

COAMATIC® Factor VIII - 82 2585 63

Intended use of the kit

Für die photometrische Determination von Faktor VIII Aktivität in Plasma, wenn die Identifizierung von Faktor VIII Defizienz oder Überwachung von Patienten nach Ersatztherapie sowie zur Bestimmung der Faktor VIII Konzentration.

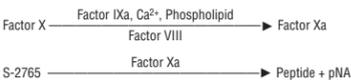
Background and summary

Das Coamatic Faktor VIII Kit liefert Reagenzien und chromogene Methoden zur Bestimmung der Faktor VIII Aktivität in menschlichem Plasma und in Faktor VIII Konzentrat. Faktor VIII ist ein hochmolekulares Plasmaprotein, das als Kofaktor für Faktor IXa in der Aktivierung von Faktor X wirkt.

Defizienz von Faktor VIII verursacht eine schwere Blutungsstörung, Hämophilie A. Die Schwere dieses Blutungsdefizits ist umgekehrt proportional zur Faktor VIII Konzentration. Hämophilie A-Patienten sind allgemein in drei Kategorien unterteilt: < 0,01 IU/mL = schwere, 0,01 - 0,05 IU/mL = mäßige und 0,05 - < 0,40 IU/mL = milde Hämophilie A.

Measurement principle

In der Gegenwart von Calcium-Ionen und Phospholipiden wird Faktor X durch Faktor VIII zu Faktor Xa aktiviert. Diese Aktivierung wird durch Faktor VIII stimuliert. Bei Verwendung einer optimalen Menge an Calcium²⁺, Phospholipid und Faktor IXa wird Faktor Xa in Faktor Xa umgewandelt. Die Aktivierung von Faktor Xa ist linear mit der Faktor VIII Konzentration. Die gemessene pNA-Freisetzung ist proportional zur Faktor VIII Aktivität. Die Spaltung des Substrats durch Thrombin wird durch Zugabe eines synthetischen Thrombininhibitors (I-2581) verhindert.



Composition

- S-2765 + I-2581:** 1 vial Chromogenes Substrat (N-A-Z-D-Arg-Gly-Arg-pNA) (7,7 mg) und synthetischer Thrombininhibitor (0,2 mg) mit Mannitol (Bulkungsmittel).
- Faktor reagent:** 2 vials Bovine Faktor IXa (0,3 U), Faktor X (2,7 IU) und Thrombin (1 NIH-U) copolymerisiert mit CaCl₂ (40 mmol) und Phospholipid (0,2 mmol).
- Buffer, stock solution:** 1 vial 24 ml konzentriertes Tris-Puffer, enthaltend NaCl und BSA. Charakteristika des verdünnten Puffers (1:10): Tris 0,025 mol/L, pH 7,9, I = 0,08, 1% BSA.

Die Reagenzien sind nicht austauschbar.

PRECAUTIONS AND WARNINGS:

Danger Factor Reagent
Hazard class: Resp. Sens. 1, H334
Hazard statements: H334: Kann bei Einatmen Allergien, asthmaparallele Symptome oder Atembeschwerden verursachen.

Precautionary statements: P261: Vermeiden Sie das Einatmen von Dämpfen/Aerosolen/Spray. P284: [In case of inadequate ventilation] tragen Sie eine Atemschutzmaske. P304 + P340: IF INHALED: Entfernen Sie sich von der kontaminierten Luft und suchen Sie ärztliche Hilfe. P342 + P311: Bei Symptomen der Atemwege: GIFTINFORMATIONSCENTRUM/Arzt anrufen. P501: Inhalt/Behälter gemäß lokalen/regionalen/nationalen/internationalen Vorschriften entsorgen.

Supplemental hazard information: Enthält Faktor IXa, Faktor X. Bis zu 60,7% dieses Gemisches besteht aus Inhaltsstoffen, die eine akute Toxizität (orale, dermale, inhalatorische) für den Menschen und das Gewässer nicht bekannt ist.

S-2765 + I-2581, Buffer Stock Solution
Hazard class: none
Hazard statements: none
Precautionary statements: none

Supplemental hazard information: EUH 210: Sicherheitsdatenblatt auf Anfrage erhältlich.
S-2765 + I-2581: Bis zu 6,12% dieses Gemisches besteht aus Inhaltsstoffen, die eine akute Toxizität (orale, dermale, inhalatorische) für den Menschen und das Gewässer nicht bekannt ist.

