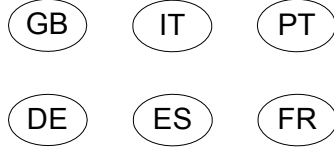







Factor VIII Inhibitor Reagent Kit



REF 5152005 Factor VIII Inhibitor Reagent Kit (Bethesda Units)



symbols key / Symbolschlüssel / interpretazione dei simboli / explicación de símbolos / explicação dos símbolos / clé des symboles / Symbolnyckel / symbolforklaring / Tegnforklaring / Κλειδί συμβόλων / Използвани символи / символы / Klíčova slova / Značenje simbola			
	manufacturer / Hersteller / fabbricante / fabricante / fabricante / fabricant / Tillverkaren / Fabrikanten / Produzent / Κατασκευαστής / Производитель / Производител / výrobce / Proizvođač	 expiry date / Verfallsdatum / data di scadenza / fecha de caducidad / data de validade / date d'expiration / utgångsdatum / udløbsdato / Utløpsdato / Ημερομηνία λήξης / срок на годност / datum expirace / срок годности / datum expirace / Rok trajanja	
	storage temperature / Lagertemperatur / temperatura di conservazione / temperatura de conservación / temperatura de conservação / température de stockage / lagringstemperatur / oppbevaringstemperatur / Oppbevaringstemperatur / Βερυοκρασία αποθήκευσης / съхранение на / teplota skladování / температура хранения / teplota skladování / Temperatura lagerovanja	 consult instructions for use / Gebrauchsanweisung beachten / consultare le istruzioni per l'uso / consulte las instrucciones de uso / consultar o manual de instruções / instruction d'utilisation / se användarinstruktioner / følg brugsvejledning / Følg bruksanvisningen / συμβουλευθείτε τις οδηγίες για τη χρήση / прочетете инструкцията за работа / potřeba řídit se instrukcemi / перед использованием читайте инструкцию / sledujte návod k použití / Pročitaj upustvo pre upotrebe	
		 determinations / Bestimmungen / determinazioni / determinaciones / determinações / déterminations / bestämmingar / bestemmelse / Bestemmelse / προσδιορισμοί / брой тестове / stanovení / определнный / роčet stanovení / Definicija	
AQUA	distilled water / destilliertes Wasser / acqua distillata / agua destilada / água destilada / eau distillée / destillerat vatten / destilleret vand / Destillert vann / απεσταγμένο νερό / destilirana voda / destilovaná voda / дистиллированная вода / destilovaná voda / Serija	LOT	lot / Charge / lotto / lote / lote / lot / sats / serie / Parti / партиа / партида номер / šarže / lot / šarže / in vitro diagnostika
BUF	Reaction buffer / Reaktionspuffer / tampone di reazione / tampón de reacció / Tampão de reação / tampon de réaction / Reaktionspuffer / Reaktionsbuffer / Reaktionsbuffer / διάλυμα αντίδρασης / Реакционен буфер / Рабочий буферный раствор / Reakční pufr / Reakcioni pufer	MTP	microtiter plate / Mikrotiterplatte / placa microtiter / microplaca / microplaca / microplaques sensibilisées / Mikrotiterplatta / Mikrotiterplade / mikrotiterplate / πλάκα μικροτιτλοδότησης / Микротитр-на плака / Микропланшет / Mikrotitrační destička / Mikrotitracione ploče
CAL	Calibrator / Kalibrator / Calibratore / calibrador / calibrador / calibreur / Kalibrator / Kalibrator / Kalibrator / Βαθμονομητής / Калибратор / калибратор / kalibrátor / Kalibrator	REF	catalogue number / Katalognummer / numero di catalogo / número de catálogo / número de referència / réf. de catalogue / katalognummer / Katalognummer / αριθμός καταλόγων / каталожен номер / katalogové číslo / каталожный номер / katalogové číslo / Kataloški broj
CONJ	Conjugate / Konjugat / Coniugato / conjugado / conjugado / conjugaté / Konjugerad / Konjugat / Konjugat / συνδεδετικό / Конюгат / Конъюгат / Konjugát / Konjugat	RTU	ready to use / gebrauchsfertig / pronto all'uso / listo para usar / pronto a usar / prêt à l'emploi / færdig att användas / færdig til brug / klar til bruk / έτοιμο προς χρήση / Готов за употреба / готов к использованию / k přímému použití / Razrediti ili rastvoriti
CONT	Control / Kontrolle / controllo / control / control / contrôle / Kontroll / Kontroll / Kontroll / διάλυμα ελέγχου / Контрол / Контрольный образец / Kontrola / Kontrola	STOP	stop solution / Stopplösung / Soluzione di arresto / solución de parada / solução de paragem / solution d'arrêt / Stoppløsning / Stop-opløsning / Stoppløsning / διάλυμα παύσης / Стоп раствор / Стоп-раствор / Zastavovací roztok / Stop solucija
DIL	dilute or dissolve in / verdünnen oder lösen in / diluire o dissolvere in / diluir o dissolver / diluir ou dissolver em / diluer ou dissoudre dans / späd eller upplös i / fortyndes eller opløses i / Fortyndes eller oppløses i / αραιωση ή διάλυση σε / разтворете или разрежете с / zředit anebo rozpustit v / разбавить или растворить в / nafedte nebo rozpustite v / razrediti ili rastvoriti u	SUB	substrate / Substrat / substrato / substrato / substrato / substrat / Substrat / Substrat / Substrat / υπόστρωμα / Субстрат / Субстрат / Substrát / Substrat
INC	incubation buffer / Inkubationspuffer / tampone di incubazione / tampón de incubación / tampão de incubação / tampon d'incubation / Inkubationspuffer / Inkubationsbuffer / Vaskebufferkonsentrat / διάλυμα επώασης / Инкубационен буфер / Буфер для инкубации / Inkubační pufr / Inkubacioni pufer	WASH	washing solution concentrate / Waschlösungskonzentrat / concentrado de solución de lavado / solución de lavado concentrada / tampão de lavagem concentrado / Tampon de lavage concentré / Vattenlösingskoncentrat / Vaskeopløsningskoncentrat / vaskeløsningskoncentrat / συμπυκνωμένο διάλυμα πλύσης / Концентриран миеш разтвор / Концентрат промывочного раствора / Koncentrát promývacího roztoku / Koncetrat solucije za ispiranje
F I C	For research use only		



PRODUCT DESCRIPTION

INTENDED USE

Reagent kit for carrying out Factor VIII inhibitor assays.

COMPOSITION

The Factor VIII Inhibitor Reagent kit for 2-4 determinations contains:

vial(s)	Reagents
2 x	Factor VIII Normal Plasma ~ 3 mL
1 x	Factor VIII Inhibitor Plasma 1 mL
1 x	Factor VIII Inhibitor Free Plasma i.ads. 1 mL
1 x	Imidazole buffer, sterile 17 mL

The reagents for Factor VIII assay are not included.

MATERIAL REQUIRED (not supplied with the kit)

-	Pipettes	- Distilled water	
-	Solutions/buffers:		
	REF 5277015	CaCl ₂ 25 mmol/L Solution	100 mL
	REF 5410010	Imidazole Buffer	50 mL
-	Reagents		
	REF 5154007	F VIII Deficient Plasma, native	5 x 1 mL
	REF 5035060	Dapttin TC	5 x 2 mL
	REF 5035090	Dapttin TC	6 x 10 mL
-	Chromogenic method		
	REF 5344101	Technochrom F VIII:C	40 tests
	REF 5344103	Ceveron Technochrom F VIII:C	40 tests
-	Calibration Plasma		
	REF 5220110	Coagulation Reference	5 x 1 mL
	REF 5220130	Ceveron Coagulation Reference	5 x 1 mL

WARNING AND PRECAUTIONS

- For Research Use Only
- All blood and plasma samples and products have to be regarded as potentially infectious and handled with appropriate care and in compliance with the biosafety regulations in force and must be disposed of in the same way as hospital waste.
- This lot of reagents prepared from human blood and each single plasma used for this lot are HBsAg, HIV 1/2 Ab negative and HCV Ab positive. At present plasma of haemophiliacs is only available as HCV Ab positive (see package label and vial label).

STABILITY AND STORAGE

The expiry date printed on the labels applies to storage of the unopened bottles at +2...+8 °C.

Stability after reconstitution:

*RT= room temperature

RT*	-20 °C
2 hours	1 month

TEST PROCEDURE

PREPARATION OF PLASMA SAMPLES

Plasma separation:

Mix 9 parts of venous blood and 1 part of Sodium Citrate Solution (0.11 mol/L) and centrifuge for 15 min at a RCF of at least 2500 (corresponding to DIN 58905). The plasma sample can be stored at room temperature for 3 hours. For longer storage freeze immediately after centrifugation (1 month).

