

CRYOcheck™ IVD FACTOR II DEFICIENT PLASMA

Plasma déficient pour le test
de coagulation de facteur II

CRYOcheck™

Factor Deficient Plasmas

FACTOR II DEFICIENT PLASMA

Intended Use

CRYOcheck Factor II Deficient Plasma is recommended for use as a deficient substrate in clot-based factor II assays using the one-stage prothrombin time (PT).

Summary and Principle

Deficiencies in coagulation factors may have congenital or acquired etiologies and can compromise *in vivo* hemostasis¹. Factor II (prothrombin) is a single-chained glycoprotein with a molecular weight of 72,000 Da and is important for both intrinsic and extrinsic coagulation². Plasma samples deficient in coagulation factor II exhibit a prolonged PT and activated partial thromboplastin time (APTT). Factor II deficiency is commonly diagnosed through the use of a modified PT assay. When a patient sample is mixed with factor II deficient plasma, the degree of correction of the PT is proportional to the level of factor II in the patient plasma³.

Reagents

CRYOcheck Factor II Deficient Plasma consists of normal citrated human plasma, which has been depleted of factor II by immunoadsorption. The plasma is then buffered with HEPES buffer, aliquoted, and rapidly frozen. Factor II has been assayed at less than 1% of normal levels by both functional and antigenic methods. Other factors have been assayed and results are provided on the Quality Control Certificate that accompanies each lot number.



All blood products should be treated as potentially infectious. Source material from which this product was derived was found to be negative when tested in accordance with current FDA required tests. No known test methods can offer assurance that products derived from human blood will not transmit infectious agents. Accordingly, these human blood based products should be handled and discarded as recommended for any potentially infectious human specimen⁴.

Storage and Handling

When stored at -40 to -80°C, CRYOcheck Factor II Deficient Plasma is stable to the end of the month indicated on the product packaging.

Thaw each vial at 37°C (± 1°C) in a waterbath. **The use of a dry bath or heating block for thawing is not recommended.** Thawing times are important and should be strictly adhered to. The use of a timer is recommended. Refer to the Thawing Table for recommended thawing times based on aliquot size. Allow thawed plasma to acclimate to room temperature (18 to 25°C) and invert gently prior to use.

Thawing Table	
Aliquot Size	37°C (± 1°C) Waterbath
1.0 mL	4 minutes
1.5 mL	5 minutes

CRYOcheck Factor II Deficient Plasma may be used for up to eight hours after thawing, if capped in the original vial and maintained at 2 to 8°C. Allow refrigerated plasma to acclimate to room temperature (18 to 25°C) and invert gently prior to use. **Thawed material should be discarded after eight hours and should not be refrozen.**

Availability

Product	Catalog #	Format
Factor II Deficient Plasma	FDP02-10	25 vials x 1.0 mL
	FDP02-15	25 vials x 1.5 mL

Instruments

Each lab should prepare the local instrument in accordance with the manufacturer's instructions for use.

Procedure

After thawing and preparing CRYOcheck Factor II Deficient Plasma, use in accordance with established laboratory procedures for the quantitative assessment of factor II.

Materials Provided

- CRYOcheck Factor II Deficient Plasma

Materials Required but not Provided

- Waterbath capable of maintaining 37°C (± 1°C)
- Assay reagents
- Owren's Veronol Buffer or equivalent
- Coagulation instrument or assay system
- Calibration plasma (e.g. CRYOcheck Normal Reference Plasma)
- Quality control material (e.g. CRYOcheck Reference Control Normal, CRYOcheck Abnormal 1 Reference Control, CRYOcheck Abnormal 2 Reference Control)
- 2 cycle log-log graph paper
- Plastic test tubes (e.g. 12 x 75 mm)
- Sample cups
- Plastic disposable pipettes
- Volumetric pipette
- Timer

