

COATEST® SP4 FVIII - 82 4094 63

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

Measurement principle
1. Factor X $\xrightarrow{\text{Factor IXa, Ca}^{2+}, \text{phospholipid}}$ factor Xa
factor VIII
2. S-2765 $\xrightarrow{\text{factor Xa}}$ Peptide + pNA

In the presence of calcium and phospholipids, factor X is activated to factor Xa by factor IXa. This generation is greatly stimulated by factor VIII, which may be considered as a cofactor in this reaction. By using optimal amounts of Ca²⁺ and phospholipids and an excess of factors IXa and X, the rate of activation of factor X is solely dependent on the amount of factor VIII. Factor Xa hydrolyses the chromogenic substrate S-2765 thus liberating the chromophoric group, pNA. The color is then read photometrically at 405 nm. The generated factor Xa and thus the intensity of color 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 15.4 mg + I-2581** 1 vial
Chromogenic substrate (N-a-Z-D-Arg-Gly-Arg-pNA), 15.4 mg, synthetic thrombin inhibitor, 0.4 mg, and mannitol added as a bulking agent.
 - Factor IXa + factor X 2.7 IU** 4 vials
Lyophilized bovine factors IXa and X with bovine albumin added as a stabilizing agent.
 - CaCl₂ 6 ml** 1 vial
Calcium chloride solution, 0,025 mol/L.
 - Buffer, stock solution 20 mL** 1 vial
20 mL concentrated Tris buffer containing NaCl and BSA. Characteristics of tenfold diluted buffer: Tris 0,05 mol/L, pH 7,3, 10 mg/L Ciprofloxacin and 1,0% BSA.
 - Phospholipid 2 mL** 1 vial
Mixture of highly purified phospholipids and 10 mg/L Ciprofloxacin.

PRECAUTION AND WARNINGS
Hazard class: **none**
Hazard statements: **none**
Precautionary statements: **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 12.0 mL of sterile water or NCCLS type II water¹¹, to obtain a concentration of 1.8 mmol/L.
 - Factor IXa + Factor X:** Reconstitute with 3.0 mL of sterile water or NCCLS type II water¹¹
 - CaCl₂:** Ready to use.
 - Buffer, stock solution:** Dilute 1:10 (1+9) with sterile water or NCCLS type II water¹¹. Prepare a new buffer working solution each day.
 - Phospholipid:** Ready to use.

- Reagent storage and stability**
When kept at 2-8°C the sealed reagents are stable until the expiry date printed on the label. Contamination by microorganisms should be avoided once the vials are opened.
- S-2765 + I-2581:** Stability after reconstitution: 3 months at 2-8°C.
 - Factor IXa + Factor X:** Stability after reconstitution: 12 hours at 2-8°C. The solution can be stored frozen in aliquots at -20°C (or at lower temperature) for 3 months. Do not refreeze.
 - CaCl₂ (0,025 mol/L):** Opened vial is stable 3 months at 2-8°C.
 - Buffer, stock solution (Tris 0,05 mol/L, pH 7,3, 10 mg/L Ciprofloxacin and 1,0% BSA):** Once opened the buffer is stable 3 months at 2-8°C. Prepare a new buffer working solution each day.
 - Phospholipid:** Opened vial is stable for 3 months at 2-8°C. Shake gently before use.

- Reagents and materials required but not provided**
- Deionized water, filtered through 0.22 µm or NCCLS type II water.¹¹
 - Acetic acid 20% or citric acid 2%.
 - Control Plasma Abnormal and Normal calibrated against an International Standard for Factor VIII
 - Calibration plasma calibrated against an International Standard
 - Photometer, 405 nm (and 490 nm for microplate procedure)
 - Heat incubator 37°C ± 0.2°C
 - Semi-micro cuvettes
 - Centrifuge, 2000xg
 - Plastic test tubes
 - Stopwatch
 - Vortex mixer
 - Calibrated pipettes

Specimen collection
Nine parts of freshly drawn venous blood are collected into one part trisodium citrate. Centrifugation: 2000 x g for 10-20 minutes at 20-25°C. Refer to NCCLS document H21-A4 for further instructions on specimen collection, handling and storage.¹²

Quality Control
Normal and abnormal controls for plasma or concentrates are recommended for reliable quality control.¹³ Assigned values of Controls should be traceable to the International Standard. 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 % activity (100% factor VIII activity is equivalent to 1.0 IU/mL).

COATEST® SP4 FVIII - 82 4094 63

Verwendungszweck
Zur photometrischen Bestimmung der Faktor VIII Aktivität in Citratplasma zur Identifizierung von Faktor VIII-Mängeln und zur Überwachung einer Substitutionstherapie sowie zur Gehaltsbestimmung von Faktor VIII-Konzentraten.

Messprinzip
1. Faktor X $\xrightarrow{\text{Faktor IXa, Ca}^{2+}, \text{Phospholipid}}$ Faktor Xa
Faktor VIII
2. Substrat $\xrightarrow{\text{Faktor Xa}}$ Peptid + pNA

In Anwesenheit von Calcium und Phospholipiden wird Faktor X durch Faktor IXa zu Faktor Xa aktiviert. Diese Aktivierung wird beträchtlich durch Faktor VIII stimuliert, der als Kofaktor dieser Reaktion betrachtet werden kann. Bei Verwendung optimaler Mengen Ca²⁺-Ionen und Phospholipiden sowie eines Überschusses der Faktoren IXa und X ist die Aktivierungsrate ausschließlich von der Menge des verfügbaren Faktor VIII abhängig. Faktor Xa spaltet vom chromogenen Substrat S-2765 die chromophore Gruppe pNA ab. Die photometrisch bei 405 nm gemessene pNA-Freisetzung ist proportional zur Faktor VIII Aktivität der Probe. Die Hydrolyse von S-2765 durch gebildetes Thrombin wird durch Zugabe eines synthetischen Thrombin-Inhibitors (I-2581) verhindert.

