

BIOPHEN™ FVIII:C

REF 221402 **R1** **R2** **R3** 2 x 2.5 mL, **R4** 4 x 25 mL

REF 221406 **R1** **R2** **R3** 2 x 6 mL, **R4** 4 x 25 mL


Chromogenická metoda pro test faktoru VIII:C
v plazmě nebo terapeutických koncentrátech.

POUŽITÍ:

Souprava BIOPHEN™ FVIII:C je chromogenická metoda určená pro in vitro kvantitativní stanovení Faktor VIII (FVIII:C) v lidské citrátové plazmě nebo terapeutických koncentrátech, s použitím automatizované nebo manuální metody.

SHRNUTÍ A VYSVĚTLENÍ:

Technické:

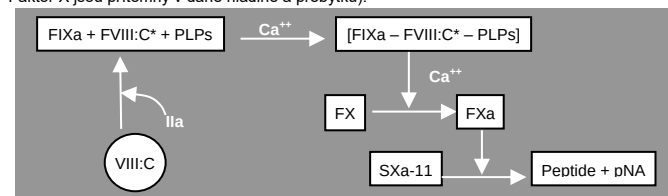
Faktor VIII je přibližně 280 kDa plazmatický protein. Je přítomen v plazmě ve velice nízké koncentraci (100-200 ng/ml). V krvi je FVIII stabilizován jeho vazbou na von Willebrandův Faktor (vWF), který dramaticky zvyšuje jeho poločas v krevním oběhu. Pokud je vWF nepřítomen, FVIII je rychle odbourán z krve.

Klinické:

Deficit faktoru VIII (neboli antihemofilického faktoru A) vede k hemofilii A, vrozené koagulační poruše. Hladina faktoru VIII je nižší u von Willebrandovy nemoci (vWD), u Disseminované intravaskulární koagulace (DIC) nebo u získané produkce FVIII inhibitorů. Zvýšená koncentrace FVIII je pozorována u zánětů nebo jaterních onemocnění a může být znakem zvýšeného rizika žilní trombózy. Koncentrace FVIII je zvýšená u těhotenství.

PRINCIP:

BIOPHEN™ Factor VIII:C metoda zahrnuje chromogenní měření kofaktoru FVIII:C. V přítomnosti fosfolipidů (PLP) a vápníku je FVIII:C aktivován trombinem a tvoří enzymatický komplex s faktorem IXa, který aktivuje faktor X. Výsledný faktor Xa hydrolyzuje chromogenní substrát, který vyloučí paranitroanilin (pNa). Množství vyloučeného pNa (měřeno absorpcí světla při 405nm) je přímo úměrné koncentraci FVIII:C ve vzorku (Faktor IXa, Trombin a Faktor X jsou přítomny v dané hladině a přebytku).



NB: FVIII:C*: FVIII:C aktivovaný trombinem.

REAGENCIE:

R1 Lidský Faktor X, lyofilizováno. Obsahuje fibrin a polymerizační inhibitor fibrinu, BSA a stabilizační látky.

R2 Aktivací reagentie, (IXa – Trombin – Vápník – Fosfolipidy), lyofilizováno. Obsahuje lidský Faktor IXa, v určité hladině a nabytku, lidský trombin, vápník, syntetické fosfolipidy, stabilizační látky a BSA.

R3 SXa-11, chromogenní substrát, specifický pro Faktor Xa (SXa-11), lyofilizováno. Obsahuje inhibitor trombinu.

R4 Tris-BSA pufr, tekutý. Contains 1% BSA, PEG, Factor VIII:C stabilizing agents and small amounts of sodium azide (0.9 g/L) as a preservative.

