

REPRESENTATIVE INSTRUCTIONS FOR USE

VisuLize™ FVIII Antigen Kit

96 Test Enzyme Immunoassay Kit for Factor VIII (FVIII) antigen.

For *In Vitro* Diagnostic Use.

Product # FVIII-AG



Store at 2–8°C. Do not freeze.

INTENDED USE

The VisuLize™ FVIII Antigen kit is an Enzyme Immunoassay for the quantitative determination of Factor VIII antigen in human plasma samples and Factor VIII concentrates using the double antibody enzyme linked immuno-sorbent assay (ELISA).

SUMMARY

Factor VIII (formerly referred to as antihaemophilic globulin and Factor VIII:C) is a large glycoprotein with a molecular weight of 320000 daltons that circulates in plasma at a concentration of approximately 200 ng/mL.^{1,2} FVIII is stabilized by association with von Willebrand Factor to form a FVIII-vWF complex required for the normal survival of FVIII in vivo ($t_{1/2}$ of 8-12 hours).³ FVIII is a pro-cofactor that is activated through limited proteolysis by thrombin. In this process FVIIIa dissociates from vWF to combine with activated Factor IX, calcium and a phospholipid surface where it is an essential cofactor in the assembly of the Factor X activator complex.^{4,5} Once dissociated from vWF, FVIIIa is susceptible to inactivation by activated Protein C and by non-enzymatic decay.⁴

The biological importance of Factor VIII is demonstrated in Hemophilia A, a congenital bleeding disorder occurring primarily in males that results from an X-chromosome-linked deficiency of FVIII.⁶ The prevalence of Hemophilia A has been estimated to be between 1/5000 and 1/10000.⁶ The severity of the deficiency generally correlates with the severity of the disease. Individuals with <1% Factor VIII activity are classified as severe patients, those with between 1 and 5% Factor VIII activity are classified as moderate and those with between 5 and 40% Factor VIII activity are classified as mild hemophiliacs.⁷ Some Hemophiliacs produce a FVIII protein that is partially or totally inactive. In these cases, the Factor VIII activity is low but the antigen levels are normal or near normal. These patients, comprising approximately 5% of Hemophilia A patients, are termed cross-reacting material (CRM)-positive.⁸ The production of neutralizing antibodies to FVIII also occurs in 5-20% of Hemophiliacs.^{9,10}

The laboratory diagnosis of Factor VIII deficiency typically involves quantitative determinations based on procoagulant levels (functional activity of Factor VIII typically measured by clotting assay). Clinical bleeding symptoms may also be used in the diagnosis and classification, however, the quantitative procoagulant measurement is the preferred method of classifying the severity of hemophilia.⁷ An ELISA for Factor VIII antigen may be used in conjunction with the functional assays in the assessment of Factor VIII replacement therapies, assessment of carrier status as well as to distinguish those patients that may be deemed CRM-Positive.

PRINCIPLE OF ENZYME IMMUNOASSAY

Strip wells are pre-coated with sheep polyclonal antibody to human FVIII. Plasma samples are diluted and applied to the wells. The FVIII antigen present binds to the coated antibody. After washing away unbound material, peroxidase-labeled sheep detecting antibody is applied and allowed to bind to the captured FVIII. The wells are again washed and a solution of TMB (the peroxidase substrate tetramethylbenzidine) is applied and allowed to react for a fixed period of time. A blue color develops which changes to yellow upon quenching the reaction with acid. The color formed is measured spectrophotometrically in a microplate reader at 450 nm. The absorbance at 450 nm is directly proportional to the quantity of FVIII antigen captured

onto the well. The assay is calibrated using the calibrator plasma provided in the kit.

REAGENTS

A. Description of Reagent Items

- Item 1:** Foil pouch containing 6 strips, each containing 16 wells coated with sheep antibody to human FVIII.
- Item 2:** 2 vials of Calibrator Plasma, each lyophilized from 1 mL plasma.
- Item 3:** 2 vials of Control Plasma A, each lyophilized from 1 mL plasma.
- Item 4:** 2 vials of Control Plasma B, each lyophilized from 1 mL plasma.
- Item 5:** 1 vial containing 50 mL of 20X Wash Buffer Concentrate.
- Item 6:** 3 vials, each containing 20 mL of buffered Sample Diluent.
- Item 7:** 1 vial containing 12 mL peroxidase-labeled sheep detecting antibody.
- Item 8:** 1 vial containing 12 mL of tetramethylbenzidine (TMB) substrate.
- Item 9:** 1 vial containing 12 mL Stop Solution (0.2 M Sulphuric acid).

B. Caution and Warning

This kit is intended for use by personnel trained in laboratory procedures and universal precautions for the use of chemicals and potentially biohazardous substances. Some items contain human source material. Each unit of source plasma used in the preparation of this product has been tested by FDA approved methods and found negative for HBsAg, syphilis and antibodies to HIV and HCV and non-reactive for HIV-1 rNA and HCV rNA. However, no test can offer complete assurance that products derived from human blood will not transmit infectious diseases. As with all materials of human origin, this product should be handled as a potentially infectious material.

The substrate TMB (tetramethylbenzidine) has reduced toxicity, but precautions should still be taken to avoid direct contact. The use of gloves and safety glasses is recommended. The Stop Solution contains dilute sulphuric acid (0.2 M), which is corrosive. The use of gloves and safety glasses is recommended. The disposal of waste materials must be carried out according to current local regulations. For a Safety Data Sheet for this product contact Affinity Biologicals Inc.

C. Reagent Preparation

Item 1 (Antibody-coated strips with frame): Just prior to use, open pouch and remove strips and frame. Unused strips should be replaced in the pouch and resealed. Strips may be used directly, see Procedure section C: Assay Procedure.

Item 2 (Calibrator plasma): Reconstitute one vial with 1.0 mL of reagent grade water. Allow contents to dissolve for 15 minutes at room temperature with occasional swirling. Stability after reconstitution is 4 hours at ambient (18-25°C), or 30 days at -20°C.

Items 3 and 4 (Control plasmas): Reconstitute one vial of each plasma with 1.0 mL of reagent grade water. Allow contents to dissolve for 15 minutes at room temperature with occasional swirling. Stability after reconstitution is 4 hours at ambient (18-25°C), or 30 days at -20°C.

Item 5 (20X Wash Buffer Concentrate): Allow vial to warm to room temperature before use. Ensure any crystals that may have formed are dissolved before proceeding. If necessary the vial can be warmed to 37°C until all crystals have dissolved. Dilute the concentrate 1/20 before use. For every 2 strips (32 wells), add 16 mL concentrate to 304 mL reagent grade water and mix. Stability after dilution is 1 week at 2–8°C.

Items 6-9 are supplied ready to use.

D. Storage and Stability

Intact kits and un-reconstituted reagents are stable until the expiration date stated on the box and individual reagent labels when stored at 2–8°C.

SPECIMEN COLLECTION

Blood is collected into 3.2% Buffered Citrate anticoagulant tubes at a ratio of 9 volumes blood to 1 volume anticoagulant and gently mixed by inversion. Centrifuge at a minimum of 1500 x g for 15 minutes (CLSI Guideline H21-A5¹¹). Remove supernatant plasma and use within 4 hours or freeze below -20°C for up to 1 month.

PROCEDURE

A. Material Provided

- Foil pouch containing 6 strips of antibody coated wells.
- Calibrator Plasma, lyophilized.
- Control Plasma A, lyophilized.
- Control Plasma B, lyophilized.
- 20X Wash Buffer Concentrate.
- Sample Diluent.
- Detecting antibody solution.
- TMB substrate.

Stop Solution.
Adhesive Plate Sealer.

B. Additional Material Required (but not provided)

Reagent grade water for reconstitution and for dilution
Single-channel adjustable volume pipettes
Multi-channel pipettes
Pipette Tips
Laboratory timer
Microplate strip-well washer device
Microplate compatible spectrophotometer capable of 450 nm.

C. Assay Procedure

PROCEDURAL NOTES:

- Reconstitute reagents as described in REAGENTS, Section C, Reagent Preparation. Allow reagents to warm to room temperature before use.
- It is recommended that all calibrator, control and test sample dilutions be run in duplicate and that each run include a buffer blank (see Assay Calibration section).
- All dilutions must be made just prior to use in the assay.
- Do not allow the wells to become dry at any time. Keep plate covered during incubations.
- Plasma samples should not be applied at dilutions lower than 1/4.
- Do not use kit components from different lot numbers.
- Incubation temperatures above or below normal room temperature (18 -25°C) may contribute to inaccurate results.
- Do not use kit components beyond expiration date
- Used strips must be discarded and not re-used.

- Preparation of Calibrator Plasma Dilutions:** Dilute the Calibrator Plasma (reconstituted Item 2) into Sample diluent (Item 6) as detailed in Table 1 below:

TABLE 1:

Dilution	Calibrator Plasma	Sample Diluent
100% **	175 µL	525 µL
50%	350 µL of 100%	350 µL
25%	350 µL of 50%	350 µL
12.5%	350 µL of 25%	350 µL
6.25%	350 µL of 12.5%	350 µL
3.13%	350 µL of 6.25%	350 µL
1.56%	350 µL of 3.13%	350 µL
0.79%	350 µL of 1.56%	350 µL

(NOTE: 100% = 1.0 IU/mL)

**Refer to Calibrator plasma vial (Item 2) for FVIII antigen value to be used as the concentration of the initial dilution of the calibrator plasma. E.g. If the calibrator has an assigned value of 1.25 IU/ml, follow the dilution scheme above but call the first point of the calibration curve 1.25 IU/ml.

- Control plasma A** (reconstituted Item 3) and **normal test plasmas** are diluted 1/8 and 1/16. Add 100 µL plasma into 700 µL sample diluent (Item 6), mix, then add 350 µL of this 1/8 dilution into 350 µL sample diluent to obtain the 1/16 dilution. **Control Plasma B** (reconstituted Item 4) and samples low in FVIII antigen (Haemophilic samples) should be run at lower dilutions of 1/4 and 1/8. Add 175 µL plasma into 525 µL sample diluent (Item 6), mix, then add 350 µL of this 1/4 dilution into 350 µL sample diluent to obtain the 1/8 dilution.

- Assay**

PLATE PREPARATION	Place desired number of strips into frame.	
STEP	Pipette into each pre-coated well:	
FVIII CAPTURE	Test Sample (run in duplicate)	100 µL
	Cover strips with the plate sealer and incubate 1 hour at ambient temperature.	
Empty wells and wash with 300 µl diluted wash buffer 3 times.		
DETECTING ANTIBODY	Detecting Antibody Solution (Item 7)	100 µL
	Cover strips with the plate sealer and incubate 45 minutes at ambient temperature.	
Empty wells and wash with 300 µl diluted wash buffer 3 times.		

COLOR DEVELOPMENT	TMB Substrate (Item 8)	100 µL
	Allow color to develop for exactly 10 minutes at ambient temperature.	
	Stop Solution (Item 9)	100 µL (Add to each well in same order in which the TMB was added)
Read plate at a wavelength of 450 nm within 30 minutes of adding Stop Solution. If necessary, keep plate frame for use with any unused strips. Discard used strips.		

CALIBRATION

A. Assay Calibration

The FVIII antigen value stated on the Calibrator Plasma vial has been determined by comparison to a secondary standard that is traceable to the WHO International standard for FVIII antigen. This antigen value should be used as the concentration of the initial dilution of the calibrator plasma. It is recommended that the plate be blanked on wells that have received Sample Diluent alone instead of diluted sample (reagent blank wells).

B. Reference Curve and Calculation of Results

The reference curve is a log-log plot of the mean absorbance values (y axis) versus the FVIII antigen concentration (x axis). The Factor VIII antigen content of test samples and controls can be read from the reference curve and multiplied by the appropriate dilution factor. Under the conditions described here, a sample diluted 1/4 will have a dilution factor of 1, a dilution of 1/8 will have a dilution factor of 2, and a dilution of 1/16 has a dilution factor of 4.

Example: Test plasma when diluted 1/8 gives an absorbance corresponding to 45% when read from the reference curve. This value would be multiplied by a dilution factor of 2 to obtain the corrected value of 90%.

QUALITY CONTROL

The supplied Control Plasmas (Item 3 and 4) should be assayed with every series of samples that are run. The FVIII antigen values obtained for test samples should be considered suspect if the values obtained for the control plasmas fall outside of the range stated on the Control Plasma labels.