- Reagenzien**
- S-2765 15,4 mg + I-2581** 1 Flasche
Chromogenes Substrat (N-a-Z-D-Arg-Gly-Arg-pNA), 15,4 mg, synthetischer Thrombin-Inhibitor, 0,4 mg, und Mannitol als Füllstoffzusatz.
 - Faktor IXa + Faktor X 2,7 IU** 4 Flaschen
Lyophilisierte Faktoren IXa und X vom Rind, stabilisiert mit Rinderserumalbumin (BSA)
 - CaCl₂ 6 ml** 1 Flasche
Calciumchloridlösung, 0,025 mol/l
 - Puffer, Konzentrat 20 mL** 1 Flasche
20 ml konzentrierter Tris-Puffer, enthält NaCl und BSA. Der 10-fach verdünnte Puffer enthält: Tris 0,05 mol/l, pH 7,3, 10 mg/ml Ciprofloxacin und 1,0 % BSA.
 - Phospholipide 2 mL** 1 Flasche
Mischung hochgereinigter Phospholipide und 10 mg/l Ciprofloxacin

WARNHINWEISE
Gefahrenklasse: **keine**
Gefahrenhinweise: **keine**
Sicherheitssätze: **keine**
In vitro -Diagnostikum.

Vorbereitung der Reagenzien
Die Reagenzien werden entsprechend der spezifischen Geräte-Applikationen rekonstituiert. Für Mikrotiter- und Teströhrchen-Methoden:

- S-2765 + I-2581:** Mit 12,0 ml sterilem Wasser bzw. NCCLS Typ II Wasser¹¹ rekonstituieren, um eine Konzentration von 1,8 mmol/l zu erhalten.
- Faktor IXa + Faktor X:** Mit 3,0 ml sterilem Wasser bzw. NCCLS Typ II Wasser¹¹ rekonstituieren.
- CaCl₂:** Gebrauchsfertig.
- Puffer, Stammlösung:** Vor Gebrauch 1:10 (1+9) mit sterilem Wasser bzw. NCCLS Typ II Wasser¹¹ verdünnen. Puffer-Arbeitslösung täglich frisch zubereiten.
- Phospholipid:** Gebrauchsfertig

Lagerung und Stabilität der Reagenzien
Die verschlossenen Reagenzien sind bei 2-8°C bis zum aufgedruckten Verfalldatum haltbar. Nach Öffnen sollte eine Kontamination durch Mikroorganismen verhindert werden.

- S-2765 + I-2581:** Nach Rekonstitution 3 Monate bei 2-8°C haltbar.
- Faktor IXa + Faktor X:** Nach Rekonstitution 12 Stunden bei 2-8°C stabil. Die Lösung kann in Aliquots bei -20°C (oder tieferen Temperaturen) für 3 Monate eingefroren werden. Nicht wieder einfrieren.
- CaCl₂ (0,025 mol/L):** Das Reagenz ist nach Öffnen der Flasche für 3 Monate bei 2-8°C haltbar.
- Puffer, Stammlösung (Tris 0,05 mol/l, pH 7,3, 10 mg/l Ciprofloxacin und 1,0 % BSA):** Nach Öffnen ist der Puffer bei 2-8°C für 3 Monate haltbar. Puffer-Arbeitslösung täglich frisch zubereiten.
- Phospholipid:** Das Reagenz ist nach Öffnen der Flasche für 3 Monate bei 2-8°C haltbar. Vor Gebrauch vorsichtig mischen.

- Zusätzlich benötigte Reagenzien und Materialien**
- Entionisiertes Wasser, gefiltert durch einen Filter mit 0,22 µm Porengröße oder NCCLS Typ II Wasser.¹¹
 - 20 %ige Essigsäure oder 2 %ige Zitronensäure.
 - Normale und pathologische Kontrollplasma, die gegen einen Internationalen Standard für Faktor VIII kalibriert sind.
 - Kalibrationsplasma, das gegen einen Internationalen Standard für Faktor VIII kalibriert ist.
 - Photometer, 405 nm (und 490 nm für Mikrotiter-Methoden).
 - Inkubator, 37°C (± 0,2°C).
 - Semi-Mikroküvetten.
 - Zentrifuge, 2000 x g.
 - Teströhrchen aus Kunststoff.
 - Stoppuhr.
 - Vortex-Mixer.
 - Geeichte Pipetten.