Standard Curve Preparation

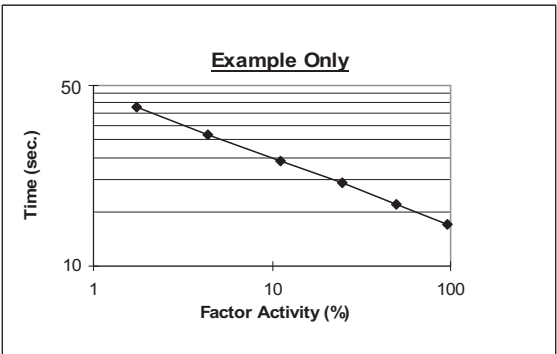
Methods may vary according to instrumentation used. Consult the instrument manufacturer's instruction manual for recommended factor assay (extrinsic) protocols.

- Prepare assay reagents, calibration plasma, and buffer according to manufacturer's directions.
- Make serial dilutions of calibration plasma from 1:10 to 1:320 in buffer as follows:

Tube No.	Volume of Buffer	Volume of Calibration Plasma	Dilution	% Factor
1	1.8 mL	0.2 mL calibration plasma	1:10	100
2	1.0 mL	1.0 mL of Tube No. 1	1:20	50
3	1.0 mL	1.0 mL of Tube No. 2	1:40	25
4	1.0 mL	1.0 mL of Tube No. 3	1:80	12.5
5	1.0 mL	1.0 mL of Tube No. 4	1:160	6.25
6	1.0 mL	1.0 mL of Tube No. 5	1:320	3.12

*Note: This is an **example only** of a serial dilution profile prepared using calibration plasma with a factor II level of 100%. Always be sure to utilize the lot-specific factor II level of the calibration plasma in use. If using CRYOcheck Normal Reference Plasma, refer to the lot-specific Assay Certificate.*

- Pre-warm thromboplastin to 37°C (± 1°C).
- To a coagulation reaction cuvette, add 0.1 mL of CRYOcheck Factor II Deficient Plasma and 0.1 mL of Tube No. 1 (100% of factor). Mix and incubate according to manufacturer's directions.
- Add 0.2 mL of pre-warmed thromboplastin and simultaneously initiate the clot timer. Record clotting time in seconds.
- Repeat steps 4 and 5 for Tube No.'s 2 to 6.
- On log-log graph paper plot clotting times in seconds (y-axis) vs. % of factor II activity (x-axis).
- Construct the standard curve by drawing the best straight line fit through the plots.



Specimen Collection and Preparation

Patient samples should be collected into 105 - 109 mmol/L sodium citrate dihydrate anticoagulant (3.2%) in a ratio of 9 parts blood to 1 part anticoagulant. Patient plasma is derived by centrifugation at 1500 x g for 15 minutes and should be tested within four hours of collection when maintained at 2 to 4°C in accordance with CLSI guidelines⁵.

Assay Procedure

- Prepare a 1:10 dilution of patient plasma with buffer.
- Repeat steps 3 through 5 of Standard Curve Preparation, substituting diluted patient plasma for diluted calibration plasma.
- Read the percent factor II activity from the standard curve by finding the point where the clotting time intercepts the curve, then reading the percent factor II activity off the x-axis.
- Further dilutions of patient plasma may be prepared and tested to confirm the value.

Quality Control

Each laboratory should establish its own quality control (QC) ranges using acceptable statistical methods. These QC ranges may then be used to monitor and validate the integrity of the test system⁶. For all coagulation tests, the laboratory must include at least two levels of control for every eight hours of operation and any time a change in reagents occurs⁷.

Results

Factor II activity values recovered below the normal range may be indicative of a factor II deficiency (congenital or acquired). Each laboratory should establish its own normal range for factor II activity in accordance with CLSI guidelines⁸.

Limitations of the Procedure

When proper control values are not obtained, assessment of each component of the test system including reagents, control plasmas, instrumentation and operator technique must be undertaken in order to ascertain that all other components are functioning properly⁹.

Expected Values

Expected values may vary according to reagent, instrument and technique employed. It is recommended each laboratory establish its own normal range for factor II activity.

