



Factor XI Deficient Plasma

ADP070A / #ADP070K

Deficient plasma for the assay of Factor XI with a clotting assay

For in vitro diagnostic use only

Diagnostic in vitro exclusivement



Manufactured By: HYPHEN BioMed

Last revision / Dernière version: 14/01/2010

ENGLISH

Intended use:

The kit is proposed for the measurement of Factor XI (FXI or factor Rosenthal) activity in human citrated plasma using a clotting method, in the presence of cephalin, activator and calcium (APTT reagent).

Assay principle:

The method is a clotting assay where all the clotting factors are present (constant and in excess, brought by the deficient plasma), excepted for FXI, which is brought by the diluted tested plasma, and clotting is triggered with cephalin, activator and calcium (APTT). FXI is the limiting factor and clotting time is inversely proportional to the concentration of FXI. There is an inverse linear relationship, on a bilogarithmic graph paper, between the FXI concentration and the corresponding clotting time.

Assay specimen:

Human plasma obtained from Trisodium Citrate anticoagulated blood.

Reagents:

1 vial of 1 ml (#ADP070A) or 6 vials of 1 ml (#ADP070K) of citrated human plasma, deficient for Factor XI, immuno-depleted, lyophilized in the presence of glycine and stabilizers. This plasma is deficient for FXI (<1%), whereas all the other coagulation factors are within about the normal range (> 50%).

Reagents and material required, but not supplied:

- Pipettes with dispensing volumes of 20 µl, 50 µl and 100 µl; or with a variable dispensing volume from 50 µl to 1,000 µl.
- Semi-automatic or automatic coagulation instrument, or fibrometer or electromagnetic water bath; stop watch.
- Distilled water.
- Calcium chloride 0.025M (ex AAR001A/AAR001K)
- Owren Koller buffer (ex AAR003A/AAR003K).
- Normal human citrated plasma pool or Factor XI calibrator.
- Normal and Abnormal quality control plasmas, titrated for Factor XI.
- aPTT reagent (cephalin).

Reagent preparation and stability:

In the original package, and before any use, when stored at 2-8°C, the reagent is stable until the expiration date printed on the kit.

Reagent Preparation:

Restore the vial with 1 ml of distilled water; mix gently until complete dissolution of the content (vortex), let for 15 min. at room temperature (18-25°C); homogenize before each use.

Reagent stability following reconstitution:

- When opened and protected from any contamination, the reconstituted plasma is stable for:
 - 8 hours at room temperature (18-25°C)
 - 24 hours at 2-8°C
 - 2 months, frozen at -20°C or below, in its original vial, or in a plastic tube (before use, thaw in a water bath at 37°C, for at least 15 min).

Note: Plasmas used for the Deficient Plasma preparation were tested with registered methods and found negative for HIV antibodies, HBs Ag and HVC antibodies. However, no assay may warrant the total absence of infectious agents. Any product of human origin must then be handled with all the required cautions, as being potentially infectious. Note: The stability studies at 30°C show that the reagent can be shipped at room temperature without damage.

Sample collection and preparation:

Blood (9 vol.) must be collected on 0.109M trisodium citrate anticoagulant (1 vol.); plasma supernatant is decanted following a 20 min. centrifugation at 2,500 g; citrated plasma must be tested within 4 hours when stored at room temperature (20-25°C).

Refer to GEHT or NCCLS/CLSI guidelines for further instructions on specimen collection, handling and storage. Discard any sample with an unusual aspect.

Protocol:

Calibration curve:

Prepare 2 ml of normal citrated human pooled plasma diluted 1:10 in Owren Koller buffer (eg 200µl of pool + 1800µl of buffer). By definition, this ten fold dilution of the normal citrated human plasma pool corresponds to a concentration of 100% of FXI. Using this preparation, the calibration curve is obtained as follows:

XI	12.5%	25%	50%	100%
Dilution*	1:80	1:40	1:20	1:10
Plasma pool 1:10	0.125 mL	0.250 mL	0.500 mL	1 mL
Owren Koller Buffer	0.875 mL	0.750 mL	0.500 mL	0 mL

*Complementary dilutions (2 step serial dilutions from the 1:80) could be used when high accuracy is required for the low range (≤10%).