Buffer Stock Solution: Bis zu 12,1% dieses Gemisches besteht aus Inhaltsstoffen, die eine akute Toxizität (orale, dermale, inhalatorische) für den Menschen und das Gewässer nicht bekannt ist.

Preparation

- S-2765 + I-2581:** rekonstituieren Sie mit 6,0 ml steriler Wasser oder NCCLS Typ II Wasser.
- Faktor reagent:** rekonstituieren Sie mit 3,0 ml steriler Wasser oder NCCLS Typ II Wasser.
- Buffer, stock solution:** verdünnen Sie 1:10 (1+9) mit steriler Wasser oder NCCLS Typ II Wasser.

Reagent storage and stability

Die Reagenzien sind bei 2-8°C bis zum Verfallsdatum haltbar. Kontamination durch Mikroorganismen ist zu vermeiden.

- S-2765 + I-2581:** Stabilität nach Rekonstitution: 1 Monat bei 2-8°C.
- Faktor reagent:** Stabilität nach Rekonstitution: 12 Stunden bei 2-8°C, 2 Wochen bei -30°C oder 1 Monat bei -70°C. Vermeiden Sie Lagerung bei -70°C.
- Buffer, stock solution:** Stabilität nach Verdünnung: 1 Monat bei 2-8°C.

Warning: Das Produkt ist nur für die *in vitro* diagnostische Verwendung vorgesehen. Verwenden Sie das Produkt nicht für andere Zwecke.

Specimen collection

Proben sollten bei einem entspannten Patienten ohne Stress gesammelt werden. Blut (9 vol) wird mit 0,1 mol/L Natriumcitrat (1 vol) in Kunststoffröhrchen gesammelt. Zentrifugation: 2000 x g für 10-20 Minuten bei 20-25°C. Das Plasma sollte sofort nach der Zentrifugation in Kunststoffröhrchen gegeben werden.

Wenn das Plasma nicht sofort analysiert werden kann, sollte es bei -20°C für maximal eine Woche oder bei -70°C für maximal ein Jahr gelagert werden. Die Proben dürfen nicht aufgetaut und wieder eingefroren werden. Sollten diese nicht in selbstabtauhenden Gefriergeräten gelagert werden, weitere Informationen zur Gewinnung, Handhabung und Lagerung der Proben: siehe NCCLS-Dokument H21-A5.

Referieren Sie sich auf das NCCLS-Dokument H21-A5 für weitere Anweisungen zur Probenentnahme, -handhabung und -lagerung.

COAMATIC® Factor VIII - 82 2585 63

Verwendungszweck

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

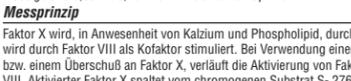
Zur Messung des Faktor VIII Gehaltes in Faktor VIII Konzentraten.

Hintergrund und Zusammenfassung

Das Coamatic Faktor VIII Testkit enthält Reagenzien zur chromogenen Bestimmung der Faktor VIII Aktivität in menschlichem Plasma und in Faktor VIII Konzentrat. Faktor VIII ist ein hochmolekulares Plasmaprotein, das als Kofaktor von Faktor IXa bei der Aktivierung von Faktor X zu Faktor Xa dient. Ein Mangel an Faktor VIII bedingt eine starke Blutungsneigung (Hämophilie A). Die Ausprägung dieser Blutungsneigung ist abhängig von der Faktor VIII Konzentration, weshalb Hämophilie A-Patienten generell in drei Kategorien unterteilt werden: < 0,01 I.E./ml = schwere, 0,01 - 0,05 I.E./ml = mäßige und 0,05 - < 0,40 I.E./ml = leichte Hämophilie A.

Messprinzip

Faktor X wird, in Anwesenheit von Calcium und Phospholipid, durch Faktor IXa zu Faktor Xa aktiviert. Diese Reaktion wird durch Faktor VIII als Kofaktor stimuliert. Bei Verwendung einer optimalen Menge an Calcium²⁺, Phospholipid und Faktor IXa wird Faktor Xa in Faktor Xa umgewandelt. Die Aktivierung von Faktor Xa ist linear mit der Faktor VIII Konzentration. Die gemessene pNA-Freisetzung ist proportional zur Faktor VIII Aktivität. Die Spaltung des Substrats durch Thrombin wird durch Zugabe eines synthetischen Thrombininhibitors (I-2581) verhindert.



