NoFact VIII

Immunodepleted Factor VIII Deficient Substrate Plasma

ENGLISH VERSION

INTENDED USE

NoFACT VIII Deficient Plasma is a human plasma immunodepleted of Factor VIII and intended for the quantitative determination of Factor VIII activity in citrated plasma from patients suspected of FVIII deficiency. FVIII activity is based on the activated partial thromboplastin time. For in vitro diagnostic use.

SUMMARY AND PRINCIPLE

Factor VIII is a glycoprotein zymogen of approximately 330,000 Daltons that circulates at a concentration of 300 pM (1). When converted to its active form, Factor VIIIa, it complexes with activated FIX (FIXa) and accelerates the conversion of FX to FXa.

Factor VIII has decreased activity in a congenital condition known as Hemophilia A. An acquired Factor VIII deficiency state may occur in disseminated intravascular coagulation (DIC) and in patients who develop specific Factor VIII inhibitors.

The quantitative clot-based assay for Factor VIII uses a modification of the activated partial thromboplastin time (APTT) test and Factor VIII deficient plasma (2, 3). In this system a dilution of the test plasma is mixed with a FVIII deficient plasma and the clot time of an APTT determined for the mixture. Under these conditions the clot time is inversely proportional to the concentration of FVIII in the test plasma (3).

SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Perform sample collection, handling, and storage according to the CLSI document H21-A5 "Transport and Processing of Blood Samples for Testing Plasma-based Coagulation Assays and Molecular Hemostasis Assays" (4). Nine parts of freshly drawn whole blood should be collected into one part 3.2% trisodium citrate anticoagulant. Fresh plasma samples up to 4 hours post-collection and frozen samples stored up to two weeks at -20C and up to six months at -70C are acceptable. Thaw frozen samples rapidly in a 37C water bath and mix gently and thoroughly before testing.

REAGENTS

For *In-Vitro* Diagnostic Use Only.

Factor VIII Deficient Substrate Plasma

Package Contents: 10 vials x 1 mL, lyophilized.

Ingredients: The reagent is human plasma, which has been immunodepleted to contain less than 1% Factor VIII activity. The plasma has been buffered and lyophilized to maximize stability.

WARNING: Potential Biohazard: The NoFACT VIII Deficient Plasma has been found negative when tested for Hepatitis B Antigen (HBsAg) and antibodies to HCV and HIV by FDA licensed tests; however, the deficient plasma should be handled with the same precautions as those observed when handling patient plasmas.

Preparation for Use: Reconstitute each vial of NoFACT VIII Deficient Plasma with 1.0 mL distilled water. Swirl gently; do not shake. Allow to stand for 20 minutes at room temperature to insure complete dissolution before use.

Storage and Stability: The lyophilized product is stable until the expiration date printed on the vial when stored at 2 to 8°C. The reconstituted product is stable for 8 hours when stored at 2 to 8°C and 4 hours when stored at RT (room temperature; 18-25°C).

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

Supplies available from r2 Diagnostic (or equivalent products from other manufacturers):

Phospholin ES, an APTT reagent
0.025 M Calcium Chloride
Imidizole Buffered Saline
Calibration plasma

Supplies not provided by r2 Diagnostics:

Semi-automated or automated coagulation analyzer
Normal and abnormal quality control plasmas approved for FVIII activity
Common clinical laboratory equipment and materials such as centrifuges, test tubes, pipettes, and distilled water.

TEST PROCEDURE

Contact r2 Diagnostics for instrument applications using APTT reagent to test for FVIII concentration.

Quality Control

Quality control of coagulation tests involves multiple components. Each laboratory should establish a quality control program that includes both normal and abnormal controls.

RESULTS

Results of a factor assay may be expressed in % activity or IU/mL. The analytical measurement range (linearity) is 1% - 160% FVIII activity.

LIMITATIONS

Hemolysis to 500 mg/dL hemoglobin, icterus to 20 mg/dL unconjugated bilirubin, and lipemia to 2000 mg/dL triglycerides cause less than a 10% shift in % FVIII recoveries using NoFACT VIII Deficient Plasma with Stago PTT-A on the Stago Compact. Unfractionated heparin, Low Molecular Weight Heparin, and direct thrombin inhibitors interfere with FVIII determinations. Lupus anticoagulants may also interfere (6).

The performance characteristics of NoFACT VIII Deficient Plasma were not evaluated for other coagulation analyzers and APTT reagent combinations or coagulation systems.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

The method comparison and analytical studies of NoFACT VIII Deficient Plasma were assessed using Diagnostica Stago STA Compact coagulation analyzers, Stago PTT Automate 5, and Stago STA Unicalibrator and controls.

Precision:

CLSI EP5-A2 (5) precision estimates of the Stago PTT-A Factor VIII assay using three lots of NoFACT VIII Deficient Plasma, as % CV of the recovered FVIII values, were:

Plasma	Mean FVIII activity, %	% CV, Within-run (S-r)	% CV, Lot-to-Lot (S-lot)	% CV, Within-Device (S-device)
System N (Normal Control Plasma) n = 240	91.6%	4.2%	0.63%	6.8%
System P (Abnormal Control Plasma) n = 240	33.3%	4.9%	3.8%	8.0%
Low FVIII pooled patient plasma n = 120	11.8%	5.7%	0.0%	8.5%

Correlation:

A total of two hundred and thirty-three frozen plasma samples from patients and donors were assessed in three laboratories in parallel with the Stago PTT-A FVIII assay using Stago VIII Deficient plasma and with the Stago PTT-A FVIII assay using NoFACT VIII Deficient Plasma. The regression statistics were:

	All Labs n= 233	Site 1 n = 90	Site 2 n = 90	Site 3 n = 53
Slope	0.845	0.861	0.914	0.831
Intercept	4.2	2.8	2.5	5.9
r^2	0.968	0.991	0.986	0.953
r	0.984	0.995	0.993	0.976

EXPECTED VALUES

Factor VIII activity reference range: 50% - 150% (7). The normal range can be affected by pre-analytical as well as analytical variables. Each laboratory should therefore determine the normal range for FVIII activity for its particular population, instrument / reagent system, and laboratory practice.

