



#### Vorsichtsmaßnahmen:

- Um die Stabilität zu erhöhen, müssen die Reagenzien nach jedem Gebrauch mit der Original-Schraubkappe verschlossen werden (weiße Kappen für R1A, R1B und R2, gelbe Kappe für R3, weiße Kappe für Puffer R4 und blaue Kappe für Cal).
- Um jegliche Kontamination während des Gebrauchs zu vermeiden, sind die Reagenzien mit entsprechender Sorgfalt zu behandeln.
- Eine Gelbfärbung des Substrates deutet auf Kontamination hin. Die betroffene Flasche muss verworfen und eine neue Flasche verwendet werden.
- Die Inkubation der rekonstituierten Reagenzien bei Raumtemperatur dient deren Stabilisierung und homogenen Reaktivität.
- Während der Verwendung der Reagenzien soll Verdunstung (z.B. durch Einsatz von Reduzierkappen) möglichst verhindert werden.

#### Anmerkung:

- Die Flaschen von R1A, R1B, R2 und R3 werden unter Vakuum verschlossen. Die Verschlüsse sind vorsichtig zu entfernen, um einen Verlust von Lyophilisat beim Öffnen zu vermeiden.
- Entsprechend der verwendeten Automatenmethode kann es zu Abweichungen der Rekonstitutionsvolumina der Reagenzien von den empfohlenen Rekonstitutionsvolumina kommen. In jedem Fall müssen jedoch die festgelegten reaktiven Verhältnisse (entsprechende Reagenzkonzentrationen im Testansatz) zwischen R1A, R1B, R2 und R3 genau eingehalten werden.
- Es dürfen ausschließlich Reagenzien aus Testpackungen mit übereinstimmender Chargennummer verwendet werden. Zur Testdurchführung dürfen keine Reagenzien aus Testpackungen mit unterschiedlichen Chargennummern eingesetzt werden. Die Kombination der Reagenzien R1A, R1B und R2 ist in Bezug auf die jeweilige Charge optimiert.

#### TESTDURCHFÜHRUNG:

BIOPHEN® Faktor XIa wurde als automatisierte, kinetische Methode entwickelt, kann jedoch ebenso als manuelle Endpunktmethode durchgeführt werden. Adaptionvorschriften für die verschiedenen Automaten sind auf Anfrage erhältlich. Der Test wird unter Temperaturkontrolle bei 37°C durchgeführt und die Farbentwicklung bei 405 nm gemessen.

#### KALIBRATION:

Unter Verwendung des in der Testpackung enthaltenen FXIa-Kalibrators (mit 2,0 ml Aqua dest. rekonstituiert) mit der Konzentration ‚C‘ (chargenabhängig, in der Regel etwa 5,0 ng/ml bzw. 50 mAU/ml) werden folgende Kalibratorverdünnungen hergestellt:

Faktor XIa-Konzentration (ng/ml bzw. mAU/ml)	C	C/2	C/4	C/8	0
Vol. Faktor XIa-Kalibrator (C)	1 ml	0,5 ml	0,25 ml	0,125 ml	0 ml
Vol. Tris-BSA-Puffer (R4)	0 ml	0,5 ml	0,75 ml	0,875 ml	1 ml

Zur vollständigen Homogenisierung vorsichtig mischen.

Die Kalibratorverdünnungen sind für mindestens 4 Stunden bei Raumtemperatur (18-25°C) stabil.

Die Kalibration kann ebenso mit Faktor XIa-Referenzmaterialien durchgeführt werden. Das Referenzmaterial wird mit R4 Puffer auf einen Gehalt von ‚C‘ (etwa 5 ng/ml bzw. 50 mAU/ml) Faktor XIa verdünnt um daraus anschließend die Kalibratorverdünnungen herzustellen.

Für die Bestimmung in Faktor XI-Konzentration muss die Probe mit R4 Puffer verdünnt werden, um eine erwartete Faktor XIa-Konzentration von <5,0 ng/ml bzw. 50 mAU/ml FXIa in der Probe zu erhalten. Die gemessene Konzentration muss dann noch mit den Verdünnungs- und Vorverdünnungsfaktoren multipliziert werden (z.B. x10, wenn die Probe 1:10 mit R4 Puffer vorverdünnt wurde).

Um optimale Testgenauigkeit zu gewährleisten und den Abbau von Faktor XIa zu verhindern, dürfen die verdünnten Kalibrationslösungen erst kurz vor der Testdurchführung hergestellt werden.

#### Proben und Kontrollen:

Proben oder Konzentrate müssen mit R4 Puffer so verdünnt werden, dass die FXIa-Konzentration bei ≤5 ng/ml (50 mAU/ml) liegt. Da der Test in Anwesenheit von Calcium (R2) durchgeführt wird, ist darauf zu achten, dass die Proben (wurden diese auf Citrat oder Na<sub>2</sub>EDTA abgenommen) ausreichend verdünnt werden, damit das Calcium in der Testdurchführung nicht stört. Alternativ kann das Calcium in der Probe mit divalenten Anionen in passender Konzentration neutralisiert werden.