Probengewinnung
Neun Teile frisch gewonnenes venöses Vollblut mit 1 Teil Natriumcitrat mischen und bei 2000 x g für 10-20 Minuten bei 20-25°C zentrifugieren. Weitere Anweisungen bezüglich Entnahme, Behandlung und Lagerung von Probenmaterial gemäß NCCLS Dokument H21-A4.¹²

Qualitätskontrolle
Normale und pathologische Kontrollmaterialien für Plasma bzw. Konzentrate werden zur Durchführung einer zuverlässigen Qualitätskontrolle empfohlen. Die spezifizierten Werte der Kontrollen sollten auf einen internationalen Standard rückföhrbar sein. Regelmäßig während einer Analysenserie sollten Kontrollmessungen stattfinden. Das Kontrollmaterial sollte entsprechend den Proben behandelt werden. Der Bereich tolerierbarer Abweichungen für die Kontrollen sollte in jedem Labor ermittelt werden. Falls ein Wert außerhalb dieses Vertrauensbereiches liegt, sollte eine vollständige Überprüfung von Kalibration, Reagenzien und Analysegerät durchgeführt werden.

Expected values
Range: 49 - 126 % (2 SD, n=121) in a normal healthy population evaluated with Coatest SP Factor VIII (test tube method).

Due to the many variables that may affect results, each laboratory should establish its own normal range, avoiding inadvertent losses of factor VIII activity.

Procedure
NOTE: All conditions included in this package insert refer to the manual method. Detailed settings for the ACL 8000/9000/10000 including instructions for preparation of the reagents are available on request from Chromogenix.

Two ranges of factor VIII are defined (20-150% and 1-20%).
Range 20-150%:
Prepare a solution of phospholipid+factor IXa and factor X reagent by mixing:
• 1 volume of phospholipid
• 5 volumes of factor IXa+factor X reagent
Keep on ice or at 2-8°C
Shake gently just before use.
The mixture is stable for 4 hours at 2-8°C or 12 hours on ice.

Calibration
A standard curve is required for each Coatest SP Factor VIII kit. Normal human plasma, calibrated against an International Standard, is used for preparation of standard dilutions in plastic tubes using pre-cooled buffer working solution according to the table below:

Standard	Predilution		Buffer working-solution		Final dilution	
	%	Plasma µL	µL	Predilution µL	µL	Buffer working-solution µL
150	-	undiluted	25	25	2000	
120	200	50	20	25	2000	
100	100	50	25	25	2000	
75	100	100	25	2000		
50	100	200	25	2000		
21	100	600	25	2000		

The assigned percentage values of the standard dilutions are those obtained from a normal plasma containing 1.0 IU factor VIII/mL. In case the factor VIII content of the normal plasma differs from this value, an appropriate correction factor should be used.

Preparation of plasma sample
Use plastic test tubes.
Test plasma or concentrate 25 µL
Buffer working solution (2-8°C) 3000 µL
Mix well. Keep at 2-8°C.
The assay must be performed within 30 minutes after dilution because of the lability of factor VIII.

Assay
NOTE: The assay should be performed in plastic material.

Standard	Predilution		Buffer working-solution		Final dilution	
	%	Plasma µL	µL	Predilution µL	µL	Buffer working-solution µL
Phospholipid+ FIXa + FX (2-8°C)			200 µL		200 µL	
Test plasma or standard dilution (2-8°C)			100 µL		100 µL	
CaCl ₂ (37°C)			100 µL		100 µL	
Mix and incubate at 37°C exactly 5 min						
S-2765+I-2581 (37°C)			200 µL		200 µL	
Mix and incubate at 37°C exactly 5 min						
Acetic acid 20% or citric acid 2% (20-25°C)			100 µL			

Acid-stopped method: Read the absorbance of the sample against a reagent blank (buffer working solution instead of sample) within 4 hours.
Acid-stopped method: Because of the large dilution of the plasma, no sample blanks have to be included.
Initial rate method: Transfer immediately to a 1 cm semi-micro cuvette (pre-heated to 37°C) and measure the absorbance change at 405 nm.
Range 1-20%:
Prepare a solution of phospholipid+factor IXa and factor X reagent by mixing:
• 1 volume of phospholipid
• 5 volumes of factor IXa+factor X reagent
Keep on ice or at 2-8°C.
Shake gently just before use.
The mixture is stable for 4 hours at 2-8°C or 12 hours on ice.

Calibration
A standard curve is required for each Coatest SP Factor VIII kit. Normal human plasma, calibrated against the International Standard, is used for preparation of standard dilutions in plastic tubes using pre-cooled buffer working solution according to the table below:

Standard	Predilution		Buffer working-solution		Final dilution	
	%	Plasma µL	µL	Predilution µL	µL	Buffer working-solution µL
20	50	200	25	25	2000	
14,3	50	300	25	25	2000	
9,1	50	500	25	25	2000	
4,8	25	500	25	25	2000	
1,2	25	2000	25	25	2000	

The assigned percentage values of the standard dilutions are those obtained from a normal plasma containing 1.0 IU FVIII/mL. In case the FVIII content of the normal plasma differs from this value, an appropriate correction factor should be used.

Ergebnisse
Die Faktor VIII-Messwerte werden als % Aktivität angegeben (100 % Faktor VIII-Aktivität entspricht 1,0 IU/ml).

Erwartete Werte
Bereich: 49-126 % (2 SD-Bereich, n = 121) in einer gesunden Normalpopulation, gemessen mit COATEST SP Faktor VIII (Teströhrchen-Methode). Auf Grund der vielfältigen Variablen, die das Testergebnis beeinflussen können, sollte jedes Labor unter Vermeidung von Faktor VIII-Aktivitätsverlusten einen eigenen Normalbereich erstellen.