Performance Characteristics

Refer to the Quality Control Certificate for clotting factor specifications with each lot number of CRYOcheck Factor II Deficient Plasma. When used according to recommended methods, results are subject to the limitations of the assay system (i.e. reagents, instrument) in use.

PrecisionBioLogic

CRYOcheck™

FACTOR II DEFICIENT PLASMA Plasma déficient pour le test de coagulation de facteur II

Intérêt du Coffret

Le CRYOcheck Factor II Deficient Plasma est recommandé pour l'évaluation de l'activité du facteur II par la méthode de dosage du temps de prothrombine (TP) nécessitant l'emploi d'un plasma dépourvu de facteur II.

Résumé et Principe

Les déficiences en facteur de coagulation peuvent avoir des origines congénitales ou acquises et peuvent compromettre le processus de l'hémostase *in vivo*¹. Le facteur II est une glycoprotéine dont le poids moléculaire est voisin de 72 000 Da environ. Il est nécessaire pour la voie intrinsèque et extrinsèque de la coagulation². Les plasmas déficients en facteur II ont un temps coagulation en présence de thromboplastine calcique allongé. Une déficience en facteur II est couramment diagnostiquée au travers le dosage d'un TP modifié où tous les facteurs sont présents et en excès à l'exception du facteur II apporté successivement par les plasmas dilués du témoin et des malades. Dans ces conditions, le degré de correction du TP est proportionnel au niveau de facteur II dans le plasma du patient³.

Réactifs

Le CRYOcheck Factor II Deficient Plasma consiste en un pool de plasmas normaux humains citrates, qui a été dépourvu de facteur II par immuno-adsorption, tamponné avec de l'HEPES, aliquote et congelé rapidement. Le CRYOcheck Factor II Deficient Plasma a été validé comme ayant moins de 1% du taux normal, évaluations effectuées à la fois en méthodes fonctionnelles et antigéniques. Les autres facteurs ont été dosés et les résultats sont consignés sur le certificat de contrôle de qualité qui accompagne chaque numéro de lot.



Tous les produits sanguins doivent être traités comme potentiellement infectieux. Les matières dont ils dérivent, ont été testées suivants les directives imposées par la FDA. Cependant, aucune méthode connue ne peut offrir l'assurance que les produits dérivés du sang humain ne transmettent pas d'agents infectieux. En conséquence, ces produits issus de sang humain doivent être manipulés et détruits comme préconisés pour tout échantillon potentiellement infectieux⁴.

Conservation et préparation du réactif

Ce plasma est stable s'il est conservé congelé entre -40 et -80°C, jusqu'à la fin du mois de la date de péremption indiquée sur l'emballage.

Décongeler chaque flacon à 37°C (±1°C) dans un bain-marie. **L'utilisation d'un bain sec ou d'un bloc chauffant pour la décongélation n'est pas recommandée.** Les temps de décongélation sont importants et doivent être rigoureusement respectés, un chronomètre est recommandé. Se référer aux tables de décongélation basées sur la taille des aliquotes. Laisser les plasmas décongelés se stabiliser à 18 à 25°C et retourner doucement avant utilisation.

Table de Décongélation	
Taille de l'aliquote	Bain-marie à 37°C (± 1°C)
1.0 ml	4 minutes
1.5 ml	5 minutes

Ce plasma doit être utilisé dans les huit heures suivant la décongélation, s'il est conservé dans son flacon d'origine, à 2 à 8°C. **Le produit décongelé doit être détruit après huit heures et ne pas être recongelé.**

Disponibilité

Produit	Référence	Présentation
Factor II Deficient Plasma	FDP02-10	25 flacons de 1.0 ml
	FDP02-15	25 flacons de 1.5 ml

Instruments

Chaque laboratoire doit préparer les instruments nécessaires stipulés dans les instructions du fabricant.

Procédure

Après décongélation et préparation du *CRYOcheck* Factor II Deficient Plasma, utilisez, comme décrit, les procédures établies au laboratoire pour des dosages quantitatifs du facteur II.