LIMITATIONS AND INTERFERENCES

The Factor VIII antigen values obtained using this assay should not be used in isolation to diagnose disease. Patient history, clinical presentation and findings from other diagnostic procedures should also be considered. Clinically significant states are known to exist in which plasma Factor VIII antigen levels are normal or near-normal in the presence of a significant reduction in Factor VIII activity.⁸

This kit has been developed for use with citrated plasma. The use of samples containing anticoagulants other than 3.2% sodium citrate is not recommended.

Assay interference due to the presence of drugs or due to the presence of heterophilic antibodies such as Lupus Anticoagulant (LA) has not been reported, however, the potential for interference by high levels of heterophilic antibodies cannot be excluded. The presence of Rheumatoid Factor in test samples will cause interference in the assay. The theoretical possibility of test samples containing antibodies to sheep immunoglobulin may also interfere in the assay.

EXPECTED VALUES

The normal range for Factor VIII as reported in the literature is 0.5-1.8 IU/mL.¹² Each laboratory should determine a normal range independently but results from three lots measured in 99 healthy individuals indicate a normal reference interval for FVIII antigen of 0.64-1.89 IU/mL (mean 1.268 IU/mL, SD = 0.3116).

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

A. Specificity

This assay measures Factor VIII antigen in human plasma, therapeutic Factor VIII concentrates and recombinant Factor VIII preparations.

B. Detection Limit

When assay is performed as indicated in Section C, Assay Procedure, the detection limit of this assay is 0.008 IU/mL (0.8 %) Factor VIII antigen. The upper limit of detection may vary with each lot of kit depending on the

assayed value of the calibrator plasma supplied in the kit. Samples with values outside the range of the reference curve should be re-tested at an appropriate dilution to obtain accurate results.

C. Method Comparison:

The average results of three lots of the *VisuLize™* Factor VIII Antigen kit were compared internally to the Coamatic® FVIII Assay on 142 patient samples containing Factor VIII levels ranging across the entire detection range. The correlation co-efficient (r) was 0.970 ($R^2 = 0.940$, $y = 1.2059x + 0.1053$). The *VisuLize™* Factor VIII Antigen kit was also compared at two external testing sites to the Coamatic® FVIII Assay on patient samples with Factor VIII levels ranging across the entire detection range. At external site #1, 110 samples were tested and the correlation co-efficient (r) was 0.969 ($R^2 = 0.9381$, $y = 1.2261x + 0.1085$). At external site #2, 81 samples were tested and the correlation co-efficient (r) was 0.974 ($R^2 = 0.9488$, $y = 1.1768x + 0.0242$).

D. Precision

Intra-assay Precision, Method 1: In each of three lots of product, normal and abnormal plasma samples were tested in 4 assays total with 38 replicates per sample per plate. The mean coefficient of variation (CV) from all results was 4.56%

Intra-assay Precision, Method 2: Three plasmas with different Factor VIII antigen concentrations were tested in replicates of 8 in 20 assay events using 3 lots of product. The intra-assay coefficient of variation (CV) was calculated according to NCCLS Guideline EP5-A¹³ and is indicated in the summary below for each Factor VIII level. The mean CV from all results by this method was 4.51%.

	Lot 1	Lot 2	Lot 3
1.35-1.75 IU/mL sample	2.17%	2.85%	3.89%
0.6-0.9 IU/mL sample	2.85%	3.33%	5.19%
<0.055 IU/mL sample	5.23%	6.83%	8.25%

Inter-assay Precision: Three plasmas with different Factor VIII antigen concentrations were tested in replicates of 8 in 20 assay events using 3 lots of product. The inter-assay coefficient of variation (CV) was calculated according to NCCLS Guideline EP5-A¹³ and is indicated in the summary below for each Factor VIII level. The mean CV from all results by this method was 4.69%

	Lot 1	Lot 2	Lot 3
1.35-1.75 IU/mL sample	2.12%	3.92%	4.11%
0.6-0.9 IU/mL sample	1.63%	3.19%	7.30%
<0.055 IU/mL sample	6.79%	5.49%	7.71%

E. Lot-to-Lot Variability

94 control samples with Factor VIII antigen values ranging from 0.23-2.3 IU/mL were tested in duplicate on three lots to determine assay precision between lots. The mean lot-to-lot variability was 7.78%.

Coffret *VisuLize™* pour la détection de l'antigène du facteur VIII

Pour la réalisation de 96 tests par détection immuno-enzymatique de l'antigène du facteur VIII (FVIII).

Conçu uniquement pour une utilisation diagnostique *in vitro*.

Produit n° FVIII-AG



A conserver entre +2 et +8 °C. Ne pas congeler.

USAGE PREVU

Le coffret *VisuLize™* pour la détection de l'antigène du facteur VIII consiste en un dosage immuno-enzymatique pour déterminer la quantité d'antigènes du facteur FVIII dans des échantillons de plasma humain et dans les concentrés de facteur VIII utilisant le dosage immuno-enzymatique (ELISA) à double anticorps.

INTRODUCTION

Le facteur VIII (précédemment appelé globuline antihémophilique et facteur VIII:C) est une grosse glycoprotéine au poids moléculaire de 320 000

daltons qui circule dans le plasma à une concentration d'environ 200 ng/ml.^{1,2} FVIII est stabilisé par association au facteur von Willebrand pour former un complexe FVIII-vWF requis pour la survie normale du facteur VIII *in vivo* ($t_{1/2}$ de 8-12 heures).³ FVIII est un pro-cofacteur activé via protéolyse limitée par thrombine. Dans ce processus, FVIII se dissocie de vWF pour s'associer au facteur IX activé, au calcium et à une surface phospholipide où il est un co-facteur essentiel dans l'assemblage du complexe activateur facteur X.^{4,5} Une fois dissocié de vWF, FVIII est susceptible d'inactivation par la protéine C activée et par désintégration non-enzymatique.⁴

L'importance biologique du facteur VIII est démontrée en cas d'hémophilie A, un trouble de saignement congénital que l'on retrouve principalement chez des sujets masculins lié à une carence de chromosome X du facteur VIII.⁶ La prévalence de l'hémophilie A est estimée entre 1/5000 et 1/10000.⁶ La sévérité de la carence est généralement en corrélation avec la sévérité de la maladie. Les individus ayant une activité de facteur VIII <1 % sont classés comme cas sévères, ceux ayant une activité de facteur VIII comprise entre 1 et 5 % sont classés comme cas modérés et ceux ayant une activité de facteur VIII comprise entre 5 et 40 % sont classés comme légers.⁷ Certains hémophiles produisent une protéine FVIII qui est partiellement ou totalement inactives. Dans ces cas, l'activité du facteur VIII est faible mais les niveaux d'antigènes sont normaux ou quasi-normaux. Ces patients, qui représentent environ 5 % des patients souffrant d'hémophilie A, sont considérés avoir un matériel à réaction croisée (CRM)-positive.⁸ La production d'anticorps neutralisants du facteur VIII se produit également chez 5 à 20 % des hémophiles.^{9,10}

Le diagnostic en laboratoire de la carence en facteur VIII consiste en général à déterminer quantitativement les niveaux de procoagulants (activité fonctionnelle du facteur VIII généralement mesurée par épreuve de coagulation). Des symptômes de saignement clinique peuvent également être utilisés lors du diagnostic et de la classification ; cependant, la mesure quantitative des procoagulants est la méthode préférée de classification de la sévérité de l'hémophilie.⁷ La méthode ELISA pour détecter les antigènes du facteur VIII peut être utilisée conjointement avec des dosages fonctionnels dans l'évaluation des thérapies de remplacement du facteur VIII, la détermination du statut de porteur ainsi que le dépistage des patients qui ont un matériel à réaction croisée positive.

PRINCIPE DE LA METHODE IMMUNO-ENZYMATIQUE

Les puits sont pré-sensibilisés à partir d'anticorps polyclonal de mouton anti-facteur FVIII humain. Les échantillons de plasma sont dilués et ajoutés dans les puits. L'antigène du facteur VIII présent se lie à l'anticorps sensibilisé. Après lavage afin d'évacuer tout matériel non lié, l'anticorps de mouton de détection marqué à la peroxydase est ajouté et peut se lier de l'antigène du facteur VIII capturé. Les puits sont à nouveau lavés, puis on y ajoute une solution de TMB (le tétra-méthyl-benzidine, substrat de la peroxydase) qui va réagir pendant une durée déterminée. Une couleur bleue se développe, qui devient jaune lorsque la réaction est arrêtée au moyen d'un acide. La couleur formée est mesurée spectrophotométriquement dans un lecteur de microplaques à 450 nm. L'absorbance à 450 nm est directement proportionnelle à la quantité de facteur FVIII capturée dans le puit. Le dosage est étalonné grâce au plasma étalon fourni dans le coffret.

REACTIFS

A. Description des éléments réactifs

Élément 1 : Poche pelable contenant 6 barrettes de 16 puits sensibilisés à partir d'anticorps de mouton anti-facteur VIII humain.

Élément 2 : 2 flacons de plasma étalon lyophilisés à partir de 1 ml de plasma.

Élément 3 : 2 flacons de plasma de contrôle A lyophilisés à partir de 1 ml de plasma.

Élément 4 : 2 flacons de plasma de contrôle B lyophilisés à partir de 1 ml de plasma.

Élément 5 : 1 flacon contenant 50 ml de concentré de tampon de lavage 20X.

Élément 6 : 3 flacons contenant chacun 20 ml de diluant échantillon tamponné.

Élément 7 : 1 flacon contenant 12 ml d'anticorps de mouton de détection marqué à la peroxydase.

Élément 8 : 1 flacon contenant 12 ml de substrat de tétra-méthyl-benzidine (TMB).

Élément 9 : 1 flacon contenant 12 ml de solution d'arrêt (0,2 M d'acide sulfurique).

B. Avertissement

Ce coffret est conçu pour être utilisé par un personnel formé pour les procédures en laboratoire et les précautions universelles concernant l'utilisation de produits chimiques et de substances potentiellement nocives

pour l'organisme. Certains éléments contiennent des matériels humains. Chaque unité de plasma-aphérèse destinée au fractionnement utilisée dans la préparation de ce produit a été testée par des méthodes approuvées par la FDA et confirmée négative pour l'HBsAg, la syphilis et les anticorps dirigés contre les virus HIV et HCV et non réactive à l'ARN du HIV-1 et à l'ARN du HCV. Cependant, aucun test ne permet de garantir complètement que les produits dérivés du sang humain ne transmettront pas de maladies infectieuses. Comme pour tous les matériels d'origine humaine, ce produit doit être manipulé comme un matériel potentiellement infectieux. Le substrat de TMB (tétra-méthyl-benzidine) a une toxicité réduite mais il est toutefois nécessaire de prendre des précautions pour éviter tout contact direct. Il est recommandé d'utiliser des gants et des lunettes de protection. La solution d'arrêt contient de l'acide sulfurique dilué (0,2 M) corrosif. Il est recommandé d'utiliser des gants et des lunettes de protection. L'élimination des déchets doit être effectuée en accord avec la réglementation locale. Pour une fiche de données de sécurité de ce produit, merci de contacter Affinity Biologicals Inc.

C. Préparation des réactifs

Élément 1 (barrettes sensibilisées à partir d'anticorps, avec support) : Juste avant l'utilisation, ouvrez la poche et retirez barrettes et support. Les barrettes non utilisées doivent être remises dans la poche et refermées. Les barrettes peuvent être utilisées directement, reportez-vous à la procédure dans la section C. Procédure de dosage.

Élément 2 (plasma étalon) : Reconstituez un flacon avec 1,0 ml d'eau pure. Laissez le contenu se dissoudre pendant 15 minutes à température ambiante, en remuant de temps en temps. La stabilité après reconstitution est de 4 heures à température ambiante (18-25 °C) ou 30 jours à -20 °C.

Éléments 3 et 4 (plasmas de contrôle) : Reconstituez un flacon de chaque plasma avec 1,0 ml d'eau pure. Laissez le contenu se dissoudre pendant 15 minutes à température ambiante, en remuant de temps en temps. La stabilité après reconstitution est de 4 heures à température ambiante (18-25 °C) ou 30 jours à -20 °C.