LITERATURE REFERENCES

1) Kaufman K, Antonarakis S, and Fay P, "Factor VIII and Hemophilia A", in Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice, 5th edition, editors Coleman R et al, Lippicott Williams and Wilkins, 2006.
2) Marques MB and Fritsma GA, Quick Guide to Coagulation Testing, AACC Press2006.
3) Laposata M, et. al., The Clinical Hemostasis Handbook, Year Book Medical Publishers, 1989.
4) H21-A5, Collection, Transport and Processing of Blood Samples for Testing Plasma-based Coagulation Assays and Molecular Hemostasis Assays; Approved Guideline-Fifth Edition, Clinical Laboratory Standards Institute, 2008.
5) EP5-A2, Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods; Approved Guideline-2nd Edition, Clinical Laboratory Standards Institute, 2004.
6) Brandt JT, et al, Effect of lupus anticoagulants on the activated partial thromboplastin time, Arch Pathol Lab Med 115: 109, 1991.
7) Kitchen, Olson, and Preston (ed), Quality in Laboratory Hemostasis and Thrombosis, 1st edition, Blackwell Publishing, 2009, page 90. ISBN 978-1-4051-6803-8.

VERSION FRANÇAISE

UTILISATION PRÉVUE

Le NoFACT VIII Deficient plasma est un plasma humain immuno-déplété en Facteur VIII et destiné à la détermination quantitative de l'activité du Facteur VIII dans le plasma citraté de patients soupçonnés de déficience en FVIII. L'activité du FVIII est basée sur le temps de céphaline activée. Pour usage diagnostique in vitro.

RÉSUMÉ ET PRINCIPE

Le Facteur VIII est une glycoprotéine zymogène d'environ 330 000 Daltons qui circule à une concentration de 300 pM (1). Lorsqu'il est converti en sa forme active, le Facteur VIIIa, il se complexe avec le FIX activé (FIXa) et accélère la conversion du FX en FXa.

Le Facteur VIII présente une activité diminuée dans une affection congénitale appelée Hémophilie A. Un déficit acquis en Facteur VIII peut survenir en cas de coagulation intravasculaire disséminée (CIVD) et chez les patients qui développent des inhibiteurs spécifiques du Facteur VIII.

Le dosage quantitatif du Facteur VIII de la coagulation humaine utilise une modification du test du temps de céphaline activée (TCA) ainsi que du plasma déficient en Facteur VIII (2, 3). Dans ce système, une dilution du plasma de test est mélangée à du plasma déficient en FVIII et le temps de coagulation d'un TCA déterminé pour le mélange. Dans ces conditions le temps de coagulation est inversement proportionnel à la concentration du FVIII dans le plasma de test (3).

PRÉLÈVEMENT ET PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

Réaliser le prélèvement, la manipulation et le stockage des échantillons conformément au document H21-A5 du CLSI, « Transport et traitement des échantillons de sang aux fins de test des dosages plasmatiques de la coagulation et des dosages de l'hémostase moléculaire » (4). Neuf parties de sang total fraîchement prélevé doivent être recueillies dans une partie d'anticoagulant, du citrate trisodique à 3,2 %. Les échantillons de plasma frais sont acceptables jusqu'à 4 heures après le prélèvement, tandis que les échantillons congelés sont acceptables jusqu'à deux semaines à -20 °C et jusqu'à six mois à -70 °C. Décongeler rapidement les échantillons congelés dans un bain-marie à 37 °C et mélanger doucement et soigneusement avant de tester.

RÉACTIFS

À usage diagnostique *in vitro* uniquement.

Substrat plasmatique déficient en Facteur VIII

Contenu de l'emballage : 10 flacons de 1 ml, lyophilisés.

Ingrédients : le réactif est du plasma humain, qui a été immuno-déplété pour contenir moins de 1 % d'activité en Facteur VIII. Le plasma a été tamponné et lyophilisé pour en maximiser la stabilité.

AVERTISSEMENT : Danger biologique potentiel : le NoFACT VIII Deficient plasma s'est avéré négatif lors de tests agréés par la FDA pour l'antigène de l'hépatite B (HBsAg) et les anticorps dirigés contre le VHC et le VIH ; cependant, le plasma déficient doit être manipulé avec les mêmes précautions que celles utilisées pour la manipulation des plasmas de patients.

Préparation à l'utilisation : reconstituer chaque flacon de NoFACT VIII Deficient Plasma avec 1,0 ml d'eau distillée. Agiter doucement ; ne pas secouer. Laisser reposer 20 minutes à température ambiante pour assurer la dissolution complète avant l'utilisation.

Conservation et stabilité : le produit lyophilisé est stable jusqu'à la date de péremption imprimée sur le flacon en cas de conservation entre 2 et 8 °C. Le produit reconstitué est stable pendant 8 heures en cas de conservation entre 2 et 8 °C, et pendant 4 heures en cas de conservation à température ambiante (18-25 °C).