Matériel fourni

- *CRYOcheck* Factor II Deficient Plasma

Matériels requis mais non fournis

- Bain-marie (37°C ± 1°C)
- Réactifs de dosage du TP
- Tampon Owren-Koller ou équivalent
- Instrument de coagulation ou système de dosage
- Plasma de calibration (ex. *CRYOcheck* Normal Reference Plasma)
- Matériel de contrôle qualité (ex. *CRYOcheck* Reference Control Normal, *CRYOcheck* Abnormal 1 Reference Control, *CRYOcheck* Abnormal 2 Reference Control)
- Pipettes plastiques
- Chronomètre
- Papier Log-Log
- Tubes à essai en plastique
- Tasses à échantillon
- Pipette volumétrique

Préparation des courbes standards

La méthode peut varier selon les instruments utilisés. Consulter le manuel d’instructions du fabricant d’instrument pour les protocoles de dosages de facteurs.

Dans la mesure du possible, tous les essais seront réalisés simultanément.

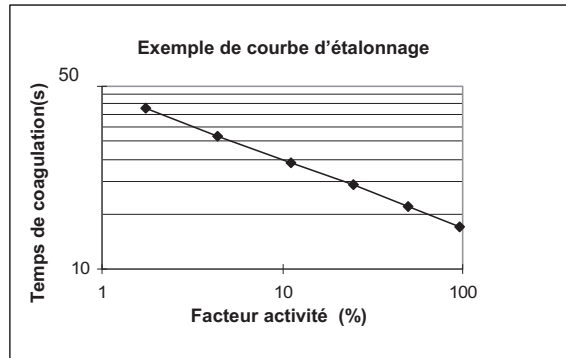
1. Préparer les réactifs de dosage, les plasmas de calibration et les tampons selon les directives du fabricant.
2. Faire une série de dilutions du plasma de calibration du 1/10^{ème} au 1/320^{ème} dans du tampon Owren-Koller comme suit (la dilution au 1/10^{ème} correspond au taux de base):

N° Tubes	Volume de tampon	Volume de plasma de calibration	Dilution	% Facteur
1	1.8 ml	0.2 ml du plasma de calibration	1/10	100
2	1 ml	1 ml du tube 1	1/20	50
3	1 ml	1 ml du tube 2	1/40	25
4	1 ml	1 ml du tube 3	1/80	12.5
5	1 ml	1 ml du tube 4	1/160	6.25
6	1 ml	1 ml du tube 5	1/320	3.12

Note: Il ne s'agit ici que d'un exemple de dilutions en série préparées avec le plasma de calibration avec un taux de facteur II de 100%. Toujours s'assurer d'utiliser le lot correspondant au taux de facteur II du plasma de calibration utilisé. Pour le plasma CRYOcheck Normal Reference Plasma, voir le Certificat d'analyse sur le lot utilisé.

3. Préchauffer la thromboplastine calcique à 37°C (± 1°C).
4. Ajouter 0.1 ml de *CRYOcheck* Factor II Deficient Plasma à la cuvette de réaction de coagulation et 0.1 ml du tube 1 (100%). Mélanger et incuber suivant les instructions du fabricant.
5. Ajouter 0.2 ml de thromboplastine calcique préchauffé et simultanément commencer la mesure du temps de coagulation. Enregistrer ce temps en secondes.

6. Répéter les étapes 4 et 5 pour les tubes 2 à 6.
7. Tracer sur papier log-log les temps obtenus sur l’axe des y et le % du taux de facteur II sur l’axe des x.
8. Construire la courbe standard en traçant la meilleure droite passant par tous les points.



Prélèvement et préparation

Les prélèvements du sang de patients doivent être collectés sur une solution anticoagulante de citrate trisodique (3.2%) de concentration 105 - 109 mmol/l dans un ratio de 9 volumes de sang pour 1 volume d’anticoagulant. Le plasma de patient est obtenu par centrifugation à 1500 x g pendant 15 minutes et doit être testé quatre heures après le prélèvement quand il est maintenu à 2 à 4°C comme convenu dans les instructions du CLSI².

