

**COAMATIC® Factor VIII - 82 2585 63**

**Intended use of the kit**

For the photometric determination of factor VIII activity in plasma such as when identifying factor VIII deficiency or monitoring patients on replacement therapy as well as for potency estimation of FVIII concentrates.

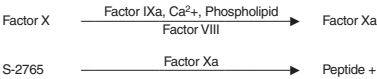
**Background and summary**

The Coamatic Factor VIII kit provides reagents and chromogenic methods for determining factor VIII activity in human plasma and in factor VIII concentrates. Factor VIII is a high molecular weight plasma protein which serves as a cofactor to factor IXa in its activation of factor X to Xa.

Deficiency of factor VIII causes a severe bleeding disorder, hemophilia A. The severity of this bleeding disorder is inversely related to the factor VIII concentration. Hemophilia A patients are generally classified according to their factor VIII activity into three categories: <0.01 IU/mL = severe, 0.01-0.04 IU/mL = moderate and 0.05-0.25 IU/mL = mild hemophilia (4).

**Measurement principle**

In the presence of calcium ions and phospholipids, factor X is activated to factor Xa by factor IXa. This activation is greatly stimulated by factor VIII which acts as a cofactor in this reaction. By using optimal amounts of Ca<sup>2+</sup>, phospholipid and factor IXa, and an excess of factor X, the rate of activation of factor X is linearly related to the amount of factor VIII. Factor Xa hydrolyses the chromogenic substrate S-2765 thus liberating the chromophoric group, pNA. The colour is then read photometrically at 405 nm. The generated factor Xa and thus the intensity of colour is proportional to the factor VIII activity in the sample. Hydrolysis of S-2765 by thrombin formed is prevented by the addition of the synthetic thrombin inhibitor I-2581 together with the substrate.



**Composition**

- S-2765 + I-2581** 1 vial Chromogenic substrate (N-a-Z-D-Arg-Gly-Arg-pNA) (7.7 mg) and synthetic thrombin inhibitor (0.2 mg) with mannitol (bulking agent).
- Factor reagent** 2 vials Bovine factor IXa (0.3 IU), factor X (2.7 IU) and thrombin (1 NIH-U) copolyphillized with CaCl<sub>2</sub> (40 mmol) and phospholipid (0.2 mmol).
- Buffer, stock solution** 1 vial 24 ml concentrated Tris buffer, containing NaCl and BSA. Characteristics of diluted buffer (1:10): Tris 0.025 mol/L, pH 7.9, I = 0.08, 1% BSA.

The reagents are not interchangeable between lots.

**PRECAUTIONS AND WARNINGS:**

- Hazard class: **none**
- Risk phrases: **none**
- Safety phrases: **none**

This product is for *in vitro* diagnostic use.

**Preparation**

The reagents are reconstituted according to the specific instrument application. For microplate and test tube techniques:

- S-2765 + I-2581** reconstitute with 6.0 ml of sterile water or NCCLS type II water<sup>®</sup>
- Factor reagent** reconstitute with 3.0 ml of sterile water or NCCLS type II water<sup>®</sup>

- Buffer, stock solution** dilute 1:10 (1+9) with sterile water or NCCLS type II water<sup>®</sup>

**Reagent storage and stability**

The sealed reagents are stable at 2-8°C until the expiry date printed on the label. Avoid contamination by microorganisms in the reagents.

- S-2765 + I-2581** Stability after reconstitution: 1 month at 2-8°C.
- Factor reagent** Stability after reconstitution: 12 hours at 2-8°C, 2 weeks at -30°C or 1 month at -70°C. Avoid storage at -20°C.
- Buffer, stock solution.** Stability after dilution: 1 month at 2-8°C.

Caution: Do not use reagents beyond the expiry date printed on the package label. If the substrate solution appears yellow, discard.

**Specimen collection**

Samples should be collected with the patient at rest and without stress. Sampling: Blood (9 vol) is mixed with 0.1 ml sodium citrate (1 vol) in plastic tubes or siliconized glass tubes. Centrifugation: 2000 x g for 10-20 minutes at 20-25°C. The plasma should be separated from the cells as soon as possible and the test should be performed within 30 minutes.

If the plasma is not tested immediately, store at -20°C for maximally one week or at -70°C for maximally one year. It should be noted that losses approaching 20% of the factor VIII activity may occur during freezing and thawing, especially if the plasma is frozen slowly. Specimens should not be stored in a self defrosting freezer and not be thawed and refrozen before assay.

Refer to NCCLS document H21-A5 for further instructions on specimen collection, handling and storage.<sup>®</sup>

**Additional reagents**

- Deionized water, filtered through 0.22 µm or NCCLS type II water<sup>®</sup>.
- Calibration plasma, calibrated against an International Standard
- Control Plasma Abnormal and Normal, calibrated against an International Standard for Factor VIII
- Saline (0.9% NaCl).
- Acetic acid 20% or citric acid 2% (end-point methods).

**Material required but not provided**

- Spectrophotometer, 405 nm (and 490 nm for microplate procedure)
- Incubator 37°C ±0.2
- Microplate or semi-micro cuvettes
- Centrifuge, 2000 x g
- Plastic test tubes
- Stopwatch
- Vortex mixer
- Calibrated pipettes
- Linear graph paper

**COAMATIC® Factor VIII - 82 2585 63**

**Verwendungszweck**

Für die photometrischen Bestimmung der Faktor VIII Aktivität in Plasma, zur Identifizierung von Faktor VIII Mangelzuständen oder Überwachung von Patienten mit Faktor VIII Substitutionstherapie.