Inhalt

- S-2765 + I-2581:** 1 Flasche 7,7 mg chromogenes Substrat (N-A-Z-D-Arg-Gly-Arg-pNA) und 0,2 mg synthetischer Thrombininhibitor, mit Mannitol als Füllstoff.
- Faktor reagent:** 2 Flaschen Boviner Faktor IXa (0,3 U), Faktor X (2,7 IU) und Thrombin (1 NIH-U), lyophilisiert mit CaCl₂ (40 mmol) und Phospholipid (0,2 mmol).
- Buffer:** 1 Flasche 24 ml Tris-Pufferkonzentrat, enthält NaCl und BSA. Spezifikation des 1:10 verdünnten Puffers: Tris 0,025 mol/l, pH 7,9, I = 0,08, 1% BSA.

Die Reagenzien sind bei verschiedenen Kit-Chargen nicht austauschbar.

ACHTUNG: INFEKTIONSRISKO

Gefahr Factor Reagent
Gefahrenklasse: Resp. Sens. 1, H334
Gefahrenhinweise: H334: Kann bei Einatmen Allergien, asthmaparallele Symptome oder Atembeschwerden verursachen.

Sicherheitsätze: P261: Einatmen von Dampf/Aerosol vermeiden. P284: [Bei unzureichender Belüftung] Atemschutz tragen. P304 + P340: BEI EINATMEN: Die Person an die frische Luft bringen und für ungehinderte Atmung sorgen. P342 + P311: Bei Symptomen der Atemwege: GIFTINFORMATIONSCENTRUM/Arzt anrufen. P501: Inhalt/Behälter gemäß lokalen/regionalen/nationalen/internationalen Vorschriften entsorgen.

Ergänzende Gefahrenmerkmale: Enthält Faktor IXa, Faktor X. Bis zu 60,7% dieses Gemisches besteht aus Inhaltsstoffen, die eine akute Toxizität (orale, dermale, inhalatorische) für den Menschen und das Gewässer nicht bekannt ist.

S-2765 + I-2581, Buffer Stock Solution
Gefahrenklasse: Keine
Gefahrenhinweise: Keine
Sicherheitsätze: Keine

Ergänzende Gefahrenmerkmale: EUH 210: Sicherheitsdatenblatt auf Anfrage erhältlich.
S-2765 + I-2581: Bis zu 6,12% dieses Gemisches besteht aus Inhaltsstoffen, die eine akute Toxizität (orale, dermale, inhalatorische) für den Menschen und das Gewässer nicht bekannt ist.

Buffer Stock Solution: Bis zu 12,1% dieses Gemisches besteht aus Inhaltsstoffen, die eine akute Toxizität (orale, dermale, inhalatorische) für den Menschen und das Gewässer nicht bekannt ist.

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

Lösen der Reagenzien

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

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

Lagerung und Haltbarkeit

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

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

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

Probengewinnung

Vor der Blutabnahme sollte der Patient ruhen, da es ansonsten zu temporär erhöhten Faktor VIII Werten kommen kann. 9 Teile Blut werden mit 1 Teil 0,1 mol/l Natriumcitrat in Kunststoffröhrchen oder silikonisiertem Glas gemischt und bei Raumtemperatur 10-20 Minuten mit 2000 x g zentrifugiert. Das Plasma unmittelbar nach der Zentrifugation von den Zellen trennen und innerhalb von 30 Minuten testen. Wird das Plasma nicht gleich getestet, kann es eine Woche bei -20°C oder ein Jahr bei -70°C aufbewahrt werden, wobei es jedoch - speziell bei langsamen Einfrieren - zu einer Abnahme der Faktor VIII Aktivität von bis zu 20% kommen kann. Die Proben dürfen nicht aufgetaut und wieder eingefroren werden bzw. sollten diese nicht in selbstabtauhenden Gefriergeräten gelagert werden. Weitere Informationen zu Gewinnung, Handhabung und Lagerung der Proben: siehe NCCLS-Dokument H21-A5.