MATÉRIEL REQUIS MAIS NON FOURNI

Fournitures disponibles auprès de r2 Diagnostic (ou produits équivalents chez d'autres fabricants) :

Phospholin ES, un réactif TCA
Chlorure de calcium 0,025 M
Solution tampon d'imidazole
Plasma étalon

Fournitures non proposées par r2 Diagnostics :

Analyseur de coagulation semi-automatique ou automatique
Plasma normal et anormal, pour le contrôle de la qualité, approuvé pour l'activité du FVIII
Équipement et matériel courant de laboratoire clinique comme centrifugeuses, tubes à essai, pipettes et eau distillée.

PROCÉDURE DE TEST

Contactez r2 Diagnostics afin de connaître les applications pour instruments utilisant un réactif TCA pour tester la concentration en FVIII.

Contrôle de la qualité

Le contrôle de la qualité des tests de coagulation implique plusieurs éléments. Chaque laboratoire doit établir un programme de contrôle de la qualité qui inclut des contrôles normaux et anormaux.

RÉSULTATS

Les résultats d'un dosage de facteur peuvent être exprimés en % d'activité ou en UI/ml. La plage de mesure analytique (linéarité) est 1 % - 160 % d'activité FVIII.

LIMITES

Hémolyse à 500 mg/dl d'hémoglobine, ictère à 20 mg/dl de bilirubine non conjuguée, et lipidémie à 2 000 mg/dl de triglycérides causent une variation inférieure à 10 % du pourcentage de récupération du FVIII en utilisant NoFACT VIII Deficient Plasma avec Stago PTT-A sur le Stago Compact. L'héparine non fractionnée, l'héparine de faible poids moléculaire et les inhibiteurs directs de la thrombine interfèrent avec les déterminations du FVIII. Les anticoagulants lupiques peuvent également interférer (6).

Les caractéristiques de performances de NoFACT VIII Deficient Plasma n'ont pas été évaluées pour d'autres analyseurs de la coagulation, combinaisons de réactifs TCA ou systèmes de coagulation.

CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCES

La comparaison des méthodes et les études analytiques de NoFACT VIII Deficient Plasma ont été évaluées par des contrôles et analyseurs de coagulation Diagnostica Stago STA Compact, Stago PTT Automate 5 et Stago STA Unicalibrator.

Précision :

Les estimations de précision CLSI EP5-A2 (5) du dosage Stago PTT-A du Facteur VIII en utilisant trois lots de NoFACT VIII Deficient Plasma, en % de CV des valeurs récupérées de FVIII, étaient:

Plasma	Activité FVIII moyenne, %	CV %, dans l'analyse (S-r)	CV %, de lot à lot (S-lot)	CV %, dans l'appareil (S-device)
Système N (Plasma de contrôle normal) n = 240	91,6 %	4,2 %	0,63 %	6,8 %
Système P (Plasma de contrôle anormal) n = 240	33,3 %	4,9 %	3,8 %	8,0 %
Pool de plasmas de patients à faible FVIII n = 120	11,8 %	5,7 %	0,0 %	8,5 %

Corrélation :

Au total, deux cent trente-trois échantillons de plasma congelé de patients et donneurs ont été évalués dans trois laboratoires en parallèle avec le dosage Stago PTT-A FVIII en utilisant du plasma déficient Stago VIII et le dosage Stago PTT-A FVIII en utilisant du NoFACT VIII Deficient plasma. Les statistiques de régression étaient :

	Tous les laboratoires n = 233	Site 1 n = 90	Site 2 n = 90	Site 3 n = 53
Pente	0,845	0,861	0,914	0,831
Ordonnée	4,2	2,8	2,5	5,9
r^2	0,968	0,991	0,986	0,953
r	0,984	0,995	0,993	0,976

VALEURS ESCOMPTÉES

Plage de référence de l'activité du Facteur VIII : 50 % - 150 % (7). La plage normale peut être affectée par des variables pré-analytiques et analytiques. Ainsi, chaque laboratoire doit déterminer la plage normale de l'activité du FVIII selon sa population, son instrument / système de réactifs, et ses pratiques de laboratoire particulières.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1) Kaufman K, Antonarakis S, and Fay P, "Factor VIII and Hemophilia A", in Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice, 5th edition, editors Coleman R et al, Lippicott Williams and Wilkins, 2006.
2) Marques MB and Fritsma GA, Quick Guide to Coagulation Testing, AACC Press2006.
3) Laposata M, et. al., The Clinical Hemostasis Handbook, Year Book Medical Publishers, 1989.
4) H21-A5, Collection, Transport and Processing of Blood Samples for Testing Plasma-based Coagulation Assays and Molecular Hemostasis Assays; Approved Guideline-Fifth Edition, Clinical Laboratory Standards Institute, 2008.
5) EP5-A2, Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods; Approved Guideline-2nd Edition, Clinical Laboratory Standards Institute, 2004.
6) Brandt JT, et al, Effect of lupus anticoagulants on the activated partial thromboplastin time, Arch Pathol Lab Med 115: 109, 1991.
7) Kitchen, Olson, and Preston (ed), Quality in Laboratory Hemostasis and Thrombosis, 1st edition, Blackwell Publishing, 2009, page 90. ISBN 978-1-4051-6803-8.

DEUTSCHE VERSION

VERWENDUNGSZWECK

NoFACT VIII Deficient Plasma ist ein humanes Plasma, das hinsichtlich Factor VIII immundepletiert ist. Es ist für die quantitative Bestimmung der Factor VIII-Aktivität in Plasma, das durch Zitration von Patienten, bei denen der Verdacht einer FVIII-Defizienz besteht, gewonnen wurde, vorgesehen. Die FVIII-Aktivität basiert auf der aktivierten partiellen Thromboplastinzeit. Für die professionelle In-vitro-Diagnostik.