REF 221402 → **R1** **R2** **R3** 2 x 2.5 mL lahvičky

R4 4 x 25 mL lahvičky

REF 221406 → **R1** **R2** **R3** 2 x 6 mL lahvičky

R4 4 x 25 mL lahvičky

UPOZORNĚNÍ A BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ:

- Některé reagentie obsažené v těchto soupravách obsahují materiály lidského a zvířecího původu. Kdykoliv je pro přípravu těchto reagentů nutná lidská plazma, je potřebné testovat plazmu na protilátky proti HIV 1, HIV 2 a HCV a pro povrchový antigen hepatitidy B schválenými metodami a výsledky musí být negativní. Žádné testy nemohou zcela vyloučit přítomnost infekčních agens. Z tohoto důvodu je třeba při manipulaci s tímto biologickým materiálem učinit veškerá opatření nezbytná při používání potenciálně infekčních produktů.
- Odpad musí být likvidován v souladu s příslušnými místními předpisy.
- Používejte pouze reagentie ze stejné série soupravy.
- Studie stability ukazují, že reagentie mohou být přepravovány při pokojové teplotě bez degradace.
- Toto zařízení pro diagnostické použití in vitro je určeno pro odborné použití v laboratoři.

PŘÍPRAVA REAGENCIÍ:

Zátka po vymrazování opatrně vyjměte, aby se zabránilo ztrátám produktu při otvírání lahvičky.

R1 **R2** **R3** Rekonstituuje obsah každé lahvičky přesně s :

REF 221402 → **R1** **R2** **R3** 2.5 mL destilované vody

REF 221406 → **R1** **R2** **R3** 6 mL destilované vody

Dobře promíchejte do úplného rozpuštění (Zajistěte, aby u **R3** nebyly žádné depozity na dně lahvičky - popřípadě nechte **R3** stabilizovat po dobu 15 minut při 37°C a homogenizujte před použitím).

Zabraňte tvorbě pěny a ihned vložte do analyzátoru dle příslušného aplikačního protokolu. Pro manuální metodu nechte stabilizovat 30 minut při pokojové teplotě (18-25°C), před použitím homogenizujte.

R4 Reagentie je připravená k použití; homogenizujte a vložte ji přímo do analyzátoru podle instrukcí uvedených v návodu k použití.

U manuální metody nechte stabilizovat po dobu 30 minut při pokojové teplotě (18-25°C), před použitím homogenizujte.

SKLADOVÁNÍ A STABILITA:

Neotevřené reagentie musí být skladovány při teplotě 2-8°C ve svém originálním balení. Za těchto podmínek mohou být používány až do doby expirace vytištěné na soupravě.

R1 **R2** Stabilita reagentie po rekonstituci bez jakýchkoli kontaminací nebo vypařování a skladované uzavřené je:

- 72 hodin při teplotě 2-8°C.
- 24 hodin při pokojové teplotě (18-25°C).
- 3 měsíce zmrazená při teplotě -20°C nebo nižší*
- Stabilita na palubě analyzátoru: viz specifické aplikace.

R3 Stabilita reagentie po rekonstituci bez jakýchkoli kontaminací nebo vypařování a skladované uzavřené je:

- 3 měsíce při teplotě 2-8°C.
- 7 dní při pokojové teplotě (18-25°C).
- 3 měsíce zmrazená při teplotě -20°C nebo nižší*
- Stabilita na palubě analyzátoru: viz specifické aplikace.

*Rozmrazte pouze jednou, co nejrychleji při 37°C a ihned použijte. Novou kalibraci provádějte se zmrazenou reagentií.

R4 V původním obalu a skladovaná při 2-8°C je reagentie stabilní až do data expirace vytištěného na soupravě, bez kontaminace nebo odpařování.

Žluté zabarvení značí kontaminovaný substrát. Lahvičku zlikvidujte a použijte novou.

POŽADOVANE REAGENCIE A MATERIAL (NEJSOU SOUČÁSTÍ SOUPRAVY):

Reagentie:

- Destilovaná voda.
- 20% kyseliny octové nebo 2 % kyseliny citronové (metoda endpoint).
- Referenční materiály pro stanovení FVIII:C v terapeutických koncentrátech (mezinárodní nebo interní).
- Specifické kalibrátory a kontroly se známou titrací, jako jsou:

Název produktu	Reference
BIOPHEN™ Plasma Calibrator	222101
BIOPHEN™ Normal Control Plasma	223201
BIOPHEN™ Abnormal Control Plasma	223301

- Pro kalibraci nízkého rozsahu zředit kalibrátor v plazmě s nedostatkem FVIII:C (DP040A/K).