Bibliography / Literatur / Bibliografia / Bibliographie / Bibliografía

- ROSEN S et al: Clinical application of a chromogenic substrate method for determination of factor VIII activity. *Thromb Haemost* 54, 818-823 (1985).
- MERTENS K et al: The role of factor VIII in the activation of blood coagulation factor X by activated factor IX. *Thromb Haemost* 54, 654-660 (1985).
- LEHAGEN S et al: Clinical application of the chromogenic assay of factor VIII in hemophilia A and different variants of von Willebrand's disease. *Scand J Haematol* 37, 448-453 (1986).

Symbols used / Verwendete Symbole / Símbolos utilizados / Symboles utilisés / Simboli impiegati

IVD In Vitro Diagnostic Medical Device In Vitro Diagnostikum Dispositif médical de diagnostic in vitro Producto sanitario para diagnóstico in vitro Dispositivo medicodiagnóstico in vitro	LOT Batch code Chargenbezeichnung Codigo de lote Code du lot Codice del lotto	 Use by Verwendbar bis Fecha de caducidad Utiliser jusque Utilizzare entro	 Temperature limitation Zulässiger Temperaturbereich Limite de temperatura Limites de température Limite di temperatura	 Consult instructions for use Gebrauchsanweisung beachten Consulte las instrucciones de uso Consulte las instrucciones d'utilisation Consultare le istruzioni per l'uso	 Manufacturer Hersteller Fabricant Fabricante Fabbriicante	EC REP Authorised representative Bevollmächtigter Representante autorizado Mandatario Rappresentanza autorizzata
--	---	---	--	--	---	--

Additional reagents

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

Material required but not provided

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

Quality control

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

Results

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

Expected values

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

Procedures

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

Calibration

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

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

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

Assay condition for microplate and test tube techniques

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

Dilution of samples and controls:

Samples/controls	25 µL
Buffer working solution	2000 µL
Mix well	

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

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

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

Zusätzlich benötigte Reagenzien

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

Zusätzlich benötigte Materialien

- Photometer, 405 nm (und 490 nm bei Mikrotiterplatten)
- Incubator 37°C ±0,2
- Mikrotiterplatte oder Halbmikroküvetten
- Zentrifuge, 2000 x g
- Kunststoffröhrchen
- Stopppuhr
- Vortex Mixer
- Kalibrierte Pipetten
- Lineares Millimeterpapier

Qualitätskontrolle

Gegen einen internationalen Faktor VIII Standard für Plasma oder für Faktor VIII Konzentrat kalibrierte Kontrollen sollten verwendet werden. Innerhalb der Testläufe periodisch Kontrollen mittesten, wobei diese wie Proben behandelt werden. In jedem Labor sollte ein Referenzbereich für die Kontrollen erstellt werden. Falls ein Kontrollwert ausserhalb des Referenzbereiches liegt, so sind Kalibration, Reagenzien und Gerät zu kontrollieren.

Ergebnisse

Die Ergebnisse der Bestimmung werden als Faktor VIII -Aktivität ausgedrückt in [IU/ml]. 1,0 IU/mL von FVIII entspricht 100% FVIII.

Referenzbereiche

Die bei 61 gesunden Individuen (28 männliche und 33 weibliche Personen im Alter von 21 bis 55 Jahren) gemessenen Faktor VIII Werte lagen im Bereich von 0,5-2 I.E./ml. Der Mittelwert betrug 1,13 I.E./ml, Standardabweichung 0,39 I.E./ml (Mikrotiterplatten Methode).

Testdurchführung

Alle Angaben in diesem Institut beziehen sich auf die Mikrotiterplatten und Manuelle Methode. Spezielle Automatenadaptionen sind auf Anfrage bei Chromogenix erhältlich.

Kalibration

Eine Standardkurve sollte mit jedem Testlauf erstellt werden. Die verschiedenen Standards werden durch Verdünnung eines Kalibrationsplasmas, das gegen den internationalen Standard kalibriert ist, hergestellt. Zur Präparation der Standardverdünnungen kann auch Normalplasma verwendet werden, das gegen den internationalen Standard kalibriert sein sollte. Es wird in Kunststoffröhrchen verdünnt (siehe "Zusätzlich benötigte REAGENZIEN"). Wenn das Normalplasma nicht genau 1 I.E./ml (100%) Faktor VIII enthält, müssen die Werte für die Faktor VIII Standards exakt berechnet werden. Das Normalplasma wird, wie unten beschrieben, in zwei Stufen verdünnt (Vorverdünnung und Endverdünnung). Bei Faktor VIII Werten unter 0,05 I.E./mL (Hämophilie A Patienten), sollte der niedrige Messbereich gewählt werden.