ZUSAMMENFASSUNG UND PRINZIP

Factor VIII ist ein Glykoprotein-Zymogen von ca. 330.000 Dalton, das in einer Konzentration von 300 pM zirkuliert (1). Bei Umwandlung in seine aktive Form Factor VIIIa bildet es einen Komplex mit aktiviertem FIX (FIXa) und beschleunigt die Umwandlung von FX zu FXa.

Factor VIII weist in einer angeborenen Krankheit, die als Hämophilie A bezeichnet wird, eine verringerte Aktivität auf. Eine erworbene Factor VIII-Defizienz kann bei disseminierter intravaskulärer Koagulation (DIC) sowie bei Patienten, die bestimmte Factor VIII-Hemmer entwickeln, auftreten.

Der quantitative gerinnungsbasierte Assay auf Factor VIII verwendet einen modifizierten Test der aktivierten partiellen Thromboplastinzeit (APTT) und das Factor VIII-defiziente Plasma (2, 3). In diesem System wird eine Verdünnung des Testplasmas mit einem FVIII-defizienten Plasma vermischt und die Gerinnungszeit einer APTT für diese Mischung bestimmt. Unter diesen Bedingungen ist die Gerinnungszeit umgekehrt proportional zu der Konzentration von FVIII im Testplasma (3).

PROBENENTNAHME UND -VORBEREITUNG

Führen Sie die Entnahme, Hantierung und Lagerung gemäß CLSI-Dokument H21-A5 „Transport and Processing of Blood Samples for Testing Plasma-based Coagulation Assays and Molecular Hemostasis Assays“ (Transport und Verarbeitung von Blutproben zum Test von plasmabasierten Gerinnungs-Assays und molekularen Hämostase-Assays) (4) durch. Neun Teile von frisch entnommenem Blut werden einem Teil von 3,2%igem Trinatriumcitrat-Antikoagulans zugefügt. Frische Plasmaproben bis zu 4 Stunden nach Entnahme sowie gefrorene Proben, die bis zu zwei Wochen bei -20 °C und bis zu sechs Monate bei -70 °C aufbewahrt wurden, sind akzeptabel. Gefrorene Proben schnell in 37 °C warmem Wasserbad auftauen und vor dem Test vorsichtig und sorgfältig vermischen.

REAGENZIEN

Nur zur *In-vitro*-Diagnostik

Factor VIII-defizientes Substratplasma

Packungsinhalt: 10 Fläschchen x 1 mL, lyophilisiert.

Inhaltsstoffe: Das Reagenz ist humanes Plasma, das derart immundepletiert wurde, dass es eine Factor VIII-Aktivität von weniger als 1 % aufweist. Für maximale Stabilität wurde das Plasma gepuffert und lyophilisiert.

WARNHINWEIS: Potenzielle Biogefährdung: Das NoFACT VIII Deficient Plasma erwies sich beim Test auf Hepatitis B-Antigen (HBsAg) und Antikörper gegen HCV und HIV mittels von der FDA lizenzierten Tests als negativ; das defiziente Plasma sollte jedoch trotzdem unter Anwendung der gleichen Vorsichtsmaßnahmen wie beim Umgang mit Patientenplasmen behandelt werden.

Vorbereitung für die Verwendung: Jedes Fläschchen mit NoFACT VIII Deficient Plasma mit 1,0 mL destilliertem Wasser rekonstituieren. Vorsichtig schwenken; nicht schütteln. 20 Minuten bei Raumtemperatur stehen lassen, um vollständiges Auflösen vor der Verwendung sicherzustellen.

Lagerung und Stabilität: Das lyophilisierte Produkt ist bei Lagerung bei 2 bis 8 °C bis zum Verfallsdatum, das auf dem Fläschchen aufgedruckt ist, stabil. Das rekonstituierte Produkt ist bei Lagerung bei 2 bis 8 °C 8 Stunden lang und bei Lagerung bei RT (Raumtemperatur ; 18-25 °C) 4 Stunden lang stabil.

ERFORDERLICHE, NICHT IM LIEFERUMFANG ENTHALTENE MATERIALIEN

Hilfsstoffe sind von r2 Diagnostic (bzw. gleichwertige Produkte von anderen Herstellern) erhältlich:

Phospholin ES, ein APTT-Reagenz
0,025 M Calciumchlorid
Imidazol-gepufferte Kochsalzlösung
Kalibrationsplasma

Nicht von r2 Diagnostics gelieferte Hilfsstoffe:

Semi-automatisches oder automatisches Gerinnungsmessgerät
Normale und abnormale, für FVIII-Aktivität genehmigte Qualitätskontrollplasmen
Gängige klinische Laborausrüstung und -materialien, wie Zentrifugen, Reagenzröhrchen, Pipetten und destilliertes Wasser.

TESTDURCHFÜHRUNG

Wenden Sie sich zwecks Instrumentenanwendungen mittels APTT-Reagenzien zum Testen der FVIII-Konzentration bitte an r2 Diagnostics.

Qualitätskontrolle

Die Qualitätskontrolle von Gerinnungstests umfasst mehrere Komponenten. Jedes Labor sollte ein Qualitätskontrollprogramm festlegen, das sowohl normale als auch abnormale Kontrollen umfasst.

ERGEBNISSE

Ergebnisse eines Factor-Assays können in % Aktivität oder in IU/mL angegeben werden. Der analytische Messbereich (Linearität) beträgt 1 % - 160 % FVIII-Aktivität.