Élément 5 (concentré de tampon de lavage 20X) : Laissez le flacon se réchauffer à température ambiante avant utilisation. Avant de poursuivre, assurez-vous que tous les cristaux qui ont pu se former sont dissous. Si nécessaire, le flacon peut être réchauffé jusqu'à 37 °C jusqu'à ce que tous les cristaux soient dissous. Diluez le concentré au 1/20 avant utilisation. Pour chaque groupe de deux barrettes (32 puits), ajoutez 16 ml de concentré à 304 ml d'eau pure et mélangez. La stabilité après dilution est d'une semaine à 2-8 °C.

Les éléments 6 à 9 sont prêts à l'emploi.

D. Stockage et stabilité

A condition d'être conservés entre +2 et +8 °C, les coffrets intacts et les réactifs non reconstitués sont stables jusqu'à la date d'expiration située sur la boîte et sur les étiquettes individuelles des réactifs.

COLLECTE DES SPECIMENS

Le sang est prélevé dans des tubes d'anticoagulants de citrate tamponné à 3,2 %, selon un rapport de 9 volumes de sang pour 1 volume d'anticoagulant, et mélangé délicatement par inversion. Centrifugez à un minimum de 1500 x g pendant 15 minutes (ligne directrice H21-A5¹¹ du CLSI). Retirez le plasma surnageant et utilisez-le dans les 4 heures ou congelez-le à moins de -20 °C pendant une durée maximum de 1 mois.

PROCEDURE

A. Matériel fourni

Poche pelable contenant 6 barrettes de puits sensibilisés à partir d'anticorps.
Plasma étalon, lyophilisé.
Plasma de contrôle A, lyophilisé.
Plasma de contrôle B, lyophilisé.
Concentré de tampon de lavage 20X.
Diluant échantillon.
Solution d'anticorps de détection.
Substrat de TMB.
Solution d'arrêt.
Ruban adhésif pour recouvrir la plaque.

B. Matériel supplémentaire requis (mais non fourni)

Eau pure pour la reconstitution et la dilution
Pipettes à volume variable à canal unique
Pipettes multi-canaux
Embouts de pipettes

Chronomètre de laboratoire
Appareil de lavage pour les puits des microplaques.
Spectrophotomètre compatible avec les microplaques allant jusqu'à 450 nm.

C. Procédure de dosage

NOTES PROCEDURALES :

- Reconstituez les réactifs comme décrit dans REACTIFS, section C, Préparation des réactifs. Laissez les réactifs se réchauffer à température ambiante avant utilisation.
- Il est recommandé de réaliser en double toutes les dilutions d'étalons, d'échantillons pour essai et de contrôle, et chaque manipulation doit inclure un blanc (reportez-vous à la section Etalonnage du dosage).
- Toutes les dilutions doivent être effectuées juste avant d'être utilisées dans le dosage.
- Ne laissez les puits s'assécher à aucun moment. Laissez les plaques couvertes pendant les incubations.
- Les échantillons de plasma ne doivent pas être ajoutés aux dilutions à moins de 1/4.
- N'utilisez pas des éléments de coffret qui ont un numéro de lot différent.
- Les températures d'incubation supérieures ou inférieures à la température ambiante normale (18 à 25 °C) peuvent fausser les résultats.
- N'utilisez pas les éléments de ce coffret au-delà de la date d'expiration
- Les barrettes usées doivent être jetées ; vous ne devez pas les réutiliser.

Préparation des dilutions du plasma étalon : Diluez le plasma étalon (élément 2 reconstitué) dans le diluant échantillon (élément 6) comme détaillé dans le tableau 1 ci-dessous :

TABLEAU 1 :

Dilution	Plasma étalon	Diluant échantillon
100 %**	175 µl	525 µl
50 %	350 µl sur 100 %	350 µl
25 %	350 µl sur 50 %	350 µl
12,5 %	350 µl sur 25 %	350 µl
6,25 %	350 µl sur 12,5 %	350 µl
3,13 %	350 µl sur 6,25 %	350 µl
1,56 %	350 µl sur 3,13 %	350 µl
0,79 %	350 µl sur 1,56 %	350 µl

(REMARQUE : 100 % = 1,0 IU/ml)

**Consultez sur le flacon de plasma étalon (élément 2) la valeur d'antigène du facteur VIII à utiliser comme concentration de la dilution initiale du plasma étalon. Par exemple, si la valeur déterminée du plasma étalon est 1,25 IU/ml, respectez le même dosage dilué ci-dessus, en fixant toutefois le premier point de la courbe d'étalonnage à 1,25 IU/ml.

Le plasma de contrôle A (élément 3 reconstitué) et **les plasmas de test normaux** sont dilués au 1/8 et au 1/16. Ajoutez 100 µl de plasma dans 700 µl de diluant échantillon (élément 6), mélangez, puis ajoutez 350 µl de cette dilution au 1/8 dans 350 µl d'échantillon de diluant pour obtenir la dilution au 1/16. **Le plasma de contrôle B** (élément 4 reconstitué) et les échantillons contenant une faible quantité de l'antigène du facteur VIII (échantillons d'hémophiles) doivent être manipulés à des dilutions inférieures, au 1/4 et 1/8. Ajoutez 175 µL de plasma dans 525 µL de diluant échantillon (élément 6), mélangez, puis ajoutez 350 µL de cette dilution au 1/4 dans 350 µL d'échantillon de diluant pour obtenir la dilution au 1/8.

Dosage

PREPARATION DE LA PLAQUE	Placez le nombre souhaité de barrettes sur le support.	
ETAPE	Pipetez dans chaque puits pré-sensibilisé :	
CAPTURE DU FVIII	Echantillon pour essai (manipulé en double)	100 µl
	Couvrez les barrettes avec le ruban adhésif fourni et incubez 1 heure à température ambiante.	
Videz les puits et lavez-les avec 300 µl de tampon de lavage 3 fois.		
ANTICORPS DE	Solution d'anticorps de détection (élément 7)	100 µl

DETECTION	Couvrez les barrettes avec le ruban adhésif fourni et incubez 45 minutes à température ambiante.	
Videz les puits et lavez-les avec 300 µl de tampon de lavage 3 fois.		
DEVELOPPEMENT DE LA COULEUR	Substrat de TMB (Élément 8)	100 µl
	Laissez la couleur se développer pendant exactement 10 minutes à température ambiante.	
	Solution d'arrêt (Élément 9)	100 µl (Ajoutez à chaque puits dans l'ordre selon lequel la TMB a été ajoutée)
Lisez la plaque à une longueur d'onde de 450 nm dans les 30 minutes après avoir ajouté la solution d'arrêt		
Si nécessaire, conservez le support de la plaque pour l'utiliser avec les barrettes non utilisées. Jetez les barrettes qui ont été utilisées.		

ETALONNAGE

A. Etalonnage du dosage

La valeur d'antigène du facteur VIII indiquée par le flacon de plasma étalon a été déterminée par comparaison avec un étalon secondaire traçable à l'étalon international de la WHO pour d'antigène du facteur VIII. Cette valeur d'antigène doit être utilisée comme concentration de la dilution initiale du plasma étalon.

Il est recommandé que la plaque soit vidée des puits qui ont reçu du diluant échantillon pur au lieu d'échantillon dilué (puits de réactif à blanc).

B. Courbe de référence et calcul des résultats

La courbe de référence est un graphique logarithmique représentant les valeurs d'absorbance moyennes (axe des ordonnées) selon la concentration en l'antigène du facteur VIII (axe des abscisses). La concentration en l'antigène du facteur VIII des échantillons pour essai et des contrôles peut être lue sur la courbe de référence et multipliée par le facteur de dilution approprié. Dans les conditions décrites ici, un échantillon dilué au 1/4 aura un facteur de dilution de 1, une dilution au 1/8 aura un facteur de dilution de 2, et une dilution au 1/15 aura un facteur de dilution de 4.

Exemple : Dilué au 1/8, le plasma de test donne une absorbance correspondant à 45 % d'après lecture sur la courbe de référence. Cette valeur serait multipliée par un facteur de dilution de 2 pour obtenir la valeur correcte qui est de 90 %.

CONTROLE QUALITE

Les plasmas de contrôle fournis (éléments 3 et 4) doivent être dosés avec chaque série d'échantillons manipulés. Les valeurs de l'antigène du facteur VIII obtenues dans les échantillons pour essai doivent être considérées comme douteuses si les valeurs obtenues pour les plasmas de contrôle se situent en dehors de la plage indiquée sur l'étiquette des plasmas de contrôle.

LIMITES ET INTERFERENCES

Les seules valeurs d'antigène du facteur VIII obtenues par ce dosage ne permettent pas de diagnostiquer une maladie. Les antécédents médicaux du patient, son tableau clinique, et les éléments révélés par d'autres procédures de diagnostic doivent également entrer en considération. Des états cliniques sérieux ont été rapportés, alors que le niveau d'antigènes du facteur VIII dans le plasma était normal ou quasi-normal en présence d'une réduction conséquente de l'activité du facteur VIII.⁸

Ce coffret a été élaboré pour être utilisé avec un plasma citraté. Il n'est pas recommandé d'utiliser des échantillons contenant des anticoagulants autres que le citrate de sodium à 3,2 %.

L'interférence de dosage due à la présence de médicaments ou à la présence d'anticorps hétérophiles tels que le lupus anticoagulant (LA) n'a pas été rapportée, cependant, un risque d'interférence par des niveaux élevés d'anticorps hétérophiles ne peut pas être exclu. La présence du facteur rhumatoïde dans les échantillons pour essai est une source d'interférence dans le dosage. La possibilité théorique que des échantillons contiennent des anticorps anti-immunoglobine de mouton peut aussi interférer sur le dosage.

VALEURS ATTENDUES

La plage normale pour le facteur VIII telle qu'indiquée dans la documentation est comprise entre 0,5 et 1,8 IU/ml.¹² Chaque laboratoire doit déterminer une plage normale indépendamment, mais les résultats de

trois lots mesurés auprès de 99 individus en bonne santé montrent un intervalle de référence normal de 0,64 à 1,89 IU/ml (moy = 1,268 IU/ml, écart-type = 0,3116).

PERFORMANCES DU TEST

A. Spécificité

Ce dosage mesure l'antigène du facteur VIII dans le plasma humain, les concentrés de facteur VIII thérapeutiques et les préparations de facteur VIII recombiné.

B. Limite de détection

Lorsque le dosage est réalisé comme indiqué dans la section C, Procédure de dosage, la limite de détection de ce dosage est de 0,008 IU/ml (0,8 %) de l'antigène du facteur VIII. La limite supérieure de détection peut varier pour chaque lot dans un coffret en fonction de la valeur dosée du plasma étalon fourni dans le coffret. Les échantillons dont les valeurs se situent en dehors de la plage de la courbe de référence devraient être testés à nouveau à une dilution appropriée afin d'obtenir des résultats exacts.

C. Comparaison des méthodes:

Les résultats moyens des trois échantillons du coffret VisuLize™ pour la détection de l'antigène du facteur VIII ont été comparés de manière interne au dosage Coamatic® FVIII sur 142 échantillons de patients contenant des niveaux de facteur VIII différents à l'intérieur de la plage de détection. Le coefficient de corrélation (r) était de 0,970 ($R^2 = 0,940$, $y = 1,2059x + 0,1053$). Le coffret VisuLize™ pour la détection de l'antigène du facteur VIII a été également comparé dans deux centres de tests extérieurs au dosage Coamatic® FVIII sur des échantillons de patients avec des niveaux de facteur VIII différents à l'intérieur de la plage de détection. Dans le centre n° 1, 110 échantillons ont été testés et le coefficient de corrélation (r) était de 0,969 ($R^2 = 0,9381$, $y = 1,2261x + 0,1085$). Dans le centre n° 2, 81 échantillons ont été testés et le coefficient de corrélation (r) était de 0,974 ($R^2 = 0,9488$, $y = 1,1768x + 0,0242$).

D. Précision

Précision intra-essai, méthode 1 : Les échantillons de plasma normal et anormal ont été testés dans 4 dosages au total dans chacun des trois lots, avec 38 répliques par échantillon et par plaque. Le coefficient de variation moyen (CV) calculé à partir de tous les résultats était de 4,56 %.

