

**BIOPHEN™ Faktor XIII****REF 227005****R1 3 x 4 mL, R2 3 x 5 mL**

Vertrieb und Support:
CoaChrom Diagnostica GmbH
 www.coachrom.com | info@coachrom.com
 Tel. +43-1-236 222 1 | Fax +43-1-236 222 111
 Kostenfreie Nummern für Deutschland:
 Tel. 0800-24 66 33-0 | Fax 0800-24 66 33-3

Chromogener Test zur Bestimmung der Faktor XIII-Aktivität

VERWENDUNGSZWECK:

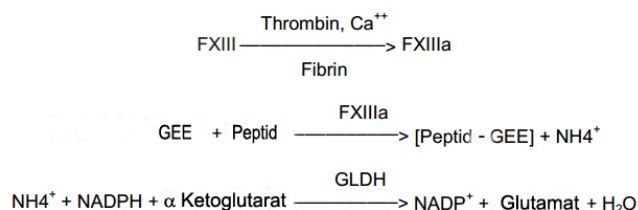
BIOPHEN™ Faktor XIII ist ein chromogener Test zur quantitativen Bestimmung der Faktor XIII-Aktivität in humanem Citratplasma.

ZUSAMMENFASSUNG:

Faktor XIII (FXIII) Pro-Transglutaminase zirkuliert als A₂B₂ Tetramer im Plasma, wobei die A-Untereinheit die funktionale Form ist. Bei Aktivierung durch Thrombin und Calcium zu FXIIIa trägt es zur Fibrinvernetzung und Stabilisierung des Gerinnsels im letzten Schritt der Gerinnungskaskade bei. Ein FXIII-Mangel kann angeboren oder durch erhöhten Verbrauch oder das Vorhandensein von Autoantikörpern erworben sein. Niedrige FXIII-Spiegel werden mit Blutungskomplikationen in Situationen wie Trauma oder Operationen assoziiert. FXIII ist auch in anderen Prozessen wie Wundheilung und Erhaltung einer Schwangerschaft beteiligt.^{1,2,3} Die Bestimmung der FXIII-Aktivität in humanem Plasma hilft bei der Diagnose eines angeborenen oder erworbenen FXIII-Mangels.

TESTPRINZIP:

FXIII wird in der Probe durch Thrombin in Anwesenheit von Calcium in den aktivierten FXIII (FXIIIa) umgewandelt.⁴ Während das lösliche Fibrin, das ebenfalls durch Thrombinaktivität gebildet wird, die Reaktion beschleunigt, verhindert ein Anti-Polymerisationspeptid die Gerinnungsbildung. Die FXIIIa-Transglutaminase-Aktivität zwischen einem synthetischen Peptidsubstrat und Glycineylester (GEE) führt zur Bildung von Ammoniak (NH₄⁺). In Gegenwart von Ammoniak und Alpha-Ketoglutarat wandelt die Glutamat-Dehydrogenase (GLDH) NADPH zu NADP⁺ um. Diese Umwandlung kann bei 340 nm gemessen werden. Die Absorptionsabnahme bei 340 nm ist proportional zur FXIII-Konzentration der Probe.



IM KIT ENTHALTENE REAGENZIEN:

R1 Thrombin-Reagenz

3 Flaschen mit je 4 mL, lyophilisiert. Enthält Rinderserumalbumin.

R2 Nachweis-Reagenz

3 Flaschen mit je 5 mL, lyophilisiert. Enthält Rinderserumalbumin und Glycine Ethylester Hydrochlorid (GEE).

ANMERKUNGEN UND WARNHINWEISE:

- Produkte biologischen Ursprungs müssen mit den erforderlichen Vorsichtsmaßnahmen und als potentiell infektiös gehandhabt werden.
- Das Produkt enthält Substanzen tierischen Ursprungs und muss als potentieller Träger und Überträger von Krankheiten behandelt werden.
- Bei Entsorgung sind die lokalen Entsorgungsrichtlinien zu befolgen.
- Nur Reagenzien aus Packungen mit identischer Chargennummer verwenden.
- Die Reagenzien sind sorgfältig zu handhaben, um jegliche Kontamination während des Gebrauchs zu vermeiden. Die Verdunstung ist während des Reagenzgebrauchs durch Verringerung der Verdunstungsfläche so gering wie möglich halten. Verdunstung verringert die Reagenzstabilität in Analysenautomaten.
- Um die Stabilität zu gewährleisten, müssen die Reagenzflaschen nach jedem Gebrauch mit der Original-Schraubkappe verschlossen werden.
- Stabilitätsstudien für 3 Wochen bei 30°C haben gezeigt, dass die Packungen ohne Beeinträchtigung bei Raumtemperatur versendet werden können.
- Zur in-vitro-Diagnostik

R2 GEE: H318: Ruft schwere Augenschäden hervor.

