATE/ SUBSTRATE BUFFER):

при температуре 37 °C	2 ч.
при температуре от 15 до 25 °C	8 ч.
при температуре от 2 до 8 °C	3 дн.

Информация по стабильности после загрузки в прибор указана в справочных руководствах (кратких инструкциях) по каждому анализатору гемостаза.

Признаки негодности: отсутствие вакуума при вскрытии флакона; трудности при восстановлении реагентов; сильная мутность или наличие механических включений в SUBSTRATE BUFFER.

Образцы

Смешайте 9 частей свежеотобранной крови пациента с 1 частью раствора цитрата натрия 0,11 моль/л или 0,13 моль/л. Обработайте образец крови на центрифуге при 1 500 x g в течение как минимум 15 мин. при комнатной температуре. Сразу же перенесите плазму в пластиковую пробирку и храните в холодильнике до готовности провести анализ.

Анализ плазмы пациента должен быть проведен не позднее чем через 1 ч. после забора крови; плазма может храниться до 30 дн. при –20 °C. По причине нестабильности фактора VIII плазму можно разморозить только один раз и выполнить ее анализ не позднее чем через 1 ч.

Необходимые материалы, не входящие в комплект поставки

Цитрат натрия 0,11 моль/л или 0,13 моль/л для забора крови.

Пул свежей плазмы (FPP — fresh plasma pool) или стандартная человеческая плазма (REF ORKL) для калибровки.

Плазма с дефицитом фактора свертывания VIII (человеческая), REF OTXW.

Дистиллированная или деионизированная вода.

Спектрофотометр со следующими характеристиками:

– Длина волны:	405 нм
– Длина оптического пути:	1 см
– Температура измерений:	25 °C, 30 °C или 37 °C.

Раствор хлорида натрия, 0,9 %.

Для определения по конечной точке – уксусная кислота 20 % или лимонная кислота 1 моль/л. (Смешайте 200 мл ледяной уксусной кислоты с 800 мл дистиллированной или деионизированной воды или растворите 210 г моногидрата лимонной кислоты в дистиллированной или деионизированной воде и доведите до объема 1 литр.)

Секундомер.

Пипетки 0,1 мл, 0,5 мл и 3,0 мл.

Пластиковые пробирки и кюветы для полумикроанализа, 1 см

Плазма контрольная нормальная (N), REF ORKE

Плазма контрольная патологическая (P), REF OUPZ

Имидазоловый буфер, REF OQAA, *или*

Вероналовый буфер Оурена Dade®, REF B4234, *или*

Системный буфер Dade® CA, REF B4265

Анализатор гемостаза

Процедура

Вручную:

Методика анализа по конечной точке/кинетического

Анализ может проводиться при 25 °C, 30 °C или 37 °C. Настройте фотометр так, чтобы длина волны составляла 405 нм и ноль относительно 0,9 % раствора хлорида натрия.

Разведение образца/калибровочной плазмы

Анализ выполняется при разведении 1 : 31 образца или калибровочной плазмы. Порядок разведения следующий: смешайте 0,1 мл образца или калибровочной плазмы с 3,0 мл раствора хлорида натрия 0,9 % в пластиковой пробирке.

Построение кривой калибровки

Анализ может быть выполнен с использованием одного разведения калибровочной плазмы, но для большей точности должна быть рассчитана кривая калибровки. Для этого используйте калибровочную плазму с известным уровнем F. VIII (например, 100 %) и разведите ее раствором хлорида натрия 0,9 % следующим образом:

Разведение калибровочной плазмы		1 : 21	1 : 31	1 : 62	1 : 124	нулевой стандарт
0,9 % NaCl	мл	2,0	3,0	1,0	1,0	1,0
Калибровка плазмы	мл	0,1	0,1			-
Перемешивание и внесение	мл		1,0	1,0		
F. VIII*	%	148	100	50	25	0

* При использовании доступной в продаже стандартной плазмы для анализа предполагаемое значение фактора в процентах, получаемое при разведении в соотношении 1 : 31, будет совпадать с аттестованным значением анализа. Предполагаемое значение фактора в процентах, получаемое для других разведений, должно быть соответствующим образом скорректировано. Концентрация F. VIII при разведении 1 : 21 рассчитывается следующим образом: концентрация F. VIII при разведении 1:31 x 1,48 = концентрация F. VIII при разведении 1 : 21, например 100 % x 1,48 = 148 %.

