



BIOPHEN™ Factor XIII

Ref 227005

R1 3 x 4 ml R2 3 x 5 ml

Chromogenní metoda pro stanovení Faktoru XIII.



www.hyphen-biomed.com

155, rue d'Eragny
95000 NEUVILLE SUR OISE
FRANCE
Tel. : +33 (0)1 34 40 65 10
Fax : +33 (0)1 34 48 72 36
info@hyphen-biomed.com

Revize: 11/2017

POUŽITÍ:

BIOPHEN™ Faktor XIII je chromogenní metoda určená pro In Vitro kvantitativní stanovení Faktoru XIII v lidské citrátové plazmě.

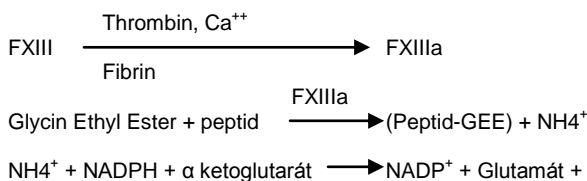
SOUHRN:

Faktor XIII (FXIII) protransglutamináza cirkuluje v plazmě jako A₂B₂ tetramer, podjednotka A je funkční formou. Po aktivaci thrombinem s vápníkem na FXIIIa zprostředkuje tento faktor poslední krok v koagulační kaskádě a zpevňuje koagulum. Deficit FXIII může být vrozený nebo získaný – jako důsledek nadměrné konzumpce nebo přítomnosti autoprotilátek. Nízké hladiny FXIII jsou spojeny s krvácivými komplikacemi např. při traumatech nebo chirurgických výkonech. FXIII je také součástí různých procesů jako je hojení ran a udržení těhotenství^{1,2,3}.

Test na aktivitu FXIII v lidské plazmě mohou pomoci při stanovení diagnózy vrozeného nebo získaného deficitu.

PRINCIP:

Faktor XIII (FXIII) v testovaném vzorku je převeden na aktivní FXIIIa (FXIIIa) thrombinem za přítomnosti kalcia⁴. Solubilní fibrin, vznikající též touto interakcí reakci urychluje, zatímco anti-polymerizační peptid brání tvorbě koagula. FXIIIa transglutaminasová aktivita mezi syntetickým peptidovým substrátem a ethylesterem glycinu (GEE) vede k tvorbě amoniaku (NH₄⁺). Amoniak se pak testuje reakcí glutamátdehydrogenázy (GLDH), která konvertuje NADPH na NADP⁺, v přítomnosti amoniaku a alfa-ketoglutarátu. Konverze NADPH na NADP⁺ může být detekována při 340 nm a směrnice klesající křivky absorbance při 340 nm je přímo úměrná koncentraci FXIII v testovaném vzorku.



REAGENCIE:

R1: Thrombinová reagencie: lyofilizovaný, obsahuje BSA
3 lahvičky po 4 ml

R2: Detekční reagencie: lyofilizovaný, obsahuje BSA a GEE
3 lahvičky po 5 ml.

UPOZORNĚNÍ A VAROVÁNÍ:

- S produkty biologického původu musí být zacházeno s opatrností, jako s potenciálně infekčními.
- Tento materiál obsahuje složky zvířecího původu a musí s ním být zacházeno jako s možným přenašečem infekce.
- Odpadní materiál zlikvidujte dle lokálních směrnic o zacházení s odpadem
- Reagencie nejsou zaměnitelné mezi šaržemi. Pro testování užívejte pouze reagencie z kitů o stejné šarži
- S reagencie zacházejte opatrně, aby nedošlo ke kontaminaci během používání. Pokud je možné, snižte odpar reagencie zmenšením plochy kontaktu reagencie se vzduchem. Odpařování snižuje stabilitu reagencie v analyzátoru.
- Pro zajištění dostatečné stability uzavírejte lahvičky jejich vlastními zátkami.
- Stabilitní studie trvající 3 týdny při 30°C prokázaly, že reagencie může být přepravována za pokojové teploty po krátký čas bez jejího poškození.
- Pouze pro použití In Vitro.

R2: GEE - H318 – může způsobit vážné poškození očí.

PŘÍPRAVA A STABILITA:

Reagencie jsou lyofilizovány ve vakuu v jejich vlastních lahvičkách. Vyvarujte se ztráty lyofilizátu při otevírání lahvičky s lyofilizovanou reagentií. Zátku odstraňte opatrně.

R1 Thrombinová reagencie

Hnědá lahvička. Rekonstituujte obsah lahvičky přesně 4 ml destilované vody a poté promíchejte, dokud se obsah plně nerozpustí. Při míchání se vyvarujte napěnění reagentie. Nechte stabilizovat za pokojové teploty (18-25°C) po dobu 30 minut za občasného promíchání.

Před použitím promíchejte.