The calibration curve must be used within 2 hours at room temperature (18-25°C).

FRANCAIS

Utilisation :

Le coffret est proposé pour la détermination de l'activité du Facteur XI (FXI ou facteur Rosenthal) présent dans le plasma humain citraté. C'est une méthode coagulante, en présence de céphaline, activateur et calcium (réactif TCA).

Principe :

La technique proposée est basée sur une méthode de coagulation où tous les facteurs sont présents (constants et en excès, apportés par le plasma déficient), à l'exception du FXI, qui est apporté par le plasma à tester, dilué, et la coagulation est initiée par la céphaline, l'activateur et le calcium (réactif TCA). Le FXI est alors le facteur limitant. Le temps de coagulation obtenu avec le test est inversement proportionnel à la concentration de FXI. Il en résulte une relation linéaire inverse, en coordonnées bilogarithmiques, entre la concentration en FXI et le temps de coagulation correspondant.

Echantillon :

Plasma humain prélevé sur anticoagulant citraté.

Réactifs :

1 flacon de 1 ml (ADP070A) ou 6 flacons de 1 ml (ADP070K) de plasma humain citraté, déficient en Facteur XI, immuno-déplété, lyophilisé en présence de glycine et de stabilisants. Ce plasma est déficient pour le FXI de la coagulation (<1%), tandis que tous les autres facteurs sont sensiblement dans la zone normale (> 50%).

Matériel nécessaire et non fourni :

- Pipettes à volume fixe de 20 µl, 50 µl et 100 µl, et variable de 50 µl à 1000 µl.
- Appareils de coagulation semi-automatiques ou automatiques, fibromètre ou Bain-Marie électromagnétique le cas échéant; chronomètre.
- Eau distillée.
- Chlorure de calcium 0,025M (ex AAR001A/AAR001K)
- Tampon Owren Koller (ex. AAR003A/AAR003K).
- Pool de plasma humain citraté normal ou calibrateur titré en FXI.
- Plasmas de contrôle Normal et Anormal titrés en FXI.
- Réactif TCA (céphaline).

Préparation, conservation et stabilité des réactifs :

Dans l'emballage d'origine, et avant toute utilisation, conservé à 2-8°C, le réactif est stable jusqu'à la date d'expiration indiquée sur le coffret.

Préparation :

Reconstituer le réactif avec 1 ml d'eau distillée, homogénéiser jusqu'à dissolution complète du contenu (vortex), et laisser stabiliser pendant au moins 15 min. à température du laboratoire (18-25°C). Agiter délicatement pour homogénéiser totalement le réactif, avant chaque utilisation.

Stabilité du réactif après reconstitution :

Après ouverture, et protégé de toute contamination, le plasma ainsi reconstitué est stable :

- 8 heures à température ambiante (18-25°C)
- 24 heures à 2-8°C
- 2 mois, conservé congelé à -20°C ou moins, dans son flacon d'origine ou dans un tube plastique (avant utilisation, le décongeler pendant 15min dans un bain-marie à 37°C).

Nota: Les plasmas utilisés pour la préparation de ce réactif ont été testés par des méthodes enregistrées et sont certifiés exempts pour l'anticorps VIH, le Hbs Ag et l'anticorps VCH. Toutefois, aucune méthode ne permettant d'exclure totalement le risque d'agent pathogène, ces produits doivent être manipulés avec toutes les précautions requises pour l'utilisation de produits potentiellement infectés.

Prélèvement :

Le sang (9 vol.) doit être prélevé sur du citrate trisodique 0.109M (1 vol.); le plasma est obtenu par décantation du surnageant après 20 min. de centrifugation à 2,500 g.