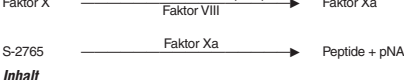
Zur Messung des Faktor VIII Gehaltes in Faktor VIII Konzentraten.

**Hintergrund und Zusammenfassung**

The Coamatic Factor VIII Testkit enthält Reagenzien zur chromogenen Bestimmung der Faktor VIII Aktivität in humanem Plasma und in Faktor VIII Konzentraten. Faktor VIII ist ein hochmolekulares Plasmaprotein, das als Kofaktor von Faktor IXa bei der Aktivierung von Faktor X zu Xa dient. Ein Mangel an Faktor VIII bedingt eine starke Blutungsneigung (Hämophilie A). Die Ausprägung dieser Blutungsneigung ist abhängig von der Faktor VIII Konzentration, weshalb Hämophilie A Patienten generell in drei Kategorien unterteilt werden: <0,01 I.E./ml = schwere, 0,01-0,04 I.E./ml = mässige und 0,05-0,25 I.E./ml = leichte Hämophilie (4).

**Messprinzip**

Faktor X wird, in Anwesenheit von Kalzium und Phospholipid, durch Faktor IXa zu Faktor Xa aktiviert. Diese Reaktion wird durch Faktor VIII als Kofaktor stimuliert. Bei Verwendung einer optimalen Menge Ca<sup>2+</sup>, Phospholipid und Faktor IXa bzw. einem Überschuß an Faktor X, verläuft die Aktivierung von Faktor X proportional zur Menge des verfügbaren Faktor VIII. Aktivierter Faktor X spaltet vom chromogenen Substrat S-2765 die chromophore Gruppe pNA ab. Die bei 405 nm gemessene pNA Freisetzung ist proportional zur Faktor VIII Aktivität der Probe. Die Spaltung des Substrates durch Thrombin wird durch Zugabe eines synthetischen Thrombininhibitors (I-2581) verhindert.



**Inhalt**

- S-2765 + I-2581** 1 Flasche 7,7 mg chromogenes Substrat (N-a-Z-D-Arg-Gly-Arg-pNA) und 0,2 mg synthetischer Thrombininhibitor, mit Mannitol als Füllstoff.
- Factor reagent** 2 Flaschen Boviner Faktor IXa (0,3 IU), Faktor X (2,7 IU) und Thrombin (1 NIH-U), lyophilisiert mit CaCl<sub>2</sub> (40 mmol) und Phospholipid (0,2 mmol).
- Buffer** 1 Flasche 24 ml Trispuffer Konzentrat, enthält NaCl und BSA. Spezifikation des 1:10 verdünnten Puffers: Tris 0,025 mol/l, pH 7,9, I = 0,08, 1% BSA.

Die Reagenzien sind bei verschiedenen Kit-Chargen nicht untereinander austauschbar.

**ACHTUNG: INFEKTIONSRISSIKO**

Gefahrenklasse: **keine**

Risikoeinstufung: **keine**

SicherheitsEinstufung: **keine**

Dieses Produkt ist nur für die *in vitro* geeignet.

**Lösen der Reagenzien**

Die Reagenzien werden entsprechend den spezifischen Geräteapplikationen rekonstituiert. Für die Mikrotiterplatten- und Manuelle-Methoden gilt:

- S-2765 + I-2581** mit 6,0 ml sterilem Wasser lösen.(0,22 mm filtriert oder Wasser NCCLS Typ II<sup>®</sup>)
- Factor reagent** (Faktorenreagenz) mit 3,0 ml sterilem Wasser lösen (0,22 mm filtriert oder Wasser NCCLS Typ II<sup>®</sup>)
- Buffer, stock solution** (Puffer, Konzentrat) 1:10 (1+9) mit sterilem Wasser verdünnen (0,22 mm filtriert oder Wasser NCCLS Typ II<sup>®</sup>)

**Lagerung und Haltbarkeit**

Die verschlossenen Reagenzien sind bei 2-8°C bis zum aufgedruckten Verfalldatum haltbar. Kontamination mit Mikroorganismen ist zu vermeiden.

- S-2765 + I-2581** Haltbarkeit nach dem Lösen: 1 Monat bei 2-8°C.
- Factor reagent** (Faktorenreagenz): Haltbarkeit nach dem Lösen: 12 Stunden bei 2-8°C, 2 Wochen bei -30°C oder 1 Monat bei -70°C. Lagerung bei -20°C vermeiden!
- Buffer, stock solution.** (Puffer, Konzentrat): Haltbarkeit nach 1:10 Verdünnung: 1 Monat bei 2-8°C.

Achtung: Reagenzien nach dem Verfalldatum nicht mehr verwenden! Falls die Substratlösung gelb gefärbt ist, so ist diese zu verwerten.

**Probengewinnung**

Vor der Blutabnahme sollte der Patient ruhen, da es ansonsten zu temporär erhöhten Faktor VIII Werten kommen kann.<sup>®</sup> Teile Blut werden mit 1 Teil 0,1 mol/l Natriumcitrat in Kunststoffröhrchen oder silikonisiertem Glas gemischt und bei Raumtemperatur 10- 20 Minuten mit 2000 x g zentrifugiert. Das Plasma unmittelbar nach der Zentrifugation von den Zellen trennen und innerhalb von 30 Minuten testen. Wird das Plasma nicht gleich getestet, kann es eine Woche bei -20°C oder ein Jahr bei -70°C aufbewahrt werden, wobei es jedoch - speziell bei langsamen Entfrieren - zu einer Abnahme der Faktor VIII Aktivität von bis zu 20% kommen kann. Die Proben dürfen nicht aufgetaut und wieder eingefroren werden bzw. sollten diese nicht in selbstabtauwenden Gefriergeräten gelagert werden. Weitere Informationen zu Gewinnung, Handhabung und Lagerung der Proben: siehe NCCLS-Dokument H21-A5.<sup>®</sup>

**Zusätzlich benötigte Reagenzien**

- Steriles Wasser (0,22 mm filtriert oder Wasser NCCLS Typ II<sup>®</sup>).
- Kalibrationsplasma, kalibriert gegen einen internationalen Plasmastandard für Faktor VIII.
- Kontrollplasma Abnormal, Kontrollplasma Normal, kalibriert gegen einen internationalen Faktor VIII Standard.
- Physiologische Kochsalzlösung (0,9% NaCl).
- 20% Essigsäure oder 2% Zitronensäure (Endpunkt-Methode - Manuelle und Mikrotiterplatten Methode).