PREPARATION OF REAGENT

Factor VIII Normal Plasma, 2 vials, to be dissolved with the amount of distilled water indicated on the label. The normal plasma then contains one I.U. Factor VIII/mL.

Factor VIII Inhibitor Plasma, to be dissolved in 1 mL distilled water. The number of Factor VIII inhibitor units/mL (Bethesda units) is given on the label.

Factor VIII Inhibitor Free Plasma i.ads., to be dissolved in 1 mL distilled water. It serves as a negative control without Factor VIII Inhibitor.

DETERMINATION OF FACTOR VIII

The Factor VIII determination has to be effected either by the one-stage method or by using a chromogenic method (TECHNOCHROM F VIII:C).

When setting up the calibration curve with the one-stage method, Coagulation Reference shall be applied.

DESCRIPTION AND CALCULATION OF THE TEST

CEVERON

Technoclone provides Application sheets for Ceveron® alpha. The Application sheets contain analyser/assay specific handling and performance information which may differ from that provided in this instruction for use. In this case the information contained in the Application sheets supersedes the information in this instruction for use. Please consult the instruction manual of the Ceveron® alpha.

MANUAL

- 1. Test sample:** The citrated plasma, either neat or diluted with Imidazole buffer is mixed in equal parts with the Factor VIII Normal Plasma (1 I.U. Factor VIII/mL).
- 2. Normal value (comparison mixture):** The normal plasma is diluted with equal parts of Imidazole buffer in a similar way to the test sample.
- 3. Test:** Each mixture has to be incubated for exactly two hours in a water bath at 37°C and stored at 2...8°C (ice waterbath) until testing of the F

VIII content. This test than has to be performed within two hours. The incubated sample to be tested is diluted in accordance with the selected F VIII method (one stage method: 1:5 with imidazole buffer dilution, TECHNOCHROM F VIII:C 1:41 with F VIII dilution buffer). In order to set up the F VIII calibration curve, TECHNOCONE's F VIII standard plasmas calibrated against the valid WHO plasma standards should be used (not contained in the kit).

- 4. Residual % Factor VIII Activity:** A test sample has no inhibitor if the Factor VIII value of the test sample is the same as the value of the control mixture i.e. the % Factor VIII activity remaining after incubation is 100%.

$$\% \text{ F VIII residual activity} = \frac{\text{F VIII value of the test sample}}{\text{F VIII value of the comparison mixture}} \times 100$$

- 5. Definition of Bethesda Unit:** A test sample treated by the method above with a residual Factor VIII activity of 50% contains one Bethesda Unit of Factor VIII Inhibitor/mL.

- 6. Calculation:** Using semi log graph paper, residual % Factor VIII activity is plotted against Bethesda Units/mL (Linear Axis). The residual % Factor VIII activity between 25% and 75% can then be read off and the number of units Factor VIII Inhibitor/mL is multiplied by the dilution factor to obtain the number of Bethesda units per mL in the sample (see graph.). For this purpose it is also possible to make use of the equation below which is based on the graphic presentation:

$$\text{F VIII Inhibitor (BU)} = \frac{[2 - \log(\text{residual activity F VIII})]}{0.30103}$$

INTERPRETATION OF RESULTS

- A. Samples:** The plasma samples under test can be classified in three groups (a) without Factor VIII inhibitor, (b) weak Factor VIII inhibitor (≤ 10 BU./mL) and (c) strong Factor VIII inhibitor. There are different dilutions for each test group (see table).

In special cases other dilutions may be used e.g. 1:1.5 or 1:512 and 1:1024.

	B.U./mL	undil.	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256
(a) without F VIII-inh.	≤ 1	+	+							
(b) weak F VIII-inh.	≤ 10	+	+	+	+	+				
(c) strong F VIII-inh.	> 10				+	+	+	+	+	+

Geometric dilution of the plasma sample under test, with an unknown value of Factor VIII inhibitor, are made with imidazole buffer based on the group class either a, b or c. Then one part of sample (0.2 mL) is mixed with one part of Factor VIII Normal plasma (0.2 mL).

B. Factor VIII Inhibitor Plasma: Three geometrical dilutions of the Factor VIII Inhibitor Plasma with known Bethesda Units should be used as a positive Control. The dilution factor of the middle dilution should correspond approximately to the Bethesda Units of the plasma.

C. Factor VIII Inhibitor Free Plasma: To detect or exclude a very weak Factor VIII inhibitor the Factor VIII Inhibitor Free Plasma should be tested undiluted and at a dilution of 1:2 as a negative control (without Factor VIII inhibitor).

D. Normal Value: The comparison mixture (0.2 mL Imidazole buffer + 0.2 mL Factor VIII Normal Plasma) serves as reference value for the calculation of the residual % Factor VIII activities of each sample. It should be determined every time.

E. Performance of the Test: see under Point MANUAL / 3.Test

F. Assessment: Normally only one or two dilutions of every sample will fall within the range of the graph. In the case of two dilutions, the results should be averaged. Results with Bethesda Units/mL ≤ 1 should be regarded with caution. (see C).

Example: Patient plasma dilution 1:8
 Factor VIII-content of the incubated sample: 16.5%
 Normal value: 47%
 F VIII Residual Activity: 35% = 1.5 U.F VIII Inh./mL
 Bethesda units in the test sample: 1.5 x 8 = 12 BU/mL

STANDARDISATION

The Coagulation Reference is calibrated against the plasma standard of the WHO.

LIMITATION OF THE TEST

Other inhibitors, for example a F IX inhibitor, can affect the F VIII determination. A new calibration is required for each batch of reagents where a calibration curve is necessary and for each instrument used. Also a new calibration is recommended, if software changes are introduced or following a major service of either instruments or equipment.

PRECISION

Reproducibility was determined with different samples.

The following results were obtained for day to day precision:

Sample	Sample 1	Sample 2
n	8	20
MV BU	1,7	19,9
SD	0,2	1,9
CV (%)	9,77	9,89

LITERATURE

Carol K. Kaspar et. al.: A More Uniform Measurement of Factor VIII Inhibitors; Thrombos. Diathes. Haemorrh. 34 (1975), 869

PRODUKTBESCHREIBUNG

ANWENDUNG

Reagenziensatz zur Bestimmung von Faktor VIII Inhibitor.

ZUSAMMENSETZUNG

Der Factor VIII Inhibitor Reagenziensatz für 2-4 Bestimmungen enthält:

- Fl. Reagenzien
- 2 x Factor VIII Normal Plasma ~3 mL
- 1 x Factor VIII Inhibitor Plasma 1 mL
- 1 x Factor VIII Inhibitor Free Plasma i.ads. 1 mL
- 1 x Imidazolpuffer, steril 17 mL

Die Reagenzien zur FVIII Bestimmung sind nicht enthalten.

BENÖTIGTES MATERIAL (nicht im Testkit enthalten)

- Pipetten - Destilliertes Wasser
- Lösungen/Puffer:
 - [REF] 5277015 CaCl₂ 25 mmol/L Lösung 100 mL
 - [REF] 5410010 Imidazolpuffer 50 mL
- Reagenzien
 - [REF] 5154007 F VIII Mangelplasma, nativ 5 x 1 mL
 - [REF] 5035060 Daptin TC 5 x 2 mL
 - [REF] 5035090 Daptin TC 6 x 10 mL
- Chromogener Test
 - [REF] 5344101 Technochrom F VIII:C 40 tests
 - [REF] 5344103 Ceveron Technochrom F VIII:C 40 tests
- Kalibrationsplasma
 - [REF] 5220110 Coagulation Reference 5 x 1 mL
 - [REF] 5220130 Ceveron Coagulation Reference 5 x 1 mL

WARNHINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN

- Nur zur Anwendung als *in vitro* Diagnostikum
- Alle Blut- bzw. Plasmaprodukte und Proben müssen als potentiell infektiös angesehen werden. Sie sind mit der notwendigen Sorgfalt und entsprechend den Sicherheitsvorschriften zu behandeln und wie Krankenhausmüll zu entsorgen.
- Die Reagenziencharge, hergestellt aus humanem Blut, und jedes hierzu verwendete Einzelplasma sind HBs Ag, HIV 1/2 Ak negativ und HCV Ak positiv. Plasmen von Hämophilien sind derzeit nur HCV Ak positive verfügbar. (siehe Außen- bzw. Flaschenetikette).

LAGERUNG UND STABILITÄT

Die Reagenzien sind ungeöffnet bei +2...8°C zu lagern und bis zu dem auf dem Etikett angegebenen Datum verwendbar.