BEGRENZUNGEN

Hämolyse bis 500 mg/dL Hämoglobin, Ikterus bis 20 mg/dL unkonjugiertes Bilirubin und Lipämie bis 2000 mg/dL Triglyceride verursachen Veränderungen von weniger als 10 % bei Rückgewinnungen von FVIII unter Verwendung von NoFACT VIII Deficient Plasma mit Stago PTT-A auf dem Stago Compact. Unfraktioniertes Heparin, niedermolekulares Heparin sowie direkte Thrombinhemmer haben einen störenden Einfluss auf FVIII-Bestimmungen. Lupusantikoagulanzien können sich ebenfalls störend auswirken (6).

Die Leistungsdaten von NoFACT VIII Deficient Plasma wurden nicht im Hinblick auf andere Gerinnungsmessgeräte und APTT-Reagenzienkombinationen oder -gerinnungssysteme geprüft.

LEISTUNGSDATEN

Methodenvergleichs- und Analysestudien von NoFACT VIII Deficient Plasma wurden mit Diagnostica Stago STA Compact-Gerinnungsmessgeräten, Stago PTT Automate 5 sowie Stago STA Unicalibrator und mittels Kontrollen durchgeführt.

Präzision:

Schätzungen der CLSI EP5-A2 (5)-Präzision des Stago PTT-A Factor VIII-Assay unter Verwendung von drei Chargen von NoFACT VIII Deficient Plasma in % CV der rückgewonnenen FVIII-Werte betrugen:

Plasma	Mittlere FVIII-Aktivität, %	% CV, Innerhalb eines Laufs (S-r)	% CV, Charge-zu-Charge (S-Charge)	% CV, Innerhalb eines Geräts (S-Geräts)
System N (normales Kontrollplasma) n = 240	91,6 %	4,2 %	0,63 %	6,8 %
System P (abnormales Kontrollplasma) n = 240	33,3 %	4,9 %	3,8 %	8,0 %
Gepooltes Patientenplasma mit niedrigem FVIII n = 120	11,8 %	5,7 %	0,0 %	8,5 %

Korrelation:

Es wurden insgesamt zweihundertdreiunddreißig gefrorene Plasmaproben von Patienten und Spendern parallel bei drei Laboren mit dem Stago PTT-A FVIII-Assay unter Verwendung von Stago VIII Deficient Plasma und mit dem Stago PTT-A FVIII-Assay unter Verwendung von NoFACT VIII Deficient Plasma getestet. Die Regressionsstatistiken fielen wie folgt aus:

	Alle Labore n = 233	Zentrum 1 n = 90	Zentrum 2 n = 90	Zentrum 3 n = 53
Steigung	0,845	0,861	0,914	0,831
Achsenabschnit	4,2	2,8	2,5	5,9
r^2	0,968	0,991	0,986	0,953
r	0,984	0,995	0,993	0,976

ERWARTETE WERTE

Referenzbereich für Factor VIII-Aktivität: 50 % - 150 % (7). Der Normalbereich kann von Variablen vor sowie während der Analyse beeinflusst werden. Jedes Labor sollte aus diesem Grund den Normbereich für die FVIII-Aktivität für seine jeweilige Population, sein Instrumenten-/Reagenzsystem und seine Laborpraxis bestimmen.

LITERATURHINWEISE

1) Kaufman K, Antonarakis S, and Fay P, „Factor VIII and Hemophilia A“, in Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice, 5th edition, editors Coleman R et al, Lippicott Williams and Wilkins, 2006.
2) Marques MB and Fritsma GA, Quick Guide to Coagulation Testing, AACC Press2006.
3) Laposata M, et. al., The Clinical Hemostasis Handbook, Year Book Medical Publishers, 1989.
4) H21-A5, Collection, Transport and Processing of Blood Samples for Testing Plasma-based Coagulation Assays and Molecular Hemostasis Assays; Approved Guideline-Fifth Edition, Clinical Laboratory Standards Institute, 2008.
5) EP5-A2, Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods; Approved Guideline-2nd Edition, Clinical Laboratory Standards Institute, 2004.
6) Brandt JT, et al, Effect of lupus anticoagulants on the activated partial thromboplastin time, Arch Pathol Lab Med 115: 109, 1991.

7) Kitchen, Olson, and Preston (ed), Quality in Laboratory Hemostasis and Thrombosis, 1st edition, Blackwell Publishing, 2009, page 90. ISBN 978-1-4051-6803-8.

VERSIONE ITALIANA

USO PREVISTO

NoFACT VIII Deficient Plasma è un plasma umano sottoposto a immunodeplezione del Fattore VIII, indicato per la determinazione quantitativa dell'attività del Fattore VIII nel plasma citrato di pazienti con sospetta carenza di FVIII. L'attività FVIII si basa sul tempo di tromboplastina parziale attivata. Per uso diagnostico in vitro.

RIEPILOGO E PRINCIPIO

Factor VIII è una glicoproteina zimogeno di circa 330.000 Dalton che circola a una concentrazione di 300 pM (1). Quando convertito nella forma attiva, Factor VIIIa, forma un complesso con FIX attivato (FIXa) e accelera la conversione di FX in FXa.

Factor VIII ha diminuito l'attività in una condizione congenita nota come Emofilia A. Uno stato di carenza di Factor VIII acquisito può verificarsi nella coagulazione intravascolare disseminata (CID) e nei pazienti che sviluppano specifici inibitori di Factor VIII.