Le plasma citraté doit être utilisé : dans les 4 heures s'il est maintenu à température du laboratoire (20-25°C).

Se référer aux recommandations du GEHT ou du NCCLS/CLSI pour toute instruction complémentaire sur la collecte, le traitement et le stockage des échantillons. Rejeter tout échantillon suspect.

Protocole :

Gamme d'étalonnage :

Préparer 2 ml de pool de plasma normal citraté dilué au 1:10 en tampon Owren Koller (ex : 200µl de pool + 1800µl de tampon). Par définition, la dilution au 1:10 de pool de plasma normal citraté correspond à la concentration de 100% de FXI. Utiliser cette dilution au 1:10 pour préparer la gamme d'étalonnage suivante :

XI	12.5%	25%	50%	100%
Dilution*	1:80	1:40	1:20	1:10
Pool de plasma 1:10	0,125 mL	0,250 mL	0,500 mL	1 mL
Tampon Owren Koller	0.875 mL	0.750 mL	0.500 mL	0 mL

*dilutions supplémentaires possibles (rythme 2 à partir de la dilution 1/80) pour une meilleure précision pour les valeurs ≤10% .

La gamme d'étalonnage ainsi préparée est stable pendant 2 heures à température du laboratoire.

D.750.08/DP/070A/K



6580 Gove Court - Mason, OH 45404

Phone: 513.770.1991

Toll Free: 866.783.3797

Fax: 513.573.9241

Email: info@aniara.com

www.aniara.com

• **Preparation of tested plasma:**

Tested plasma must be **diluted 1:10** with Owren Koller type buffer. The diluted plasma must be tested within 2 hours.

Caution : to ensure optimal performances of the assay, perform all assays (calibration, samples, controls) extemporaneously and successively without interruption

• **Assay:**

Manual Method:

In a test tube, or a cuvette, introduce:

- 100 µl of FXI deficient Plasma.
- 100 µL of calibration solution or of tested plasma diluted **1:10**.

Incubate for 1 min. at 37°C, and then introduce:

- 100 µL of aPTT reagent (cephalin)

Incubate for exactly 3 min. at 37°C, and then introduce (starting the stop watch):

- 100 µl of Calcium Chloride 0.025M preincubated at 37°C.

Record the clotting time.

Automatic Method:

The assay can be used with the semi-automatic or automatic instruments, such as STA-R, KC-4, KC-10, BCT, BCS, etc...

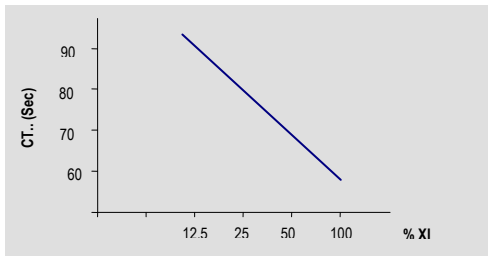
The usual program used for testing the factors involved in the coagulation pathway with a clotting based activated partial thromboplastin time method, and a specific deficient plasma, can be applied. The respective specimen and reagent volume ratios indicated for the manual method must be strictly respected. Usually, with automatic methods the volumes used for reagents and tested plasma (diluted 1:10) are half those recommended for the normal method.

With semi automatic or automatic instruments, especially those with a photometric detection of clot formation, clotting times use to be slightly shorter than with the manual method.

Expression of results:

On a bilogarithmic graph paper, plot on abscissae the FXI concentrations and on ordinates the corresponding clotting times. On the calibration curve obtained, interpolate directly the corresponding FXI concentration for the tested plasma.

Example of Calibration curve: This calibration curve is indicated as an example only. It was obtained with CEPHEN from HYPHEN BioMed, using the STAR instrument.



QUALITY CONTROL:

The control is performed using commercially available control plasmas, titrated for FXI activity.