#### TESTDURCHFÜHRUNG:

##### Manuelle Methode:

Der Testansatz erfolgt entweder auf der Mikrotiterplatte oder in Plastikröhrchen, vorinkubiert auf 37°C:

Reagenzien	Mikrotiterplatte	Teströhrchen
Kalibratorverdünnung, verdünnte Proben oder Kontrollen	50 µl	200 µl
R1A: Faktor X-VIII:C	50 µl	200 µl
R1B: Faktor IX	50 µl	200 µl
Mischen und 2 Minuten bei 37°C inkubieren, dann zugeben:		
R2 : Aktivierungsreagenz	50 µl	200 µl
Mischen und 2 Minuten bei 37°C inkubieren, dann zugeben:		
R3: Substrat SXa-11, bei 37°C vorinkubiert	50 µl	200 µl
Mischen und für exakt 5 Minuten bei 37°C inkubieren		
Stoppen der Reaktion durch Zugabe von:		
Zitronensäure (2%) oder Essigsäure (20%)	50 µl	200 µl
Mischen und die Absorption bei 405nm gegen einen Probenleerwert messen.		

Die Gelbfärbung ist für 2 Stunden stabil.

Der Probenleerwert wird durch Mischung der Reagenzien in umgekehrten Reihenfolge wie bei den Proben erzeugt, d.h.: Zitronensäure (2%), Substrat SXa-11, verdünnte Probe, R2, R1B, R1A.

Die Absorption wird bei 405 nm (A405) gemessen und anschließend der Probenleerwert des Testes um A405-Wert subtrahiert.

##### Kinetische Methode:

Der Test kann auch als kinetische Methode durchgeführt werden. In diesem Fall wird die Änderung der Absorption im Bereich von 10 bis 100 Sekunden nach Zugabe des Substrates aufgezeichnet. Die Subtraktion der Probenleerwerte und das Stoppen der Reaktion sind bei der kinetischen Methode nicht erforderlich. Die Ergebnisse werden anhand der Änderung der Absorption (ΔA405) der Kalibratoren und Proben berechnet.

##### Automatisierte Methoden:

Adaptionvorschriften für die verschiedenen Automaten sind auf Anfrage erhältlich. Der Test wird dann kinetisch durchgeführt. Das Stoppen der Reaktion ist nicht erforderlich und die Probenleerwerte werden automatisch subtrahiert. Gerätespezifisch Applikationsvorschriften sind verfügbar.

#### Anmerkung:

- Falls die verwendete Methode andere Reagenzienvolumina als die oben beschriebenen erfordert, müssen die Verhältnisse der Reagenzienkonzentrationen und Reagenzienvolumina genau eingehalten werden, um den Erhalt der Leistungsmerkmale des Testes zu gewährleisten.
- Bei Proben, deren Färbung von der gewöhnlichen Färbung abweicht, ist ein Probenleerwert durchzuführen.

#### QUALITÄTSKONTROLLE:

Die Qualitätskontrolle kann mit internen oder kommerziell erhältlichen Kontrolllösungen durchgeführt werden, deren Faktor XIa-Gehalt bestimmt wurde. Die Messung von Qualitätskontrollen ermöglicht eine Validierung der Kalibration und die Überprüfung der gleichbleibenden Qualität von Analysenlauf zu Analysenlauf und von Serie zu Serie bei Verwendung derselben Reagenziencharge.

Die Kalibration ist gültig, wenn die gemessenen Kontrollwerte innerhalb des angegebenen Bereichs liegen. Jedes Labor sollte seine eigenen Akzeptanzbereiche festlegen in Abhängigkeit der exakten Arbeitsbedingungen und für jede neue Kontrollcharge.

#### Anmerkung:

- Eine neue Kalibrationskurve muss bei Wechsel der Testkitcharge, größeren Wartungsarbeiten am Messgerät und wenn die gemessenen Werte außerhalb des zu erwartenden Bereiches liegen, erstellt werden.
- Jedes Labor kann, entsprechend der verwendeten Testvorschriften und Geräte, eigene Vertrauensbereiche festlegen.
- Bei jeder Testserie ist eine Qualitätskontrolle (mit unterschiedlichen Werten) zu inkludieren.

#### ERGEBNISSE:

Bei der Endpunktmethode wird die Faktor XIa-Konzentration (ng/ml bzw. mAU/ml) auf der x-Achse (Abszisse) gegen die korrespondierende Absorption (A405) auf der y-Achse (Ordinate) im bilogarithmischen Maßstab aufgetragen. Die Faktor XIa-Konzentration der Probe kann direkt an der Kalibrationskurve abgelesen werden. Die Ergebnisse werden als ng/ml oder mAU/ml Faktor XIa angegeben.