**Zusätzlich benötigte Materialien**

- Photometer, 405 nm (und 490 nm bei Mikrotiterplatten)
- Inkubator 37°C ±0.2
- Mikrotiterplatte oder Halbmikroküvetten
- Zentrifuge, 2000 x g
- Kunststoffröhrchen
- Stoppuhr
- Vortex Mixer
- Kalibrierte Pipetten
- Lineares Millimeterpapier

**Quality control**

Appropriate controls for plasma or concentrates calibrated against an International Standard for Factor VIII should be used. Periodically within each run a control should be analyzed. The control material should be treated in the same way as a test sample. A range of allowable variation should be established for controls in each laboratory. If a value outside the established control range is obtained, a complete check of calibration, reagents and instrument performance should be made.

**Results**

Factor VIII results are reported in IU/mL. 1.0 IU/mL of FVIII is equivalent to 100% FVIII.

**Expected values**

The Factor VIII levels measured in 61 healthy individuals, 28 males and 33 females, aged between 21 and 55, were in the range of 0.5-2 IU/mL. Median 1.13 IU/mL, SD 0.39 IU/mL. (Microplate method).

**Procedures**

All conditions included in this package insert are referred to Microplate method. Detailed instrument settings including instructions for preparation of the reagents for a variety of automated instruments are available on request from Chromogenix.

**Calibration**

A standard curve should be performed with every run, prepared by different dilution of Calibration Plasma which should be traceable to the International Standard. A normal plasma can be also used for preparation of standard dilutions (It should be calibrated against an International Standard for plasma factor VIII) in case the normal plasma does not contain exactly 1 IU/mL (100% factor VIII), the values of the standards must be recalculated accordingly, in order to obtain a correct factor VIII potency assignment.

This plasma is diluted according to a two-step procedure (predilution followed by final dilution) described in the below table. For factor VIII levels below 0.05 IU/mL (hemophilia A patients), the low range should be used.

Factor VIII IU/mL	Predilution		Final dilution	
	Plasma µL	Buffer working solution µL	Plasma predilution µL	Buffer working solution µL
Normal range				
1.42	undiluted	—	25	1400
1.00	undiluted	—	25	2000
0.50	100	100	25	2000
0.25	50	150	25	2000
0	—	—	25	2000
Low range				
0.050	100	1900	25	2000
0.024	50	2000	25	2000
0.012	25	2000	25	2000
0.006	25	4000	25	2000
0	—	—	—	2000

**Assay design for microplate and test tube techniques**

The test should be performed within 30 minutes after sampling or thawing of the plasma samples.

Dilution of samples and controls:

Samples/controls 25 µL  
Buffer working solution 2000 µL

Mix well

For extremely low levels of factor VIII, 0.005-0.05 IU/mL, a special range with increased reaction times is used in order to secure optimal resolution.

- Microplate method

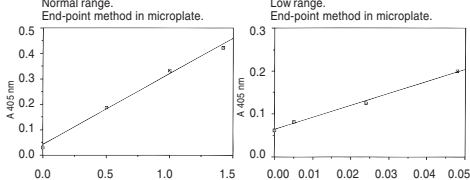
Diluted samples/controls/standards incubate at 37°C	Assay range	
	0-1.5 IU/mL	0-0.05 IU/mL
Factor reagent (pre-warm at 37°C)	50 µL	50 µL
incubate at 37°C	3-4 min	3-4 min
S-2765 + I-2581 (pre-warm at 37°C)	50 µL	50 µL
incubate at 37°C	2 min	4 min
A. Kinetic method: read ΔA/min	50 µL	50 µL
B. End-point method: proceed as described below	2 min	10 min
incubate at 37°C	50 µL	50 µL
Acetic acid 20% or 2% citric acid	2 min	10 min
A. Kinetic method: read the absorbance change at 405 nm for 30-120 S.	50 µL	50 µL
B. End-point method: read the absorbance against buffer at 405 nm.	—	—

- For manual method in plastic tubes, use 200 µL instead of 50 µL for all pipetting steps in the above scheme

**ENGLISH - Insert revision 03/2013**

**Calculation**

Plot the change in absorbance per minute (ΔA/min) or absorbance (A) for the standard samples against their concentration of factor VIII on linear graph paper. Plot ΔA/min or A on the Y axis and IU/mL factor VIII on the X axis. Connect the standard points with the best fit straight line. Samples are evaluated from this standard curve. Examples of typical standard curves are shown below:



Absorbance values for the standard curve should be within the following limits:

Microplate method	Standard	Kinetic, ΔA/min	End-point, A
Normal range	0 IU/mL	<0.06	<0.12
	1.0 IU/mL	0.16-0.32	0.33-0.63
Low range	0 IU/mL	<0.02	<0.18
	0.05 IU/mL	0.02-0.05	0.17-0.44
Test tube method			
Normal range	0 IU/mL	<0.14	<0.21
	1.0 IU/mL	0.38-0.74	0.58-1.11
Low range	0 IU/mL	<0.04	<0.32
	0.05 IU/mL	0.04-0.11	0.29-0.76

**Performance Characteristics**

**SPECIFICITY AND INTERFERING FACTORS**

In order to minimize the influence from heparin in this assay, polybrene has been added to the reaction system. To prove the efficiency of this addition, plasma samples with heparin were used for standard preparation and standard curves were run in absence and presence of polybrene. In the presence of polybrene there is no inhibiting effect from 1.0 IU/mL heparin in the plasma. To check if polybrene by itself does not influence the system, standard curves were prepared from normal, heparin free plasma, in the absence and presence of polybrene. No influence from polybrene was detected in the case of heparin free plasma.