Stabilität nach Rekonstitution: * = Raumtemperatur

RT*	-20 °C
2 Stunden	1 Monat

TESTDURCHFÜHRUNG

VORBEREITUNG DER PLASMAPROBE

Plasmagewinnung:

9 Teile Venenblut mit 1 Teil Natriumcitratlösung (0,11 mol/L) mischen und 15 min. bei einer RZB von mind. 2500 zentrifugieren (entspr. DIN 58905). Die Plasmaprobe kann 3 Stunden bei Raumtemperatur aufbewahrt werden, andernfalls muss die Probe sofort nach Zentrifugation eingefroren werden. Haltbarkeit bei -20°C: 1 Monat.

VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

Faktor VIII-Normalplasma, 2 Fl., lyophilisiert, aufzulösen mit den auf dem Etikett angegebenen mL Aqua dest. Das Normalplasma enthält dann eine I.E. Faktor VIII/mL.

Faktor VIII-Inhibitorplasma, lyophilisiert, in 1mL Aqua dest. aufzulösen. Es enthält dann die auf dem Etikett angegebenen E. FVIII-Inhibitor/mL in BE.

Faktor VIII Inhibitor Free Plasma i.ads., lyophilisiert, in 1mL Aqua dest. aufzulösen. Es dient als negativ Kontrolle ohne Faktor VIII-Inhibitor.

BESTIMMUNG VON FAKTOR VIII

Die FVIII-Bestimmung erfolgt entweder mit der Einstufenmethode oder unter Verwendung einer chromogenen Methode (TECHNOCHROM F VIII:C). Bei der Erstellung der Bezugskurve mit der Einstufenmethode sollte das Coagulation Reference verwendet werden.

TESTVERFAHREN

CEVERON

Technoclone stellt für den Ceveron® alpha Applikationen zur Verfügung. Diese enthalten geräte/testspezifische Informationen zur Abarbeitung und zu den Leistungsdaten, die von den Informationen in dieser Gebrauchsanweisung abweichen können. In diesem Fall ersetzen die Informationen in den Applikationsvorschriften die Informationen in dieser Gebrauchsanweisung. Bitte beachten sie die Bedienungsanleitung des Ceveron® alpha.

MANUELL

1. Probe: Die zu untersuchende Citratplasma, unverdünnt oder verdünnt mit Imidazolpuffer, wird 1:2 (1 Teil + 1 Teil) mit dem Faktor VIII-Normalplasma (1 E. Faktor VIII/mL) gemischt.

2. Normalwert (Kontrollmischung): Das Normalplasma wird zu gleichen Teilen (1 Teil + 1 Teil) mit dem Imidazolpuffer verdünnt und analog zur Probe weiterbehandelt.

3. Testung: Jede Mischung wird genau 2 Stunden bei 37°C im Wasserbad inkubiert und dann bis zur Testung des F VIII-Gehaltes bei **2 bis 8°C (Eiswasserbad)** aufbewahrt und innerhalb von 2 Stunden getestet. Die zu testende inkubierte Probe wird je nach gewählter Faktor VIII-Methode weiterverdünnt (Ein-stufenmethode: 1:5 bei Imidazolpufferverdünnung, TECHNOCHROM F VIII:C 1:41 mit F VIII-Verdünnungspuffer). Zur Erstellung der FVIII-Bezugskurve sollten die gegen den jeweils gültigen F VIII-Plasmastandard der WHO kalibrierten Standardplasmen von TECHNOCLONE (nicht in der Packung enthalten) verwendet werden.

4. % Faktor VIII-Restaktivität: Eine Testprobe hat keinen Inhibitor, wenn der Faktor VIII-Gehalt der Probe gleich dem der Kontrollmischung ist, d.h. deren % F VIII-Restaktivität 100% beträgt.

$$\% \text{ F VIII Restaktivität} = \frac{\text{F VIII-Gehalt der Probe}}{\text{F VIII-Gehalt d. Kontrollmischung}} \times 100$$

5. Definition Bethesda-Einheit: Eine Testprobe, erhalten nach obiger Testbeschreibung, mit einer Restaktivität von 50% Faktor VIII, enthält eine Bethesda-Einheit Faktor VIII-Inhibitor/mL.

6. Auswertung: Die Auswertung erfolgt mittels der semilogarithmischen graph. Darstellung, wobei logarithmisch die % F VIII-Restaktivität und arithmetisch die E. F VIII-Inhibitor/mL aufgetragen werden. Auf dieser Geraden werden alle F VIII-Restaktivitäten zwischen 25% und 75% abgelesen. Die erhaltenen E. F VIII-Inhibitor/mL müssen dann nur noch mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert werden, um die Bethesda-Einheiten der Probe per mL zu erhalten (siehe graphische Darstellung). Es kann auch die der graphischen Darstellung zugrunde liegende Gleichung verwendet werden:

$$\text{F VIII Inhibitor (BE)} = \frac{[2 \cdot \log(\text{Restaktivität F VIII})]}{0,30103}$$

INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

A. Proben: Die zu bestimmenden Plasmaproben können in drei Testgruppen (a), Ausschuss eines F VIII-Inhibitors, (b) schwacher F VIII-Inhibitor (≤ 10 BE/mL) und (c) starker F VIII-Inhibitor eingeteilt werden. Für jede dieser Gruppen ergeben sich andere Verdünnungen für den Testansatz (siehe Tabelle). In speziellen Fällen kann man andere Verdünnungen wählen, z.B. 1:1,5 oder 1:512 und 1:1024.

	B.E./mL	unv..	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256
(a) Ausschluss F VIII-Inh.	≤ 1	+	+							
(b) schwacher F VIII-Inh.	≤ 10	+	+	+	+	+				
(c) starker F VIII-Inh.	> 10				+	+	+	+	+	+

Von der zu bestimmenden Plasmaprobe mit unbekanntem FVIII-Inhibitorgehalt wird mit Imidazolpuffer eine geometrische Verdünnungsreihe erstellt, wobei die Gruppeneinteilung meistens ausreicht. Dann wird jeweils 1 Teil Probe (0,2 mL) mit 1 Teil Faktor VIII-Normalplasma (0,2 mL) gemischt.

B. Faktor VIII-Inhibitorplasma: Zur Qualitätskontrolle sollen von dem F VIII-Inhibitorplasma, dessen Bethesda-Einheiten bekannt sind, drei geometrischen Verdünnungen als pos. Kontrolle mitbestimmt werden. Der Verdünnungsfaktor der mittleren Verdünnung sollte ca. den Bethesda-Einheiten des Plasmas entsprechen.

C. Faktor VIII Inhibitor Free Plasma: Zur Beurteilung eines sehr schwachen F VIII-Inhibitors bzw. zu dessen Ausschluss sollte das F VIII Inhibitor Free Plasma als neg. Kontrolle (ohne F VIII-Inhibitor) unverdünnt und 1:2 verdünnt mitgetestet werden.

D. Normalwert: Die Kontrollmischung (0,2 mL Imidazolpuffer + 0,2 mL FVIII-Normalplasma) dient als Bezugswert zur Berechnung der % FVIII-Restaktivität jeder Probe. Sie muss jedes Mal mitbestimmt werden.

E. Testung: siehe unter Punkt MANUELL – 3. Testung

F. Bewertung: Normalerweise lassen sich nur eine oder zwei Verdünnungen jeder Probe auf der graphischen Darstellung ablesen. Bei zwei Verdünnungen bildet man den Mittelwert. Ergebnisse mit ≤ 1 Bethesda-Einheit/mL sollten immer skeptisch behandelt werden (siehe C).

Beispiel: Patientenplasmaverdünnung 1:8
 F VIII-Gehalt der inkubierten Probe 16,5%
 Normalwert 47%
 F VIII-Restaktivität 35% = 1,5 E. F VIII-Inh./mL
 Bethesda-Einheiten in der Probe: 1,5 x 8 = 12 BE/mL

STANDARDISIERUNG

Das Coagulation Reference ist gegen den Plasmastandard der WHO kalibriert.

TESTEINSCHRÄNKUNGEN UND FEHLERQUELLEN

Andere Inhibitoren, z.B. ein F IX-Inhibitor, können die F VIII-Bestimmung stören. Für jedes Lot eines Reagenzes bei dem eine Eichkurve erstellt werden muss und für jedes verwendete Gerät muss eine Kalibrierung durchgeführt werden. Bei Software Änderungen und nach größeren Instrumentenwartungen bzw. Geräte Reparaturen empfiehlt sich ebenfalls eine neue Kalibrierung.