Také viz specifický návod k použití analyzátoru.

Materiály:

- Analyzátor se spektrofotometrickou a chromogenickou metodou.
- Stopky, kalibrované pipety, plastové zkumavky nebo mikroděstičky.

ODBĚR A PŘÍPRAVA VZORKU:

Krev (9 dílů) musí být opatrně odebrána do antikoagulantu citrátu trisodného (1 díl) (0,109 M, 3,2%) přímou venepunkcí. První zkumavku zlikvidujte.

Vzorky by měly být připravovány a skladovány v souladu s místními pokyny (pro USA viz pokyny CLSI H21-A5⁹ s dalšími informacemi o odběru, manipulaci a skladování). Informace o skladování plazmy naleznete v referencích^{9,10,11}.

POSTUP:

Souprava může být použita pro kinetické, automatizované nebo manuální (endpoint) metody. Test provádějte při teplotě 37°C a intenzitu barvy určujte při 405 nm.

Pro automatizované metody jsou aplikační návody k dispozici na vyžádání. Viz specifické aplikace a specifická opatření pro každý analyzátor.

Metoda stanovení:

1. Resuspendujte kalibrátory a kontroly jak je uvedeno ve specifických instrukcích. Pro stanovení kalibrační křivky by kalibrátory měly být ředěny v **R4** pufru, viz následující tabulka. „C“ definuje koncentraci FVIII:C.

Vysoký rozsah (0 až 200%):

Když je kalibrační křivka stanovena s použitím komerční kalibrační plazmy (např.: BIOPHEN™ Plasma kalibrátor), ředění 1/40 odpovídá indikované koncentraci (C) FVIII:C a ředění 1/20 dvojnásobku této koncentrace. U kalibrátoru s titrem C se 200% hladina (za testovacích podmínek) získá zředěním tohoto kalibrátoru následujícím faktorem: 20x (C) / 100. Kalibrační křivka může být také stanovena pomocí směsi citrátované normální plazmy (nejméně 30 normálních jedinců, mužů a žen, ve věku od 18 do 55 let, bez známé léčby nebo nemoci), které mají podle definice titr FVIII:C 100%. Test zahrnuje zředění plazmy 1/40, které podle definice představuje 100% FVIII:C. Kalibrační křivka je v rozsahu od 5 do 200% FVIII:C. Zředění 1:20 v pufru **R4** představuje 200% FVIII:C.

Připravte 1 mL roztoku normální plazmy 1/20 nebo roztoku (20xC/100) kalibrační plazmy titrované FVIII:C (i.e. C1). Tento roztok má titr FVIII:C 200%. Připravte si následující kalibrační křivku sériovým ředěním v pufru **R4**, jak je popsáno v následující tabulce:

kalibrátory	C1	C2	C3	C4
FVIII:C (%)	200	100	50	0
Objem 200% kalibrátoru FVIII:C	500 µL	250 µL	125 µL	0 µL
Objem pufru R4	0 µL	250 µL	375 µL	500 µL

Kalibrační křivka může být také stanovena z referenčního materiálu titrovaného FVIII:C (mezinárodní standard nebo interní standard). Tento materiál předem naředíte v pufru **R4** aby se získal roztok **1 IU/ml**, pak naředíte **1/20** v **R4** aby se získal roztok **s 200%** (2 IU/ml) titrem FVIII:C. Tento roztok použijte ke stanovení kalibrační křivky v pufru **R4** jak bylo vysvětleno výše.