Stabilita reagentu po otevření, pokud je v originální lahvičce a je zabráněno jakémukoliv odpařování a kontaminaci během použití:

- 1 týden v 2-8°C
- 48 hodin za pokojové teploty (18-25°C)
- 2 měsíce zamrazený na -20°C nebo méně

R2 Detekční reagencie

Světlá lahvička. Rekonstituujte obsah lahvičky přesně 5 ml destilované vody a poté promíchejte, dokud se obsah plně nerozpustí. Při míchání se vyvarujte napěnění reagentie. Nechte stabilizovat za pokojové teploty (18-25°C) po dobu 30 minut za občasného promíchání.

Před každým použitím opět promíchejte.

Stabilita reagentu po otevření, pokud je v originální lahvičce a je zabráněno jakémukoliv odpařování a kontaminaci během použití:

- 1 týden v 2-8°C
- 48 hodin za pokojové teploty (18-25°C)
- 2 měsíce zamrazený na -20°C nebo méně

Zamrazené reagencie rozpouštějte co nejrychleji při 37°C, dobu rozpouštění přizpůsobte objemu reagentie. Stabilita takto rozmrazené reagentie by měla být zkontrolována v konkrétních laboratorních podmínkách. Rozmrazenou reagentii znovu nemrazte.

SKLADOVÁNÍ:

Neotevřené reagencie musí být skladovány v teplotě 2-8°C, v jejich originálních obalech v krabičkách. Pak jsou stabilní až do data expirace vytištěného na obalu.

REAGENCIE POTŘEBNÉ, V KITU NEPŘÍTOMNÉ:

Reagencie:

- Destilovaná voda
- Fyziologický roztok (0,9% NaCl)
- Plazmatické kalibrátory se známou koncentrací FXIII s návazností na mezinárodní standard pro FXIII v plazmě.

Materiál:

Spektrofotometr nebo automatický přístroj pro chromogenní testy s vlnovou délkou 340 nm
Stopy, Kalibrované pipety, plastové zkumavky

ODBĚR VZORKU A PŘÍPRAVA:

Příprava a skladování vzorku musí být provedeno ve shodě s lokálními předpisy (v USA CLSI H21-A5¹¹ pro další informace týkající se zacházení se vzorkem, jeho odběrem a skladováním).

Vzorek:

Lidská citrátová plazma.

Odběr vzorku:

Krev (9 dílů) musí být odebrána do 0,109 M citrátového antikoagulantu (1 díl), přímou venepunkcí s velkou opatrností – pro zabránění aktivace a uvolnění PF4, který je potenciálním inhibátorem heparinu. Lze použít i speciální odběrové zkumavky s CTAD (citrát, Theophyllin, Adenosin, Dipyridamol). První odebraná zkumavka by měla být znehodnocena.

Centrifugace:

Centrifugace, nutná k oddělení plazmy od destiček pro získání plazmy chudé na destičky. Použijte validovanou metodu centrifugace, například 15 minut při 2500g za pokojové teploty (18-25°C) a plazmu přeneste do plastové zkumavky.

- **Skladování plazmy⁴:**
 - 8 hodin při pokojové teplotě (18-25°C)
 - 2 měsíce při -20°C
 - 6 měsíců při -70°C

Plazma by měla být rozmrazena rychle při teplotě 37°C a poté promíchána. Jakékoliv precipitáty v rozmrazené plazmě by měly být před testováním rozmíchány.

PROVEDENÍ:

Souprava je určena pro kinetickou metodu. Test je měřen při 37°C a rozvoj změn barvy je měřen při **340 nm**.

Automatizované metody:

Adaptace pro různé systémy jsou dostupné na vyžádání. Aplikace na přístroje CS-serie je k dispozici u lokálního distributora.

Metodika:

1. Rekonstruuje kalibrátory a kontroly dle jejich příbalových letáků a poté naředte dle níže uvedené tabulky. Pro přípravu kalibrační řady ředte kalibrátor fyziologickým roztokem, aby bylo možné kalibrovat v rozmezí 0 až 150%. Ředění kalibrátorů a kontrol v poměru **1:2** ve fyziologickém roztoku je vstupním ředěním a odpovídá 100% normální poolované plazmy, nebo C% FXIII komerčního kalibrátoru.

Kalibrátor %FXIII	C	C:2	C:4	C:8	0
Objem kalibrátoru	500µl	250 µl	125 µl	60 µl	0 µl
Objem FR	0 µl	250 µl	375 µl	420 µl	500 µl

Bod 3C/2 (nebo 150% při použití poolované plazmy) se získá přidáním 30 µl kalibrátoru a 10 µl FR v tabulce níže.

2. Sestavte kalibrační křivku a ověřte správnost kontrolními plazmami. Přesné hodnoty kalibrátoru a kontrol jsou uvedeny na letáčích přiložených ke kitům.