PRÄZISION

Die Reproduzierbarkeit wurde mittels verschiedenen Proben von Tag zu Tag bestimmt :

Probe	Probe 1	Probe 2
n	8	20
MV BU	1,7	19,9
SD	0,2	1,9
CV (%)	9,77	9,89

LITERATUR

Carol K. Kaspar et. al.: A More Uniform Measurement of Factor VIII Inhibitors; Thrombos. Diathes. Haemorrh. 34 (1975), 869

DESCRIZIONE DEL PRODOTTO

APPLICAZIONE

Kit di reagenti per la determinazione dell'inibitore del Fattore VIII.

COMPOSIZIONE

Kit del reagenti dell'inibitore di fattore VIII per 2-4 determinazioni contiene:

- fl. reagenti
- 2 x Plasma normale di F VIII ~3 mL
- 1 x Plasma dell'inibitore del F VIII 1 mL
- 1 x Plasma senza inibitore del F VIII i.ads. 1 mL
- 1 x Tampone Imidazolo, sterile 17 mL

Non sono inclusi i reagenti per la determinazione del F VIII.

MATERIALI ADDIZIONALI NECESSARI (non inclusi nel kit)

- Pipette - Acqua distillata
- Soluzione/tampone:

REF	5277015 CaCl ₂ 25 mmol/L Solution	100 mL
REF	5410010 Imidazole Buffer	50 mL
- Reagenti

REF	5154007 F VIII Deficient Plasma, native	5 x 1 mL
REF	5035060 Dapttin TC	5 x 2 mL
REF	5035090 Dapttin TC	6 x 10 mL
- Test cromogenico

REF	5344101 Technochrom F VIII:C	40 tests
REF	5344103 Ceveron Technochrom F VIII:C	40 tests
- Plasma di calibratura

REF	5220110 Coagulation Reference	5 x 1 mL
REF	5220130 Ceveron Coagulation Reference	5 x 1 mL

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

- IVD Da usare solamente come diagnostico *in vitro*.
- Tutti i derivati da sangue o plasma umano come pure i campioni di sangue o plasma devono essere considerati potenzialmente infettivi e devono essere maneggiati con la dovuta attenzione e in accordo con le norme di sicurezza e devono essere smaltiti nello stesso modo dei rifiuti ospedalieri.
- Il carico delle provette, prodotto con sangue umano, e ogni plasma singolo a tal fine utilizzato sono HBs Ag, HIV 1/2 Ak negativi e HCV Ak positivo. Al momento il plasma ottenuto da pazienti emofilici è disponibile unicamente nella forma HCV-RNA positivo (si veda all'esterno ovvero sull'etichetta del flacone).

CONSERVAZIONE E STABILITÀ

Tutti i reagenti conservati nei flaconi integri a +2...8°C possono essere utilizzati fino alla data indicata sull'etichetta.

Stabilità dopo ricostituzione: * = Temperatura ambiente

TA* 2 ore	-20 °C 1 mese
--------------	------------------

ESECUZIONE DEL TEST

PREPARAZIONE DEI CAMPIONI DI PLASMA

Separazione del plasma:
Miscelare 9 parti di sangue venoso con 1 parte di soluzione di sodio citratato (0,11 mol/L) e centrifugare per 15 min. a almeno 2500 gpm (corrispondente a DIN 58905). Il campione di plasma può essere conservato a temperatura ambiente fino a 3 ore, altrimenti bisogna congelare il campione subito dopo la centrifugazione (1 mese).

PREPARAZIONE DEI REAGENTI

Plasma normale di F VIII, 2 flaconi, liofilizzato, da dissolvere nella quantità di acqua distillata indicata sull'etichetta. Il plasma normale quindi contiene 1 U.I. di F VIII/mL.

F VIII Inhibitor Plasma, liofilizzato, da dissolvere in 1 mL di acqua distillata. Il plasma quindi contiene le U. di inibitore del F VIII /mL (in unità Bethesda) indicate sull'etichetta.

F VIII Inhibitor Free Plasma, liofilizzato, da dissolvere in 1 mL di acqua distillata. Serve da controllo negativo senza inibitore di fattore VIII.

DETERMINAZIONE DEL FATTORE VIII

La determinazione di fattore VIII deve essere effettuata con il metodo ad uno stadio o usando un metodo cromogeno (TECHNOCHROM F VIII:C). Nell'installare la curva di calibratura con il metodo ad uno stadio, il riferimento di coagulazione sarà applicato.

METODO DEL TEST E VALUTAZIONE

CEVERON

Technoclone offre le Protocolli Applicativi per Ceveron® alpha. Protocolli Applicativi riportano l'utilizzo specifico analizzatore/test e informazioni sulle caratteristiche che possono differire da quelli forniti nelle presenti Istruzioni per l'Uso. In questo caso, l'informazione contenuta nelle Protocolli Applicativi sostituisce le informazioni delle presenti Istruzioni per l'Uso. Consultare il manuale di istruzioni del Ceveron® alpha.

MANUALE

1. Campione: Miscelare il campione di plasma citratato, non diluito o diluito con tampone imidazolo, 1:2 (1 parte + 1 parte) con il plasma normale di F VIII (1 U. F VIII/mL).

2. Valore normale (miscela di controllo): Diluire il plasma normale in parti uguali (1 parte + 1 parte) con tampone di imidazolo e continuare a testare come il campione.

3. Esecuzione del test: Ogni miscela viene incubata a 37°C in bagnomaria per 2 ore, poi conservata a 2 a 8°C (bagno d'acqua ghiaccio) e testata entro 2 ore. Il campione incubato viene ulteriormente diluito a seconda del metodo F VIII impiegato (Metodo a uno stadio: 1:5 con diluizione con tampone di imidazolo, TECHNOCHROM F VIII:C 1:41 con tampone di diluizione F VIII). I plasm standard, calibrati contro i standard di plasma F VIII dell'OMS validi, prodotti da TECHNOCLONE (non inclusi nel kit) devono essere utilizzati per preparare la curva di calibratura di F VIII.

4. % attività residua di F VIII: Un campione è privo d'inibitore se il contenuto di F VIII del campione è uguale a quello della miscela di controllo, cioè la sua % attività residua di F VIII raggiunge 100%.

$$\% \text{ attività residua di F VIII} = \frac{\text{contenuto di FVIII del campione}}{\text{contenuto di FVIII della miscela di controllo}} \times 100$$

5. Definizione Unità Bethesda: Un campione, ottenuto secondo il suddetto metodo del test, con un'attività residua di F VIII di 50% contiene 1 Unità Bethesda d'inibitore del F VIII/mL.

6. Valutazione: La valutazione viene effettuata tramite la rappresentazione grafica lineare - su carta semilogaritmica l'attività residua di F VIII è riportata contro le U. dell'inibitore di F VIII/ml (asse lineare). L'attività residua di F VIII può essere letta sul grafico e il numero di U. d'inibitore del F VIII viene moltiplicato con il fattore di diluizione per ottenere le Unità Bethesda/mL del campione (vedere rappresentazione grafica). Si può utilizzare anche l'equazione sulla quale è basata la rappresentazione grafica:

$$\text{Inibitore del F VIII (UB)} = \frac{[2 - \log(\text{attività residua di F VIII})]}{0,30103}$$

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

A. Campioni di plasma: I campioni da testare possono essere suddivisi in tre gruppi (a) senza inibitore del F VIII, (b) contenuto basso d'inibitore del F VIII (≤ 10 UB/mL) e (c) contenuto alto d'inibitore del F VIII. Per ogni gruppo si usano diverse diluizioni (vedere tabella).

In casi particolari si possono usare altre diluizioni, per esempio 1:1,5 o 1:512 e 1:1024.

	UB./mL	undil.	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256
(a) senza inib. del F VIII-ini.	≤ 1	+	+							
(b) basso cont. d'inib. del F VIII	≤ 10	+	+	+	+	+				
(c) alto cont. d'inib. del F VIII	> 10				+	+	+	+	+	+

Preparare con il campione di plasma da testare, con un contenuto ignoto d'inibitori del F VIII, e tampone imidazolo una serie geometrica di diluizioni, basata sui tre gruppi. Poi miscelare 1 parte di campione (0,2 mL) con 1 parte di plasma normale di F VIII (0,2 mL).

B. Plasma dell'inibitore del F VIII: Tre diluizioni geometriche del plasma con contenuto noto d'inibitori del F VIII in Unità Bethesda devono essere testate come controllo positivo. Il fattore di diluizione della diluizione intermedia deve essere in conformità con le Unità Bethesda del plasma.

C. Plasma senza inibitore del F VIII: Per determinare o escludere un contenuto di F VIII molto basso, il plasma senza inibitore del F VIII deve essere testato non diluito e diluito 1:2 come controllo negativo (senza inibitore del F VIII).