Testdurchführung
ANMERKUNG: Alle Angaben in dieser Gebrauchsanweisung beziehen sich auf die manuelle Durchführung der Methode. Genaue Angaben für die Durchführung der Methode auf ACL 8000/9000/10000 incl. der Vorbereitung der Reagenzien sind auf Nachfrage von Chromogenix erhältlich.
Zwei Bereiche der Faktor VIII-Aktivität werden unterschieden (20-150% und 1-20 %).

Bereich 20-150%
Lösung aus Phospholipid und Faktor IXa + Faktor X-Reagenz mischen:
• 1 Volumenteil Phospholipid
• 1 Volumenteile Faktor IXa + Faktor X-Reagenz
Auf Eis oder bei 2-8°C lagern
Vor Gebrauch vorsichtig mischen.
Die Mischung ist bei 2-8°C für 4 Stunden, auf Eis für 12 Stunden haltbar.

Kalibration
Eine Standardkurve ist für jede Testpackung COATEST SP Faktor VIII erforderlich. Humanes Normalplasma, das gegen einen Internationalen Standard kalibriert ist, wird zur Herstellung von Standardverdünnungen in Kunststoff-Röhrchen, unter Verwendung gekühlter Puffer-Arbeitslösung entsprechend nachstehender Tabelle, verwendet:

Standard	Vorverdünnung		Endverdünnung	
	Plasma µL	Puffer-Arbeitslösung µL	Vorverdünnung µL	Puffer-Arbeitslösung µL
150	-	unverdünt	25	2000
120	200	50	25	2000
100	100	50	25	2000
75	100	100	25	2000
50	100	200	25	2000
21	100	600	25	2000

Die angegebenen %-Werte der Faktor VIII-Aktivität der Standardverdünnungen ergeben sich bei Verwendung eines Normalplasmas mit einer Faktor VIII-Aktivität von 1,0 IU/ml. Falls der Faktor VIII-Gehalt des Normalplasmas von diesem Wert abweicht, ist bei der Angabe der %-Werte der Faktor VIII-Aktivität der Standardverdünnungen ein entsprechender Korrekturfaktor zu berücksichtigen.

Probenvorbereitung
Kunststoffröhrchen verwenden.
Testplasma oder Konzentrat 25 µL
Puffer-Arbeitslösung (2-8°C) 3000 µL
Gut mischen und bei 2-8°C lagern.
Auf Grund der Instabilität des Faktor VIII muss der Test innerhalb von 30 Minuten nach Verdünnung durchgeführt werden.

Testdurchführung
ANMERKUNG: Für die Testdurchführung ausschließlich Kunststoffmaterial verwenden.

Standard	Vorverdünnung		Endverdünnung	
	Plasma µL	Puffer-Arbeitslösung µL	Vorverdünnung µL	Puffer-Arbeitslösung µL
Phospholipid+ FIXa + FX (2-8°C)			200 µL	
Testplasma oder Standardverdünnung (2-8°C)			100 µL	
Mischen und 4-5 min bei 37°C inkubier				
CaCl ₂ (37°C)			100 µL	
Mischen und exakt 5 min bei 37°C inkubieren				
S-2765+I-2581 (37°C)			200 µL	
Mischen und exakt 5 min bei 37°C inkubieren				
20 %ige Essigsäure oder 2 %ige Zitronensäure (20-25°C)			100 µL	

Endpunkt Methode: Die Absorption der Proben bei 405 nm innerhalb von 4 Stunden gegen einen Reagenzienleerwert (Arbeitspuffer an Stelle des Testplasmas) ablesen. Aufgrund der hohen Vorverdünnung der Testplasmen ist ein Probenleerwert nicht erforderlich.
Kinetische Methode: Das Testgemisch sofort in eine auf 37 °C vorgewärmte Semi-Mikroküvette überführen und die Absorptionsänderung bei 405 nm aufzeichnen.

Bereich 1-20%
Lösung aus Phospholipid und Faktor IXa + Faktor X-Reagenz mischen:
• 1 Volumenteil Phospholipid
• 5 Volumenteile Faktor IXa + Faktor X-Reagenz
Auf Eis oder bei 2-8 °C lagern
Vor Gebrauch vorsichtig mischen.
Die Mischung ist bei 2-8 °C für 4 Stunden, auf Eis für 12 Stunden haltbar.

Kalibration
Eine Standardkurve ist für jede Testpackung COATEST SP Faktor VIII erforderlich. Humanes Normalplasma, das gegen einen Internationalen Standard kalibriert ist, wird zur Herstellung von Standardverdünnungen in Kunststoffröhrchen, unter Verwendung gekühlter Puffer-Arbeitslösung entsprechend nachstehender Tabelle, verwendet:

Standard	Vorverdünnung		Endverdünnung	
	Plasma µL	Puffer-Arbeitslösung µL	Vorverdünnung µL	Puffer-Arbeitslösung µL
20	50	200	25	2000
14,3	50	300	25	2000
9,1	50	500	25	2000
4,8	25	500	25	2000
1,2	25	2000	25	2000

Die angegebenen %-Werte der Faktor VIII-Aktivität der Standardverdünnungen ergeben sich bei Verwendung eines Normalplasmas mit einer Faktor VIII-Aktivität von 1,0 IU/ml. Falls der Faktor VIII-Gehalt des Normalplasmas von diesem Wert abweicht, ist bei der Angabe der %-Werte der Faktor VIII-Aktivität der Standardverdünnungen ein entsprechender Korrekturfaktor zu berücksichtigen.