Procédure de dosage

1. Préparer une dilution au 1/10 du plasma du patient avec du tampon Owren-Koller.
2. Répéter les étapes 3 à 5 de la Préparation de la courbe standard, en substituant le plasma de calibration dilué par celui du patient.
3. Lire le pourcentage d’activité du facteur II à partir de la courbe standard en joignant le point où le temps de coagulation intercepte la courbe, on lit alors le pourcentage d’activité du facteur II sur l’axe des x.
4. Plusieurs dilutions du plasma du patient peuvent être préparées et testées afin de confirmer cette valeur.

Contrôle de qualité

Chaque laboratoire doit établir ses propres normes de contrôle qualité utilisant des méthodes statistiques acceptables. Ces normes doivent être utilisées afin de contrôler et de valider l’intégrité des systèmes de test⁶. Pour tous les tests de coagulation, le laboratoire doit inclure au moins deux niveaux de contrôle toutes les huit heures et en aucun cas, un changement de réactifs ne doit intervenir⁷.

Résultats

Les valeurs d’activité du facteur II trouvées en dessous de la normale peuvent indiquer une déficience en facteur II (congénitale ou acquise). Chaque laboratoire doit établir sa propre gamme pour l’activité du facteur II en accord avec les instructions du CLSI⁸.

Limites de la Méthode

Quand des valeurs attendues des contrôles ne sont pas conformes, le contrôle de chaque composant du système de mesure (réactifs, plasmas de contrôle, instrument et techniques opératoires) doit être effectué afin de s’assurer que tous les composants sont fonctionnellement corrects⁹.

Valeurs Attendues

Les valeurs attendues peuvent varier suivant les lots de réactifs, les instruments et les techniques employées. Il est recommandé à chaque laboratoire d’établir sa propre gamme normale d’activité du facteur II.

Performances

Se référer au certificat de contrôle de qualité pour les spécifications des facteurs de la coagulation pour chaque numéro de lot de *CRYOcheck* Factor II Deficient Plasma. Quand ils sont utilisés selon les méthodes préconisées, les résultats sont soumis aux limitations propres liées au système de dosage utilisé.

Bibliography / Bibliographie

1. Biggs R. Human blood coagulation, haemostasis and thrombosis 3rd ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications; 1984.
2. Halkier T. Mechanisms in blood coagulation, fibrinolysis, and the complement system. Cambridge: Cambridge University Press; 1991.
3. Triplett DA, Smith C. Routine testing in the coagulation laboratory. In: Triplett DA, editor. Laboratory evaluation of coagulation. Illinois: ASCP Press; 1982. p. 28-51.
4. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories 4th ed. Centers for Disease Control and Prevention / National Institutes of Health, 1999.
5. Collection, transport, and processing of blood specimens for coagulation testing and general performance of coagulation assays, CLSI, H21-A3. 1998.
6. Cembrowski GS, Carey RN. Laboratory quality management. Chicago: ASCP Press; 1989.
7. CLIA 1988 – Code of Federal Regulations, 42CFR493.1253, 1998.
8. Determination of Factor Coagulant Activities, CLSI, H48A. 1997.
9. Gilmer PR. Preanalytical variables in coagulation testing. In: Triplett DA, editor. Laboratory evaluation of coagulation. Illinois: ASCP Press; 1982. p. 1-8.

European Authorized Representative (Regulatory affairs only)
Emergo Europe Molenstraat 15, 2513 BH The Hague, The Netherlands
Tel: (+31) 70 345 8570 Fax: (+31) 70 346 7299



Symbols used / Symboles utilisés

09.60.00019

Rev. 09 February / février 2011



In vitro diagnostic medical device

Dispositif médical de diagnostic *in vitro*



Batch code

Désignation du lot



Use by

Date de péremption



Temperature limitation

Températures limites de conservation



Biological risks

Risque biologique



Manufacturer

Fabricant



Authorized representative

Mandataire