Précision intra-essai, méthode 2 : Trois plasmas avec des concentrations de l'antigène du facteur VIII différentes ont été testés sur les répliques de 8 dosages sur 20, en utilisant 3 lots de produit. Le coefficient de variation intra-essai (CV) a été calculé conformément à la ligne directrice EP5-A¹³ du NCCLS et est indiqué dans le résumé ci-dessous, pour chaque niveau de facteur VIII. Le CV moyen, calculé avec cette méthode à partir de tous les résultats, était de 4,51 %.

	<u>Lot 1</u>	<u>Lot 2</u>	<u>Lot 3</u>
Echantillon de 1,35-1,75 IU/ml	2,17 %	2,85 %	3,89 %
Echantillon de 0,6-0,9 IU/ml	2,85 %	3,33 %	5,19 %
Echantillon <0,055 IU/ml	5,23 %	6,83 %	8,25 %

Précision inter-essai : Trois plasmas avec des concentrations de l'antigène du facteur VIII différentes ont été testés sur les répliques de 8 dosages sur 20, en utilisant 3 lots de produit. Le coefficient de variation inter-essai (CV) a été calculé conformément à la ligne directrice EP5-A¹³ du NCCLS et est indiqué dans le résumé ci-dessous, pour chaque niveau de facteur VIII. Le CV moyen, calculé avec cette méthode à partir de tous les résultats, était de 4,69 %.

	<u>Lot 1</u>	<u>Lot 2</u>	<u>Lot 3</u>
Echantillon de 1,35-1,75 IU/ml	2,12 %	3,92 %	4,11 %
Echantillon de 0,6-0,9 IU/ml	1,63 %	3,19 %	7,30 %
Echantillon <0,055 IU/ml	6,79 %	5,49 %	7,71 %

E. Variabilité d'un lot à l'autre

94 échantillons de contrôle avec une concentration de l'antigène du facteur VIII comprise entre 0,23 et 2,3 IU/ml ont été testés en double sur trois lots afin de déterminer la précision entre les lots. La variabilité moyenne d'un lot à l'autre était de 7,78 %.

VisuLize™ FVIII Antigen-Kit

Enzym-Immunoassaykit mit 96 Tests auf Faktor VIII (FVIII) Antigen

für In-vitro-Diagnose

Produkt-Nr. FVIII-AG



Bei 2 bis 8 °C aufbewahren. Nicht einfrieren.

BESTIMMUNGSGEMÄSSER GEBRAUCH:

Der VisuLize FVIII Antigen-Kit ist ein Enzym-Immunoassay für die quantitative Bestimmung des Faktor-VIII-Antigens in humanen Plasmaproben, wobei Faktor VIII in einem ELISA-Test (enzyme linked immunosorbent assay) an zwei Antikörper gebunden wird.

ZUSAMMENFASSUNG

Faktor VIII (früher bezeichnet als antihämphiles Globulin und Faktor VIII: C) ist ein großes Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 320.000 Dalton, das im Plasma mit einer Konzentration von etwa 200 ng/ml zirkuliert.^{1,2} FVIII wird durch Zusammenwirken mit dem von Willebrand-Faktor stabilisiert und bildet einen FVIII-vWF-Komplex, der erforderlich ist, um die normale Beständigkeit von FVIII in vivo (Halbwertszeit von 8 bis 12 Stunden) sicherzustellen.³ FVIII ist ein Pro-Kofaktor, der durch die limitierte Proteolyse durch Thrombin aktiviert wird. Bei diesem Prozess trennt sich FVIIIa von vWF und wird mit dem aktivierten Faktor IX sowie mit Kalzium und einer Phospholipidoberfläche kombiniert, wo es ein essentieller Kofaktor bei der Bildung des Faktor-X-Aktivator-Komplexes ist.^{4,5} Nach der Trennung von vWF reagiert FVIIIa empfindlich auf die Deaktivierung durch aktiviertes Protein C und durch nicht-enzymatische Zersetzung.⁴

Die biologische Bedeutung von Faktor VIII wird bei Hämophilie A deutlich, einer erbten Bluterkrankung, die vorwiegend bei Männern auftritt und auf einen Defekt im X-Chromosom für FVIII zurückzuführen ist.⁶ Hämophilie A kommt bei einer von 5.000 bis 10.000 Personen vor.⁶ Je schwerer der Gendefekt, umso schwerer die Erkrankung. Personen, bei denen die Aktivität des Faktors VIII unter 1 % liegt, werden als schwere Hämophilie klassifiziert, Personen mit einem Faktor VIII zwischen 1 und 5 % als mittelschwere Fälle und Patienten mit einer Aktivität des Faktors VIII zwischen 5 und 40 % als leichte Hämophilie.⁷ Viele Bluterkrankte produzieren ein Protein FVIII, das ganz oder teilweise inaktiv ist. In diesen Fällen ist die Aktivität des Faktors VIII niedrig, aber die Antigenspiegel sind normal oder fast normal. Diese Patienten machen etwa 5 % der Patienten mit Hämophilie A aus und werden als CRM-positiv bezeichnet.⁸ Eine Produktion von neutralisierenden Antikörpern für FVIII tritt ebenfalls bei 5 bis 20 % der Bluterkrankten ein.^{9,10} Die Labordiagnose des Faktor VIII-Mangels besteht in der Regel aus quantitativen Bestimmungen in Abhängigkeit von den Proagulantsspiegeln (die funktionelle Aktivität des Faktors VIII wird in der Regel durch einen Gerinnungstest bestimmt). Zur Diagnose und Klassifizierung können auch klinische Blutungssysteme herangezogen werden, jedoch ist die quantitative Bestimmung des Proagulans die bevorzugte Methode zur Klassifizierung des Schweregrads der Hämophilie.⁷ Ein ELISA-Test für Faktor-VIII-Antigen kann zusammen mit den Funktionsassays zur Bewertung der Ersatztherapien für Faktor VIII eingesetzt werden, ebenso eine Bewertung des Trägerstatus, um die Patienten zu erkennen, die als CRM-positiv gelten.

PRINZIP DES ENZYM-IMMUNOASSAYS

Mikrotiterstreifen-Wellen werden mit polyklonalen Schaf-Antikörpern für humanes FVIII vorbeschichtet. Danach werden Plasmaproben verdünnt und auf die Wells aufgetragen. Das vorhandene F-VIII-Antigen bindet sich an den als Beschichtung aufgetragenen Antikörper. Nach dem Abspülen der nicht gebundenen Substanzen wird ein mit Peroxidase markierter Erkennungsentikörper aufgetragen, der aus Schaf gewonnen wird und sich an den gebundenen FVIII binden kann. Danach werden die Wells erneut gespült und es wird eine Lösung TMB (mit dem Peroxidasesubstrat Tetramethylbenzidin) aufgebracht, damit sie für eine definierte Zeit reagieren kann. Es entsteht eine blaue Farbe, die ins Gelbe umschlägt, sobald die Reaktion durch Säure gestoppt wird. Die gebildete Farbe wird spektrophotometrisch mit einem Mikroplattenreader mit einer Wellenlänge von 450 nm gemessen. Die Absorption bei 450 nm ist direkt proportional zur Menge des F-VIII-Antigens, der in dem Well immobilisiert wurde. Der Assay wird mit dem Kalibratorplasma kalibriert, das in dem Kit mitgeliefert wurde.

REAGENZIE

A. Beschreibung der Reagenzien

Reagenz 1: Folientasche mit 6 Streifen mit jeweils 16 Wells, die mit Schaf-Antikörper für humanes FVIII beschichtet sind

Reagenz 2: 2 Ampullen Kalibratorplasma, jeweils aus 1 ml Plasma lyophilisiert

Reagenz 3: 2 Ampullen Kontrollplasma A, jeweils aus 1 ml Plasma lyophilisiert

Reagenz 4: 2 Ampullen Kontrollplasma B, jeweils aus 1 ml Plasma lyophilisiert

Reagenz 5: 1 Ampulle mit 50 ml 20-fachem Waschpufferkonzentrat

Reagenz 6: 3 Ampullen mit jeweils 20 ml gepufferter Probenverdünnungsmedium

Reagenz 7: 1 Ampulle mit 12 ml Peroxidase-markierter Schaf-Antikörper zur Detektion

Reagenz 8: 1 Ampulle mit 12 ml Tetramethylbenzidinsubstrat (TMB)

Reagenz 9: 1 Ampulle mit 12 ml Stopplösung (Schwefelsäure 0,2 M)

B. Sicherheits- und Warnhinweise

Dieser Kit ist zur Verwendung durch geschultes Personal im Labor vorgesehen. Es sind die allgemeinen Vorsichtsmaßnahmen beim Umgang mit Chemikalien und potentiell infektiösen Stoffen einzuhalten. Einige Substanzen enthalten Material humanen Ursprungs. Jede Quelle des Ausgangsplasmas, das bei der Herstellung dieses Produkts verwendet wurde, wurde gemäß den von der FDA zugelassenen Verfahren getestet und erwies sich als negativ auf Oberflächenantigene für Hepatitis B (HBsAg), Syphilis-Erreger und Antikörper gegen HIV und HCV und als nicht-reaktiv auf HIV-1 rNA und HCV rNA. Es kann jedoch kein Test absolute Sicherheit gewährleisten, dass Produkte, die aus humanem Blut gewonnen wurden, nicht doch Infektionskrankheiten übertragen. Wie bei allen Materialien menschlichen Ursprungs sollte dieses Produkt als potentiell infektiöses Material behandelt werden.

Das Substrat TMB (Tetramethylbenzidin) hat eine geringe Toxizität, es sollten jedoch Vorsichtsmaßnahmen ergriffen werden, um einen direkten Kontakt zu vermeiden. Wir empfehlen die Verwendung von Handschuhen und Arbeitsschutzbrillen.

Die Stopplösung enthält verdünnte Schwefelsäure (0,2 M), die korrosiv wirkt. Wir empfehlen die Verwendung von Handschuhen und Arbeitsschutzbrillen.

Die Entsorgung von Abfallmaterialien muss entsprechend den geltenden lokalen Vorschriften erfolgen.

Wenn Sie ein sicherheitsdatenblatt für dieses Produkt benötigen, wenden Sie sich bitte an Affinity Biologicals Inc.

C. Reagenzvorbereitung

Reagenz 1 (mit Antikörper beschichtete Streifen mit Rahmen): Unmittelbar vor der Verwendung die Tasche öffnen und Streifen und Rahmen herausnehmen. Nicht verwendete Streifen wieder in die Tasche legen und neu versiegeln. Die Streifen können direkt verwendet werden, siehe Abschnitt C: Ablauf des Tests.

Reagenz 2 (Kalibratorplasma): 1 Ampulle mit 1,0 ml reagenzgeeignetem Wasser rekonstituieren. Den Inhalt 15 min bei Raumtemperatur auflösen und hin und wieder schütteln. Nach der Rekonstituierung 4 Stunden lang bei Raumtemperatur (18 bis 25 °C) bzw. 30 Tage bei -20 °C stabil.

Reagenz 3 und 4 (Kontrollplasma): 1 Ampulle des jeweiligen Plasmas mit 1,0 ml reagenzgeeignetem Wasser rekonstituieren. Den Inhalt 15 min bei Raumtemperatur auflösen und hin und wieder schütteln. Nach der Rekonstituierung 4 Stunden lang bei Raumtemperatur (18 bis 25 °C) bzw. 30 Tage bei -20 °C stabil.

Reagenz 5 (20-faches Waschpufferkonzentrat): Vor der Verwendung muss die Ampulle auf Raumtemperatur erwärmt werden. Eventuell gebildete Kristalle müssen aufgelöst sein, bevor der nächste Schritt ausgeführt wird. Gegebenenfalls die Ampulle bei 37 °C erwärmen, bis sich alle Kristalle gelöst haben. Das Konzentrat im Verhältnis 1:20 vor der weiteren Verwendung verdünnen. Für jeweils 2 Streifen (32 Wells) 16 ml Konzentrat mit 304 ml reagenzgeeignetem Wasser mischen. Die Lösung ist nach der Verdünnung 1 Woche bei 2 bis 8 °C stabil.

Die Reagenzien 6 bis 9 werden gebrauchsfertig geliefert.