ENGLISH - Insert revision 02/2015

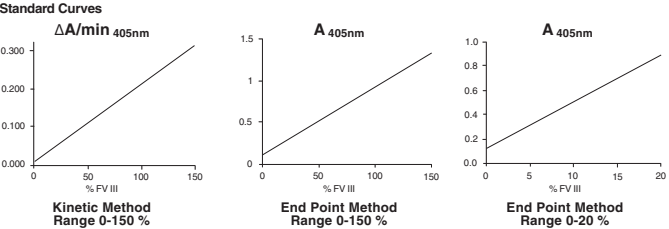
Preparation of plasma sample
Use plastic test tubes.
Test plasma or concentrate 25 µL
Buffer working solution (2-8°C) 2000 µL
Mix well. Keep at 2-8°C.
The assay must be performed within 30 minutes after dilution because of the lability of factor VIII.

Assay
Because of the fairly small generation of FXa in samples with <5% factor VIII, the acid-stopped method is preferred for this range of factor VIII.
NOTE: The assay should be performed in plastic material.
Phospholipid+ FIXa + FX (2-8°C) 200 µL
Test plasma or standard dilution (2-8°C) 100 µL
Mix and incubate at 37°C 4-5 min
CaCl₂ (37°C) 100 µL
Mix and incubate at 37°C exactly 10 min
S-2765+I-2581 (37°C) 200 µL
Mix and incubate at 37°C exactly 10 min
Acetic acid 20% or citric acid 2% (20-25°C) 100 µL

Read the absorbance of the sample against a reagent blank (buffer working solution instead of sample) within 4 hours. Because of the large dilution of the plasma, no sample blanks have to be included.
NOTE: The above described assay can also be conveniently performed in microplates by a four-fold reduction of all volumes, and keeping all other conditions such as incubation and hydrolysis times identical. In this case read the absorbance at 405 nm and 490 nm. Subtract the A₉₀ from the A₀₅ to correct for differences in microplate wells.

LIMITATIONS OF PROCEDURE
The activation reaction should be performed in plastic material since glass surfaces may interfere with the generation of factor Xa. Factor VIII is a labile coagulation factor and in order to obtain the accuracy which the method offers it is important to work in a carefully standardized manner throughout the assay procedure.

Calculation
Plot the change in absorbance per minute (ΔA/min) or absorbance (A) for the standards against their concentrations of factor VIII on linear graph paper. Read the % FVIII value for the corresponding absorbance for the unknown sample from the standard curve.



Specificity and Interfering Factors

FVIII results are not affected by Triglycerides at concentrations of 700 mg/dL. Bilirubin at concentrations of 20 mg/dL, Hemoglobin at concentrations of 100 mg/dL and unfractionated (UF) Heparin at concentrations of 1.0 IU/mL.
NOTE: Hemolyzed samples in the low range should not be analyzed.
Due to the high dilutions used, there is no underestimation of factor VIII activity in samples containing Lupus anticoagulant.

Precision
Within run and total precision was assessed over multiple runs.

System	%CV (Within run)	n	%CV (Total)	N
Test Tube method Mean FVIII				
83 %	3,4	2	5,3	80
14 %	4,3	2	5,6	80

Correlation:

System	Slope	Intercept	r	Reference method	n
Test Tube method	1,0851	-4,80	0,9873	Coatest Factor VIII (natural porcine phospholipid)	181

This study (n=181) was performed using samples from healthy individuals, as well as samples from patients with various levels of FVIII deficiency, von Willebrand's disease and other disorders.

Linearity System
Test Tube method: 0 -150% factor VIII

Detection Limit System
Test Tube method: The assay allows detection of 1% factor VIII activity.

Sensitivity: System
Test Tube method ΔA₄₀₅ per 1% of FVIII activity: Low range 0.034 Normal range 0.009

Determinations/kit
Microplate method: 240 Test tube method: 60

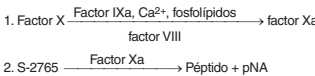
DEUTSCH - Beipackzettel Version 02/2015

Probenvorbereitung
Kunststoffröhrchen verwenden.
Testplasma oder Konzentrat 25 µL
Puffer-Arbeitslösung (2-8°C) 2000 µL
Gut

Aplicación

Para la determinación fotométrica de la actividad del Factor VIII en plasma citratado, en el estudio de deficiencias de Factor VIII o en la monitorización de pacientes bajo terapia de sustitución, así como para la estimación de concentrados de FVIII.

Principio



En presencia de calcio y fosfolípidos, el factor X se activa a factor Xa gracias al Factor IXa. Este proceso está estimulado por el factor VIII, el cual puede considerarse como cofactor de esta reacción. Utilizando cantidades óptimas de Ca²⁺ y fosfolípidos y exceso de factores IXa y X, el grado de activación de factor X depende únicamente de la cantidad de factor VIII. El Factor Xa hidroliza el sustrato cromogénico S-2765 liberándose así el grupo cromóforo pNA. El color se lee fotométricamente a 405 nm. La cantidad de Factor Xa generado y la intensidad de color producida, es proporcional a la actividad del factor VIII de la muestra. La hidrólisis del sustrato S-2765 por parte de la trombina formada, se evita con la adición de un inhibidor sintético de la trombina, I-2581, conjuntamente con el sustrato.