Nízký rozsah (0 až 25%):
Kalibraci lze provést pomocí směsi citrátované normální plazmy nebo komerční kalibrační plazmy se známou koncentrací FVIII:C, tj. C. Zředíte tuto plazmu s nedostatkem FVIII:C (DP040A/K)), aby se dosáhlo **25%** koncentrace (ředicí faktor v nedostatečné plazmě je 4 pro normální směs a **4x C / 100** pro kalibrátor s koncentrací C). Metoda testu zahrnuje zředění plazmy **1/10**. Kalibrační křivka je v rozsahu od **0 do 25%** FVIII:C. Zředění **1/10** v pufru **R4** představuje **25%** FVIII:C.

Pomocí tohoto roztoku vytvořte následující kalibrační křivku v pufru **R4** :

FVIII:C (%)	0	6.25	12.5	25
Objem 25% FVIII:C kalibrátoru	0 µL	125 µL	250 µL	500 µL
Objem pufru R4	500 µL	375 µL	250 µL	0 µL

Kalibrační křivku připravte těsně před použitím, aby nedošlo k degradaci FVIII:C.

2. Vzorky naředíte v pufru **R4**, jak je uvedeno v tabulce níže:

Vzorky	Reference	Rozsah	Ředění
Kontroly	223201/223301	Vysoký	1/40
		Nízký (po předředění 1/10 při nedostatku FVIII:C)	1/10
Vzorky	N.A.	Vysoký	1/40
		Low Nízký	1/10

Pro terapeutické koncentrace FVIII:C, předem naředíte měřené vzorky (**vysoké rozmezí**) v **R4**, s cílovou koncentrací FVIII:C přibližně 1 IU/ml. Doporučujeme předem naředit, aby se teoretická koncentrace FVIII:C upravila mezi **0,2 a 2 IU/ml**. Pak naředíte **1/40** v **R4** a proveďte test. Předpokládaná koncentrace FVIII:C je pak mezi 20 a 200%. (Naměřená koncentrace by pak měla být vynásobena faktorem „předředění“).

Vytvořte kalibrační křivku a testujte s kontrolami kvality. Pokud jsou ředěné vzorky skladovány při pokojové teplotě (18-25°C), musí být testovány ihned. Pro každou sérii jsou koncentrace kalibrátorů a kontrol uvedené na letáku dodávaném se soupravou.

3. Do jamek mikroděstičky nebo do plastové zkumavky inkubované při 37°C přidejte následující:

	Mikroděstička	Zkumavka
Kalibrátory, testované plazmy nebo kontroly ředěné v R4	50 µL	100 µL
R1 Lidský Faktor X předem inkubovaná při 37°C	50 µL	100 µL
R2 Aktivální reagentie předem inkubovaná při 37°C	50 µL	100 µL
Promíchejte a inkubujte při 37°C 5 minuty , následně přidejte následující:		
R3 SXa-11 předem inkubovaná při 37°C	50 µL	100 µL
Promíchejte a inkubujte při 37°C přesně 5 minuty :		
Reakci zastavte přidáním:		
kyselina citronová (2%)*	50 µL	200 µL
Promíchejte a změřte optickou hustotu při 405 nm vůči odpovídajícímu blanku.		

*Nebo kyselina octová (20%). Výsledné žluté zbarvení je stabilní 2 hodiny.
Slepý vzorek se získá smícháním reagentií v obráceném pořadí: kyselina citronová (2%), R3, R2, R1, ředěný testovaný vzorek.
Optickou hustotu měřte při 405 nm. Odečtete naměřenou hodnotu blanku z absorbance.

Slepý vzorek plazmy vytvořte pokud je vzorek ikterický, lipemický nebo hemolyzovaný, nebo pokud se barva liší od standardní plazmy.

Kinetic method:

Měření může být provedeno kinetickou metodou měřením změny v absorbanci mezi 10 a 100 sekundou po přidání substrátu (tedy ΔA405). V tomto případě zde není zapotřebí odečítat od blank vzorku nebo zastavovat reakci.