No other drug interference is reported.

**Precision:**

The following table shows the coefficient of variation (CV) for three different factor VIII plasma concentrations. NCCLS reference EP5-T2 User Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices - Second Edition; Tentative Guideline (1992). ISBN 1-56238-145-8.

Microplate method	CV% (Within series)	n	CV% (Between series)	n	N
Mean (FVIII IU/mL)					
1.0 IU/mL	2.4	42	2.1	6	7
0.25 IU/mL	2.6	42	5.9	6	7
0.03 IU/mL	3.0	42	3.9	6	7

**Correlation**

The assay show a strong correlation with Coatest FVIII.

System	Slope	Intercept	r	Reference method	n
Manual Method	0.94	0.07	0.97	Coatest	25
Microplate	1.09	-0.11	0.96	Coatest	25
ACL	1.16	-0.13	0.97	Coatest	25
Cobas Mira	1.15	-0.10	0.98	Coatest	25
Hitachi	1.05	-0.09	0.98	Coatest	29
Electra MLA 900	1.03	-0.06	0.98	Coatest	25
Technicon RA-1000	0.95	-0.02	0.99	Coatest	25

**Linearity**

Two ranges of factor VIII are defined

Microplate and Manual method :  
Normal range: 0.05-1.5 IU/mL Low range: 0.005-0.05 IU/mL

**DETECTION LIMIT**

Microplate and Manual method :  
Normal range: 0.05 IU/mL Low range: 0.005 IU/mL

**Sensitivity:**

Microplate ΔAbs per 1IU/mL of FVIII activity  
Normal range: 0.4Abs Low range 3.0Abs

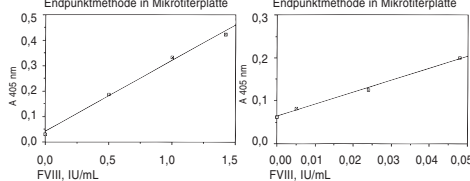
**Determinations/Kit**

Microplate method: 120 Test Tube: 30

**DEUTSCH - Packungsbeilage Version 03/2013**

**Berechnung**

Die Absorptionsänderung (ΔA/min) bzw. die Absorption (A) der einzelnen Standards (y-Achse) werden gegen die Faktor VIII Standard-Konzentration (x-Achse) auf Millimeterpapier aufgetragen und die einzelnen Punkte mit einer geraden Linie verbunden. Die Faktor VIII Konzentration der Proben wird von dieser Standardkurve abgelesen. Beispiele für typische Standardkurven sind unten angeführt:



Die Standardabsorptionen sollten innerhalb folgender Limits liegen:

Mikrotiterplatten Methode	Standard	Kinetik, ΔA/min	Endpunkt, A
Normaler Bereich	0 I.E./mL	<0.06	<0.12
	1,0 I.E./mL	0,16-0,32	0,33-0,63
Niedriger Bereich	0 I.E./mL	<0.02	<0.18
	0,05 I.E./mL	0,02-0,05	0,17-0,44
Manuelle Röhrchen Methode			
Normaler Bereich	0 I.E./mL	<0,14	<0,21
	1,0 I.E./mL	0,38-0,74	0,58-1,11
Niedriger Bereich	0 I.E./mL	<0,04	<0,32
	0,05 I.E./mL	0,04-0,11	0,29-0,76

**Testeigenschaften**

**SPEZIFITÄT UND STÖRFAKTOREN**

Um den Einfluß von Heparin zu minimieren, wird dem Reaktionssystem Polybrene zugefügt. Um die Effizienz von Polybrene zu überprüfen, wurden Standardkurven mit heparinisiertem Plasma, jeweils mit und ohne Polybrene, hergestellt. Bei Anwesenheit von Polybrene wurde bei einer Heparinkonzentration bis 1.0 I.E./ml Plasma keine Hemmung festgestellt. Der Einfluß von Polybrene auf das Testsytem wurde geprüft, indem Standardkurven mit heparinfreiem Normalplasma mit und ohne Poly

# CHROMOGENIX

## COAMATIC® Factor VIII - 82 2585 63

*Utilisation prévue de la trousse*

Pour la détermination photométrique de l'activité du facteur VIII dans le plasma, lors par exemple de l'identification d'une déficience en facteur VIII ou de la surveillance des patients sous thérapie suppléttive, ainsi que pour une estimation de la puissance des concentrés de facteur VIII.

**Contexte et resume**

La trousse Coamatic Factor VIII contient des réactifs et des méthodes chromogènes de détermination de l'activité du facteur VIII dans le plasma humain et dans les concentrés de facteur VIII. Le facteur VIII est une protéine plasmatique de poids moléculaire élevé qui sert de co-facteur au facteur IXa dans son activation du facteur X en Xa. La déficience en facteur VIII est responsable d'un grave trouble hémorragique, l'hémophilie A. Il existe un rapport inverse entre la gravité de cette affection et la concentration de facteur VIII. Les patients atteints d'hémophilie A sont généralement classés en trois catégories sur la base de leur activité de facteur VIII, à savoir : < 0,01 UI/ml = hémophilie sévère - 0,01 à 0,04 UI/ ml = h. modérée - 0,05 à 0,25 UI/ml = h. mineure.