Composición

- 1. **S-2765 15.4 mg + I-2581** **1 vial**
 Sustrato Cromogénico (N-a-Z-D-Arg-Gly-Arg-pNA), 15.4 mg, inhibidor sintético de la Trombina, 0.4 mg, y manitol añadido como excipiente.
- 2. **Factor IXa + Factor X 2.7 IU** **4 vials**
 Factores IXa y X bovinos liofilizados con albúmina bovina añadida como agente estabilizante
- 3. **CaCl₂ 6 ml** **1 vial**
 Solución de Cloruro Cálcico, 0.025 mol/L
- 4. **Buffer, stock solution 20 mL** **1 vial**
 20 mL Tampón Tris concentrado que contiene NaCl y BSA. Características del tampón diluido 1:10 (1+9): Tris 0.05 mol/L, pH 7.3, 10 mg/L Ciprofloxacín y 1.0% BSA.
- 5. **Phospholipid 2 mL** **1 vial**
 Mezcla de fosfolípidos altamente purificados y 10 mg/L Ciprofloxacín.

PRECAUCIÓN Y ALERTAS

Clase de peligro: **ninguna**
 Indicaciones de peligro: **ninguna**
 Consejos de prudencia: **ninguno**
 Este producto es para el diagnóstico *in vitro*.

Preparación

Los reactivos se reconstituyen de acuerdo a las adaptaciones específicas de cada instrumento. Para las técnicas en microplaca y tubo:

- 1. **S-2765 + I-2581**: Reconstituir con 12.0 mL de agua destilada tipo II NCCLS¹¹, para obtener una concentración de 1.8 mmol/L.
- 2. **Factor IXa + Factor X**: Reconstituir con 3.0 mL de agua destilada tipo II NCCLS¹¹
- 3. **CaCl₂**: Listo para usar.
- 4. **Buffer, stock solution**: Diluir 1:10 (1+9) con agua destilada tipo II NCCLS.¹¹ Prepare esta solución nueva cada día.
- 5. **Phospholipid**: Listo para usar.

Conservación y estabilidad de los reactivos

- Los reactivos que no hayan sido abiertos son estables hasta la fecha de caducidad indicada en el vial si se mantienen a 2-8°C. Una vez abierto el vial debe evitarse la contaminación por microorganismos.
- 1. **S-2765 + I-2581**: Estabilidad después de la reconstitución: 3 meses a 2-8°C.
 - 2. **Factor IXa + Factor X**: Estabilidad después de la reconstitución: 12 horas a 2-8°C. Alícuotas congeladas de esta solución son estables a -20°C (o temperaturas menores) durante 3 meses. No congelar de nuevo.
 - 3. **CaCl₂ (0.025 mol/L)**: El vial abierto es estable 3 meses a 2-8°C.
 - 4. **Buffer, stock solution (Tris 0.05 mol/L, pH 7.3, 10 mg/L Ciprofloxacín y 1.0% BSA)**: Una vez abierto el tampón es estable 3 meses a 2-8°C. Prepare esta solución nueva cada día.
 - 5. **Phospholipid**: El vial abierto es estable 3 meses a 2-8°C. Mezclar vigorosamente antes de usar.

Reactivos y materiales requeridos pero no suministrados

- 1. Agua desionizada, filtrada con un filtro 0.22 mm o agua destilada tipo II NCCLS.¹¹
- 2. Ácido Acético al 20% o ácido cítrico al 2%.
- 3. Plasma Control Anormal y Normal calibrado contra el estándar internacional de Factor VIII
- 4. Plasma Calibrador titulado contra un estándar internacional
- 5. Fotómetro, 405 nm (y 490 nm para procedimiento en microplaca)
- 6. Incubador 37°C ± 0.2°C
- 7. Cubetas semi-micro
- 8. Centrífuga, 2000xg
- 9. Tubos de plástico
- 10. Cronómetro
- 11. Vórtex
- 12. Pipetas calibradas

Recolección de las Muestras

Recoger nueve partes de sangre recién extraída por punción venosa y una parte de anticoagulante citrato trisódico. Centrifugar: 2000 x g durante 10-20 minutos a 20-25°C. Referirse al documento NCCLS documento H21-A4 para más información sobre la recolección, transporte y almacenamiento de muestras.¹²

Control de Calidad

Se recomienda el uso de los controles de plasma normales y anormales de IL para realizar un completo programa de Control de Calidad.¹³ Los valores asignados a los controles deben guardar trazabilidad con el Estándar Internacional. Los controles deben ser procesados dentro de cada sesión. Los controles deben ser tratados del mismo modo que las muestras. Cada laboratorio debe establecer la media y desviación estándar de sus controles. Si se obtienen resultados fuera del rango establecido para ese control, compruebe la calibración, reactivos y procedimiento del test.

Resultados

Los resultados del Factor VIII se informan en % de actividad (el 100% de actividad del factor VIII equivale a 1.0 IU/mL).

Valores esperados

Rango: 49 - 126 % (2 SD, n=121) en población sana evaluada con Coatest SP Factor VIII (método en tubo). Debido a las diferentes variables que pueden afectar a los resultados, cada laboratorio debe establecer su propio rango de normalidad, para evitar pérdidas inadvertidas de actividad de factor VIII.

Procedimiento

NOTA: Todas las condiciones del prospecto se refieren al método manual. Las instrucciones de preparación de los reactivos y configuración de la técnica para el ACL 8000/9000/10000 pueden solicitarse a Chromogenix. Se han definido dos rangos de factor VIII (20-150% y 1-20%).