Описание методики

Все реагенты, а также пластиковые пробирки необходимо предварительно инкубировать при выбранной температуре. Воспроизводимость является оптимальной, если во время реакции температура измерения не отклоняется от выбранной температуры более чем на 0,2 °C.

Этап	Кинетический анализ	Анализ по конечной точке
Разведенные образец/калибровочная плазма в соотношении 1: 31**	0,1 мл	0,1 мл
Реагент для определения фактора X	0,1 мл	0,1 мл
Реагент для определения фактора IXa	0,1 мл	0,1 мл
Тщательно перемешайте и инкубируйте	90 сек. при температуре 37 °C***	
Добавьте субстратный реагент и останавливающий буфер	0,5 мл	0,5 мл
Перемешайте и сразу же измерьте увеличение поглощения света (ΔA/мин.)	60 с 405 нм	60 с

Этап	Кинетический анализ	Анализ по конечной точке
Добавьте уксусную кислоту 20 % или лимонную кислоту 1 моль/л	-	0,1 мл
Перемешайте и измерьте значение поглощения света относительно NaCl 0,9 %	-	405 нм

** См. главу «Примечания по методике анализа».
*** 90 сек. при 37 °C, 120 сек. при 30 °C или 180 сек. при 25 °C.

Для анализа по конечной точке должен быть подготовлен банк плазмы для разведения образцов и каждой калибровочной плазмы.

Уксусная кислота, 20 %	0,1 мл
Добавьте реагент для определения фактора X. Перемешайте.	0,1 мл
Добавьте реагент для определения фактора IXa. Перемешайте.	0,1 мл
Добавьте разведенный образец. Перемешайте.	0,1 мл
Добавьте субстратный реагент и останавливающий буфер. Перемешайте.	0,5 мл
Перемешайте и измерьте значение поглощения света относительно NaCl 0,9 %.	405 нм

Внутренний контроль качества

Нормальный диапазон: Плазма контрольная нормальная (N)

Патологический диапазон: Плазма контрольная патологическая (P)

Для каждой калибровки необходимо обрабатывать два контроля (один с нормальным и один с патологическим диапазоном) как минимум каждые 3 до 4 ч. каждого рабочего дня. Контроли следует обрабатывать точно так же, как образцы. В каждой лаборатории должен быть принят свой собственный диапазон контроля качества либо на основе целевых значений и диапазонов, предлагаемых производителем контролей, либо на основе диапазонов, установленных в лаборатории. Обычно этот диапазон составляет от ± 2,0 до ± 2,5 стандартного отклонения (CO) от среднего значения контролей. Если измеренное значение контролей выходит за границы предварительно установленного доверительного интервала, необходимо проверить анализатор гемостаза, реагенты и калибровку. Не создавайте отчет с результатами анализа пациента, пока причина отклонения значений не выяснена и не устранена.

Расчет результатов

a) Применение одного коэффициента калибровки (F)

Поскольку кривая калибровки является линейной в пределах от 0 до 100 %, активность F. VIII в образце можно рассчитать с помощью известного значения калибровочной плазмы (FPP, стандартная человеческая плазма).

I. Для кинетических анализов

Активность фактора VIII в калибровочной плазме в процентах	= A
ΔA/мин. калибровочной плазмы	= C
ΔA/мин. нулевого стандарта	= B
ΔA/мин. образца	= S
Коэффициент калибровки	= F

$$\frac{A}{C - B} = F$$

Активность фактора VIII в неизвестном образце в процентах рассчитывается с помощью следующего уравнения:

(S - B) x F = активность фактора VIII в образце в %.