VORBEREITUNG UND STABILITÄT DER REAGENZIEN:

Die Flaschen sind unter Vakuum verschlossen. Die Gummistopfen sind vorsichtig zu öffnen, um einen Verlust an Reagenz zu vermeiden.

R1 Reagenz 1: Thrombin-Reagenz

Braune Flasche. Den Inhalt jeder Flasche mit exakt 4 mL aqua dest. rekonstituieren und bis zur vollständigen Auflösung des Inhalts gut durchmischen, wobei Schaumbildung zu vermeiden ist. Für 30 Minuten bei Raumtemperatur (18-25°C) stabilisieren lassen und dabei gelegentlich schütteln. Den Inhalt vor jedem Gebrauch homogenisieren.

R2 Reagenz 2: Nachweis-Reagenz

Transparente Flasche. Den Inhalt jeder Flasche mit exakt 5 mL aqua dest. rekonstituieren und bis zur vollständigen Auflösung des Inhalts gut durchmischen, wobei Schaumbildung zu vermeiden ist. Für 30 Minuten bei Raumtemperatur (18-25°C) stabilisieren lassen und dabei gelegentlich schütteln. Den Inhalt vor jedem Gebrauch homogenisieren.

Stabilität der in der Originalflasche gelagerten, geöffneten Reagenzien **R1** und **R2** unter der Voraussetzung, dass diese nicht kontaminiert wurden und keine Verdunstung erfolgte:

- 1 Woche bei 2-8°C
- 48 Stunden bei Raumtemperatur (18-25°C).
- 2 Monate bei ≤ -20°C*

* Kann einmalig gefroren und aufgetaut werden (so schnell wie möglich einfrieren). Bei 37°C auftauen, wobei die Dauer an die Volumina anzupassen ist. Die Stabilität des aufgetauten Reagenzes ist unter den Arbeitsbedingungen des jeweiligen Labors zu prüfen.

LAGERUNG:

Ungeöffnete Reagenzien müssen bei 2-8°C in der Originalverpackung gelagert werden und sind dann bis zu dem auf der Verpackung aufgedruckten Verfalldatum stabil.

ERFORDERLICHE MATERIALIEN, DIE NICHT IM KIT ENTHALTEN SIND:

Reagenzien:

- aqua dest.
- Physiologische Kochsalzlösung (0,9% NaCl)
- Kalibrations- und Kontrollplasmen mit bekannter FXIII-Konzentration (rückführbar auf den Int. Standard für FXIII im Plasma) wie z.B.:
 - BIOPHEN™ Kalibrationsplasma Gerinnung, Art.Nr. 222101
 - BIOPHEN™ Kontrollplasma Gerinnung „Normal“, Art.Nr. 223201
 - BIOPHEN™ Kontrollplasma Gerinnung „Abnormal“, Art.Nr. 223301

Geräte:

- Analysenautomat zur Bestimmung chromogener Teste mit Wellenlänge 340 nm
- Geeichte Pipetten, Kunststoffröhrchen

PROBENGWINNUNG:

Die Gewinnung und Lagerung der Proben hat gemäß aktueller lokaler Vorschriften zu erfolgen (Vorschriften für die Probengewinnung, -handhabung und -lagerung sind im CLSI-Dokument H21-A5 veröffentlicht)⁵.

- **Proben:** Humanes Plasma mit Tri-Natrium Citrat als Antikoagulant.
- **Blutabnahme:** Blut (9 Volumenteile) wird vorsichtig in 0,109 M Citrat als Antikoagulant (1 Volumenteil) abgenommen. Die Blutabnahme erfolgt durch Venenpunktion, wobei jegliche Gerinnungsaktivierung vermieden werden muss. Das erste Röhrchen ist zu verwerfen.
- **Zentrifugation:** Die Herstellung von plättchenarmem Plasma hat innerhalb von 2 Stunden nach Blutabnahme gemäß einem validierten, laborspezifischen Verfahren zu erfolgen, z.B. durch Zentrifugation bei Raumtemperatur (18-25°C) für 15 Minuten bei 2500g. Das Plasma wird anschließend in ein Kunststoffröhrchen überführt.
- **Lagerung** der Plasmaproben bis zu⁴:
 - 8 Stunden bei Raumtemperatur (18-25°C).
 - 2 Monate tiefgefroren bei -20°C oder
 - 6 Monate tiefgefroren bei -70°C

Gefrorene Plasmaproben sollten bei 37°C aufgetaut, gut durchmischt und dann sofort getestet werden. Jegliche Ablagerungen sind durch gründliches Mischen sofort nach dem Auftauen und vor dem Testen zu resuspendieren.