Rango 20-150%:

Prepare una solución de reactivos de fosfolípidos + factor IXa y factor X mezclando:

- 1 volumen de fosfolípidos
- 5 volúmenes de reactivo factor IXa + factor X

Mantenga la mezcla en hielo o a 2-8°C
 Agite vigorosamente antes de usar.
 La mezcla es estable 4 horas a 2-8°C o 12 horas en hielo.
Calibración
 Es necesario realizar una curva estándar para cada kit de Coatest Factor VIII. Se utiliza plasma humano normal, calibrado contra un Estándar Internacional, para preparar las diluciones de los estándares. Prepare las diluciones en tubos de plástico utilizando el tampón de trabajo precalentado según la tabla inferior:

Estandar	Predilución		Dilución Final	
	Plasma	Tampón de trabajo	Predilución	Tampón de trabajo
%	μL	μL	μL	μL
150	-	Sin diluir	25	2000
120	200	50	25	2000
100	100	50	25	2000
75	100	100	25	2000
50	100	200	25	2000
21	100	600	25	2000

El valor del porcentaje de cada dilución es la obtenida de un plasma normal con 1.0 IU factor VIII/mL. La concentración o actividad de un plasma normal puede diferir de este valor, utilice el factor de corrección apropiado.

Preparación de la muestra de plasma

Utilice tubos de plástico.
 Volumen de plasma o concentrado 25 μL
 Tampón de Trabajo (2-8°C) 3000 μL
 Mezclar. Mantener a 2-8°C.
 El test debe realizarse dentro de los 30 minutos posteriores a la dilución debido a la labilidad del factor VIII.

Ensayo

NOTA: El ensayo debe realizarse en material de plástico.

Método de parada con ácido	Método del ratio inicial
Fosfolípido+ FIXa + FX (2-8°C) 200 μL	200 μL
Plasma o dilución estándar (2-8°C) 100 μL	100 μL
Mezclar e incubar a 37°C 4-5 min	
CaCl ₂ (37°C) 100 μL	100 μL
Mezclar e incubar a 37°C exactamente 5 min	
S-2765+I-2581 (37°C) 200 μL	200 μL
Mezclar e incubar a 37°C exactamente 5 min	
Ácido acético 20% o ácido cítrico 2% (20-25°C) 100 μL	

Método de parada con ácido: Lea las absorbancia de la muestra contra el blanco de reactivo (tampón de trabajo en lugar de muestra) dentro de las 4 horas. Debido a la gran dilución del plasma, no se debe incluir blancos de muestra.
Método de ratio inicial: Transferir inmediatamente a una cubeta semi-micro de 1 cm (pre-calentada a 37°C) y medir el cambio de absorbancia a 405 nm.

Rango 1-20%:

Prepare una solución de reactivos de fosfolípidos + factor IXa y factor X mezclando:

- 1 volumen de fosfolípidos
- 5 volúmenes de reactivo factor IXa + factor X

Mantenga la mezcla en hielo o a 2-8°C
 Agite vigorosamente antes de usar.
 La mezcla es estable 4 horas a 2-8°C o 12 horas en hielo.
Calibración
 Es necesario realizar una curva estándar para cada kit de Coatest Factor VIII. Se utiliza plasma humano normal, calibrado contra un Estándar Internacional, para preparar las diluciones de los estándares. Prepare las diluciones en tubos de plástico utilizando el tampón de trabajo precalentado según la tabla inferior:

Estandar	Predilución		Dilución Final	
	Plasma	Tampón de trabajo	Predilución	Tampón de trabajo
%	μL	μL	μL	μL
20	50	200	25	2000
14,3	50	300	25	2000
9,1	50	500	25	2000
4,8	25	500	25	2000
1,2	25	2000	25	2000

El valor del porcentaje de cada dilución es la obtenida de un plasma normal con 1.0 IU factor VIII/mL. La concentración o actividad de un plasma normal puede diferir de este valor, utilice el factor de corrección apropiado.

ESPAÑOL - Revisión Prospecto 02/2015

Preparación de la muestra de plasma

Utilice tubos de plástico.
 Volumen de plasma o concentrado 25 μL
 Tampón de Trabajo (2-8°C) 2000 μL
 Mezclar. Mantener a 2-8°C.
 El test debe realizarse dentro de los 30 minutos posteriores a la dilución debido a la labilidad del factor VIII.

Ensayo

Debido a la escasa generación de FXa en muestras con <5% de factor VIII, se recomienda el método de parada con ácido para ese rango de factor VIII.
 NOTA: El ensayo debe realizarse en material de plástico.
 S-2765+I-2581 (37°C) 200 μL
 Plasma o dilución estándar (2-8°C) 100 μL
 Mezclar e incubar a 37°C 4-5 min

CaCl₂ (37°C) 100 μL
 Mezclar e incubar a 37°C exactamente 10 min
 S-2765+I-2581 (37°C) 200 μL
 Mezclar e incubar a 37°C exactamente 10 min
 Ácido acético 20% o ácido cítrico 2% (20-25°C) 100 μL
 Lea la absorbancia de la muestra contra el blanco de reactivo (tampón de trabajo en lugar de muestra) dentro de las 4 horas. Debido a la gran dilución del plasma, no se debe incluir blancos de muestra.
NOTA: El ensayo arriba descrito también puede realizarse en micro pocillos reduciendo a una cuarta parte todos los volúmenes, y manteniendo todas las demás condiciones (incubación, tiempos de hidrólisis). En este caso la absorbancia debe leerse a 405 nm y 490 nm. Reste la A₄₉₀ de la A₄₀₅ para corregir las diferencias de los pocillos de la microplaca.