Use of quality control plasmas allows validating the calibration curve, as well as the homogeneous reactivity of the assay from run to run, and from series to series, when using a same lot of reagents.

CAUTIONS AND LIMITATIONS:

- Sampling must be performed with great care, avoiding any blood activation. Discard any plasma presenting an unusual aspect, or any sign of activation or clotting.
- It is recommended to perform all assays of fresh calibration points, specimen and controls successively without interruption, to obtain optimal performances of the assay.
- For a better accuracy, samples measured ≤10% can be tested at the 1:5 dilution, and obtained results divided by 2; for samples measured >100% (or C%), the 1:20 dilution can be used and obtained results multiplied by 2.
- For a deficient sample: check the result by testing if necessary the 1:5 dilution (the obtained concentration must then be divided by 2), and/or another sample and/or method for the patient plasma; check potential associated factor(s) deficiency.
- Thrombin inhibitors present in the tested sample may lead to an underestimation of the FXI concentration

Normal values:

Normal values for Factor XI activity are usually > 60%.

Applications:

- The reagent is proposed for measuring Factor XI activity, by clotting assay.
- Lyophilized, human citrated plasma, deficient for FXI, for any in vitro protocol or research study where a source of human FXI deficient plasma is required.

Assay variations:

The clotting times observed for this assay are obtained with eg CEPHEN reagent from HYPHEN BioMed. They are expected <100 seconds for the 100% FXI concentration. The obtained clotting times and assay performances can vary according to the cephalin reagent type and lot, and the instrument and protocol used in the laboratory. Performances, as well as target values and acceptance ranges for each new lot of quality controls used, and the normal range, must then be confirmed (and adjusted if necessary) in the exact laboratory working conditions.

References:

1. D. Gailani, T. Renné. The intrinsic pathway of coagulation: a target for treating thromboembolic disease? J Thromb Haemost 2007 5 (6), 1106–1112.
2. Andrew M, Paes B, Milner R, Hohnston M, Mithell L, Tollefsen DM, Powers P. Development of the human coagulation system in the full-term infant. Blood 1987; 70: 165-172.
3. Abrégés "Hémorragies et thromboses – Du Diagnostic au traitement", Samama et coll. Masson, 2004.

• **Plasmas à tester :**

Diluer le plasma au **1:10** en tampon type Owren Koller. Le plasma dilué doit être utilisé dans les 2 heures.

Précaution : dans la mesure du possible, pour obtenir les performances optimales du dosage, tous les essais (gamme, échantillons et contrôles) seront réalisés extemporanément et simultanément.

• **Test :**

Méthode Manuelle :

Préincuber

Dans un tube à hémolyse, ou une cuvette réactionnelle, introduire:

- 100 µl de Plasma Déficient en FXI
- 100 µL de point d'étalonnage ou de plasma à tester dilué au **1:10**.

Incuber pendant 1 min. à 37°C, puis introduire:

- 100 µL de réactif TCA (céphaline)

Incuber pendant exactement 3 min. à 37°C, puis introduire (en déclenchant le chronomètre):

- 100 µl de CaCl2 0,025M préincubé à 37°C.

Noter le temps de coagulation.

Méthode automatique :

Le test peut être réalisé sur les instruments de coagulation semi-automatiques ou automatiques, comme : STA-R, KC-4, KC-10, BCT, BCS, etc...

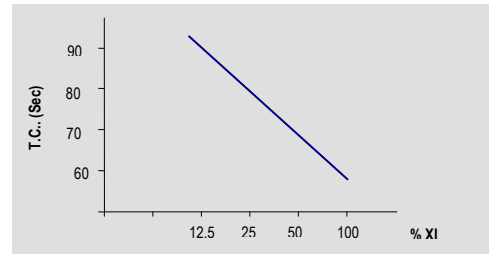
Le programme habituel utilisé pour tester les facteurs de la coagulation par méthode coagulante utilisant de la céphaline activée, et un plasma déficient, peut être appliqué. Cependant, le rapport respectif des volumes indiqué pour la méthode manuelle doit être strictement respecté. En règle générale, par méthode automatique les volumes de réactifs utilisés et de prise d'essai sont la moitié de ceux utilisés pour la méthode manuelle.