TESTDURCHFÜHRUNG:

Der Testkit BIOPHEN™ Faktor XIII wurde spezifisch als kinetische Methode zur Durchführung auf Automaten mit einem 340 nm Filter entwickelt. Der Test ist bei einer Temperatur von 37°C durchzuführen.

Automatisierte Methoden:

Anleitungen für Analysenautomaten sind auf Anfrage erhältlich. Die gerätespezifische Adaptionsanleitung und Warnhinweise sind zu beachten.

Testmethode:

1) Kalibratoren und Kontrollen gemäß deren Packungsbeilage vorbereiten. Zur Vorbereitung der Kalibrationskurve den Kalibrator mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnen.

Kalibrator % FXIII	C (100%)	C:2 (50%)	C:4 (25%)	C:8 (12,5%)	0 (0%)
Menge Kalibrator	500 µL	250 µL	125 µL	60 µL	0 µL
Menge physiolog. Kochsalzlösung	0 µL	250 µL	375 µL	420 µL	500 µL

Den Punkt 3C / 2 (oder 150% bei gepooltem Normalplasma) erhält man durch Hinzupipettieren von 30 µL Kalibrator und 10 µL physiologischer Kochsalzlösung (s. unten stehendes Applikationsbeispiel).

2) Die Kalibrationskurve ist zu erstellen und mittels Qualitätskontrollen zu überprüfen. Es sind die genauen Konzentrationen der Kalibratoren und Kontrollen zu beachten, die für das jeweilige Lot auf dem im Kit enthaltenen Zertifikat vermerkt sind.

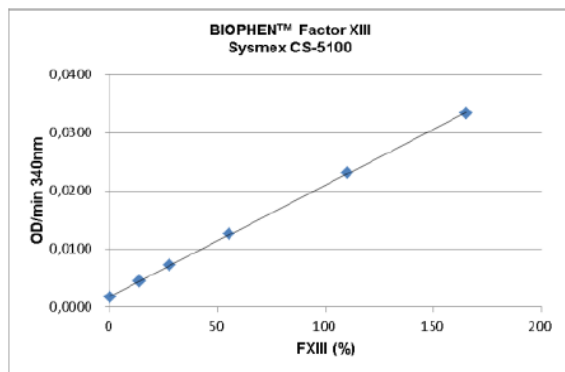
3) Die folgende Tabelle zeigt ein Applikationsbeispiel (CS-Serie). In ein bei 37°C inkubiertes Kunststoffröhrchen nach folgendem Schema hinzufügen (direkt durch den Gerinnungsautomaten durchgeführt):

Reagenz	Menge
Proben, Kalibrator oder Kontrolle	20 µL
Physiologische Kochsalzlösung	20 µL
R1 Thrombin-Reagenz, präinkubiert bei 37°C	80 µL
Mischen und exakt 110 Sekunden bei 37°C inkubieren, dann zugeben:	
R2 Nachweis-Reagenz, präinkubiert bei 37°C	100 µL
Mischen, bei 37°C inkubieren, Messen der Absorption (kinetische Methode) (OD)/min bei 340 nm zwischen 200 und 500 Sekunden.	

Falls die verwendete Methode andere Reagenzvolumina als die oben beschriebenen erfordert, müssen die Verhältnisse der Reagenzkonzentrationen und Reagenzvolumina genau eingehalten werden, um eine optimale Testleistung zu gewährleisten. Der Anwender ist für die Validierung jeglicher Änderungen und deren Auswirkungen auf die Ergebnisse verantwortlich.

KALIBRATION:

Der BIOPHENTM Faktor XIII Test kann für die Messung der FXIII-Aktivität im Plasma kalibriert werden. Im linearen Maßstab ist der Test von 5 bis 150% FXIII linear (Sysmex CS-5100, bei Standardverdünnung). Die nachfolgend gezeigte Kalibrationskurve dient lediglich als Beispiel. Zur Ergebnisberechnung von Proben darf ausschließlich die für die jeweilige Analysenserie gemessene Kalibrationskurve verwendet werden.