II. Для анализов по конечной точке

Активность фактора VIII в калибровочной плазме в процентах	= A
Значение поглощения света калибровочной плазмы	= C
Значение поглощения света холостой калибровочной плазмы	= C_b
Значение поглощения света образца	= S
Значение поглощения света холостого образца	= S_b
Значение поглощения света нулевого стандарта	= B
Значение поглощения света холостого нулевого стандарта	= B_b
Коэффициент калибровки	= F

$$\frac{A}{(C - C_b) - (B - B_b)} = F$$

Активность фактора VIII в неизвестном образце в процентах рассчитывается с помощью следующего уравнения:

$[(S - S_b) - (B - B_b)] \times F$ = активность фактора VIII в образце в процентах.

b) Применение кривой калибровки

I. Для кинетических анализов

Постройте график, нанеся значения активности F. VIII в процентах на оси абсцисс и значения поглощения света в минуту, измеренные при 405 нм, на оси ординат. Определите значение активности фактора VIII в неизвестном образце в процентах по кривой калибровки, найдя точку пересечения ΔA/мин. с кривой.

II. Для анализов по конечной точке

1. Вычтите значение поглощения света холостой калибровочной плазмы (C_b) из значения поглощения света калибровочной плазмы (C).
2. Вычтите значение поглощения света холостого образца плазмы (S_b) из значения поглощения света образца (S).
3. Вычтите значение поглощения света холостого нулевого стандарта (B_b) из значения поглощения света нулевого стандарта (B).

   Постройте график на миллиметровой бумаге, нанеся значения активности F. VIII в процентах на оси абсцисс и значения (C-C_b) на оси ординат.

   Определите значение активности фактора VIII в неизвестном образце по кривой калибровки, найдя точку пересечения (S-S_b) с кривой.

Ограничения методики

Компания Siemens провела валидацию этих реагентов на различных анализаторах для оптимизации рабочих характеристик и соответствия спецификациям продукта. Выполненные пользователем модификации не поддерживаются компанией Siemens, поскольку они могут негативно сказаться на работе системы и результатах анализа. Внося изменения в инструкции или используя эти реагенты в других анализаторах, не упомянутых в кратких инструкциях Siemens или данной инструкции по применению, пользователь сам несет ответственность за их применимость.

В каждом случае результаты данного теста следует интерпретировать с учетом анамнеза пациента, клинической картины и других показателей.

Ожидаемые значения

Уровень F. VIII в диапазоне от 60 до 168 % от нормы был определен у 124 предположительно здоровых лиц с помощью
Хромогенный метод определения фактора VIII, выполняемого на BCS®/BCS® XP.

Для других анализаторов гемостаза ожидаемые значения составляют 70 до 150 % от нормы[7].

Может понадобиться принять в лаборатории свой собственный референтный диапазон из-за систематических различий, обусловленных измерительными приборами.

Примечания по методике анализа

- Чувствительность анализа при низком диапазоне F. VIII (от 0 до 10 % от нормы) можно повысить, если плазму с дефицитом фактора свертывания VIII и FPP или стандартную человеческую плазму использовать в качестве стандартов. Подготовьте 4 стандарта посредством смешивания двух плазм, чтобы получить соответственно концентрации 100, 50, 25 и 0 % (только плазма с дефицитом фактора свертывания VIII (человеческая)). В этом случае оба стандарта и образцы могут быть проанализированы при разведении 1 : 31.
- Все реагенты, а также пластиковые пробирки необходимо предварительно инкубировать при выбранной температуре. Воспроизводимость является оптимальной, если во время реакции температура измерения не отклоняется от выбранной температуры более чем на 0,2 °C.
- Лимонная кислота 1 моль/л может быть использована вместо уксусной кислоты 20 % при определении методом конечной точки.
- Для забора образцов и измерения рекомендуются пластиковые материалы однократного применения.
- Референсная кривая должна быть определена заново при каждой замене оборудования или использовании новой партии Хромогенный метод определения фактора VIII.