	Vorverdünnung	Plasma	Puffer Arbeits-lösung µL	Plasma-Vorverdünnung µL	Endverdünnung	Puffer Arbeits-lösung µL
Normaler Bereich						
1.42	undiluted	—	25	25	1400	
1.00	undiluted	—	25	25	2000	
0.50	100	100	25	25	2000	
0.25	50	150	25	25	2000	
0	—	—	—	—	2000	
Niedriger Bereich						
0.050	100	1900	25	25	2000	
0.024	50	2000	25	25	2000	
0.012	25	2000	25	25	2000	
0.006	25	4000	25	25	2000	
0	—	—	—	—	2000	

Mikrotiterplatten und Manuelle Methode:

Den Test innerhalb von 30 Minuten nach der Probenabnahme bzw. dem Auftauen der Probe durchführen. Verdünnung von Proben und Kontrollen:

Probe / Kontrolle	25 µL
Puffer Arbeitslösung	2000 µL
Gut durchmischen	

Um ein optimales Ergebnis zu erreichen, wird bei extrem niedrigen Faktor VIII Werten von 0,005-0,05 I.E./ml eine spezielle Methode mit verlängerten Reaktionszeiten angewandt.

	Messbereich
1. Mikrotiterplatten Methode	0-1.5 IU/mL 0-0.05 IU/mL
Verdünnte Proben/Kontrollen/Standards Bei 37°C inkubieren	50 µL 50 µL
Faktoreneagenz (vorgewärmt auf 37°C) Bei 37°C inkubieren	3-4 Minuten 50 µL
S-2765 + I-2581 (vorgewärmt auf 37°C)	2 Minuten 4 Minuten 50

COAMATIC® Factor VIII - 82 2585 63

Utilisation prévue de la trousse

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

Contexte et resume

La trousse Coamatic Facteur VIII contient des réactifs et des méthodes chromogènes de détermination de l'activité du facteur VIII dans le plasma humain et dans les concentrés de facteur VIII. Le facteur VIII est une protéine plasmatique de poids moléculaire élevé qui sert de co-facteur au facteur IXa dans son activation du facteur X en Xa. La déficience en facteur VIII est responsable d'un grave trouble hémorragique, l'hémophilie A. Il existe un rapport inverse entre la gravité de cette affection et la concentration de facteur VIII. Les patients atteints d'hémophilie A sont généralement classés en trois catégories sur la base de leur activité de facteur VIII, à savoir : < 0.01 UI/ml = hémophilie sévère - 0,01 à 0,05 UI/ ml = h. modérée - 0,05 à < 0,40 UI/ml = h. mineure⁴.

Principe de mesure

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

La mise en oeuvre de quantités optimales de Ca²⁺, de Phospholipidee et de facteur IXa, plus un excès de facteur X, se traduira par une relation linéaire entre la vitesse d'activation du facteur X et la quantité de facteur VIII. Le facteur Xa hydrolyse le substrat chromogène S-2765, libérant de la sorte le groupe chromophore pNA. La coloration est ensuite lue photométriquement à 405 nm. Le facteur Xa généré, et donc l'intensité de la coloration, est proportionnel(le) à l'activité du facteur VIII dans l'échantillon. De manière à éviter l'hydrolyse du S-2765 par la thrombine formée, on ajoute en même temps que le substrat l'inhibiteur synthétique de la thrombine I-2581.

Facteur X → Facteur IXa, Ca²⁺, Phospholipid → Facteur Xa → Facteur VIII → Peptide + pNA

S-2765 → Facteur Xa → Peptide + pNA

Composition

La trousse COAMATIC® FVIII contient :

1. S-2765 + I-2581 : 1 Flacon Substrat chromogène (N-a-Z-D-Arg-Gly-Arg-pNA) (7,7 mg) et inhibiteur synthétique de la thrombine (0,2 mg avec manitolil (agent gonflant).

2. Facto reagent : 2 Flacons Facteur IXa (0,3 UI), facteur X (2,7 IU) et thrombine (1 UI NIH) bovins, corythophilés avec CaCl₂ (40 mmol) et phospholipide (0,2 mmol).