**Principe de mesure**

En présence d'ions calcium et de Phospholipides, le facteur X est activé en facteur Xa par le facteur IXa. Cette activation est fortement stimulée par le facteur VIII, qui joue ici un rôle de cofacteur.

La mise en oeuvre de quantités optimales de Ca<sup>2+</sup>, de Phospholipidee et de facteur IXa, plus un excès de facteur X, se traduira par une relation linéaire entre la vitesse d'activation du facteur X et la quantité de facteur VIII. Le substrat chromogène S-2765, libérant de la sorte le groupe chromophore pNA. La coloration est ensuite lue photométriquement à 405 nm. Le facteur Xa généré, et donc l'intensité de la coloration, est proportionnel(le) à l'activité du facteur VIII dans l'échantillon. De manière à éviter l'hydrolyse du S-2765 par la thrombine formée, on ajoute en même temps que le substrat l'inhibiteur synthétique de la thrombine I-2581.



**Composition**

La trousse COAMATIC® FVIII contient :

- S-2765 + I-2581** 1 Flacon Substrat chromogène (N-a-Z-D-Arg-Gly-Arg-pNA) (7,7 mg) et inhibiteur synthétique de la thrombine (0,2 mg avec mannitol (agent gonflant).
- Factor reagent** 2 Flacons Facteur IXa (0,3 U), facteur X (2,7 IU) et thrombine (1 U NIH) bovins, colyophilisés avec CaCl2 (40 mmol) et phospholipide (0,2 mmol).
- Buffer** 1 Flacon 24 ml de tampon Tris concentré renfermant du NaCl et de la BSA. Caractéristiques du tampon dilué (1:10) : Tris 0,025 mol/l, pH 7,9, I = 0,08, BSA 1%. Ces réactifs ne sont pas interchangeables entre lots.

**ATTENTION:**

Classification risque: **Aucune**

Phrases risque: **Aucune**

Phrases sécurité: **Aucune**

Ce produit est à usage diagnostique *in vitro*.

**Préparation des réactifs**

Les réactifs sont reconstitués selon les indications fournies dans les applications spécifiques de chaque instrument.

Pour les techniques utilisant une microplaque ou un tube à essai:

- S-2765 + I-2581** reconstituer avec 6,0 ml d'eau désionisée, ou eau NCCLS type II®
- Factor reagent** Réactif facteur reconstituer avec 3,0 d'eau désionisée, ou eau NCCLS type II®
- Buffer, stock solution** Solution tampon mère diluer à 1:10 (1+9) avec eau désionisée, ou eau NCCLS type II®

**Conditions de conservation et stabilité**

Les réactifs en ampoule scellée sont stables à 2-8°C jusqu'à la date de péremption qui figure sur l'étiquette. Eviter toute contamination par des microorganismes dans les réactifs.

- S-2765 + I-2581** Stabilité après reconstitution: 1 mois à 2-8°C.
- Factor reagent** Réactif facteur Stabilité après reconstitution: 12 heures à 2-8°C, 2 semaines à -30°C ou 1 mois à -70°C. Eviter le stockage à -20°C.
- Buffer, stock solution.** Solution tampon mère. Stabilité après dilution: 1 mois à 2-8°C.

Mise en garde: Les réactifs ne doivent pas être utilisés au-delà de la date de péremption qui figure sur l'étiquette. Si la solution de substrat présente un aspect jaune, la jeter.

**Recueil des échantillons**

Au moment du prélèvement, le patient doit être au repos et non stressé.

Echantillonnage : Le sang (9 vol.) est mélangé avec du citrate de sodium à 0,1 mol/l (1 vol.) dans des tubes en plastique ou des tubes en verre silicôné. Centrifugation: 2000 x g pendant 10-20 minutes à 20-25°C. Les plasma doit être séparé des cellules le plus tôt possible et testé dans les 30 minutes.

Si la réalisation du test n'intervient pas tout de suite, conserver le plasma à -20°C durant une semaine au maximum ou à -70°C durant un an au maximum. Il faut savoir que des pertes d'activité du facteur VIII de près de 20% peuvent se produire lors de la congélation et de la décongélation, surtout si le plasma est congelé lentement. Les échantillons ne doivent pas être stockés dans un congélateur à dégivrage automatique, ni être décongelés et recongelés avant le dosage. Pour des instructions complémentaires concernant le recueil, la manipulation et la conservation des échantillons, se reporter au document H21-A5 NCCLS.®

- S-2765 + I-2581** Stabilité après reconstitution: 1 mois à 2-8°C.
- Factor reagent** Réactif facteur Stabilité après reconstitution: 12 heures à 2-8°C, 2 semaines à -30°C ou 1 mois à -70°C. Eviter le stockage à -20°C.
- Buffer, stock solution.** Solution tampon mère. Stabilité après dilution: 1 mois à 2-8°C.

Mise en garde: Les réactifs ne doivent pas être utilisés au-delà de la date de péremption qui figure sur l'étiquette. Si la solution de substrat présente un aspect jaune, la jeter.

**Recuil des échantillons**

Au moment du prélèvement, le patient doit être au repos et non stressé.