Il dosaggio quantitativo basato sulla coagulazione per Factor VIII utilizza una modifica del test del tempo di tromboplastina parziale attivata (APTT) e plasma con carenza di Factor VIII (2, 3). In questo sistema, una diluizione del plasma del test viene miscelata a plasma con carenza di FVIII e viene determinato il tempo di coagulazione di un APTT per la miscela. In queste condizioni il tempo di coagulazione è inversamente proporzionale alla concentrazione di FVIII nel plasma del test (3).

RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Procedere alla raccolta, lavorazione e conservazione dei campioni secondo quanto previsto dal documento CLSI H21-A5 "Transport and Processing of Blood Samples for Testing Plasma-based Coagulation Assays and Molecular Hemostasis Assays" (Trasporto e lavorazione di campioni di sangue per dosaggi dei test di coagulazione basati su plasma e dosaggi per l'emostasi molecolare) (4). Nove parti di sangue intero appena prelevato devono essere raccolte in una parte di citrato di trisodio anticoagulante al 3,2%. Sono accettabili campioni di plasma freschi fino a 4 ore dal prelievo e campioni congelati conservati fino a due settimane a -20 °C e fino a sei mesi a -70 °C. Scongelare rapidamente i campioni congelati a bagnomaria a 37 °C, quindi miscelare delicatamente ma completamente prima di eseguire il test.

REAGENTI

Solo per uso diagnostico *in-vitro*.

Plasma substrato con carenza di Factor VIII

Contenuto della confezione: 10 fiale da 1 ml, liofilizzato.

Ingredienti: il reagente è plasma umano sottoposto a immunodeplezione in modo da contenere meno dell'1% di attività del Factor VIII. Il plasma è stato tamponato e liofilizzato per aumentare al massimo la stabilità.

AVVERTENZA: Potenziale rischio biologico: NoFACT VIII Deficient Plasma è risultato negativo quando sottoposto a test per l'antigene dell'epatite B (HBsAg) e per gli anticorpi a HCV e HIV tramite l'uso di test autorizzati dalla FDA; tuttavia, il plasma carente deve essere manipolato adottando le stesse precauzioni osservate per il trattamento del plasma di pazienti.

Preparazione per l'uso: Ricostituire ogni fiala di NoFACT VIII Deficient Plasma con 1,0 ml di acqua distillata. Roteare delicatamente senza agitare. Attendere 20 minuti a temperatura ambiente per garantire la completa dissoluzione prima dell'uso.

Conservazione e stabilità: Il prodotto liofilizzato è stabile fino alla data di scadenza stampata sulla fiala se conservato ad una temperatura compresa tra 2 e 8 °C. Il prodotto ricostituito è stabile per 8 ore se conservato a 2-8 °C e per 4 ore se conservato a temperatura ambiente (18-25 °C).

MATERIALI RICHIESTI MA NON FORNITI

Materiali disponibili presso r2 Diagnostic (o prodotti equivalenti di altre marche):
Phospholin ES, reagente APTT
Cloruro di calcio 0,025 M
Soluzione salina tamponata con imidizolo
Plasma di calibratura
Materiali non forniti da r2 Diagnostics:
Analizzatore di coagulazione semi-automatico o automatico
Plasma di controllo qualità normale e anormale approvati per l'attività FVIII
Normale attrezzatura e materiale da laboratorio clinico, come centrifughe, provette, pipette e acqua distillata.

PROCEDURA DEL TEST

Contattare r2 Diagnostics per applicazioni di strumenti usando il reagente APTT per testare la concentrazione di FVIII.

Controllo di qualità

Il controllo di qualità per i test di coagulazione comprende diversi componenti. Ogni laboratorio deve stabilire un programma di controllo qualità composto da controlli sia normali che anormali.

RISULTATI

I risultati di un dosaggio del fattore possono essere espressi in attività % o IU/ml. L'intervallo di misurazione analitica (linearità) è l'attività di FVIII a 1% - 160%.

LIMITAZIONI

Emolisi da emoglobina 500 mg/dL, ittero da bilirubina non coniugata 20 mg/dL e lipemia da trigliceridi 2000 mg/dL provocano meno del 10% di scostamenti nei recuperi % FVIII usando NoFACT VIII Deficient Plasma con Stago PTT-A su Stago Compact. L'eparina non frazionata, l'eparina a basso peso molecolare e gli inibitori diretti della trombina interferiscono con le determinazioni di FVIII. L'interferenza può giungere anche dagli anticoagulanti lupici (6).

Le caratteristiche prestazionali di NoFACT VIII Deficient Plasma non sono state valutate per altri analizzatori di coagulazione e combinazioni di reagenti APTT o sistemi di coagulazione.

CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI

Il confronto tra i metodi e gli studi analitici del NoFACT VIII Deficient Plasma sono stati valutati usando gli analizzatori di coagulazione Diagnostica Stago STA Compact, Stago PTT Automate 5 e Stago STA Unicalibrator e controlli.