3. Tabulka níže ukazuje schema pro aplikaci na koagulometr CS serie. Pipetování dle následující tabulky do zkumavek předehřátých na 37°C (zajišťuje analyzátor):

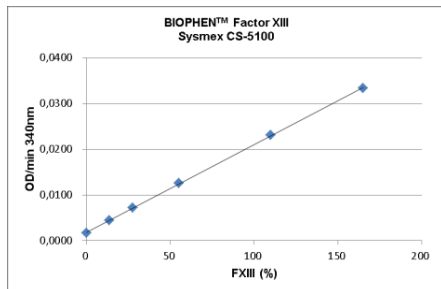
	Objem
Testovaná plazma, kalibrátor nebo kontroly	20 µl
Fyziologický roztok (FR)	20 µl
R1 : Thrombinový reagent Předehřátý na 37°C	80 µl
Promíchat a inkubovat v 37°C 110 sec , potom přidat	
R2 : Detekční reagent, předehřátý na 37°C	100 µl
Promíchat a inkubovat v 37°C, měření (kinetická metoda) optické hustoty OD/min při 340 nm mezi 200 a 500 sekundou	

Pokud jsou použity jiné reakční objemy než výše uvedené, je nutné dodržet striktně poměr objemů reagentů pro správnost provedení. Uživatel je zodpovědný za validaci každé změny v provedení testu, která může ovlivnit výsledek.

KALIBRACE:

BIOPHENTM Factor XIII může být kalibrován pro stanovení aktivity FXIII v plazmě. Při použití lineárního výpočtu je test lineární od 5 do 150% FXIII na přístroji Sysmex CS-5100 ve standardním ředění.

Kalibrační křivka uvedená níže byla získána na přístroji Sysmex CS5100, a je pouze příkladem. Kalibrační křivka musí být znovu provedena při každé sérii testů.



KONTROLA KVALITY:

Užití kontrolních plazem umožňuje ověření kalibrační křivky stejně tak jako homogenity reaktivity testu mezi sériemi při použití stejné šarže reagentů. Začleňte kontrolu kvality do každé série testů dle doporučení správné odborné laboratorní práce. Nová kalibrace musí být provedena nejméně pro každou novou šarži reagentů, po každé významné opravě či údržbě přístroje, nebo když výsledek kontrol je mimo přijatelné meze. Každá laboratoř by si měla definovat přijatelné rozmezí pro vlastní analytický systém.

VÝSLEDKY:

- Na analyzátoru Sysme CS serie je pro kalibraci použit výpočet Lin-Lin s OD/min při 340 nm na ose Y a koncentrací FXIII na ose X.
- Koncentrace FXIII v testovaném vzorku je přímo odečtena z kalibrační křivky, pokud je použito standardní ředění.
- Výsledky jsou vyjádřeny v %
- Výsledek by měl být interpretován ve shodě s pacientovým klinickým stavem a biologickými podmínkami.

LIMITY:

- Pro optimální průběh testu by měly být dodrženy technické instrukce validované výrobcem Hyphen-BioMed. Laboratoř je odpovědná za validaci změn, které provedla v těchto instrukcích.
- Reagent jeví neobvyklý vzhled nebo známky kontaminace nesmí být použit.
- Vzorek neobvyklého vzhledu nebo jeví známky kontaminace musí být vyřazen z testování.
- Možné interferenční vlivy jsou uvedeny ve specifické aplikaci pro analyzátor. Pro Sysmex CS5100 nebyly pozorovány vlivy pro koncentraci Heparinu do 2 IU/ml, bilirubinu do 60 mg/dl, hemoglobinu do 250 mg/dl, intralipis do 250 mg/dl, amoniak do 0,5 mM a fibrinogen od 0,8 do 6 g/l. Při vysokých koncentracích FXIII je nutné použít přídatné ředění (např. 1:3) a výsledek pak musí být násoben tímto dilučním faktorem.

OČEKÁVANÉ HODNOTY:

Referenční meze byly stanoveny měřením zdravých osob (n=120) za použití analyzátoru Sysmex CS-5100, 95 percentil – 60 až 146%. Přesto by si každá laboratoř měla určit normální rozmezí dle lokálních laboratorních podmínek.

CHARAKTERISTIKA:

- Mez detekce je závislá na analytickém systému. Pro Sysmex CS-5100 je 0,5%
- Na přístrojích Sysmex CS serie je měřící rozsah 5 až 300% FXIII.
- Charakteristiky přesnosti provedené na 1 šarži reagentů na analyzátoru Sysmex CS-5100 s použitím kontrolního materiálu probíhaly po 5 dní, 2 série měření denně v tripletech pro každou měřenou hladinu.

Kontrola	Intra assay				Inter assay			
	n	Prům	CV%	SD	n	Prům	CV%	SD
Normální	40	102,3	2,7	2,8	30	102,6	1,5	1,5
Patologická	40	28,8	4,9	1,4	30	31,2	1,9	0,6

REFERENCE:

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.

SYMBOLY:

Použité symboly jsou dle ISO 15223-1 standardu.