Echantillonnage : Le sang (9 vol.) est mélangé avec du citrate de sodium à 0,1 mol/l (1 vol.) dans des tubes en plastique ou des tubes en verre silicôné. Centrifugation: 2000 x g pendant 10-20 minutes à 20-25°C. Les plasma doit être séparé des cellules le plus tôt possible et testé dans les 30 minutes.

Si la réalisation du test n'intervient pas tout de suite, conserver le plasma à -20°C durant une semaine au maximum ou à -70°C durant un an au maximum. Il faut savoir que des pertes d'activité du facteur VIII de près de 20% peuvent se produire lors de la congélation et de la décongélation, surtout si le plasma est congelé lentement. Les échantillons ne doivent pas être stockés dans un congélateur à dégivrage automatique, ni être décongelés et recongelés avant le dosage. Pour des instructions complémentaires concernant le recueil, la manipulation et la conservation des échantillons, se reporter au document H21-A5 NCCLS.®

## COAMATIC® Factor VIII - 82 2585 63

*Indicaciones de uso*

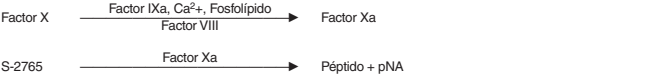
Para la determinación fotométrica de la actividad del factor VIII en el plasma, por ejemplo para la identificación de la deficiencia de factor VIII o el seguimiento de pacientes sometidos a terapia de reemplazo, así como para estimaciones de potencia de los concentrados de factor VIII.

**Antecedentes y resumen**

El kit de factor VIII Coamatic contiene reactivos y métodos cromogénicos para la determinación de la actividad del factor VIII en el plasma y en los concentrados de factor VIII. El factor VIII es una proteína plasmática de alto peso molecular que actúa como cofactor del factor Xa en la activación del factor X a Xa. La deficiencia del factor VIII produce un grave trastorno hemorrágico, la hemofilia A. La gravedad del trastorno hemorrágico tiene una relación inversa con la concentración del factor VIII. Los pacientes de hemofilia A se clasifican generalmente de acuerdo con la actividad del factor VIII en tres categorías <0,01 UI/ml = grave; 0,01-0,04 UI/ml = moderada y 0,05- 0,25 UI/ml hemofilia leve (4).

**Fundamento del método**

En presencia de iones calcio y de fosfolípidos, el factor Xe activa el factor X para convertirlo en factor Xa. El factor VIII estimula considerablemente esta activación, que actúa como cofactor en esta reacción. Mediante el uso de cantidades óptimas de Ca<sup>2+</sup>, de fosfolípidos y de factor Xa, así como de un exceso de factor X, se consigue una relación lineal del factor X con la cantidad de factor VIII. El factor Xa hidroliza el sustrato cromogénico S-2765, liberando así el grupo cromofórico pNA. El color se lee a 405 nm. El factor Xa generado y por lo tanto la intensidad del color, es proporcional a la actividad del factor VIII en la muestra. La adición del inhibidor de trombina sintético I-2581 así como el sustrato previenen la hidrólisis de la trombina formada..



**Composición**

- S-2765 + I-2581** 1 Vial Sustrato cromogénico (N-a-Z-D-Arg-Gly-Arg-pNA) (7,7 mg) e inhibidor sintético de trombina (0,2 mg) con manitol (agente de volumen).
- Factor reagent** 2 Viales Facteur bovine Xa (0,3 U), factor X (2,7 IU) y trombina (1 NIH-U) colofiolizado con CaCl2 (40 mmol) y fosfolipido (0,2 mmol).
- Buffer** 1 Vial 24 ml de tampón Tris concentrado que contiene NaCl y BSA Características del tampón diluido (1:10) : Tris 0,025 mol/l, pH 7,9, I = 0,08, 1% BSA.

Los reactivos no son intercambiables entre los diversos lotes.

**ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES:**

Indicaciones de Peligro: **Ninguna**

Frases de Riesgo: **Ninguna**

Frases de Seguridad: **Ninguna**

Este producto es para diagnóstico *in vitro*.

**Preparación de los reactivos**

Los reactivos deben ser reconstituídos según la aplicación de cada instrumento. Para las técnicas de microplacas y tubo de ensayo:

- S-2765 + I-2581** Reconstituir con 6,0 mL de agua desionizada, filtrada a través de un filtro de 0,22 mm o agua NCCLS tipo II®
- Factor reagent** Reactivo de factor reconstituir con 3,0 mL de agua desionizada, filtrada a través de un filtro de 0,22 mm o agua NCCLS tipo II®
- Buffer, stock solution** Tampón, solución de cultivo diluir 1:10 (1+9) con agua desionizada, filtrada a través de un filtro de 0,22 mm o agua NCCLS tipo II®

**Condiciones de conservación y estabilidad**

Los reactivos sellados son estables entre 2- 8°C hasta la fecha de expiración impresa en la etiqueta. Evítese la contaminación por los microorganismos de los reactivos.

- S-2765 + I-2581:** Estabilidad después de reconstitución: 1 mes entre 2-8°C.
- Factor reagent:** Estabilidad después de reconstitución: 12 horas entre 2-8°C, 2 semanas a -30°C o un mes a -70°C. Evitar almacenarlo a -20°C.
- Tampón, solución de cultivo:** estabilidad después de dilución: 1 mes entre 2-8°C.

Advertencia: No deben usarse los reactivos después de la fecha de expiración impresa en la etiqueta del envase. Deséchese si la solución de sustrato tiene un aspecto amarillento.