D. Valore normale: La miscela di controllo (0,2 mL di tampone imidazolo + 0,2 mL di plasma normale di F VIII) serve da valore di riferimento per calcolare l'attività residua di F VIII di ogni campione. Deve essere testata ogni volta.

E. Esecuzione del test: vedi sotto il manuale del punto 3. Esecuzione del test

F. Valutazione: Di solito si possono leggere soltanto una o due diluizioni di ogni campione dalla rappresentazione grafica. Nel caso di due diluizioni bisogna calcolare il valore medio. Risultati ≤ 1 Unità Bethesda/mL devono essere considerati con scetticismo (vedere C).

Esempio: Diluizione del campione di plasma del paziente: 1:8

Contenuto di F VIII del campione incubato: 16,5 %

Valore normale: 47 %

Attività residua di F VIII: 35% = 1,5U. di inibitore del F VIII/mL Unità Bethesda contenuti nel campione: 1,5 x 8 = 12 UB/mL

STANDARDIZZAZIONE

Il Coagulation Reference è calibrato contro la „preparazione internazionale di riferimento“ dell'OMS.

LIMITAZIONE DEL TEST E POSSIBILI FONTI DI ERRORI

La determinazione del F VIII può essere disturbata da altri inibitori, per esempio l'inibitore del F IX. Una calibratura deve essere effettuata per ogni lotto di reagenti che richiedono la preparazione di una curva di calibratura e per ogni strumento utilizzato. L'esecuzione di una nuova calibratura è consigliata anche dopo cambiamenti del software e dopo lavori maggiori di manutenzione o riparazione degli strumenti.

PRECISIONE

La riproducibilità è stata determinata analizzando diversi campioni (in serie o giorno per giorno). Sono stati ottenuti i seguenti risultati:

Campione	Campione 1	Campione 2
n	8	20
MV BU	1,7	19,9
SD	0,2	1,9
CV (%)	9,77	9,89

LITERATUR

Carol K. Kaspar et. al.: A More Uniform Measurement of Factor VIII Inhibitors; Thrombos. Diathes. Haemorrh. 34 (1975), 869

DESCRIPCIÓN DEL PRODUCTO

APLICACIÓN

Kit de reactivos para la determinación del inhibidor del factor VIII.

COMPOSICIÓN

Kit el reactivo del inhibidor del factor VIII para 2-4 determinaciones contiene:

- fr. reagenti
- 2 x Plasma normal del F VIII ~3 mL
- 1 x Plasma del factor VIII con inhibidor 1 mL
- 1 x Plasma del factor VIII sin inhibidor i.ads. 1 mL
- 1 x Buffer de imidazolo, estéril 17 mL

Sin reactivos para la determinación del factor VIII.

MATERIAL NECESARIO (no se suministra con el kit)

- Pipetas - Agua destilada
- Solución/buffer:
 - [REF] 5277015 CaCl₂ 25 mmol/L Solution 100 mL
 - [REF] 5410010 Imidazole Buffer 50 mL
- Reactivo
 - [REF] 5154007 F VIII Deficient Plasma, native 5 x 1 mL
 - [REF] 5035060 Dapttin TC 5 x 2 mL
 - [REF] 5035090 Dapttin TC 6 x 10 mL
- Prueba cromógena
 - [REF] 5344101 Technochrom F VIII:C 40 tests
 - [REF] 5344103 Ceveron Technochrom F VIII:C 40 tests
- Plasma de la calibración
 - [REF] 5220110 Coagulation Reference 5 x 1 mL
 - [REF] 5220130 Ceveron Coagulation Reference 5 x 1 mL

ADVERTENCIA Y PRECAUCIONES

- IVD Sólo para la aplicación en el diagnóstico in vitro
- Todos los productos sanguíneos y plasmáticos se deberán considerar como potencialmente infecciosos. Se deberán tratar con las debidas precauciones de conformidad con los reglamentos vigentes en materia de seguridad. Los desechos deberán eliminarse de la misma manera que se eliminan los desechos en los hospitales.
- Este lote de reactivos está preparado de sangre humana y cada plasma utilizado en este lote es Antígeno de superficie de la Hepatitis B (HBsAg), VIH 1/2 Ab negativo y HCV Ab positivo. En la actualidad, se dispone de plasmas para hemofílicos sólo como HCV-RNA positivo (consulte la etiqueta del embalaje y del vial).

ESTABILIDAD Y CONSERVACIÓN

Los reactivos se deben guardar a una temperatura de entre 2...8° C y utilizarse antes de la fecha indicada en las etiquetas.

Estabilidad después de la reconstitución * = Temperatura ambiente

TA*	-20 °C
2 horas	1 mes

PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA

PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PLASMÁTICAS

Separación del plasma:

Mezclar 9 partes de sangre venosa y 1 parte de solución de citrato sódico (0.11 mol/L) y centrifugar durante 15 minutos a más de 2500 FCR (de conformidad con DIN 58905). La muestra plasmática no se deberá guardar a la temperatura ambiente durante más de 3 horas, en caso contrario la muestra debe ser congelada inmediatamente después de la centrifugación (1 mes).

PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

Plasma normal del factor VIII. 2 frascos, liofilizados, para disolver con el volumen de agua destilada indicado en la etiqueta. El plasma normal contendrá entonces una U.I. del factor VIII/mL.

Plasma del factor VIII con inhibidor, liofilizado, para disolver en 1 mL de agua destilada. Contendrá subsecuentemente las unidades de inhibidor de FVIII/mL (Unidades Bethesda) que figuran en la etiqueta.

Plasma del factor VIII sin inhibidor, liofilizado, para disolver en 1 mL de agua destilada. Sirve de control negativo sin inhibidor del factor VIII.

REALIZACIÓN DE LA PRUEBA

La determinación del factor VIII tiene que ser efectuada por el método one-stage o usando un método chromogenic (TECHNOCHROM F VIII:C). Al setting-up la curva de calibración con el método one-stage, la referencia de la coagulación será aplicada.

DESCRIPCIÓN, DEFINICIÓN Y EVALUACIÓN DE LA PRUEBA

CEVERON

Technoclone pone a disposición reglamentos de aplicación para Ceveron® alpha. Estos contienen información específica aparato/test para el manejo y el rendimiento, que pueden diferenciarse de la información dada en estas instrucciones de manejo. En este caso, la información contenida en los reglamentos de aplicación reemplaza la información de estas instrucciones de manejo. Por favor consulte el manual de instrucciones del Ceveron® alpha.

MANUAL

1. Muestra: Se mezcla la muestra citrada, diluida o sin diluir en buffer de imidazolo, en partes iguales (1 parte + 1 parte) con el plasma normal del factor VIII (1E factor VIII/mL).

2. Valor normal (mezcla de control): Se mezcla el plasma normal en partes iguales (1 parte + 1 parte) con el buffer de imidazolo y a continuación se trata como la muestra.

3. Prueba: Toda mezcla se incubará durante dos horas exactamente a una temperatura de 37° C al baño de agua y se conservará a una temperatura de entre 2° C a 8° C (baño de agua hielo) y probada antes de dos horas. La muestra incubada que debe someterse a prueba se diluye con arreglo al método F VIII seleccionado (método de una fase: 1:5 con una dilución de buffer de imidazolo, TECHNOCHROM FVIII:C 1:41 con dilución de buffer de FVIII). Se deberán usar para establecer la curva de calibración de plasmas estandarizados de TECHNOCLONE, calibrados con respecto a los plasmas estandarizados de la OMS (no se suministra con el kit).

4. Actividad residual del factor VIII: Una muestra de la prueba no contiene inhibidor, si la cantidad del factor VIII de la muestra es la misma que la de la mezcla de control, es decir, la actividad residual del factor VIII después de la incubación es 100%.

$$\% \text{ F VIII actividad residual} = \frac{\text{FVIII} - \text{cantidad de la prueba}}{\text{FVIII} - \text{cantidad de al mezcál de control}} \times 100$$

5. Definición unidades Bethesda: Una muestra tratada por el método arriba mencionado, con una actividad residual del 50% del factor VIII, contiene una unidad de Bethesda de inhibidor del factor VIII/mL.

6. Cálculo: Utilizando un papel milimetrado semi log, se marca la actividad residual en % del factor VIII (logarítmico) con respecto a las unidades Bethesda/mL (aritmético, axis linear). Se lee la actividad residual en % del inhibidor del factor VIII entre el 25% y el 75% del papel y se multiplican las unidades de inhibidor del factor VIII/ml con el factor de dilución para obtener las unidades de Bethesda por ml de la muestra. También se puede utilizar la ecuación que sirve de base para la presentación grafica:

$$\text{F VIII Inhibidor (UB)} = \frac{[2 - \log(\text{actividad residual F VIII})]}{0,30103}$$

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

A. Muestras: Las muestras plasmáticas para determinar se pueden clasificar en 3 grupos: (a) sin inhibidor del factor VIII, (b) débil inhibidor del factor VIII (≤ 10 UB/mL), (c) fuerte inhibidor del factor VIII. Hay diluciones diferentes para cada grupo de prueba.