QUALITÄTSKONTROLLE:

Die Verwendung von Qualitätskontrollplasmen ermöglicht bei Verwendung der gleichen Reagenzchargen die Validierung der Methodenkonformität und der homogenen Reaktivität des Tests von Analyse zu Analyse. Gemäß guter Laborpraxis ist bei jeder Testserie eine Qualitätskontrolle zu inkludieren, um die generierten Ergebnisse zu überprüfen. Zumindest bei Chargenwechsel, Wartungsarbeiten am Analysenautomaten oder wenn die Kontrollen außerhalb des Vertrauensbereiches liegen, muss eine Neukalibration erfolgen. Jedes Labor sollte die Richtigkeit der Zielwerte und Akzeptanzbereiche unter den eigenen Testbedingungen überprüfen.

ERGEBNISSE:

- Die Kalibrationskurve wird in Lin-Lin-Skala erstellt, indem die FXIII-Konzentration (in %) auf der x-Achse gegen die korrespondierende Absorption (OD/min) auf der y-Achse aufgetragen wird.
- Sofern die Standardverdünnung verwendet wird, wird die FXIII-Konzentration in der Probe direkt von der Kalibrationskurve abgelesen.
- Die Ergebnisse werden in % angegeben.
- Die Ergebnisse sind anhand des klinischen und biologischen Zustandes des Patienten zu interpretieren.

EINSCHRÄNKUNGEN DES TESTES:

- Um eine optimale Testleistung zu gewährleisten und die Spezifikationen zu erfüllen, sollten die technischen Anweisungen von HYPHEN BioMed sorgsam beachtet werden. Für die Validierung jeglicher Änderungen dieser Anweisungen ist das Labor verantwortlich.
- Jegliches Reagenz mit unüblicher Erscheinung oder Anzeichen von Kontamination muss verworfen werden.
- Jegliche Plasmen, die Gerinnsel oder Anzeichen für Kontaminationen aufweisen, sind zu verwerfen.
- Bzgl. einer möglichen Beeinflussung der Messung ist die gerätespezifische Adaptionanleitung zu beachten. Auf dem Sysmex CS-5100 wurde keine Beeinflussung durch Heparin bis zu 2 IE/mL, Bilirubin bis zu 60 mg/dL, Hämoglobin bis zu 250 mg/dL, Intralipide bis zu 250 mg/dL, Ammonium bis zu 0,5 mM und Fibrinogen zwischen 0,8 und 6 g/L beobachtet. Proben mit hoher FXIII-Konzentration können vorverdünnt werden, die gemessenen Konzentrationen sind dann mit dem Verdünnungsfaktor zu multiplizieren.

ERWARTETE WERTE:

Der Referenzbereich wurde bei gesunden, erwachsenen Personen (n=120) zwischen 60 und 146% ermittelt. Jedes Labor sollte seinen eigenen Normalbereich bestimmen.

LEISTUNGSMERKMALE:

- Die untere Grenze ist durch das verwendete Analysensystem definiert (Sysmex CS-5100: 0,5%).
- Bei der Sysmex CS-Serie beträgt der Messbereich etwa 5 bis 300% FXIII.
- Leistungsstudien wurden intern unter Einsatz einer Reagenzcharge auf dem Sysmex CS-5100 durchgeführt. Sie wurden mittels Qualitätskontrollen des Labors über einen Zeitraum von 5 Tagen ausgewertet mit 2 Testserien pro Tag und innerhalb einer Serie für jedes Kontrollniveau dreifach. Die folgenden Daten wurden erhalten:

Kontrolle	Intra-Assay				Inter-Assay			
	n	Mittelwert	VK%	SD	n	Mittelwert	VK%	SD
Normal	40	102,3	2,7	2,8	30	102,6	1,5	1,5
Abnormal	40	28,8	4,9	1,4	30	31,2	1,9	0,6

REFERENZEN:

1. Menegatti *et al.*, Minimal factor XIII activity level to prevent major spontaneous bleeds. J Thromb Haemost, 15:1728-1736, 2017.
2. Komaromi *et al.*, Factor XIII, novel structural and functional aspects. J Thromb Haemost 2011; 9:9-20.
3. Schroeder V, Kohler HP. New developments in the area of factor XIII. J Thromb Haemost 2013; 11: 234-44.
4. Karpati L. *et al.* A modified, optimized kinetic photometric assay for the determination of blood coagulation factor XIII activity in plasma. Clin Chem. 2000.
5. CLSI Document H21-A5: "Collection, transport, and processing of blood specimens for testing plasma-based coagulation assays and molecular hemostasis assays; approved guideline". 2008.

SYMBOLE:

Verwendete Symbole und Zeichen sind in der ISO-Norm 15223-1 gelistet. Das der Packung beiliegende Symbolerklärungs-Blatt ist zu beachten.