D. Aufbewahrung und Stabilität

Intakte Kits und nicht rekonstituierte Reagenzien sind bis zum Verfallsdatum auf der Verpackung und auf den einzelnen Reagenzetiketten stabil, wenn sie bei 2 bis 8 °C gelagert werden.

PROBENNAHME

Das Blut wird in mit 3,2 % Citrat gepufferten Röhrchen mit einem Verhältnis von 9 Teilen Blut auf 1 Teil Antikoagulum gesammelt und durch Umdrehen vorsichtig gemischt. Mindestens 15 min lang mit 1500 g

zentrifugieren (CLSI-Richtlinie H21-A5¹¹). Das überstehende Plasma innerhalb von 4 Stunden verwenden oder unter -20 °C bis zu 1 Monat einfrieren.

ABLAUF

A. Gelieferte Materialien

Folientasche mit 6 Streifen mit Wells, die mit Antikörper beschichtet sind
Kalibratorplasma, lyophilisiert
Kontrollplasma A, lyophilisiert
Kontrollplasma B, lyophilisiert
20-faches Waschpufferkonzentrat
Probenverdünnungsmedium
Peroxidase-markierter Antikörper zur Detektion
TMB-Substrat
Stopplösung
Versiegelung für die Mikrotiterplatte

B. Weitere benötigte Materialien (gehören nicht zum Lieferumfang)

Reagenzgeeignetes Wasser zur Rekonstituierung und Verdünnung
Einstellbare Volumenpipetten
Mehrkanalpipetten
Pipettenspitzen
Stoppuhr
Mikroplattenstreifenwisher
Für Mikroplatten geeignetes Spektrophotometer für eine Wellenlänge von 450 nm

C. Ablauf des Tests

HINWEISE ZUM ABLAUF:

- Die Reagenzien, wie im Abschnitt C „REAGENZIEN, Reagenz Vorbereitung“ beschrieben, rekonstituieren. Vor der Verwendung müssen die Reagenzien auf Raumtemperatur gebracht werden.
- Alle Kalibratoren, Kontrollen und Testprobenverdünnungen sollten in Doppelwerten gemessen werden, und jeder Lauf sollte einen Blank (siehe Abschnitt Testkalibrierung) enthalten.
- Alle Verdünnungen müssen unmittelbar vor dem Test angefertigt werden.
- Die Wells dürfen keinesfalls austrocknen. Die Platte während der Inkubationen abdecken.
- Plasmaproben dürfen nicht mit Verdünnungen unter 1:4 verarbeitet werden.
- Keine Kitkomponenten mit verschiedenen Chargennummern verwenden.
- Inkubationstemperaturen über oder unter der normalen Raumtemperatur (18 bis 25 °C) können die Ergebnisse verfälschen.
- Kitkomponenten nicht über das Verfallsdatum hinaus verwenden.
- Verwendete Streifen müssen entsorgt und dürfen nicht wieder verwendet werden.

Vorbereitung der Kalibratorplasmaverdünnungen: Das Kalibratorplasma (rekonstituiertes Reagenz 2) mit dem Probenverdünnungsmedium (Reagenz 6), wie in Tabelle 1 angegeben, verdünnen:

TABELLE 1:

Verdünnung	Kalibratorplasma	Probenverdünnungsmedium
100 %**	175 µl	525 µl
50 %	350 µl von 100 %	350 µl
25 %	350 µl von 50 %	350 µl
12,5 %	350 µl von 25 %	350 µl
6,25 %	350 µl von 12,5 %	350 µl
3,13 %	350 µl von 6,25 %	350 µl
1,56 %	350 µl von 3,13 %	350 µl
0,79 %	350 µl von 1,56 %	350 µl

(HINWEIS: 100 % = 1,0 IU/ml)

**Als Konzentration der Ausgangsverdünnung des Kalibratorplasmas ist der Wert für FVIII-Antigen für das Fläschchen mit Kalibratorplasma (Artikel 2) zu verwenden. Wenn beispielsweise der Kalibrator einen zugewiesenen Wert von 1,25 IE/ml hat, ist oben dasselbe Verdünnungsschema zu verwenden, jedoch mit dem Wert 1,25 IE/ml als erstem Punkt auf der Kalibrierungskurve.

Kontrollplasma A (rekonstituiertes Reagenz 3) und **normale Testplasmen** werden im Verhältnis 1:8 und 1:16 verdünnt. 100 µl Plasma zu 700 µl Probenverdünnungsmedium (Reagenz 6) geben, mischen und 350 µl dieser Verdünnung im Verhältnis 1:8 in 350 µl Probenverdünnungsmedium geben, um eine Verdünnung 1:16 zu erhalten. **Kontrollplasma B** (rekonstituiertes Reagenz 4) und Proben mit niedrigem FVIII-Gehalt (hämophile Proben) sollten mit Verdünnungen von 1:4 und 1:8 verarbeitet werden. 175 µl Plasma in 575 µl Probenverdünnungsmedium (Reagenz 6) geben, mischen und dann 350 µl dieser Verdünnung im Verhältnis 1:4 in 350 µl Probenverdünnungsmedium geben, um die Verdünnung 1:8 zu erhalten.

Test

Mikrotiterplatten-VORBEREITUNG	Die gewünschte Anzahl Streifen in den Rahmen setzen.	
SCHRITT	Folgende Flüssigkeiten in jedes vorbereichete Well pipettieren:	
FVIII-BINDUNG	Testprobe (Doppelwerte)	100 µl
	Die Streifen abdecken und 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubieren.	
Die Wells entleeren und 3-mal mit 300 µl verdünnter Waschpufferlösung spülen.		
Detektion	Peroxidase-markierter Antikörper (Reagenz 7)	100 µl
	Die Streifen abdecken und 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.	
Die Wells entleeren und 3-mal mit 300 µl verdünnter Waschpufferlösung spülen.		
FARBENTWICKLUNG	TMB-Substrat (Reagenz 8)	100 µl
	Die Farbbildung bei Zimmertemperatur exakt 10 min verfolgen.	
	Stopplösung (Reagenz 9)	100 µl (Die Stopplösung in der gleichen Reihenfolge zu jedem Well geben, in der die TMB-Lösung hinzugefügt wurde)
Die Mikrotiterplatte bei einer Wellenlänge von 450 nm innerhalb von 30 min nach Zusatz der Stopplösung ablesen. Gegebenenfalls den Plattenrahmen für weitere nicht verwendete Streifen aufheben. Verwendete Streifen entsorgen		

KALIBRIERUNG

A. Testkalibrierung

Der auf der Ampulle mit dem Kalibratorplasma angegebene Antigenwert für FVIII wurde durch Vergleich mit einem sekundären Standard ermittelt, der auf den internationalen Standard für Antigen FVIII der WHO zurückgeht. Als Konzentration der anfänglichen Verdünnung des Kalibratorplasmas sollte dieser Antigenwert verwendet werden.

Wir empfehlen, auf der Mikrotiterplatte ein Well zu reservieren, in das allein Probenverdünnungsmedium anstatt verdünnte Probe gefüllt wird (d. h. einen Reagenzienblank).

B. Referenzkurve und Berechnung der Ergebnisse

Die Referenzkurve ist eine doppelt logarithmische Darstellung der Absorptionsmittelwerte (y-Achse) in Abhängigkeit von der FVIII-antigen-Konzentration (x-Achse). Der Faktor-VIII-antigen-Gehalt dieser Testproben und Kontrollen lässt sich aus der Referenzkurve ablesen und mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor multiplizieren. Unter den hier beschriebenen Bedingungen ergibt sich für eine im Verhältnis 1:4 verdünnte Probe ein Verdünnungsfaktor von 1, für ein Verhältnis von 1:8 ein Verdünnungsfaktor 2 und für ein Verdünnungsverhältnis 1:16 ein Verdünnungsfaktor 4.

Beispiel: Testplasma mit einem Verdünnungsverhältnis 1:8 ergibt eine Absorption, die 45 % des Werts aus der Referenzkurve entspricht. Dieser Wert wird dann mit einem Verdünnungsfaktor 2 multipliziert, um den korrigierten Wert von 90 % zu erhalten.

QUALITÄTSKONTROLLE

Die mitgelieferten Kontrollplasmen (Reagenzien 3 und 4) sollten bei jeder Probenreihe, die verarbeitet wird, gemessen werden. Die FVIII-antigen-Werte für die Testproben sollten dann überprüft und eventuell wiederholt werden, wenn die Werte für die Kontrollplasmen außerhalb des Bereichs liegen, der auf den Etiketten der Kontrollplasmen angegeben ist.

EINSCHRÄNKUNGEN UND INTERFERENZEN

Die Antigenwerte für Faktor VIII, die mit diesem Test bestimmt werden, dürfen nicht allein zur Diagnose der Erkrankung verwendet werden. Die Krankenakte, die klinische Präsentation und die Ergebnisse anderer Diagnosen sind ebenfalls zu berücksichtigen. Es sind klinisch signifikante Fälle bekannt, bei denen die Antigenspiegel von Faktor VIII im Plasma normal oder fast normal sind und eine signifikante Reduktion der Aktivität von Faktor VIII vorliegt.⁸

Dieser Kit wurde für die Verwendung mit Plasma entwickelt, das mit Citrat angesäuert ist. Es wird empfohlen, keine anderen Antikoagulantien außer 3,2-prozentigem Natriumcitrat einzusetzen.

Über Störungen des Tests durch Medikamente oder aufgrund von heterogenen Antikörpern wie Lupus-Antikoagulant (LA) sind nicht bekannt, die Möglichkeit einer Störung durch hohe Konzentrationen heterogener Antikörper kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. Wenn ein rheumatoider Faktor in den Testproben vorhanden ist, kommt es zu Störungen der Testergebnisse. Auch die theoretisch mögliche Existenz von Antikörpern auf Schaf-Immunglobulin in den Testproben kann die Testwerte verfälschen.

SOLLWERTE

Der normale Bereich für Faktor VIII liegt laut Literatur zwischen 0,5 und 1,8 IU/ml.¹² Jedes Labor sollte selbst einen Normalbereich festlegen. Ergebnisse aus drei Chargen, die an 99 gesunden Einzelpersonen gemessen wurden, deuten darauf hin, dass das normale Referenzintervall Faktor VIII-antigen zwischen 0,64 und 1,89 IU/ml (Mittelwert 1,268 IU/ml, SD = 0,3116) liegt.

MESSGENAUIGKEIT

A. Spezifität

Dieser Test misst das Faktor-VIII-Antigen in humanem Plasma, therapeutische Konzentrationen von Faktor VIII und rekombinante Faktor-VIII-Zubereitungen.

B. Erkennungsgrenze

Wird der Test, wie in Abschnitt C „Testablauf“ angegeben, durchgeführt, liegt die Erkennungsgrenze dieses Tests bei 0,008 IU/ml (0,8 %) für Faktor VIII-antigen. Der obere Detektionsgrenzwert kann bei jeder Kitcharge je nach dem Textwert des im Kit mitgelieferten Kalibratorplasmas schwanken. Proben mit außerhalb des Bereichs der Referenzkurve liegenden Werten sollten mit einer angemessenen Verdünnung neu getestet werden, um exakte Ergebnisse zu erhalten.

C. Methodenvergleich:

Die durchschnittlichen Ergebnisse von drei Chargen VisuLize® Faktor-VIII-Antigen-Kits wurden intern mit dem Coamatic®FVIII-Test bei 142 Patientenproben mit dem Faktor VIII in Konzentrationen, die den gesamten Nachweisbereich überdeckten, verglichen. Der Korrelationskoeffizient (r) betrug 0,970 ($R^2 = 0,940$; $y = 1,2059x + 0,1053$). Der VisuLize® Faktor-VIII-Antigen-Kit wurde darüber hinaus an zwei externen Test-Standorten mit dem Coamatic®FVIII-Test bei Patientenproben mit dem Faktor VIII in Konzentrationen, die den gesamten Nachweisbereich überdeckten, verglichen. Am externen Standort 1 wurden 110 Proben getestet, der Korrelationskoeffizient (r) betrug 0,969 ($R^2 = 0,9381$; $y = 1,2261x + 0,1085$). Am externen Standort 2 wurden 81 Proben getestet, der Korrelationskoeffizient (r) betrug 0,974 ($R^2 = 0,9488$; $y = 1,1768x + 0,0242$).