Sur automates (en particulier avec détection optique), les temps de coagulation sont légèrement plus courts que par méthode manuelle.

Expression des résultats :

Tracer la droite d'étalonnage sur papier bilogarithmique, en portant en abscisses les concentrations de FXI et en ordonnées les temps de coagulation correspondants. En fonction du temps de coagulation du plasma à tester, en déduire le taux en Facteur XI.

Exemple de courbe de calibration : La courbe d'étalonnage ci-dessous n'est montrée qu'à titre d'exemple. Elle est obtenue en utilisant du réactif Cephén d'HYPHEN BioMed, sur STAR.



CONTROLE DE QUALITE :

L'utilisation de plasmas de contrôle disponibles sur le marché, titrés en activité XI, permet de valider la courbe d'étalonnage et la réactivité homogène du dosage, dans les différentes séries, pour un même lot de réactifs.

PRECAUTIONS ET INTERFERENCES:

- Le prélèvement doit être effectué avec soin, en adhérant strictement aux précautions requises, pour éviter toute activation sanguine. Rejeter tout prélèvement suspect, ou présentant un signe d'activation ou de coagulum.
- Il est recommandé de tester successivement et sans interruption la gamme de calibration fraîchement préparée, les échantillons à tester et les contrôles, pour obtenir les performances optimales du test.
- Pour une meilleure précision des résultats, pour un échantillon mesuré ≤10%, utiliser la dilution 1:5 et diviser le taux ainsi obtenu par 2; pour un échantillon mesuré >100% (ou C %) utiliser la dilution 1:20 et multiplier le taux ainsi obtenu par 2.
- Pour un échantillon mesuré déficient : vérifier le résultat en testant si nécessaire la dilution 1/5 (le taux obtenu sera divisé par 2), et/ou sur un autre prélèvement et/ou une autre méthode ; s'assurer d'un déficit combiné en autre(s) facteur(s).
- La présence d'inhibiteurs de la thrombine dans l'échantillon est susceptible d'entraîner une sous estimation du taux de FXI.

Valeurs usuelles:

Les valeurs normales du facteur XI sont habituellement > 60 %.

Applications :

- Le réactif est proposé pour la mesure de l'activité du Facteur XI, par méthode coagulante.
- Plasma humain citraté, lyophilisé, déficient en Facteur XI de la coagulation, proposé pour tout protocole ou tout travail de recherche in vitro où une source de plasma humain déficient en Facteur XI est nécessaire.

Variations :

Les temps de coagulation observés avec ce test sont obtenus avec par exemple avec le réactif CEPHEN de HYPHEN BioMed. Ils sont de l'ordre de <100 secondes pour la concentration de 100% en FXI. Les temps de coagulation obtenus et les performances du test peuvent varier selon le type, le lot de réactif TCA et l'automate et protocole utilisés. Ces performances, ainsi que les valeurs cibles et intervalles de confiance, pour chaque nouveau lot de contrôle de qualité utilisé, et la zone normale, doivent, par conséquent, être confirmés (et ajustés si nécessaire), dans les conditions de travail exactes de chaque laboratoire.

References :

1. D. Gailani, T. Renné. The intrinsic pathway of coagulation: a target for treating thromboembolic disease? J Thromb Haemost 2007 5 (6), 1106–1112.
2. Andrew M, Paes B, Milner R, Hohnston M, Mithell L, Tollefsen DM, Powers P. Development of the human coagulation system in the full-term infant. Blood 1987; 70: 165-172.
3. Abrégés "Hémorragies et thromboses – Du Diagnostic au traitement", Samama et coll. Masson, 2004.