En casos especiales se pueden utilizar otras diluciones p.e. 1:1,5 o 1:512 o 1:1024.

	UB./mL	undil.	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256
(a) sin. F VIII-Inh.	≤ 1	+	+							
(b) F VIII-Inh. débil	≤ 10	+	+	+	+	+				
(c) F VIII-Inh fuerte	> 10				+	+	+	+	+	+

Con la muestra plasmática que debe probarse con el factor VIII indeterminado se establece una serie de dilución geométrica con buffer de imidazolo, la repartición en grupos es suficiente en la mayoría de casos. Entonces se mezcla una parte de la muestra con una parte de plasma normal de factor VIII (0,2 mL).

B. Plasma con inhibidor del factor VIII: Se deberán emplear, como control positivo, tres diluciones geométricas del inhibidor de plasma del factor VIII con unidades conocidas de Bethesda. El factor de dilución deberá corresponderse aproximadamente a las unidades de Bethesda del plasma.

C. Plasma sin inhibidor del factor VIII: Para la determinación de un inhibidor del factor VIII muy débil o para su exclusión se probará también el plasma sin inhibidor de factor VIII como control negativo (sin inhibidor FVIII), sin dilución y con dilución de 1:2.

D. Valor normal: La mezcla de control (0,2 mL buffer de imidazolo + 0,2 mL de plasma normal de factor VIII) sirve como valor de referencia para el cálculo de la actividad residual % de factor VIII. Ésta debe ser probada siempre.

E. Prueba: vea debajo del manual del punto 3.Prueba

F. Evaluación: Normalmente sólo una o dos diluciones de cada muestra que deben hallarse entre los límites de la representación gráfica. En caso de dos diluciones, los resultados deberán promediarse. Se debe considerar con cautela los resultados de ≤ 1 unidades Bethesda/mL).

Ejemplo: Dilución de plasma del paciente 1:8
 Contenido del factor VIII de la prueba incubada 16,5%
 Valor normal 47%
 Factor VIII Actividad residual 35% = 1,5 U FVIII-Inh./mL
 Unidades Bethesda en la muestra: 1,5 x 8 = 12 UB/mL

ESTANDARIZACIÓN

Coagulation reference está calibrada contra el estándar del plasma del OMS.

LIMITACIONES Y ORIGEN DE ERRORES

Otros inhibidores como un inhibidor de FIX, pueden interferir en la determinación de FVIII. Es preciso realizar una nueva calibración para cada lote de reactivos e instrumento utilizado. Asimismo, se recomienda efectuar una nueva calibración después de una modificación en el software y después de importantes revisiones en los instrumentos o aparatos.

PRECISIÓN

La reproducibilidad se determinó con diferentes muestras (en series y día a día). Se obtuvieron los siguientes resultados:

Muestra	Muestra 1	Muestra 2
n	8	20
MV BU	1,7	19,9
SD	0,2	1,9
CV (%)	9,77	9,89

BIBLIOGRAFÍA

Carol K. Kaspar et. al.: A More Uniform Measurement of Factor VIII Inhibidores; Thrombos. Diathes. Haemorrh. 34 (1975), 869

DESCRIÇÃO DO PRODUTO

USO

Conjunto de reagentes para a determinação do inibidor de factor VIII.

COMPOSIÇÃO

O conjunto de reagentes do inibidor de factor VIII para 2-4 determinações inclui:

Fr. Reagentes

Plasma Normal de Factor VIII ~3 ml

Plasma com inibidor de Factor VIII 1 ml

Plasma sem inibidor de factor VIII i.ads.1 ml

Estabilizador de imidazol, estéril 17 ml

Os reagentes para a determinação do FVIII não são inclusos.

MATERIAL NECESSÁRIO (não incluso no conjunto de teste)

- Pipetas - Água destilada

- Soluções/Estabilizadores:

REF 5277015 CaCl₂ 25 mmol/L Solution 100 ml

REF 5410010 Imidazole Buffer 50 ml

- Reagentes

REF 5154007 F VIII Deficient Plasma, native 5 x 1 ml

REF 5035060 Daptin TC 5 x 2 ml

REF 5035090 Daptin TC 6 x 10 ml

- Teste cromogéneo

REF 5344101 Technochrom F VIII:C 40 testes

REF 5344103 Ceveron Technochrom F VIII:C 40 testes

- Plasma de calibração

REF 5220110 Coagulation Reference 5 x 1 ml

ADVERTÊNCIAS E PRECAUÇÕES

- Somente para uso como diagnóstico *in vitro*

- Todas as amostras ou produtos de plasma devem ser considerados como potencialmente infecciosos e manuseados com os cuidados necessários e conforme os regulamentos de segurança e devem ser removidos como lixo hospitalar.

- Os lotes de reagentes, fabricados com sangue humano e cada plasma individual usado foram negativos nos testes de HBs Ag, HIV 1/2 Ab e positivos HCV Ab. Plasmas de hemófilos atualmente só estão disponíveis como HCV Ab positivos (veja no rótulo externo ou no frasco).

CONSERVAÇÃO E ESTABILIDADE

A data de validade impressa no rótulo se refere à armazenagem do reagente em frascos fechados entre +2 até 8°C.

Estabilidade após a reconstituição: *TA= Temperatura ambiente

TA*	-20 °C
2 hrs.	1 mês

EXECUÇÃO DO TESTE

PREPARAÇÃO DA AMOSTRA DE PLASMA

Separação do plasma:

Misturar 9 partes de sangue venoso com 1 parte de solução de citrato de sódio (0,11 mol/L) e centrifugar durante 15 minutos com pelo menos 2500 de FCR (força centrífuga radial, conforme DIN 58905). O plasma pode ser armazenado em temperatura ambiente durante 3 hrs. Validade em -20°C: 1 mês.

PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

Plasma de factor VIII normal, 2 fr., liofilizado, diluir com o volume de ml de água dest. indicado no rótulo. O plasma normal contém então uma U.I. de Factor VIII/ml.

Plasma com inibidor de factor VIII, liofilizado, diluir em 1 ml de água dest. Ele contém então as unidades (Bethesda) de inibidor de FVIII/ml indicadas no rótulo.

Plasma sem inibidor de factor VIII i.ads., liofilizado, diluir em 1ml de água dest. Este serve como controle negativo sem inibidor de factor VIII.

DETERMINAÇÃO DO FACTOR VIII

A determinação do FVIII é feita ou pelo método de etapa única ou com a utilização de um método cromogéneo (TECHNOCHROM FVIII:C). Na elaboração da curva de referência com o método de etapa única deve-se usar a Referência de Coagulação.

PROCEDIMENTO DO TESTE

CEVERON

A Technoclone disponibiliza instruções de aplicação para os Ceveron® alpha. Estes contêm informações específicas dos aparelhos/testes sobre o processamento e características de performance que podem divergir das informações deste manual de instruções. Neste caso, as informações dos livros de referência substituem as informações constantes neste manual de instruções. Por favor observe o manual de instruções do Ceveron® alpha.

MANUEL

- 1. Amostra:** A amostra de plasma citratado a ser examinada, não diluída ou diluída com o estabilizador de imidazol, será misturada 1:2 (1 parte + 1 parte) com o Plasma normal de factor VIII (1 unidade de Factor VIII/ml).
- 2. Valor normal (Mistura de controle):** O plasma normal será diluído em partes iguais (1 parte + 1 parte) com o estabilizador de imidazol e tratado igual à amostra.

- 3. Teste:** Cada mistura será incubada por exatamente 2 hrs. em 37°C em banho-maria, depois armazenada até o teste do teor de FVIII entre 2 até 8°C (banho maria gelo), e testada dentro de 2 hrs. A amostra incubada a ser testada será diluída novamente conforme o método de factor VIII utilizado (Método de etapa única: 1:5 com diluição com estabilizador de imidazol; TECHNOCHROM F VIII:C 1:41 com estabilizador de diluição de FVIII) Para a elaboração da curva de referência do FVIII devem ser usados os plasmas padronizados e calibrados cfe. o padrão de plasma F VIII vigente da WHO da TECHNOCALONE (não incluídos na embalagem).