D. Wiederholgenauigkeit

Wiederholgenauigkeit innerhalb der Tests, Methode 1: Bei jeder der 3 Chargen des Produkts wurden normale und anormale Plasmaproben von insgesamt 4 Tests mit 38 Replikaten pro Probe und Platte getestet. Der mittlere Variationskoeffizient aller Ergebnissen lag bei 4,56 %.

Wiederholgenauigkeit innerhalb der Tests, Methode 2: Es wurden 3 Plasmen mit verschiedenen Faktor-VIII-Antigen-Konzentrationen in 8 Replikaten bei 20 Testereignissen mit 3 Chargen des Produkts getestet. Der Variationskoeffizient zwischen den Tests wurde entsprechend der NCCLS-

Richtlinie EP5-A¹³ berechnet und ist in der Zusammenfassung für jeden Faktor-VIII-Spiegel angegeben. Der mittlere Variationskoeffizient aller Ergebnisse lag bei dieser Methode bei 4,51 %.

	Charge 1	Charge 2	Charge 3
1,35–1,75 IU/ml Probe	2,17 %	2,85 %	3,89 %
0,6–0,9 IU/ml Probe	2,85 %	3,33 %	5,19 %
< 0,055 IU/ml Probe	5,23 %	6,83 %	8,25 %

Wiederholgenauigkeit zwischen den Tests: Es wurden 3 Plasmen mit verschiedenen Faktor-VIII-antigen-Konzentrationen in 8 Replikaten bei 20 Testereignissen mit 3 Chargen des Produkts getestet. Der Variationskoeffizient zwischen den Tests wurde entsprechend der NCCLS-Richtlinie EP5-A¹³ berechnet und ist in der Zusammenfassung für jeden Faktor-VIII-Spiegel angegeben. Der mittlere Variationskoeffizient aller Ergebnisse lag bei dieser Methode bei 4,69 %.

	Charge 1	Charge 2	Charge 3
1,35–1,75 IU/ml Probe	2,12 %	3,92 %	4,11 %
0,6–0,9 IU/ml Probe	1,63 %	3,19 %	7,30 %
< 0,055 IU/ml Probe	6,79 %	5,49 %	7,71 %

E. Schwankungen von Charge zu Charge

Es wurden 94 Kontrollen mit Faktor-VIII-antigen-Werten zwischen 0,23 und 2,3 IU/ml doppelt bei 3 Chargen getestet, um die Testwiederholgenauigkeit zwischen verschiedenen Chargen zu bestimmen. Die mittlere Schwankung von Charge zu Charge lag bei 7,78 %.

Kit dell'antigene FVIII VisuLize™

Kit di immunodosaggio enzimatico di 96 test per l'antigene del Fattore VIII (FVIII).

Per uso diagnostico *In Vitro*.

N. prodotto FVIII-AG



Conservare a 2–8 °C. Non congelare.

UTILIZZO PREVISTO

Il kit dell'antigene VisuLize™ FVIII è un immunodosaggio enzimatico per la determinazione quantitativa dell'antigene Fattore VIII in campioni di plasma umano e di concentrati di Fattore VIII mediante la tecnica ELISA (Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay) con doppio anticorpo.

INTRODUZIONE

Il Fattore VIII (noto in precedenza come globulina antiemofiliaca e Fattore VIII:C) è una grande glicoproteina con un peso molecolare pari a 320000 dalton circolante nel plasma a una concentrazione di circa 200 ng/mL.^{1,2} Il Fattore VIII viene stabilizzato mediante associazione con il Fattore von Willebrand con cui crea un complesso FVIII-vWF necessario per la normale sopravvivenza del Fattore VIII in vivo ($t_{1/2}$ di 8-12 ore).³ FVIII è un pro-cofattore che viene attivato attraverso una proteolisi limitata mediata dalla trombina. In questo processo FVIII si dissocia dal vWF per combinarsi con il Fattore IX attivato, Ca++ e una superficie fosfolipidica dove è un cofattore essenziale nell'assemblaggio del complesso attivatore del Fattore X.^{4,5} Dopo essersi dissociato da vWF, FVIIIa può essere inattivato dalla Proteina C attivata e dal decadimento non enzimatico.⁴

L'importanza biologica del Fattore VIII è dimostrata nell'Emofilia A, una disfunzione congenita che impedisce la coagulazione del sangue. L'emofilia A colpisce principalmente i maschi ed è causata da una deficienza legata al cromosoma X di FVIII.⁶ Si stima che la prevalenza dell'emofilia A si attesti tra 1/5000 e 1/10000.⁶ La gravità della deficienza è generalmente correlata alla gravità della malattia. Gli individui in cui si registra un'attività del Fattore VIII <1% sono considerati pazienti gravi, quelli con un'attività del Fattore VIII tra l'1 e il 5% sono considerati pazienti moderatamente gravi e quelli con un'attività del Fattore VIII tra il 5 e il 40% sono considerati emofilici lievi.⁷ Alcuni emofilici producono una proteina FVIII che è parzialmente o totalmente inattiva. In questi casi, l'attività del Fattore VIII è bassa, ma i livelli di antigene sono normali o quasi normali. Questi pazienti, che comprendono circa il 5% dei malati di Emofilia A, sono definiti positivi al materiale a reazione crociata (CRM, cross-reacting material).⁸ La produzione di anticorpi neutralizzanti il Fattore VIII si verifica anche nel 5-20% di emofilici.^{9,10}

La diagnosi di laboratorio della deficienza di Fattore VIII implica in genere calcoli quantitativi basati sui livelli procoagulanti (attività funzionale del Fattore VIII misurata in genere tramite prova di coagulazione). Nella diagnosi e nella classificazione è anche possibile utilizzare i sintomi emorragici clinici; la misurazione quantitativa della procoagulazione, tuttavia, rimane il metodo preferito per la classificazione della gravità dell'emofilia.⁷ È possibile ricorrere alla tecnica ELISA per l'antigene Fattore VIII in combinazione con dosaggi funzionali per la valutazione delle terapie di sostituzione, la valutazione dello stato del portatore, nonché per distinguere quei pazienti destinati a essere CRM positivi (positivi al materiale a reazione crociata).

PRINCIPIO DI IMMUNODOSAGGIO ENZIMATICO

I micropozzetti a striscia sono prerivestiti di un anticorpo policlonale di pecora del Fattore VIII umano. I campioni di plasma vengono diluiti e applicati ai pozzetti. L'antigene Fattore VIII presente si lega all'anticorpo rivestito. Dopo aver rimosso il materiale che non è stato legato, viene applicato l'anticorpo di pecora di rilevamento marcato con perossidasi affinché si leghi al Fattore VIII catturato. I pozzetti vengono nuovamente lavati, dopodiché viene applicata una soluzione di TMB (tetrametilbenzidina che è un substrato per la perossidasi) e lasciata reagire per un periodo di tempo stabilito. Si sviluppa un colore blu che vira in giallo a seguito del quenching della reazione con acido. Il colore che si forma viene misurato spettrofotometricamente in un lettore di micropiastre a 450 nm. L'assorbanza a 450 nm è direttamente proporzionale alla quantità di l'antigene Fattore VIII catturato sul pozzetto. Il dosaggio viene calibrato mediante il plasma di calibrazione fornito nel kit.

REAGENTI

A. Descrizione degli elementi reagenti

Elemento 1: Sacchetto di alluminio contenente 6 strisce, ognuna delle quali contiene 16 pozzetti rivestiti di anticorpo di pecora del Fattore VIII umano.

Elemento 2: 2 fiale di plasma di calibrazione, ognuna liofilizzata da 1 mL di plasma.

Elemento 3: 2 fiale di plasma di controllo A, ognuna liofilizzata, da 1 mL di plasma.

Elemento 4: 2 fiale di plasma di controllo B, ognuna liofilizzata, da 1 mL di plasma.

Elemento 5: 1 fiala contenente 50 mL di tampone di lavaggio concentrato (20X).

Elemento 6: 3 fiale, ognuna delle quali contiene 20 mL di tampone di diluizione del campione concentrato (2X).

Elemento 7: 1 fiala contenente 12 mL di anticorpo di pecora marcato con perossidasi per il rilevamento.

Elemento 8: 1 fiala contenente 12 mL di substrato di tetrametilbenzidina (TMB).

Elemento 9: 1 fiala contenente 12 mL di soluzione di arresto (acido solforico 0.2 M).

B. Avvertenze

Il kit è destinato a essere utilizzato da personale che ha ricevuto una formazione specifica sulle procedure di laboratorio e sulle precauzioni universali relative all'impiego di sostanze chimiche e sostanze a rischio biologico elevato. Alcuni elementi contengono materiale di origine umana. Ciascuna delle unità di plasma utilizzate per la preparazione del prodotto è stata testata ed è risultata negativa per la sifilide HbsAg e per gli anticorpi dell'HIV e dell'HCV e non reattiva per l'HIV-1-rNA e HCV rNA, secondo i metodi approvati dalla FDA. Tuttavia, nessun test può garantire totalmente che i prodotti derivati dal sangue umano non trasmetteranno malattie infettive. Come tutti i materiali di origine umana, questo prodotto deve essere manipolato come materiale potenzialmente infetto.

La tetrametilbenzidina (TMB) è un substrato che presenta una ridotta tossicità, tuttavia è necessario adottare delle precauzioni per evitare il contatto diretto. È consigliabile utilizzare guanti e occhiali protettivi. La soluzione di arresto contiene acido solforico diluito (0,2 M), che è corrosivo. È consigliabile utilizzare guanti e occhiali protettivi. Lo smaltimento dei rifiuti deve essere svolto in conformità alle normative locali in vigore.

Per la scheda di sicurezza di questo prodotto, si prega di contattare Affinity Biologicals Inc.

C. Preparazione dei reagenti

Elemento 1 (strisce rivestite di anticorpo con supporto): Aprire il sacchetto ed estrarre le strisce e il supporto appena prima dell'uso. Riporre nel sacchetto e risigillare le strisce non utilizzate. Le strisce possono essere utilizzate direttamente, vedere la sezione C: Procedura di dosaggio.

Elemento 2 (plasma di calibrazione): Ricostituire una fiala con 1,0 mL di acqua distillata. Attendere 15 minuti per la dissoluzione del contenuto a temperatura ambiente miscelando occasionalmente. La stabilità dopo la ricostituzione è di 4 ore a temperatura ambiente (18-25°C) o 30 giorni a -20°C.

Elementi 3 e 4 (plasma di controllo): Ricostituire una fiala di ogni plasma con 1,0 mL di acqua distillata. Attendere 15 minuti per la dissoluzione del contenuto a temperatura ambiente miscelando occasionalmente. La stabilità dopo la ricostituzione è di 4 ore a temperatura ambiente (18-25°C) o 30 giorni a -20°C.

Elemento 5 (tampone di lavaggio concentrato (20X)): Attendere che la fiala si riscaldi a temperatura ambiente prima dell'uso. Prima di procedere, assicurarsi che eventuali cristalli che si possono formare vengano dissolti. Se necessario, è possibile scaldare la fiala a 37°C finché tutti i cristalli non siano dissolti. Prima dell'uso diluire il tampone di 1/20. Ogni 2 strisce (32 pozzetti), aggiungere 16 mL di tampone a 304 mL di acqua distillata e miscelare. La stabilità dopo la diluizione è di 1 settimana a 2-8°C.

Gli elementi 6-9 vengono forniti pronti all'uso.

D. Conservazione e stabilità

I kit intatti e i reagenti non ricostituiti sono stabili fino alla data di scadenza indicata sulla confezione e sulle etichette dei singoli reagenti se conservati a 2-8°C.

PRELIEVO DI CAMPIONI

Il sangue deve essere raccolto in provette con soluzione anticoagulante al 3,2% di tampone citrato nella proporzione di 9 volumi di sangue in 1 volume di soluzione anticoagulante e miscelato con cautela per inversione. Centrifugare a una velocità minima di 1500 x g per 15 minuti (CLSI Guideline H21-A5¹¹). Rimuovere il plasma sopranatante e utilizzarlo entro 4 ore oppure congelarlo a -20°C o temperature inferiori per un massimo di 1 mese.

PROCEDURA

A. Materiale fornito

Sacchetto di alluminio contenente 6 strisce di pozzetti rivestiti di anticorpo.

Plasma di calibrazione, liofilizzato.

Plasma di controllo A, liofilizzato.