3. Buffer : 1 Flacon 24 ml de tampon Tris concentré renfermant du NaCl et de la BSA. Caractéristiques du tampon dilué (1:10) : Tris 0,025 mol/l, pH 7,9, I = 0,08, BSA 1 %.

Ces réactifs ne sont pas interchangeables entre lots.

ATTENTION:

Danger

Factor Reagent

Classe de danger : Resp. Sens. 1, H334

Indications de danger : H334 : Peut provoquer des symptômes allergiques ou d'asthme ou des difficultés respiratoires par inhalation.

Conseils de prudence : P261 : Éviter de respirer les vapeurs/aérosols. P284 : [Lorsque la ventilation du local est insuffisante] porter un équipement de protection respiratoire. P304 + P340 : EN CAS D'INHALATION : transporter la personne à l'extérieur et la maintenir dans une position où elle peut confortablement respirer. P342 + P311 : En cas de symptômes respiratoires : Appeler un CENTRE ANTIPOISON/un médecin. P501 : Éliminer le contenu/récipient conformément à la réglementation locale/régionale/nationale/internationale.

Informations additionnelles sur les dangers : Contient Facteur IXa, Facteur X. Jusqu'à 60,7 % de ce mélange est constitué de composants dont la toxicité aiguë (par voie orale, cutanée, par inhalation) pour la santé humaine et l'écototoxicité pour le milieu aquatique sont inconnues.

S-2765 + I-2581. Buffer Stock Solution

Classe de danger : Aucune

Indications de danger : Aucune

Conseils de prudence : Aucune

Informations additionnelles sur les dangers : EUH 210 : Fiche de données de sécurité disponible sur demande.

S-2765 + I-2581 : Jusqu'à 6,12 % de ce mélange est constitué de composants dont la toxicité aiguë (par voie orale, cutanée, par inhalation) pour la santé humaine et l'écototoxicité pour le milieu aquatique sont inconnues.

Buffer Stock Solution : Jusqu'à 12,1 % de ce mélange est constitué de composants dont la toxicité aiguë (par voie orale, cutanée, par inhalation) pour la santé humaine et l'écototoxicité pour le milieu aquatique sont inconnues.

Ce produit est à usage diagnostique *in vitro*.

Préparation des réactifs

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

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

1. S-2765 + I-2581 : reconstituer avec 6,0 ml d'eau désionisée, ou eau NCCLS type II⁸

2. Facto reagent : Réactif facteur reconstituer avec 3,0 d'eau désionisée, ou eau NCCLS type II⁸

3. Buffer, stock solution : Solution tampon mère diluer à 1:10 (1+ 9) avec eau désionisée, ou eau NCCLS type II⁸

Conditions de conservation et stabilité

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

1. S-2765 + I-2581 : Stabilité après reconstitution : 1 mois à 2-8°C.

2. Facto reagent : Réactif facteur Stabilité après reconstitution : 12 heures à 2-8°C, 2 semaines à -30°C ou 1 mois à -70°C. Eviter le stockage à -20°C.

3. Buffer, stock solution : Solution tampon mère. Stabilité après dilution : 1 mois à 2-8°C.

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

Recuil des echantillons

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

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

COAMATIC® Factor VIII - 82 2585 63

Indicaciones de uso

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

Antecedentes y resumen

El kit de factor VIII Coamatic contiene reactivos y métodos cromogénicos para la determinación de la actividad del factor VIII en el plasma y en los concentrados de factor VIII. El factor VIII es una proteína plasmática de alto peso molecular que actúa como cofactor del factor Xa en la activación del factor X a Xa. La deficiencia del factor VIII produce un grave trastorno hemorrágico, la hemofilia A. La gravedad del trastorno hemorrágico tiene una relación inversa con la concentración del factor VIII. Los pacientes de hemofilia A se clasifican generalmente de acuerdo con la actividad del factor VIII en tres categorías < 0,01 UI/ml = grave; 0,01 - 0,05 UI/ml = moderada y 0,05 - < 0,40 UI/ml hemofilia leve⁴.