Особые рабочие характеристики

В ходе сравнительного исследования характеристик, 98 образцов пациентов анализировались как с помощью Хромогенный метод определения фактора VIII, так и с помощью коагулометрического анализа, для которых использовались дефицитная плазма и активированный кефалопластиновый реагент Actin®. Полученный коэффициент корреляции составил 0,96, а уравнение регрессии имело вид $y = 1{,}0\ x + 1{,}0\ \%$.

Точность анализа в некоторой степени зависит от качества оборудования и опыта лица, выполняющего тест. Следующие показатели точности были получены с помощью кинетического метода при 37 °C.

Образец 1	N	Среднее (%)	СО (%)	КВ (%)
Межаналитическая точность	11	118	5	4
Точность в рамках одного анализа	11	124	5	4
Образец 2	N	Среднее (%)	СО (%)	КВ (%)
Межаналитическая точность	11	25	2,5	10
Точность в рамках одного анализа	11	28	2,6	9

Гепарин не оказывает интерферирующего влияния на Хромогенный метод определения фактора VIII, если его концентрация не превышает 10 Е/мл.

Линейность Хромогенный метод определения фактора VIII составляет от 0 до 100 % от F. VIII[8].

Библиография

1. Jackson CM, Nemerson Y. Blood coagulation. Annu Rev Biochem. 1980; 49: 765-811.
2. Bloom AL, Thomas DP, eds. Hemostasis and thrombosis. New York: Churchill Livingstone Inc. 1981.
3. Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Salzmann EW. Hemostasis and thrombosis, basic principles and clinical practice. Philadelphia: J.B. Lippincott Company. 1982.
4. Thompson AR, Harker LA. Manual of hemostasis and thrombosis, Edition 3. Philadelphia: F.A. Davis Company. 1983.

5. van Dieijen G, Tans G, Rosing J, Hemker HC. The role of phospholipid and factor VIIIa in the activation of bovine factor X. J Biol Chem. 1981; 256: 3433-42.
6. Svendsen L, Brogli M, Lindeberg G, Stocker K. Differentiation of thrombin- and factor Xa-related amidolytic activity in plasma by means of a synthetic thrombin inhibitor. Thromb Res. 1984; 34: 457-62.
7. Fickenscher K. Analysis of individual coagulation factors. In: Thomas L ed. Clinical Laboratory Diagnostics. Frankfurt: TH-Books Verlagsgesellschaft, 1998; 607-9.
8. Tran TH, Zuehlke U, Hauert J, et al. Influence of heparin on factor VIII (FVIII) assay. Thromb Haemost. 1987; 58: 341 (Abstract).

Определение символов

	Не использовать повторно	YYYY-MM-DD	Срок годности
LOT	Номер партии	REF	Каталожный номер
	Внимание, обратитесь к сопроводительным документам		Производитель
EC REP	Уполномоченный представитель в Европе	Σ	Содержит достаточное количество реагентов для анализов
	Биологическая опасность	IVD	Медицинское устройство для диагностики *In Vitro*
	Температурные ограничения		См. инструкцию по пользованию
NON STERILE	Нестерильно	CE	Символ CE
CONTENTS	Содержание	→	Объем восстановленного раствора
LEVEL	Уровень		Беречь от солнечных лучей

Actin, BCS и Dade являются товарными знаками компании Siemens Healthcare Diagnostics.

© 2009 Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH.

Все права защищены.

Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH
Emil-von-Behring-Str. 76
35041 Marburg/Germany

Siemens Healthcare Headquarters
Siemens Healthcare GmbH
Henkestraße 127
91052 Erlangen/Германия
Phone: +49 9131 84-0
siemens.com/healthcare