- 4. % de actividade residual de factor VIII:** Uma amostra de teste não tem inibidor, se o teor de factor VIII da amostra estiver igual à mistura de controle, quer dizer, se o seu % de actividade residual de F VIII for de 100%.

$$\% \text{ actividade residual F VIII} = \frac{\text{F VIII} - \text{Teor da amostra}}{\text{F VIII} - \text{Teor mistura controle}} \times 100$$

- 5. Definição da unidade Bethesda (U.B.):** Uma amostra de teste, obtida a partir do teste descrito acima, com uma actividade residual de 50% de factor VIII, contém uma unidade Bethesda de inibidor de factor VIII/ml.

- 6. A avaliação é feita através da representação gráfica semi-logarítmica, onde o % de actividade residual de factor VIII é representado de maneira logarítmica e as unidades de inibidor de FVIII/ml de maneira linear. Nesta linha reta, todas as actividades residuais entre 25% e 75% podem ser verificadas. As unidades de inibidor de factor VIII/ml obtidas então só devem ser multiplicadas com o factor de diluição, para se obter as unidades Bethesda da amostra por ml (veja gráfico). Também pode ser usada a equação na qual o gráfico foi baseado:**

$$\text{F VIII} - \text{Inibidor (UB)} = \frac{[2 - \log(\text{actividade residual de FVIII})]}{0,30103}$$

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

A. Amostras As amostras de plasma a serem determinadas podem ser divididas em três grupos: (a) sem inibidor de FVIII, (b) inibidor de FVIII fraco (≤ 10 U.B./ml) e (c) inibidor de FVIII forte. Para cada um destes grupos resultam outras diluições para o teste (veja tabela). Em casos especiais, diluições diferentes podem ser usadas, por exemplo, 1:1,5 ou 1:512 e 1:1024.

	U.B./ ml	não dil.	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256
(a) Sem inibidor de F VIII	≤ 1	+	+							
inibidor de F VIII fraco	≤ 10	+	+	+	+	+				
(c) inibidor de F VIII forte	> 10				+	+	+	+	+	+

A partir da amostra de plasma a ser determinada, com um teor de inibidor de FVIII desconhecido, será feita uma série geométrica de diluições com o estabilizador de imidazol, onde a divisão em grupos normalmente é suficiente. Depois cada 1 parte da amostra (0,2 ml) é misturada com 1 parte de plasma normal de FVIII (0,2ml).

B. Plasma com inibidor de factor VIII: Para o controle de qualidade, três diluições geométricas do plasma com inibidor de FVIII, cujas U.B. são conhecidas, também devem ser determinadas como um controle positivo. O factor de diluição da diluição média deve corresponder aproximadamente às unidades Bethesda do plasma.

C. Plasma sem inibidor de factor VIII: Para a avaliação de um inibidor de FVIII muito fraco ou inexistente, o plasma sem inibidor de FVIII não diluído ou diluído 1:2, também deve ser testado como controle negativo (sem inibidor de F VIII).

D. Valor normal A mistura de controle (0,2 ml de estabilizador de imidazol + 0,2 ml de plasma normal de FVIII) serve como valor de referência para o cálculo do % da actividade residual de FVIII de cada amostra. Cada vez, ela também deve ser determinada.

E. Teste: veja sob o manual do ponto 3. Teste

F. Avaliação: Normalmente só uma ou duas diluições de cada amostra podem ser determinadas pela representação gráfica. No caso de duas diluições calcula-se o valor médio Resultados com ≤ 1 Unidade Bethesda/ml sempre devem ser tratados com cautela. (veja C).

Exemplo: Diluição do plasma do paciente 1:8
 Teor de F VIII da amostra incubada 16,5%
 Valor normal 47%
 Actividade residual de FVIII 35% = 1,5 U de inibidor de F VIII/ml
 Unidades Bethesda na amostra: 1,5 x 8 = 12 UB/ml

ESTANDARDIZAÇÃO

A Referência de Coagulação foi calibrada com o padrão de plasma da WHO.

LIMITAÇÕES DO TESTE E POSSIBILIDADES DE ERROS

Outros inibidores, como por exemplo, um inibidor de F IX, podem distorcer a determinação do F VIII.

Para cada lote de reagentes, para o qual deve ser estabelecida uma curva de calibragem, e para cada aparelho utilizado, deve ser feita uma nova calibragem. No caso de alterações no software e depois de maiores revisões nos instrumentos ou de consertos no aparelho, também se recomenda uma nova calibragem.

PRECISÃO

A reprodutibilidade foi determinada com amostras diferentes (em séries e dia a dia). Foram obtidos os seguintes resultados:

Amostra	Amostra 1	Amostra 2
n	8	20
MV BU	1,7	19,9
SD	0,2	1,9
CV (%)	9,77	9,89

LITERATURA

Carol K. Kaspar et. al.: A More Uniform Measurement of Factor VIII Inhibitors; Thrombos. Diathes. Haemorrh. 34 (1975), 869

DESCRIPTION DU PRODUIT

APPLICATION

Coffret de réactifs pour le test du inhibiteur facteur VIII.

COMPOSITION

Le coffret de réactifs d'inhibiteur du facteur VIII pour 2-4 dét. contient:

- fl. réactifs
- 2 x Plasma normal en F VIII ~3 mL
- 1 x Plasma avec inhibiteur de F VIII 1 mL
- 1 x Plasma sans inhibiteur de F VIII i.ads. 1 mL
- 1 x Tampon à imidazole, stérile 17 mL

Les réactifs pour l'analyse du facteur VIII ne sont pas inclus.

MATÉRIEL NÉCESSAIRE (non fourni avec le kit)

- Pipettes - Eau distillée
- Solution/Tampon:

REF	5277015	CaCl ₂ 25 mmol/L Solution	100 mL
REF	5410010	Imidazole Buffer	50 mL
- Réactifs

REF	5154007	F VIII Deficient Plasma, native	5 x 1 mL
REF	5035060	Dapttin TC	5 x 2 mL
REF	5035090	Dapttin TC	6 x 10 mL
- Method chromogène

REF	5344101	Technochrom F VIII:C	40 tests
-----	---------	----------------------	----------
- Plasma de calibrage

REF	5220110	Coagulation Reference	5 x 1 mL
-----	---------	-----------------------	----------

AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS

- IVD pour l'usage diagnostique *in vitro*
- Tous les produits sanguins ou plasmatiques d'origine humaine, ainsi que les échantillons de sang ou de plasma, doivent être considérés comme potentiellement infectieux et manipulés avec les précautions nécessaires relatives aux règles de sécurité.
- Ce lot de réactifs obtenus à partir de sang humain et tous les plasmas individuels utilisés à cette fin sont Ag HBS, Ac VIH négatifs et Ac VHC positifs. Les plasmas d'hémophiles sont actuellement que disponible Anti-HCV positifs (voir étiquette externe et étiquette sur le flacon).

STABILITÉ ET CONSERVATION

Les réactifs, conservés dans leur flacon non ouvert et 2...8 °C, peuvent être utilisés jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette.

Stabilité après reconstitution : * = température ambiante

TA*	-20 °C
2 heures	1 mois

REALISATION DU TEST

PREPARATION DU PLASMA

Séparation du plasma: Pour l'obtention du plasma, prélever 1 volume de solution de citrate sodium (0.11 mol/L) avec 9 volumes de sang veineux, et mélanger avec précaution en évitant la formation de mousse. Centrifuger aussitôt pendant 15 min à au moins 2500 FCR (corr. à DIN 58905). L'échantillon de plasma peut être gardé pendant 3 heures à température ambiante, sinon l'échantillon doit être gelé immédiatement après la centrifugation. Stabilité à -20°C: 1 mois.

PREPARATION DU RÉACTIF

Plasma normal en Facteur VIII, 2 flacons, lyophilisé, à dissoudre dans la quantité d'eau distillée indiquée sur l'étiquette (en mL). On obtient alors du plasma normal contenant une U.I. de Facteur VIII/mL.

Plasma avec inhibiteur de Facteur VIII, lyophilisé, à dissoudre dans 1 mL d'eau distillée. Le plasma contient les unités inhibitrices de F VIII indiquées sur l'étiquette en unités Bethesda/mL.

Plasma déficient en Facteur VIII inhibiteur, lyophilisé, à dissoudre dans 1 mL d'eau distillée. Il sert de contrôle négatif sans inhibiteur de Facteur VIII.

DETERMINATION DU FACTEUR VIII

Le F VIII est déterminé soit par une méthode en un temps soit par une méthode chromogène (TECHNOCHROM F VIII :C). Pour tracer la courbe de référence par la méthode en un temps, utiliser le Coagulation Reference.

REALISATION DU TEST

CEVERON

Technoclone propose des protocoles d'adaptation pour Ceveron® alpha. Ces manuels contiennent des informations sur la réalisation des tests et leurs caractéristiques, spécifiques aux tests et à l'appareil. Ces informations peuvent différer de celles indiquées dans cette notice d'emploi. Dans ce cas, utiliser les données du protocole d'adaptation et non celles de cette notice d'emploi. Respecter les instructions d'emploi du Ceveron® alpha.