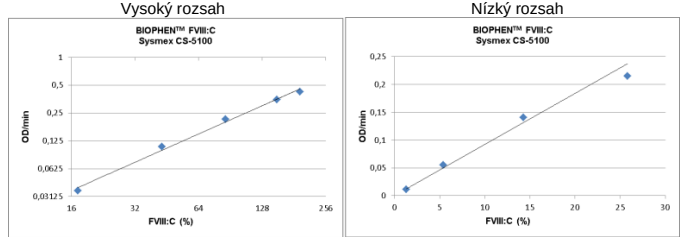
Pokud je pro používanou metodu požadován jiný reakční objem, než výše uvedený, musí být poměr objemu přesně dodržen, aby byla zaručena účinnost testu. Uživatel je zodpovědný za ověření všech změn a jejich vlivu na všechny výsledky.

KALIBRACE:

Test BIOPHEN™ FVIII:C může být pro analýzu kalibrován různými FVIII:C. Soupravy obsahující kalibrátory specifické pro tyto analyty a zahrnující dynamický rozsah testu jsou dostupné u HYPHEN BioMed (viz POŽADOVANÉ REAGENCIE A MATERIÁL (NEJSOU SOUČÁSTÍ SOUPRAVY)) a mohou být použity k vygenerování kalibrační křivky specifické pro testovaný analyt.

- Kalibrační rozmezí je kolem 17 do 195% (vysoké rozmezí) a kolem 0,7 až 26% (nízké rozmezí) na Sysmex CS-sérii.

Následující kalibrační křivky jsou pouze příkladem. Pro sérii metody je nutné sestrojit kalibrační křivky pro konkrétní podmínky.



KONTROLA KVALITY:

Použití kontrol kvality slouží k validaci shody metod spolu s homogenitou testu mezi sériemi pro danou sadu reagentií.

Za účelem validace testu zahrňte kontroly kvality do každé série podle správné laboratorní praxe. Nová kalibrační křivka by měla být definována nejlépe pro každou sérii testů a alespoň pro každou novou sadu reagentií nebo po údržbě analyzátoru, nebo když měřené hodnoty kontroly kvality spadají mimo akceptovatelný rozsah pro danou metodu.

Každá laboratoř si musí definovat a ověřovat vlastní akceptovatelné rozsahy v daném analytickém systému.

VÝSLEDKY:

- Pro manuální end-point metodu stanovte kalibrační křivku log-log (vysoké rozmezí) nebo lin-lin (nízké rozmezí), s OD 405nm na ose Y a koncentrací FVIII:C (v %) na ose X. Pokud používáte kinetickou metodu, použijte ΔOD 405 místo OD 405.
- Koncentrace FVIII:C (%) v testovaném vzorku je odvozena přímo z kalibrační křivky, pokud je použita standardní diluce.
- Jsou-li použita jiná ředění, získaná hladina je naměřená hladina vynásobená dalším použitým ředícím faktorem.
- Výsledky by měly být interpretovány podle klinického a biologického stavu pacienta.

OMEZENÍ:

- K zajištění optimálního výkonu testu a splnění specifikací je nutné se řídit technickými instrukcemi ověřenými společností HYPHEN BioMed.
- Jakékoliv reagenzie vykazující neobvyklé příznaky nebo známky kontaminace nesmí být použity.
- Jakékoliv podezřelé vzorky nebo ty, které vykazují známky aktivace, nesmí být použity.
- FVIII:C výsledky mohou být ovlivněny u pacientů s terapií přímým inhibítorem XA nebo pacientů s mutací FVIII.
- FVIII měření je citlivé na přímé anti-Xa inhibitory a bispecifické protilátky napodobující FVIII¹².

OČEKÁVANÉ HODNOTY:

Normální hodnota FVIII:C pro plazmu u dospělého jedince je obecně mezi 50 a 150%. Každá laboratoř si však musí stanovit svůj vlastní normální interval.