Alternativ kann eine Statistiksoftware zur Ermittlung der Kalibrationskurve verwendet werden.

Nach dem Zeichnen der Kalibrationskurve wird r<sup>2</sup> ermittelt. Die Kalibration ist gültig, wenn r<sup>2</sup> ≥ 0,98 ist und die gemessenen Kontrollen innerhalb des angegebenen Bereichs liegen. Alternativ kann die Akima-Auswertung für die Kalibrationskurve verwendet werden (die Kalkulation von r<sup>2</sup> ist dann nicht möglich).

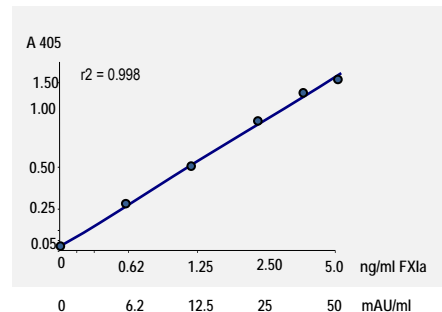
Bei abweichenden Probenverdünnungen muss die gemessene Faktor XIa-Konzentration der Probe mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor multipliziert werden, um die Faktor XIa-Konzentration in der Probe zu erhalten.

Die Ergebnissberechnung bei der kinetischen Methode erfolgt entsprechend, durch Auftragung der ΔA405-Werte anstelle der A405-Werte.

Bei der automatisierten Durchführung werden die Ergebnisse der Proben entsprechend der gemessenen Kalibrationskurve und der Probenverdünnung automatisch berechnet.

#### BEISPIELKALIBRATION:

Bei der gezeigten Kalibrationskurve handelt es sich lediglich um ein Beispiel, das mit der manuellen Endpunkt-Methode gemessen wurde. Zur Bestimmung der Faktor XIa-Konzentration darf ausschließlich eine, zusammen mit der jeweiligen Analysenserie gemessene, Kalibrationskurve verwendet werden.



#### RÜCKFÜHRBARKEIT AUF REFERENZMATERIALIEN:

Die Faktor XIa-Konzentration des Faktor XIa-Kalibrators, der in der Testpackung enthalten ist, wurde exakt gegen einen Internen Referenzstandard bestimmt, der gegen das NIBSC Referenzreagenz für Faktor XIa (11/236) validiert wurde.

#### LEISTUNGSMERKMALE:

Der Test ermöglicht Faktor XIa Bestimmungen bis 5 ng/ml bzw. 50 mAU/ml in der gemessenen Verdünnung.

Die Nachweisgrenze des Testes wird an der Kalibrationskurve durch Messung des scheinbaren Faktor XIa-Gehalts einer Faktor XIa-freien Probe bestimmt und berechnet sich als der mittlere A405-Wert dieser Probe plus 3 x Standardabweichung. Diese Nachweisgrenze liegt bei <0,10 ng/ml (1,0 mAU/ml).

Einschränkungen des Tests: Um die optimale Testgenauigkeit zu erhalten müssen sowohl die angeführten Arbeitsbedingungen sowie die angegebene Temperatur von 37°C exakt eingehalten werden.

#### ALLGEMEINE EIGENSCHAFTEN UND BIOCHEMIE:

Die normale FXI-Konzentration in Humanplasma liegt bei etwa 3 bis 7 ng/ml. Faktor XI (FXI) ist ein in der Leber synthetisiertes Protein mit einer molekularen Masse von ca. 160 kDa, das aus, mit Disulfidbrücken verbundenen, Dimeren mit identischen Polypeptidketten besteht. FXI liegt im Plasma als Zymogen vor, wird jedoch durch Aktivierung (durch FXIIa, Thrombin oder Autoaktivierung) zu einer trypsinähnlichen Serinprotease, die in der Kontaktpase an der Blutgerinnung beteiligt ist. Faktor IX wird von Faktor XIa unter Anwesenheit von Calcium, Thrombin und Phospholipiden zu Faktor IXa aktiviert und bildet einen aktiven Komplex mit Faktor VIII:C, der in der Folge Faktor X zu FXa aktiviert. Ein FXI Mangel ist eine autosomale Funktionsstörung, die in bestimmten Situationen wie operativen Eingriffen oder Zahnextraktionen mit erhöhtem Blutungsrisiko einhergeht. Patienten können mit FXI Präparaten oder Konzentraten behandelt werden. Patienten, die FXI Inhibitoren entwickeln, können mit rekombinantem FVIIa behandelt werden.

#### REFERENZEN:

Non WHO Reference Material, NIBSC Reference Reagent for activated Blood Coagulation Factor XI (FXIa), human; NIBSC code 11/236