MANUELLE

1. **Echantillon** : mélanger l'échantillon de plasma citraté à analyser, dilué ou non avec le tampon à l'imidazole, en parties égales (1 volume + 1 volume) avec le plasma normal en Facteur VIII (1 U.I. de F VIII/mL).
2. **Valeur normale** (mélange de contrôle): Le plasma normal est dilué à volumes égaux avec le tampon d'imidazole et le traitement poursuivi d'une manière analogue à l'échantillon.

3. **Test**: Les mélanges sont incubés dans un bain d'eau à 37°C pendant 2 heures exactement, puis conservés entre 2 et 8 °C (bain d'eau glace) jusqu'au dosage de la teneur en F VIII et testés dans les 2 heures. L'échantillon incubé à tester est dilué en fonction de la méthode de F VIII mise en œuvre (méthode en un étape: 1:5 en cas de dilution dans un tampon d'imidazole, TECHNOCHROM F VIII :C 1:41 avec tampon de dilution F VIII). Pour tracer la courbe de référence de F VIII utiliser les plasmas standard de TECHNOCLONE (non contenus dans l'emballage) calibrés contre le standard plasmatique valide de l'OMS.

4. **Activité résiduelle du Facteur VIII en %** : un échantillon ne contient pas d'inhibiteur lorsque sa teneur en F VIII est identique à celle du mélange de contrôle, l'activité résiduelle en % du F VIII est égale à 100%

$$\% \text{ F VIII activité résiduelle} = \frac{\text{FVIII} - \text{Teneur de l'échantillon}}{\text{FVIII} - \text{Teneur de mélange de contrôle}} \times 100$$

5. **Définition de l'Unité Bethesda** : un échantillon à analyser, préparé selon la méthode décrite, présente une activité résiduelle du F VIII de 50% contient une unité Bethesda d'inhibiteur du F VIII/mL.

6. **Interprétation** : on peut interpréter les résultats au moyen d'une droite construite sur une graphique, sur la quel on reporte en logarithme l'activité en pourcentage du Facteur VIII et, sous forme arithmétique, le nombre d'unités d'inhibiteur du Facteur VIII comprises entre 75 et 25%. Il suffira alors pour obtenir le nombre d'Unités Bethesda de l'échantillon considéré de multiplier la quantité d'unités d'inhibiteur du Facteur VIII/mL par le facteur de dilution (voir représentation graphique).

On peut aussi utiliser l'équation sur laquelle se fonde la représentation graphique.

$$\text{Inhibiteur de F VIII(UB)} = \frac{[2 - \log(\text{activité résiduelle F VIII})]}{0,30103}$$

INTERPRETATION DES RESULTATS

A. **Echantillons**: On peut subdiviser les échantillons de plasma à analyser en trois groupes: a) inhibiteur du Facteur VIII exclu, b) faible inhibiteur du F VIII (≤10 UB/mL) et c) fort inhibiteur du F VIII. Pour chacun de ces groupes, on choisira donc des dilutions différentes pour le test (voir tableau). Dans certains cas particuliers, on peut encore choisir d'autres dilutions, (p.ex 1:1,5 ou 1:512 et 1:1024).

	UB/mL	n.dil.	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256
(a) Inh. FVIII exclu	≤ 1	+	+							
(b) Inh. FVIII faible	≤ 10	+	+	+	+					
(c) Inh. FVIII fort	> 10			+	+	+	+	+	+	+

On prépare alors, avec l'échantillon de plasma à analyser dont on ne connaît pas la teneur en inhibiteur du F VIII, en utilisant le tampon à l'imidazole, une série de dilutions géométriques, en se contenant, le plus souvent de la division établie à l'intérieur des divers groupes. Puis on mélange, pour chaque dilution, un volume (0,2 mL) d'échantillon avec un volume (0,2 mL) de plasma normal en F VIII.

B. **Plasma avec inhibiteur de Facteur VIII**: Aux fins de contrôle de la qualité, il convient de déterminer simultanément trois dilutions géométriques, jouant le rôle de contrôle positif, d'un plasma dont on connaît le nombre d'unités Bethesda d'inhibiteur du F VIII. Le facteur de dilution de la dilution intermédiaire doit correspondre environ au nombre d'unités Bethesda du plasma.

C. **Plasma déficient en Facteur VIII** : Dans le cas où il s'agit d'analyser un inhibiteur très faible du F VIII ou de l'exclure, il faut procéder simultanément à la détermination du plasma déficient en F VIII, comme contrôle négatif (sans inhibiteur du F VIII), non dilué et en dilution de 1:2.

D. **Valeur normale** : Le mélange de contrôle (0,2 mL de tampon à l'imidazole + 0,2 mL de plasma normal en F VIII) est utilisé comme valeur de référence pour calculer l'activité résiduelle en % du F VIII de chaque échantillon. Cette valeur doit être déterminée en même temps.

E. **Exécution de test**: voyez sous le manuel de point 3.Test

F. **Interprétation de résultats** : Normalement, on ne peut lire sur la représentation graphique qu'une ou deux dilutions de chaque échantillon. Dans le cas où l'on a deux résultats, on calcule la valeur moyenne. Si l'on obtient un résultat ≤ à 1 unité Bethesda/mL, il convient de toujours faire preuve de la plus grande réserve (voir C).

Exemple: Dilution du plasma du patient 1:8

Teneur en F VIII de l'échantillon après incubation : 16,5%

Valeur normale : 47%

Activité résiduelle en % du F VIII: 35% = 1,5 U.d'inh F VIII/mL

Nombre d'unités Bethesda dans l'échantillon : 1,5 x 8 = 12 UB/mL

ÉTALONNAGE

Le coagulation reference est calibrée contre le niveau de plasma de l'OMS.

LIMITATION DU TEST

D'autres inhibiteurs, p.e. un inhibiteur du Facteur IX, peuvent gêner la détermination du Facteur VIII. Un nouveau calibrage est exigé pour chaque série de réactifs où une courbe d'étalonnage est nécessaire pour chaque instrument utilisé. Un nouveau calibrage est recommandé, si des changements ou un service important sont présentés.

PRECISION

La reproductibilité a été déterminée avec différents échantillons (en séries et sur plusieurs jours) Les résultats suivants ont été obtenus:

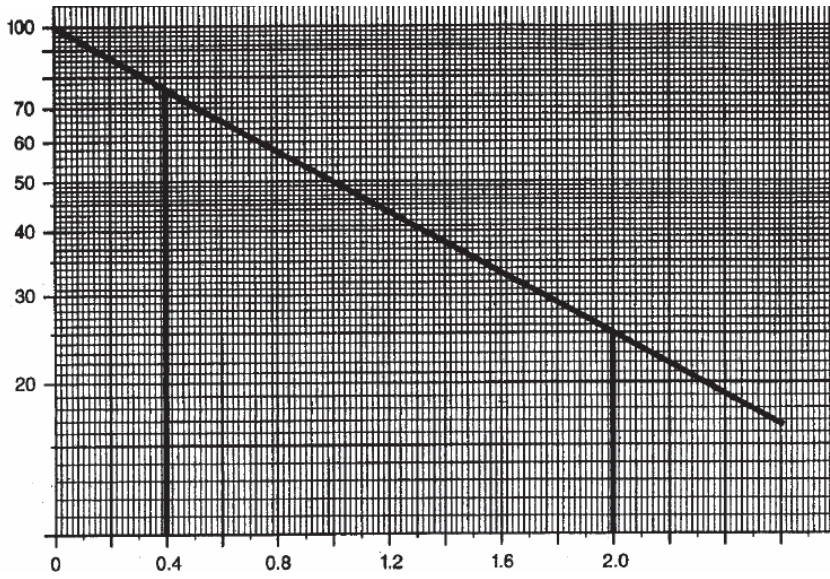
échantillon	échantillon 1	échantillon 2
n	8	20
MV BU	1,7	19,9
SD	0,2	1,9
CV (%)	9,77	9,89

BIBLIOGRAPHIE

Carol K. Kaspar et. al.: A More Uniform Measurement of Factor VIII Inhibitors; Thrombos. Diathes. haemorrh. 34 (1975), 869

Graph / Grafische Darstellung / Rappresentazione grafica / Presentación grafica / Représentation graphique

% F VIII-residual activity
% F VIII-Restaktivität
% attività residua del F VIII
% F VIII actividad residual
% d'activité résiduelle du F VIII



U. F VIII Inh./mL
E. F VIII Inh./mL
U. d'ini. del F VIII/mL
U. F VIII Inh./mL
U. inh. du F VIII/mL