Plasma di controllo B, liofilizzato.

Tampone di lavaggio concentrato (20X).

Diluente del campione.

Soluzione di un anticorpo di rilevamento.

TMB Substrato.

Soluzione di arresto.

Sigillante adesivo per piastre.

B. Materiale aggiuntivo necessario (non fornito)

Acqua distillata per la ricostituzione e la diluizione

Pipette a singolo canale a volume variabile

Pipette multicanale

Puntali per pipette

Timer da laboratorio

Strumento di lavaggio delle micropiastre a pozzetti

Spettrofotometro compatibile con micropiastre con capacità pari a 450 nm.

C. Procedura di dosaggio

NOTE PROCEDURALI:

- Ricostituire i reagenti come descritto in REAGENTI, Sezione C, Preparazione dei reagenti. Attendere che i reagenti si riscaldino a temperatura ambiente prima dell'uso.
- È consigliabile analizzare in duplicato tutte le diluizioni di calibrazione, di controllo e dei campioni di prova e predisporre per ogni analisi un tampone bianco (vedere la sezione Calibrazione del dosaggio).
- Tutte le diluizioni devono essere effettuate immediatamente prima dell'uso.
- Evitare sempre che i pozzetti secchino. Mantenere coperta la piastra durante le incubazioni.
- I campioni di plasma non devono essere utilizzati con diluizioni inferiori a 1/4.
- Non utilizzare componenti del kit con numeri di lotto diversi.
- Temperature di incubazione superiori o inferiori alla temperatura ambiente normale (18 -25°C) possono causare risultati imprecisi.
- Non utilizzare componenti del kit scaduti
- Le strisce usate devono essere eliminate e non riutilizzate.

Preparazione delle diluizioni di plasma di calibrazione: Diluire il plasma di calibrazione (Elemento 2 ricostituito) nel diluente campione (Elemento 6) come descritto nella Tabella 1 seguente:

TABELLA 1:

Diluizione	Plasma di calibrazione	Diluente campione
100%**	175 µL	525 µL
50%	350 µL di 100%	350 µL
25%	350 µL di 50%	350 µL
12,5%	350 µL di 25%	350 µL
6,25%	350 µL di 12,5%	350 µL
3,13%	350 µL di 6,25%	350 µL
1,56%	350 µL di 3,13%	350 µL
0,79%	350 µL di 1,56%	350 µL

(NOTA: 100% = 1,0 IU/mL)

**Fare riferimento al flacone di plasma del calibratore (elemento 2) per il valore antigene FVIII da usare come concentrazione della diluizione iniziale del plasma del calibratore. Ad esempio, se il calibratore ha un valore assegnato di 1,25 IU/ml, seguire lo stesso schema di diluizione indicato in precedenza ma chiamare il primo punto della curva di calibrazione 1,25 IU/ml.

Il **Plasma di controllo A** (Elemento 3 ricostituito) e i **plasma destinati ai test** sono diluiti 1/8 e 1/16. Aggiungere 100 µL di plasma in 700 µL di diluente campione (Elemento 6), miscelare, quindi aggiungere 350 µL di questa diluizione 1/8 in 350 µL di diluente campione per ottenere la soluzione diluita 1/16. Il **Plasma di controllo B** (Elemento 4 ricostituito) e i campioni a basso contenuto di l'antigene Fattore VIII (campioni emofilici) devono essere analizzati a diluizioni più basse di 1/4 e di 1/8. Aggiungere 175 µL di plasma in 525 µL di diluente del campione (Elemento 6), miscelare, quindi aggiungere 350 µL di questa soluzione diluita 1/4 in 350 µL di diluente del campione per ottenere la soluzione diluita 1/8.

Dosaggio

PREPARAZIONE DELLA PIASTRA	Inserire il numero desiderato di strisce nel supporto.	
FASE	Pipetta in ogni pozzetto prerivestito:	
CATTURA FVIII	Campione destinato ai test (analizzare in duplicato)	100 µL
	Coprire le strisce con il sigillante per piastre e incubare per 1 ora a temperatura ambiente.	
Svuotare i pozzetti e lavarli 3 volte con 300 µL di tampone di lavaggio diluito.		
ANTICORPO DI RILEVAMENTO	Soluzione di un anticorpo di rilevamento (Elemento 7)	100 µL
	Coprire le strisce con il sigillante per piastre e incubare per 45 minuti a temperatura ambiente.	
Svuotare i pozzetti e lavarli 3 volte con 300 µL di tampone di lavaggio diluito.		
SVILUPPO DEL COLORE	Substrato di TMB (Elemento 8)	100 µL
	Attendere lo sviluppo del colore per 10 minuti esatti a temperatura ambiente.	
	Soluzione di arresto (Elemento 9)	100 µL (Aggiungere a ogni pozzetto nello stesso ordine in cui era stata aggiunta la TMB)
Leggere la piastra a una lunghezza d'onda di 450 nm entro 30 minuti dall'aggiunta della soluzione di arresto Se necessario, conservare il supporto della piastra per utilizzarlo con pozzetti non usati. Smaltire i pozzetti usati.		

CALIBRAZIONE

A. Calibrazione del dosaggio

Il valore dell'antigene Fattore VIII indicato sulla fiala di plasma di calibrazione è stato determinato eseguendo un confronto con uno standard secondario attribuibile allo standard internazionale WHO per dell'antigene del Fattore

VIII. Questo valore dell'antigene deve essere utilizzato come concentrazione della diluizione iniziale del plasma di calibrazione.

È consigliabile sottrarre i valori relativi ai pozzetti che hanno ricevuto solo diluente del campione anziché campione diluito.

B. Curva di riferimento e calcolo dei risultati

La curva di riferimento è un tracciato logaritmo-logaritmo dei valori medi di assorbanza (asse y) rispetto alla concentrazione di l'antigene Fattore VIII (asse x). Il contenuto di l'antigene Fattore VIII dei controlli e dei campioni di prova può essere letto dalla curva di riferimento e moltiplicato per il fattore di diluizione appropriato. Nelle condizioni qui descritte, un campione diluito di 1/4 presenterà un fattore di diluizione di 1, una diluizione di 1/8 presenterà un fattore di diluizione di 2 e una diluizione di 1/16 presenterà un fattore di diluizione di 4.

Esempio: Se diluito di 1/8, il plasma destinato ai test offre un'assorbanza corrispondente al 45% quando letto dalla curva di riferimento. Questo valore

deve essere moltiplicato per un fattore di diluizione di 2 per ottenere il valore corretto del 90%.

CONTROLLO QUALITÀ

I plasmidi di controllo forniti (Elementi 3 e 4) devono essere dosati con ogni serie di campioni analizzati. I valori di Fattore VIII l'antigene ottenuti per i campioni destinati ai test devono essere considerati sospetti se i valori ottenuti per i plasma di controllo non rientrano nell'intervallo indicato sulle etichette del plasma di controllo.

LIMITAZIONI E INTERFERENZE

I valori dell'antigene Fattore VIII ottenuti utilizzando questo dosaggio non devono essere utilizzati da soli per la diagnosi della malattia. È altresì opportuno considerare l'anamnesi del paziente, la presentazione clinica e i risultati di altre procedure diagnostiche. Sono noti stadi clinicamente significativi in cui i livelli dell'antigene Fattore VIII del plasma sono normali o quasi normali in presenza di una sostanziale riduzione dell'attività del Fattore VIII.⁸

Il kit è stato sviluppato per essere utilizzato con plasma citrato. Non è consigliabile utilizzare campioni contenenti anticoagulanti diversi dal citrato di sodio al 3,2%.

Non sono state riscontrate interferenze nel dosaggio dovute alla presenza di farmaci o di anticorpi eterofili quali il Lupus Anticoagulant (LA); tuttavia, non è possibile escludere completamente l'insorgenza di interferenze dovute a livelli elevati di anticorpi eterofili. La presenza del fattore reumatoide nei campioni destinati ai test causerà interferenze nel dosaggio. La possibilità teorica che campioni destinati ai test contengano anticorpi dell'immunoglobina di pecora può essere causa di interferenze nel dosaggio.

VALORI PREVISTI

L'intervallo normale del Fattore VIII, come indicato nella letteratura, è 0,5-1,8 IU/mL.¹² Ogni laboratorio dovrebbe determinare un intervallo normale in modo indipendente; tuttavia i risultati di tre lotti misurati in 99 individui sani indicano un intervallo di riferimento normale di 0,64-1,89 IU/mL (media = 1,268 IU/mL, SD = 0,3116).

PRESTAZIONI

A. Specificità

Il dosaggio misura l'antigene Fattore VII nel plasma umano, i concentrati di Fattore VIII a scopo terapeutico e preparazioni di Fattore VIII ricombinanti.

B. Limite di rilevamento

Quando il dosaggio viene eseguito secondo quanto indicato nella Sezione C Procedura di dosaggio, il limite di rilevamento è 0,008 IU/mL (0,8 %) di l'antigene del Fattore VIII. Il limite superiore di rilevamento può variare con ciascun lotto di kit a seconda del valore dosato del plasma di calibrazione fornito nel kit. I campioni con valori non compresi nell'intervallo della curva di riferimento devono essere nuovamente testati a una diluizione appropriata per ottenere risultati accurati.

C. Confronto dei metodi:

I risultati medi dei tre lotti del kit dell'antigene Fattore VIII *VisuLize™* sono stati confrontati internamente al dosaggio FVIII Coamatic® su 142 campioni di pazienti contenenti livelli di Fattore VIII che coprono l'intero intervallo di rilevamento. Il coefficiente di correlazione (r) è stato di 0,970 (R² = 0,940, y = 1,2059x + 0,1053). Il kit dell'antigene Fattore VIII *VisuLize™* è stato inoltre

confrontato, presso due laboratori di test esterni, al dosaggio FVIII Coamatic® su campioni di pazienti contenenti livelli di Fattore VIII che coprono l'intero intervalo di rilevamento. Presso il laboratorio esterno 1, sono stati testati 110 campioni e il coefficiente di correlazione (r) è stato di 0,969 ($R^2 = 0,9381$ y = $1,2261x + 0,1085$). Presso il laboratorio esterno 2, sono stati testati 81 campioni e il coefficiente di correlazione (r) è stato di 0,974 ($R^2 = 0,9488$, y = $1,1768x + 0,0242$).

D. Precisione

Precisione intra-assay. Metodo 1: In ognuno dei tre lotti di prodotto, campioni di plasma normali e anormali sono stati testati in 4 dosaggi con 38 replicati per campione per piastra. Il coefficiente medio di variazione (CV) di tutti i risultati era 4,56%

Precisione intra-assay. Metodo 2: Tre plasmis con concentraciones diverse di Fattore VIII sono stati testati nei replicati con 8 replicati in 20 dosaggi utilizzando 3 lotti di prodotto. Il coefficiente intra-assay di variazione (CV) è stato calcolato secondo la direttiva NCCLS Guideline EP5-A¹³ ed è indicato nel riepilogo seguente per ogni livello di l'antigene Fattore VIII. Il valore CV medio di tutti i risultati ottenuti con questo metodo era 4,51%.

	Lotto 1	Lotto 2	Lotto 3
1,35-1,75 IU/mL di campione	2,17%	2,85%	3,89%
0,6-0,9 IU/mL di campione	2,85%	3,33%	5,19%
<0,055 IU/mL di campione	5,23%	6,83%	8,25%

Precisione inter-assay: Tre plasmis con concentraciones diverse di l'antigene Fattore VIII sono stati testati con 8 replicati in 20 dosaggi utilizzando 3 lotti di prodotto. Il coefficiente inter-assay di variazione (CV) è stato calcolato secondo la direttiva NCCLS Guideline EP5-A¹³ ed è indicato nel riepilogo seguente per ogni livello di Fattore VIII. Il valore CV medio di tutti i risultati ottenuti con questo metodo è stato del 4,69%.

	Lotto 1	Lotto 2	Lotto 3
1,35-1,75 IU/mL di campione	2,12%	3,92%	4,11%
0,6-0,9 IU/mL di campione	1,63%	3,19%	7,30%
<0,055 IU/mL di campione	6,79%	5,49%	7,71%

E. Variabilità tra lotti

94 campioni di controllo con valori di l'antigene Fattore VIII compresi nell'intervallo tra 0,23 e -2,3 IU/mL sono stati testati in duplicato su tre lotti per determinare la precisione del dosaggio da un lotto a un altro. La variabilità media tra lotti è stata del 7,78%.