**Obtención de las muestras**

Las muestras debe recolectarse cuando el paciente está en reposo y relajado. Muestreo: Mezclar la sangre (9 vol) con 0,1 mol/L de citrato de sodio (1 vol) en tubos de plástico o tubos de vidrio silicónizado. Centrifugado: 2000 x g durante 10 a 20 minutos a temperatura 20-25°C. El plasma debe separarse de las células tan pronto sea posible electuarse la dosificación dentro de los 30 minutos siguientes. Si el plasma no se dosifica de inmediato, almacenar a -20°C durante una semana como máximo, y a -70°C durante un año como máximo. Debe tenerse en cuenta que pueden producirse pérdidas de hasta 20% de la actividad del factor VIII durante la congelación y la descongelación, especialmente si el plasma se descongela lentamente. Las muestras no deben almacenarse en un congelador de autodescongelación, ni deben descongelarse y recongelarse antes de la dosificación. Consultar en el documento H21-A5 del NCCLS las instrucciones adicionales sobre la obtención, manejo y conservación de las muestras.®

**Réactifs nécessaires mais non fournis**

- Eau désionisée, filtrée sur filtre de 0,22 mm, ou eau NCCLS type II®).
- Plasma calibrant , étalonné par rapport à un standard international.
- Témoins appropriés étalonnés par référence à un Standard International pour le facteur VIII.
- De l'eau physiologique (NaCl à 0,9%)
- Acide acétique 20% ou acide citrique 2% (méthodes manuelle et de la microplaque).

**Matériel nécessaire mais non fourni**

- Spectrophotomètre à 405 nm (et 490 nm pour la procédure sur microplaque)
- Incubateur à 37°C ±0,2
- Microplaque ou cuvettes semi-micro
- Centrifugeuse à 2000 x g
- Tubes à essai en plastique
- Chronomètre
- Mélangeur à vortex
- Pipettes jaugées
- Papier millimétré

**Controles de qualite**

Il convient d'utiliser, pour le plasma et les concentrés, des témoins appropriés étalonnés par référence à un Standard International pour le facteur VIII. Au cours de chaque cycle, on procédera périodiquement à l'analyse d'un témoin. La substance témoin sera soumise au même traitement qu'un échantillon à tester. Une fourchette de variation admissible devra être établie pour les témoins dans chaque laboratoire. L'obtention d'une valeur sortant de la fourchette témoin établie donnera lieu à un contrôle complet de l'étalonnage, des réactifs et de la performance des instruments.

**Resultats**

Les résultats de la factor VIII sont indiqués en activité (UI/ml). 1,0 UI/ml de FVIII est équivalent à 100% de FVIII.

**Valeurs de reference**

Les taux de facteur VIII mesurés chez 61 sujets sains, 28 hommes et 33 femmes âgés de 21 à 55 ans, se situaient dans la fourchette de 0,5 à 2 UI/ml. Médiane : 1,13 UI/ml; écart type 0,39 UI/ml. (Méthode de la microplaque).

**Procedures**

Toutes les conditions contenues dans la brochure annexée à la confection se rapportent à la Méthode en microplaque. Des adaptations détaillées, pour de nombreux automates avec les consignes de préparation des, sont disponibles chez CHROMOGENIX et leurs distributeurs sur simple demande.

**Etalonnage**

Une courbe standard, obtenue en analysant différant dilutions de plasma calibrant étalonné par rapport à un standard international, doit être effectuée lors de chaque série.

Un plasma normal peut être utiliser pour la préparation des dilutions standards (ce plasma doit être étalonné par rapport au standard international du Facteur VIII plasmatique). Si le taux du facteur VIII du plasma normal n'est pas exact à 1 UI/ml (100 %), les valeurs des étalons doivent être corrigé pour obtenir une estimation exacte du Facteur VIII dans les échantillons.

Ce plasma est dilué selon la procédure en deux étapes (pré-dilution suivie d'une dilution finale) que décrit le tableau ci-dessus. Pour les taux de facteur VIII en dessous de 0,05 UI/ml (patients atteints d'hémophilie A), utiliser la fourchette basse.

Factor VIII UI/ml	Plasma µL	Prédiution		Dilution finale	
		Solution tampon de travail µL	Solution tampon de travail µL	Plasma pré-dilution µL	Solution tampon de travail µL
Fourchette normale					
1,42	undiluted	—	—	25	1400
1,00	undiluted	—	—	25	2000
0,50	100	100	25	25	2000
0,25	50	150	25	25	2000
0	—	—	—	25	2000
Fourchette basse					
0,050	100	1900	25	25	2000
0,024	50	2000	25	25	2000
0,012	25	2000	25	25	2000
0,006	25	4000	25	25	2000
0	—	—	—	—	2000

**Méthode en microplaque:**

Le test doit être réalisé dans les 30 minutes qui suivent le prélèvement ou la décongélation des échantillons de plasma.

Dilution des échantillons et des témoins:

Echantillons/témoins 25 µL
Solution tampon de travail 2000 µL
Bien mélanger.

Pour les taux extrêmement bas de facteur VIII - entre 0,005 et 0,05 UI/ml - une fourchette spéciale avec des temps de réaction plus longs est utilisée en vue de garantir une résolution optimale.