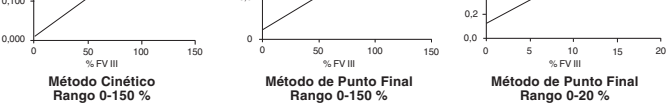
LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

La reacción de activación debe realizarse en material de plástico ya que las superficies de cristal pueden interferir con la generación de factor Xa. El Factor VIII es un factor de la coagulación muy lábil, de modo que es muy importante seguir al pie de la letra y estandarizando al máximo todo el proceso de trabajo para asegurar unos buenos resultados.

Cálculo

Introduzca los cambios de absorbancia por minuto (ΔA/min) o absorbancia (A) para todos los estándares contra sus concentraciones de factor VIII en un papel de gráficos lineales. Con la absorbancia obtenida de la muestra y calcule el valor en % de FVIII utilizando la curva estándar.

Curvas Estándar



Características Técnicas

Especificidad y Factores de interferencia
 Los resultados de FVIII no se ven afectados por concentraciones de: Triglicéridos < 700 mg/dL, Bilirrubina < 20 mg/dL, Hemoglobina < 100 mg/dL y Heparina no fraccionada (UF) < 1.0 IU/mL.
 NOTA: No deberían analizarse muestras hemolizadas en el rango bajo.

Debido a las diluciones tan grandes que se utilizan, no hay una infravaloración de actividad de factor VIII en muestras con anticoagulante tipo Lupus.

Precisión

La precisión total e intraserie se establecieron sobre múltiples series.

Sistema	%CV (Intraserie)	n	%CV (Total)	N
Método en tubo Media: % FVIII				
83 %	3.4	2	5.3	80
14 %	4.3	2	5.6	80

Correlación:

Sistema	Pendiente	Intercepción	r	Método de Referencia	n
Método en tubo	1.0851	-4.80	0.9873	Coatest Factor VIII (fosfolípidos porcinos naturales)	181

Este estudio (n=181) se realizó utilizando muestras procedentes de individuos sanos, así como de pacientes con diferentes niveles de deficiencia de FVIII, enfermedad de von Willebrand y otras patologías.

Linealidad del Sistema

Método en tubo: 0 -150% factor VIII

Límite de detección del Sistema

Método en tubo: El ensayo permite la detección de 1% de actividad de factor VIII.

Sensibilidad del Sistema

Método en tubo:	ΔA ₄₀₅ por 1% de actividad de FVIII:	rango bajo 0.034 rango normal 0.009
-----------------	---	--

Determinaciones/kit

Método en microplaca: 240 Método en tubo: 60

Symbols used / Verwendete Symbole / Simbolos utilizados / Symboles utilisés / Simboli impiegati / Χρησιμοποιηθέντα σύμβολα

IVD In vitro Diagnostic Medical Device In vitro Diagnostikum Dispositif médical de diagnostic <i>in vitro</i> Producto sanitario para diagnóstico <i>in vitro</i> Dispositivo medicodiagnóstico <i>in vitro</i> Dispositivo médico para utilização em diagnóstico <i>in vitro</i> Medicinsk udstyr til <i>in vitro</i> -diagnostik In vitro diagnostisk medicinsk produkt Πρόϊον για διάγνωστική χρήση <i>in vitro</i>	LOT Batch code Chargenbezeichnung Codigo de lote Code du lot Codice del lote Número de lote Batchkoden Tilvækningskod Αρ. Παρτίδας	Use by Verwendbar bis Fecha de caducidad Utilizzare entro Date limite de utilização Anvendelsesdato Ανvändning Χρήση έως	Temperature limitation Zulässiger Temperaturbereich Limite de temperatura Limites de température Limite di temperatura Limite de temperatura Temperaturbegrensning Temperatur gräns Περιορισμοί θερμοκρασίας	Consult instructions for use Consulte las instrucciones de uso Gebrauchsanweisung beachten Consulte las instrucciones de uso Consultare le istruzioni d'utilisation Consultare le istruzioni per l'uso Consultar as instruções de utilização Se instruktion för brug Ta del av instruktionerna före användning Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης	CONTROL Control Kontrollen Control Contrôle Controllo Controllo Kontrol Kontrol Υακό πρότυπο έλέγχου	Biological risks Biologisches Risiko Riesgo biológico Risque biologique Rischio biologico Risco biológico Miljø oplysniger Biologiska risker Βιολογικοί κίνδυνοι	Manufacturer Hersteller Fabricant Fabricante Fabricado por Producent Tilværkare Κατασκευαστής	EC REP Authorised representative Bevollmächtigter Representante autorizado Mandataire Rappresentanza autorizzata Representante autorizado Leverandør Auktoriserad representant Εξουσιοδοτημένος αντιπρόσωπος
--	--	---	---	---	---	--	--	--

Printed Insert Sheet: 303412
Revision: R3
Issued: 02/2015
C.O.: 453590

LANGUAGES

ENGLISH
DEUTSCH
ESPAÑOL

TECHNICAL SPECS

PAPER: White paper, 50-60 g/m² weight.
SIZE: 11 x 17" (280 x 432 mm.).
PRINT: Front/Back.
PRINT COLOR: Front - Top rule Orange Pantone 137, all remaining type in black
Back - All type in black.