Precisione:

La stime di precisione CLSI EP5-A2 (5) del dosaggio Stago PTT-A Factor VIII usando tre lotti di NoFACT VIII Deficient Plasma, come % CV dei valori FVIII recuperati, sono state:

Plasma	Attività media FVIII, %	% CV, intra-analisi (S-r)	% CV, da lotto a lotto (S-lot)	% CV, tra dispositivi (S-device)
Sistema N (plasma di controllo normale) n = 240	91,6%	4,2%	0,63%	6,8%
Sistema P (plasma di controllo anormale) n = 240	33,3%	4,9%	3,8%	8,0%
Plasma paziente in pool con FVIII basso n = 120	11,8%	5,7%	0,0%	8,5%

Correlazione:

Un totale di duecentotrentatré campioni di plasma congelato provenienti da pazienti e donatori sono stati valutati in tre laboratori in parallelo con il dosaggio Stago PTT-A FVIII usando Stago VIII Deficient plasma e con il dosaggio Stago PTT-A FVIII usando NoFACT VIII Deficient Plasma. La statistica di regressione è la seguente:

	Tutti i lab. n = 233	Centro 1 n = 90	Centro 2 n = 90	Centro 3 n = 53
Pendenza	0,845	0,861	0,914	0,831
Intercetta	4,2	2,8	2,5	5,9
r^2	0,968	0,991	0,986	0,953
r	0,984	0,995	0,993	0,976

VALORI PREVISTI

Intervallo di riferimento dell'attività di Factor VIII: 50% - 150% (7). L'intervallo normale può essere influenzato dalle variabili pre-analitiche e analitiche. Ogni laboratorio deve pertanto determinare l'intervallo normale per l'attività FVIII in relazione alla popolazione specifica, al sistema strumento/reagente e alla pratica di laboratorio.

BIBLIOGRAFIA

1) Kaufman K, Antonarakis S, and Fay P, "Factor VIII and Hemophilia A", in Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice, 5th edition, editors Coleman R et al, Lippicott Williams and Wilkins, 2006.
2) Marques MB and Fritsma GA, Quick Guide to Coagulation Testing, AACC Press2006.
3) Laposata M, et. al., The Clinical Hemostasis Handbook, Year Book Medical Publishers, 1989.
4) H21-A5, Collection, Transport and Processing of Blood Samples for Testing Plasma-based Coagulation Assays and Molecular Hemostasis Assays; Approved Guideline-Fifth Edition, Clinical Laboratory Standards Institute, 2008.
5) EP5-A2, Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods; Approved Guideline-2nd Edition, Clinical Laboratory Standards Institute, 2004.
6) Brandt JT, et al, Effect of lupus anticoagulants on the activated partial thromboplastin time, Arch Pathol Lab Med 115: 109, 1991.
7) Kitchen, Olson, and Preston (ed), Quality in Laboratory Hemostasis and Thrombosis, 1st edition, Blackwell Publishing, 2009, page 90. ISBN 978-1-4051-6803-8.

VERSIÓN ESPAÑOLA

USO PREVISTO

NoFACT VIII Deficient Plasma es plasma humano inmunodepletado del Factor VIII previsto para su uso para la determinación cuantitativa de la actividad del Factor VIII en plasma citratado de pacientes en quienes se sospeche deficiencia de FVIII. La actividad de FVIII se basa en el tiempo de tromboplastina parcial activada. Para uso diagnóstico in vitro.

RESUMEN Y PRINCIPIO

Factor VIII es una glucoproteína zimógeno de aproximadamente 330 000 dalton que circula con una concentración de 300 pM (1). Cuando se convierte a su forma activa, el Factor VIIIa, forma un complejo con el FIX (FIXa) activado y acelera la conversión de FX a FXa.

El Factor VIII tiene una menor actividad en una enfermedad congénita denominada hemofilia A. Se puede producir un estado de deficiencia del Factor VIII adquirida en pacientes con coagulación intravascular diseminada (CID) y en aquellos que hayan desarrollado inhibidores específicos del Factor VIII.

El ensayo de coagulación cuantitativa para el Factor VIII utiliza una modificación de la prueba de tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPa) y de plasma deficiente de Factor VIII (2, 3). En este sistema, se mezcla una dilución del plasma de prueba con un plasma deficiente de FVIII, y se determina el tiempo de coagulación de un TTPa para la mezcla. Con estas condiciones, el tiempo de coagulación es inversamente proporcional a la concentración de FVIII en el plasma de prueba (3).

EXTRACCIÓN Y PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Realice la recogida, manipulación y almacenamiento de las muestras conforme al documento del CLSI H21-A5 "Transport and Processing of Blood Samples for Testing Plasma-based Coagulation Assays and Molecular Hemostasis Assays" (Transporte y procesamiento de muestras de sangre para pruebas de ensayos de coagulación con plasma y ensayos de hemostasia molecular) (4). Se deben recoger nueve partes de sangre completa recién extraída en una parte de anticoagulante de citrato de sodio al 3,2 %. Es aceptable usar muestras de plasma fresco hasta 4 horas después de la recogida y muestras congeladas almacenadas hasta dos semanas a –20 °C y hasta seis meses a –70 °C. Descongele las muestras congeladas rápidamente en un baño de agua a 37 °C y mézclelas suave y completamente antes de la prueba.

REACTIVOS

Para uso exclusivo en diagnóstico *in vitro*.

Plasma sustrato deficiente en Factor VIII

Contenido del paquete: 10 viales de 1 ml, liofilizados.

Ingredientes: El reactivo es plasma humano, que ha sido inmunodepletado para contener menos de un 1 % de actividad de Factor VIII. El plasma se ha tamponado y liofilizado para maximizar la estabilidad.

ADVERTENCIA: Posible riesgo biológico: Se ha descubierto que NoFACT VIII Deficient Plasma resulta negativo para el antígeno de la hepatitis B (HBsAg) y para los anticuerpos del VHC y el VIH en las pruebas autorizadas por la Administración de Drogas y Alimentos de EE. UU. (FDA); sin embargo, el plasma deficiente se debe manipular con la misma precaución que el plasma de pacientes.

Preparación para el uso: Reconstituya cada vial de NoFACT VIII Deficient Plasma con 1,0 ml de agua destilada. Remuévalo con cuidado; no lo agite. Déjelo reposar durante 20 minutos a temperatura ambiente para garantizar una disolución completa antes del uso.