Fundamento del método

En presencia de iones calcio y de fostfolípidos, el factor Xe activa el factor X para convertirlo en factor Xla. El factor VIII estimula considerablemente esta activación, que actúa como cofactor en esta reacción. Mediante el uso de cantidades óptimas de Ca²⁺, de fostfolípidos y de factor Xa, así como de un exceso de factor X, se consigue una relación lineal del factor X con la cantidad de factor VIII. El factor Xa hidroliza el substrato cromogénico S-2765, liberando así el grupo cromofórico pNA. El color se lee a 405 nm. El factor Xa generado y por lo tanto la intensidad del color, es proporcional a la actividad del factor VIII de la muestra. La adición del inhibidor de trombina sintético I- 2581 así como el sustrato previenen la hidrólisis de la trombina formada.

Factor X → Factor IXa, Ca²⁺, Fostfolipido → Factor Xa → Factor VIII → Peptide + pNA

S-2765 → Facto Xa → Péptido + pNA

Composición

1. S-2765 + I-2581 : 1 Vial Sustrato cromogénico (N-a-Z-D-Arg-Gly-Arg-pNA) (7,7 mg) e inhibidor sintético de trombina (0,2 mg) con manitol (agente de volumen).

2. Facto reagent : 2 Viales Facto bovino Xa (0,3 UI), factor X (2,7 IU) y trombina (1 NIH-U) coliofilizado con CaCl₂ (40 mmol) y fostfolipido (0,2 mmol).

3. Buffer : 1 Vial 24 ml de tampón Tris concentrado que contiene NaCl y BSA Características del tampón diluido (1:10) : Tris 0,025 mol/l, pH 7,9, I = 0,08, 1% BSA.

Los reactivos no son intercambiables entre los diversos lotes.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES:

Peligro

Factor Reagent

Clase de peligro: Resp. Sens. 1, H334

Indicaciones de peligro: H334: Puede provocar síntomas de alergia o asma o dificultades respiratorias en caso de inhalación.

Consejos de prudencia: P261: Evitar respirar los vapores/el aerosol. P284: [En caso de ventilación insuficiente.] llevar equipo de protección respiratoria. P304 + P340: EN CASO DE INHALACIÓN: Transportar a la persona al aire libre y mantenerla en una posición que le facilite la respiración. P342 + P311: En caso de síntomas respiratorios: Llamar a un CENTRO DE TOXICOLOGA/medico. P501: Eliminar el contenido/el recipiente de conformidad con la normativa local, regional, nacional o internacional.

Información suplementaria sobre los peligros: Contiene Factor IXa, Factor X. Hasta el 60,7 % de la mezcla está constituido por componentes con una toxicidad aguda (oral, dérmica, por inhalación) para los seres humanos y un peligro para el medio ambiente no conocidos.

S-2765 + I-2581. Buffer Stock Solution

Clase de peligro: Ninguna

Indicaciones de peligro: Ninguna

Consejos de prudencia: Ninguna

Información suplementaria sobre los peligros: EUH 210: Puede solicitarse la ficha de datos de seguridad. **S-2765 + I-2581:** Hasta el 6,12% de la mezcla está constituido por componentes con una toxicidad aguda (oral, dérmica, por inhalación) para los seres humanos y un peligro para el medio ambiente no conocidos.

Buffer Stock Solution: Hasta el 12,1% de la mezcla está constituido por componentes con una toxicidad aguda (oral, dérmica, por inhalación) para los seres humanos y un peligro para el medio ambiente no conocidos.

Este producto es para diagnóstico *in vitro*.

Preparación de los reactivos

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

1. S-2765 + I-2581: Reconstituir con 6,0 mL de agua desionizada, filtrada a través de un filtro de 0,22 mm o agua NCCLS tipo II⁸

2. Facto reagent: Reactivo de factor reconstituir con 3,0 mL de agua desionizada, filtrada a través de un filtro de 0,22 mm o agua NCCLS tipo II⁸

3. Buffer, stock solution: Tampón, solución de cultivo diluir 1:10 (1+9) con agua desionizada, filtrada a través de un filtro de 0,22 mm o agua NCCLS tipo II⁸

Condiciones de conservación y estabilidad

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

1. S-2765 + I-2581: Estabilidad después de reconstitución: 1 mes entre 2-8°C.

2. Facto reactivo: Estabilidad después de reconstitución: 12 horas entre 2-8°C, 2 semanas a -30°C o un mes a -70°C. Evitar almacenarlo a -20°C.