CHARAKTERISTIKA:

- Nízký detekční limit analyzátoru závisí na použitém analytickém systému (<2% u vysokého rozmezí a <0,5% u nízkého rozmezí na Sysmex CS-5100).
- Měřicí rozmezí testu závisí na použitém analytickém systému. Přibližně **2,5 až 250%** pro vysoké rozmezí a **0,25 až 30%** pro nízké rozmezí na Sysmex CS-sérii.
- Studie výkonu, provedena interně na Sysmex CS-5100, s laboratorními kontrolami po dobu 20 dnů, 2 série denně, 2 opakování v sérii pro danou kontrolní hladinu prokázala následující data:

	Kontrola	Mezi sériemi				Mezi sériemi			
		n	Průměr	CV%	SD	n	Průměr	CV%	SD
Vysoký rozsah	Normální	30	93.6	1.5	1.4	120	99.0	2.7	2.7
	Abnormální	30	35.3	1.1	0.4	120	37.2	2.8	1.1
Nízký rozsah	Normální	30	9.9	1.9	0.2	120	10.1	4.4	0.4
	Abnormální	30	4.0	3.3	0.1	120	3.9	4.7	0.2

- Korelace s referenční metodou (Faktor VIII chromogenní test SIEMENS vs BIOPHEN™ Faktor VIII:C na Sysmex CS-5100):
n = 86 y = 1,07x - 7,19 r = 0,989
- Interference:
Žádné interference nebyly zaznamenány na analyzátoru Sysmex CS-5100 (pro vysoké rozmezí) do následujících koncentrací:

Hemoglobin	Bilirubin (F/C)	Heparin (LMWH/UFH)	Intralipidy	Apixaban	Dabigatran
1000 mg/dL	60 mg/dL	2 IU/mL	600 mg/dL	50 ng/mL	50 ng/mL

Viz specifický návod k použití daného analyzátoru.

REFERENCE:

- Wagenvoord RJ *et al.* Development of a simple chromogenic factor VIII assay for clinical use. Haemostasis. 1989.
- Hubbard AR. *et al.* Potency estimation of recombinant factor VIII: effect of assay method and standard. Br. J Haematol. 2001.
- Raut S. *et al.* A collaborative study to establish the 6th International Standard for factor VIII concentrate. Thromb. Haemost. 2001.
- Peyvandí F. *et al.*, A critical appraisal of one-stage and chromogenic assays of factor VIII activity. Journal of Thrombosis and Haemostasis. 2015.
- Sommer J.M. *et al.*, Comparative field study evaluating the activity of recombinant factor VIII Fc fusion protein in plasma samples at clinical haemostasis laboratories. Haemophilia. 2014.
- Vince Jenkins P. *et al.*, Elevated factor VIII levels and risk of venous thrombosis. British Journal of Haematology. 2012.
- Bowyer A.E. *et al.* Role of chromogenic assays in haemophilia A and B diagnosis. Haemophilia. 2018.
- Kitchen S. *et al.* A computer-based model to assess costs associated with the use of factor VIII and factor IX one-stage and chromogenic activity assays. J Thromb Haemost 2016.
- CLSI Document H21-A5: "Collection, transport, and processing of blood specimens for testing plasma -based coagulation assays and molecular hemostasis assays; approved guideline". 2008
- Woodhams B. *et al.* Stability of coagulation proteins in frozen plasma. Blood coagulation and Fibrinolysis. 2001.
- Mauge L. and Alhenc-Gelas M. Stabilité pré-analytique des paramètres de la coagulation: revue des données disponibles. Ann Biol Clin. 2014.
- Schmitt C. *et al.* Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Emicizumab in Persons with Hemophilia A with Factor VIII Inhibitors: HAVEN 1 Study. Emicizumab Pharmacokinetics and Pharmacodynamics. 2020.

SYMBOLY:

Použité symboly a značky uvedené v normě ISO 15223-1 viz dokument definic symbolů.

R3 H373: Může způsobit poškození orgánů prodlouženou nebo opakovanou expozicí.

Změny ve srovnání s předchozí verzí.