- Méthode sur microplaque

	0-1,5 UI/ml	Fourchette de dosage 0-0,05 UI/ml
--	-------------	-----------------------------------

Echantillons dilués/témoins/standard	50 µL	50 µL
Incuber à 37°C	<i>3-4 min</i>	<i>3-4 min</i>
Réactif facteur (préchauffer à 37°C)	50 µL	50 µL
Incuber à 37°C	<i>2 min</i>	<i>4 min</i>
S-2765 + I-2581 (préchauffer à 37°C)	50 µL	50 µL

A. Méthode cinétique: lire ΔA/min

B. Méthode du point final: procéder comme il est dit ci-dessous

Incuber à 37°C

	<i>2 min</i>	<i>10 min</i>
--	--------------	---------------

Acide acétique 20% ou acide citrique 2%

	50 µL	50 µL
--	-------	-------

A. Méthode cinétique: lire la modification de l'absorbance à 405 nm pendant 30-120 s.

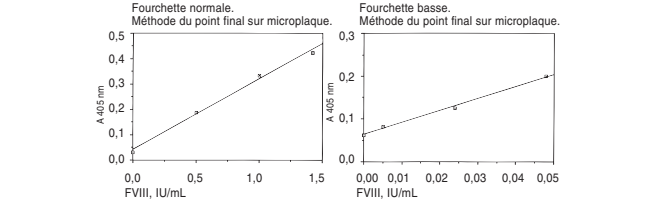
B. Méthode du point final: lire l'absorbance par rapport au tampon à 405 nm.

- Pour la méthode manuelle dans des tubes en plastique, on utilisera 200 µl au lieu de 50 µl à chacune des étapes de pipetage du protocole indiqué ci-dessus.

**FRANÇAIS - Révision de la notice 03/2013**

**Calcul**

Sur une feuille de papier millimétré, tracer la courbe de la modification de l'absorbance par minute (ΔA/min) ou de l'absorbance (A) des échantillons de standard en fonction de leur concentration en facteur VIII. Porter ΔA/min ou A en ordonnée et les UI/ml de facteur VIII en abscisse. Relier les points standard entre eux par la droite la mieux ajustée. L'évaluation des échantillons se basera sur cette courbe standard. Des exemples de courbes standard types sont présentés ci-dessous:



Les valeurs d'absorbance pour la courbe standard doivent se situer à l'intérieur des limites suivantes:

Méthode de la microplaque	Standard	Kinétik, ΔA/min	Endpunkt, A		
Fourchette normale	0 IU/ml	<0,06	<0,12		
	1,0 IU/ml	0,16-0,32	0,33-0,63		
Fourchette basse	0 IU/ml	<0,02	<0,18		
	0,05 IU/ml	0,02-0,05	0,17-0,44		

*Méthode des tubes à essai*

Fourchette normale	0 IU/ml	<0,14	<0,21		
	1,0 IU/ml	0,38-0,74	0,58-1,11		
Fourchette basse	0 IU/ml	<0,04	<0,32		
	0,05 IU/ml	0,04-0,11	0,29-0,76		

**Caractéristiques et performances**

**SPECIFICITE ET FACTEURS INTERFERENTS**

Afin de réduire au minimum l'influence de l'héparine dans ce dosage, on a additionné au système réactionnel du polybrène. Dans le but de prouver l'efficacité d'un tel ajout, des échantillons de plasma héparinés ont été utilisés pour la préparation de l'étalon et des courbes étalons ont été réalisées en l'absence et en présence de polybrène. En présence de polybrène, il n'y a eu aucun effet inhibiteur jusqu'à 1,0 UI/ml d'héparine dans le plasma. Pour vérifier si le polybrène en lui-même n'influencerait pas le système, on a établi des courbes standard à partir d'un plasma normal sans héparine, en l'absence et en présence de polybrène. Aucune influence du polybrène n'a été décelée dans le cas de ce plasma sans héparine. Il n'a été signalé aucune autre interférence médicamenteuse.

**PRECISION**

Le tableau de la page suivante montre le coefficient de variation (CV) pour trois concentrations plasmatiques différentes de facteur VIII. Référence NCCLS EP5-T2: Evaluation par l'Utilisateur des Performances des Appareils de Chimie Clinique en matière de Précision - 2ème Edition; Directive Provisoire (1992). ISBN 1-56238-145-8.

Méthode sur microplaque	CV% (A l'intérieur des séries)	n	CV% (Entre les séries)	n	N
Mean (FVIII IU/ml)					
1,0 IU/ml	2,4	42	2,1	6	7
0,25 IU/ml	2,6	42	5,9	6	7
0,03 IU/ml	3,0	42	3,9	6	7
n = nombre de réplicats dans chaque série; N = nombre de séries.					

**Corrélation:**

Les dosages font apparaître une forte corrélation avec le Coatest Facteur VIII:

Appareils	Pente	Ordonnée à l'origine	r	Méthode de référence	n
méthode manuelle	0,94	0,07	0,97	Coatest	25
Microplaque	1,09	-0,11	0,96	Coatest	25
ACL	1,16	-0,13	0,97	Coatest	25
Cobas Mira	1,15	-0,10	0,98	Coatest	25
Hitachi	1,05	-0,09	0,98	Coatest	29
Electra MLA 900	1,03	-0,06	0,98	Coatest	25
Technicon RA-1000	0,95	-0,02	0,99	Coatest	25

**Linéarité:**

Deux fourchettes de facteur VIII sont définies: basse de 0,005 à 0,05 UI/ml.

**Appareil**

Microplaque et manuelle:

Normale allant de 0,05 à 1,5 UI/ml
Basse de 0,005 à 0,05 UI/ml

**LIMITE DE DETECTION**

**Appareil**

Printed Insert Sheet: 302143  
Revision: R4  
Issued: 03/2013  
C.O.: 433273

**LANGUAGES**

---

ENGLISH  
DEUTSCH  
ESPAÑOL  
FRANÇAIS  
PORTUGÊES  
DANSK  
SWENSK  
GREEK

**TECHNICAL SPECS**

---

PAPER: White paper, 50-60 g/m<sup>2</sup> weight. SIZE: 11 x 17" (280 x 432 mm.).  
PRINT: Front/Back. PRINT COLOR: Top rule Orange Pantone 137, all remaining type in black  
Back - All type in black.