3. Tampón, solución de cultivo: estabilidad después de dilución: 1 mes entre 2-8°C.

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

Obtención de la muestras

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

Si la realización del test n'intervient pas tout de suite, conserver le plasma à -20°C durant une semaine au maximum ou à -70°C durant un an au maximum. Il faut savoir que des pertes d'activité du facteur VIII de près de 20% peuvent se produire lors de la congélation et de la décongélation, surtout si le plasma est congelé lentement. Les échantillons ne doivent pas être stockés dans un congélateur à dégivrage automatique, ni être décongelés et recongelés avant le dosage. Pour des instructions complémentaires concernant le recueil, la manipulation et la conservation des échantillons, se reporter au document H21-A5 NCCLS.⁹

Réactifs nécessaires mais non fournis

- Eau désionisée, filtrée sur filtre de 0,22 mm, ou eau (NCCLS type II⁸).
- Plasma calibrant, étalonné par rapport à un standard international.
- Témoins appropriés étalonnés par référence à un Standard International pour le facteur VIII.
- De l'eau physiologique (NaCl à 0,9 %).
- Acide acétique 20 % ou acide citrique 2 % (méthodes manuelle et de la microplaque).

Matériel nécessaire mais non fourni

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

- Chronomètre
- Mélangeur à vortex
- Pipettes jaugées
- Papier millimétré

Controles de qualite

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

Resultats

Les résultats de le factor VIII sont indiqués en activité (UI/ml). 1.0 UI/ml de FVIII est équivalent à 100 % de FVIII.

Valeurs de reference

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

Procedures

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

Etalonnage

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

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

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

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

Méthode en microplaque :

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

Dilution des échantillons et des témoins :

Echantillons/témoins 25 µL

Solution tampon de travail 2000 µL

Bien mélanger.

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

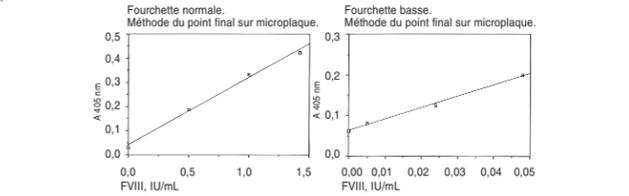
		Fourchette de dosage
	1. Méthode sur microplaque	0-1,5 UI/ml 0-0,05 UI/ml
	Echantillons dilués/témoins/standard	50 µL 50 µL
	Incuber à 37°C	3-4 min 3-4 min
	Réactif facteur (préchauffer à 37°C)	50 µL 50 µL
	Incuber à 37°C	2 min 4 min
	S-2765 + I-2581 (préchauffer à 37°C)	50 µL 50 µL
	A. Méthode cinétique : lire ΔA/min	
	B. Méthode du point final : procéder comme il est dit ci-dessous	
	Incuber à 37°C	2 min 10 min
	Acide acétique 20 % ou acide citrique 2 %	50 µL 50 µL
	A. Méthode cinétique : lire la modification de l'absorbance à 405 nm pendant 30-120 s.	
	B. Méthode du point final : lire l'absorbance par rapport au tampon à 405 nm.	

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

FRANÇAIS - Révision de la notice 03/2019

Calcul

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



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

Méthode de la microplaque				
Fourchette normale	Standard 0 IU/ml 1,0 IU/ml	Kinetik, ΔA/min <0,06 0,16-0,32	Endpunkt, A <0,12 0,33-0,63	
Fourchette basse	0 IU/ml 0,05 IU/ml	<0,02 0,02-0,05	<0,18 0,17-0,44	
Méthode des tubes à essai				
Fourchette normale	0 IU/ml 1,0 IU/ml	<0,14 0,38-0,74	<0,21 0,58-1,11	
Fourchette basse	0 IU/ml 0,05 IU/ml	<0,04 0,04-0,11	<0,32 0,29-0,76	

Caractéristiques et performances

SPECIFICITE ET FACTEURS INTERFERENTS

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

Printed Insert Sheet: 302143
Revision: R6
Issued: 03/2019
C.O.: 495650

LANGUAGES

ENGLISH
DEUTSCH
ESPAÑOL
FRANÇAIS

TECHNICAL SPECS

PAPER: White paper, 50-60 g/m² weight, PCS00400180.
SIZE: 11 x 17" (280 x 432 mm.).
PRINT: Front/Back.
PRINT COLOR: Top rule Orange Pantone 137, all remaining type in black,
PMS 179 RED where used.
Back - All type in black. PMS 179 RED where used.