Almacenamiento y estabilidad: El producto liofilizado es estable hasta la fecha de caducidad impresa en el vial si se almacena entre 2 y 8 °C. El producto reconstituido es estable durante 8 horas cuando se almacena entre 2 y 8 °C, y durante 4 horas cuando se almacena a temperatura ambiente (18-25 °C).

MATERIALES NECESARIOS PERO NO PROPORCIONADOS

Suministros disponibles a través de r2 Diagnostics (o productos equivalentes de otros fabricantes):
Phospholin ES, un reactivo de TTPa
0,025 M de cloruro de calcio
Solución salina tamponada con imidazol
Plasma de calibración
Suministros no proporcionados por r2 Diagnostics:
Analizador de coagulación semiautomático o automático
Plasmas de control de calidad normal y anormal aprobados para actividad de FVIII
Equipo y materiales de laboratorio clínico habituales, como centrífugas, tubos de ensayo, pipetas y agua destilada.

PROCEDIMIENTO DE PRUEBA

Póngase en contacto con r2 Diagnostics para conocer aplicaciones de instrumentos que utilicen reactivo de TTPa para probar la concentración de FVIII.

Control de calidad

Las pruebas de control de calidad de la coagulación implican distintos componentes. Cada laboratorio debe establecer un programa de control de calidad que incluya controles tanto normales como anormales.

RESULTADOS

Los resultados de un ensayo de factor se pueden expresar en porcentaje de actividad o en UI/ml. El intervalo de medición analítica (linealidad) es 1 %-160 % de actividad de FVIII.

LIMITACIONES

La hemólisis con 500 mg/dl de hemoglobina, la ictericia con 20 mg/dl de bilirrubina no conjugada y la lipemia con 2000 mg/dl de triglicéridos provocan un desplazamiento inferior al 10 % en porcentaje de recuperaciones de FVIII empleando NoFACT VIII Deficient Plasma con Stago PTT-A en Stago Compact. La heparina no fraccionada, la heparina de bajo peso molecular y los inhibidores directos de la trombina interfieren con las determinaciones de FVIII. Los anticoagulantes lúpicos también pueden interferir (6).

Las características de rendimiento de NoFACT VIII Deficient Plasma no se han valorado para otros analizadores de coagulación y combinaciones de reactivos de TTPa o sistemas de coagulación.

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

La comparación del método y los estudios analíticos de NoFACT VIII Deficient Plasma fueron evaluados utilizando analizadores de coagulación Diagnostica Stago STA Compact, Stago PTT Automate 5, y Stago STA Unicalibrator y controles.

Precisión:

Las estimaciones de precisión de EP5-A2 del CLSI (5) para el ensayo de Factor VIII Stago PTT-A utilizando tres lotes de NoFACT VIII Deficient Plasma como porcentaje del CV de los valores de FVIII recuperados fueron:

Plasma	Actividad media de FVIII, %	% CV, intraserie (S-r)	% CV, entre lotes (S-lot)	% CV, intradispositivo (S-device)
Sistema N (plasma de control normal) n = 240	91,6 %	4,2 %	0,63 %	6,8 %
Sistema P (plasma de control anormal) n = 240	33,3 %	4,9 %	3,8 %	8,0 %
Plasma de pacientes agrupado con FVIII bajo n = 120	11,8 %	5,7 %	0,0 %	8,5 %

Correlación:

Se analizaron un total de doscientas treinta y tres muestras de plasma congelado de pacientes y donantes en tres laboratorios en paralelo con el ensayo Stago PTT-A FVIII utilizando Stago VIII Deficient plasma y con el ensayo Stago PTT-A FVIII utilizando NoFACT VIII Deficient Plasma. Los análisis de regresión fueron:

	Todos los laboratorios n = 233	Centro 1 n = 90	Centro 2 n = 90	Centro 3 n = 53
Pendiente	0,845	0,861	0,914	0,831
Ordenada en el origen	4,2	2,8	2,5	5,9
r^2	0,968	0,991	0,986	0,953
r	0,984	0,995	0,993	0,976

VALORES ESPERADOS

Intervalo de referencia de la actividad de Factor VIII: 50 %-150 % (7). El intervalo normal se puede ver afectado por las variables preanalíticas y también por las analíticas. Por lo tanto, cada laboratorio debe determinar el intervalo normal de la actividad de FVIII para su población, instrumento / sistema de reactivos y práctica de laboratorio concretos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1) Kaufman K, Antonarakis S, and Fay P, "Factor VIII and Hemophilia A", in Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice, 5th edition, editors Coleman R et al, Lippicott Williams and Wilkins, 2006.
2) Marques MB and Fritsma GA, Quick Guide to Coagulation Testing, AACC Press2006.
3) Laposata M, et. al., The Clinical Hemostasis Handbook, Year Book Medical Publishers, 1989.
4) H21-A5, Collection, Transport and Processing of Blood Samples for Testing Plasma-based Coagulation Assays and Molecular Hemostasis Assays; Approved Guideline-Fifth Edition, Clinical Laboratory Standards Institute, 2008.
5) EP5-A2, Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods; Approved Guideline-2nd Edition, Clinical Laboratory Standards Institute, 2004.
6) Brandt JT, et al, Effect of lupus anticoagulants on the activated partial thromboplastin time, Arch Pathol Lab Med 115: 109, 1991.

7) Kitchen, Olson, and Preston (ed), Quality in Laboratory Hemostasis and Thrombosis, 1st edition, Blackwell Publishing, 2009, page 90. ISBN 978-1-4051-6803-8.