Kit de antigene VisuLize™ FVIII

Immunoensayo enzimático de 96 test para la detección del antigene factor VIII (FVIII).

Para diagnóstico *in vitro*.

Ref. de producto FVIII-AG



Almacenar entre 2–8 °C. No congelar.

USO

El kit de antigene VisuLize™ FVIII es un immunoensayo enzimático para la determinación cuantitativa del antigene factor VIII en muestras de plasma humano y concentraciones de factor VIII mediante el ensayo inmuno-sorbente ligado a enzimas (ELISA).

RESUMEN

El factor VIII (anteriormente denominado globulina antihemofílica y factor VIII:C) es una glicoproteína de gran tamaño con un peso molecular de 320.000 daltons que circula en el plasma con una concentración de aproximadamente 200 ng/mL.^{1,2} El FVIII se estabiliza mediante la asociación con el factor von Willebrand para formar un complejo FVIII-vWF, necesario para la supervivencia normal del FVIII *in vivo* ($t_{1/2}$ de 8-12 horas)³. El FVIII es un pro-cofactor que se activa mediante la proteólisis limitada de la trombina. En este proceso, el FVIIIa se disocia del vWF para combinarse con el factor IX activado, calcio y una superficie fosfolipídica, donde es un cofactor esencial para la formación del complejo activador factor X^{4,5}. Una vez

disociado del vWF, el FVIIIa es susceptible de inactivación por la proteína C activada y por la descomposición no enzimática⁴.

La importancia biológica del factor VIII se demuestra en la hemofilia A, un trastorno hemorrágico congénito que se produce principalmente en varones y que es el resultado de una deficiencia de FVIII relacionada con un cromosoma X⁶. Se estima que la prevalencia de la hemofilia A está entre 1/5.000 y 1/10.000⁶. El grado de deficiencia está normalmente relacionado con la gravedad de la enfermedad. Las personas con una actividad de factor VIII <1% se clasifican como pacientes graves, con una actividad de factor VII entre el 1 y el 5% se clasifican como moderados, y con una actividad de factor VIII entre 5 y 40% como hemofílicos leves⁷. Algunos hemofílicos producen una proteína FVIII que es parcial o totalmente inactiva. En estos casos, la actividad del factor VIII es baja, pero los niveles de antígeno son normales o casi normales. Estos pacientes, que suponen aproximadamente un 5% de los pacientes con hemofilia A, se denominan positivos de reactivo cruzado (CRM)⁸. La producción de anticuerpos neutralizantes al FVIII también se da en un 5-20% de hemofílicos^{9,10}.

Para el diagnóstico en laboratorio de la deficiencia de factor VIII se requieren normalmente determinaciones cuantitativas basadas en niveles de procoagulante (actividad funcional del factor VIII medida normalmente mediante ensayo de coagulación). Los síntomas de sangrado clínico también se pueden utilizar en el diagnóstico y la clasificación, si bien la medición cuantitativa de procoagulante es el método preferido para la clasificación de la gravedad de la hemofilia⁷. Junto con los ensayos funcionales, se puede utilizar un ELISA para el antígeno del factor VIII para la evaluación de los tratamientos de sustitución del factor VIII, así como para la determinación del estado de portador y para distinguir aquellos pacientes que se pueden considerar positivos de reactivo cruzado (CRM).

PRINCIPIO DEL INMUNOENSAYO ENZIMÁTICO

Las tiras que contienen los pocillos están recubiertas de anticuerpos policlonales de oveja contra el factor VIII humano. Las muestras de plasma se diluyen y se introducen en los pocillos. El antígeno FVIII presente se conjuga con el revestimiento de anticuerpo. Tras lavar el material no conjugado, se aplica anticuerpo de detección de oveja con marcador de peroxidasa, que se conjugará con el antígeno FVIII capturado. Los pocillos se lavan otra vez y se aplica una solución de TMB (tetrametilbencidina sustrato peroxidasa) y se deja reaccionar durante un período de tiempo fijo. Aparece un color azul que cambia a amarillo al parar la reacción con ácido. El color que se forma se mide por espectrofotometría en un lector de microplacas a 450 nm. La absorbancia a 450 nm es directamente proporcional a la cantidad de FVIII capturado en el pocillo. El ensayo se calibra mediante el plasma calibrador incluido en el kit.

REACTIVOS

A. Descripción de los reactivos

Reactivo 1: Bolsa de papel de aluminio que contiene 6 tiras, cada una de ellas con 16 pocillos revestidos con anticuerpo de oveja contra el factor VIII humano.

Reactivo 2: 2 viales de plasma calibrador, cada uno de ellos liofilizado de 1 mL de plasma.

Reactivo 3: 2 viales de plasma control A, cada uno de ellos liofilizado de 1 mL de plasma.

Reactivo 4: 2 viales de plasma control B, cada uno de ellos liofilizado de 1 mL de plasma.

Reactivo 5: 1 vial que contiene 50 mL de concentrado de tampón de lavado de 20X.

Reactivo 6: 3 viales, cada uno de ellos con 20 mL de diluyente de muestra de tampón.

Reactivo 7: 1 vial que contiene 12 mL de anticuerpo de detección de oveja con marcador de peroxidasa.

Reactivo 8: 1 vial que contiene 12 mL de sustrato de tetrametilbencidina (TMB).

Reactivo 9: 1 vial que contiene 12 mL de solución de parada (ácido sulfúrico 0,2 M).

B. Precaución y advertencia

Este kit está destinado para su uso por personal con formación en procedimientos de laboratorio y seguridad en el laboratorio en el uso de sustancias químicas y con riesgo biológico potencial. Algunos reactivos contienen material de origen humano. Cada unidad de plasma utilizada en la preparación de este producto ha sido analizada según los métodos aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (FDA), y se ha comprobado que son negativas para el antígeno de superficie de hepatitis B (HbsAg), la sífilis y los anticuerpos del VIH y la HCV y que no son reactivas al ARN del HIV-1 y al ARN del HCV. Sin embargo, no existe ninguna prueba que pueda ofrecer una seguridad total de que los

productos derivados de sangre humana no transitan enfermedades infecciosas. Al igual que todos los materiales de origen humano, este producto se debe manipular como material potencialmente infeccioso.

La toxicidad del TMB sustrato (tetrametilbencidina) es leve, pero se deben adoptar precauciones para evitar un contacto directo. Se recomienda utilizar guantes y gafas de seguridad.

La solución de parada contiene ácido sulfúrico diluido (0,2 M), que es corrosivo. Se recomienda utilizar guantes y gafas de seguridad.

El desecho de materiales se debe realizar de acuerdo a la normativa local vigente.

Para la hoja de datos de seguridad de este producto, por favor póngase en contacto con Affinity Biologicals, Inc.

C. Preparación de los reactivos

Reactivo 1 (tiras recubiertas de anticuerpos con soporte): Justo antes de proceder a su utilización, abra la bolsa y retire las tiras y el soporte. Las tiras no utilizadas se deben volver a colocar en la bolsa, que se debe volver a sellar. Las tiras se pueden utilizar directamente, consultar la sección C del Procedimiento: Procedimiento de ensayo.

Reactivo 2 (plasma calibrador): Reconstituya un vial con 1,0 mL de agua de grado reactivo. Deje que el contenido se disuelva durante 15 minutos a temperatura ambiente, removiendo de vez en cuando. La estabilidad tras la reconstitución es de 4 horas a temperatura ambiente (18-25 °C) o 30 días a -20 °C.

Reactivos 3 y 4 (plasmas control): Reconstituya un vial de cada plasma con 1,0 mL de agua de grado reactivo. Deje que el contenido se disuelva durante 15 minutos a temperatura ambiente, removiendo de vez en cuando. La estabilidad tras la reconstitución es de 4 horas a temperatura ambiente (18-25 °C) o 30 días a -20 °C.

Reactivo 5 (concentrado de tampón de lavado 20X): Deje que el vial se atempere antes de proceder a su utilización. Antes de continuar, asegúrese de que los cristales que se puedan haber formado se hayan disuelto. Si fuese necesario, el vial se puede calentar a 37 °C hasta que se hayan

disuelto todos los cristales. Diluya el concentrado en una proporción 1/20 antes de proceder a su utilización. Añada 16 mL de concentrado a 304 mL de agua de grado reactivo por cada 2 tiras (32 pocillos) y mézclelos. La estabilidad tras la dilución es de 1 semana a 2-8 °C.

Los reactivos 6-9 se suministran listos para su uso.

D. Almacenamiento y estabilidad

Los kits cerrados y los reactivos sin reconstituir son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la caja y en la etiqueta de cada reactivo si se almacenan a una temperatura de 2-8 °C.

TOMA DE MUESTRAS

La sangre se recoge mediante tubos anticoagulantes que contienen tampón citrato al 3,2% en una proporción de 9 volúmenes de sangre por cada volumen de anticoagulante y se mezcla suavemente mediante inversión. Centrifúguelos a un mínimo de 1500 x g durante 15 minutos (según la indicación H21-A5 de CLSI)¹⁴. Retire el plasma sobrenadante y utilícelo en las 4 horas siguientes; también puede congelarlo a una temperatura inferior a -20 °C durante un período máximo de 1 mes.

PROCEDIMIENTO

A. Material proporcionado

Bolsa de papel de aluminio que contiene 6 tiras de pocillos recubiertos de anticuerpos.

Plasma calibrador, liofilizado.

Plasma control A, liofilizado.

Plasma control B, liofilizado.

Concentrado de tampón de lavado 20X.

Diluyente de muestra.

Solución de anticuerpos de detección.

Sustrato TMB.

Solución de parada.

Sellador de placas adhesivo.

B. Material adicional requerido (pero no suministrado)

Agua de grado reactivo para reconstitución y dilución

Pipetas monocal con ajuste de volumen

Pipetas multicanal

Puntas de pipeta

Temporizador de laboratorio

Dispositivo para el lavado de microplacas/tiras de pocillos

Espectrofotómetro de microplacas compatible con una longitud de onda de 450 nm.

C. Procedimiento de ensayo

NOTAS SOBRE EL PROCEDIMIENTO:

- Reconstituya los reactivos de la manera indicada en REACTIVOS, Sección C, "Preparación de los reactivos". Deje que los reactivos se atemperen antes de proceder a su utilización.
- Se recomienda realizar por duplicado todas las diluciones de muestras de análisis, calibración y control, y que cada una incluya una muestra tampón blanco (consulte la sección Calibración del ensayo).
- Todas las diluciones se deben realizar justo antes de proceder a su utilización en el ensayo.
- No deje que se sequen los pocillos en ningún momento. Mantenga cubiertas las placas durante las incubaciones.
- Las muestras de plasma no se deben aplicar a diluciones inferiores al 1/4.
- No utilice componentes del kit con distintos números de lote.
- Las temperaturas de incubación superiores o inferiores a la temperatura ambiente normal (18 - 25 °C) pueden afectar a la exactitud de los resultados.
- No utilice componentes del kit que hayan caducado.
- Las tiras utilizadas se deben desechar y no se pueden volver a utilizar.

Preparación de las diluciones de plasma calibrador: Diluya el plasma calibrador (reactivo reconstituido 2) en el diluyente de muestra (reactivo 6) de la manera indicada en la tabla 1 siguiente:

TABLA 1:

Dilución	Plasma calibrador	Diluyente de muestra
100%**	175 µL	525 µL
50%	350 µL de 100%	350 µL
25%	350 µL de 50%	350 µL
12.5%	350 µL de 25%	350 µL
6.25%	350 µL de 12,5%	350 µL
3.13%	350 µL de 6,25%	350 µL
1.56%	350 µL de 3,13%	350 µL
0.79%	350 µL de 1,56%	350 µL

(NOTA: 100% = 1,0 IU/mL)

**Consulte el vial del plasma de control (elemento 2) para conocer el valor del antígeno FVIII que se debe utilizar como concentración de la dilución inicial del plasma de control. Por ejemplo, si el plasma de control tiene un valor asignado de 1,25 IU/ml, siga el mismo esquema de dilución anterior pero utilice 1,25 IU/ml para el primer punto de la curva de calibrado.

El plasma de control A (elemento 3 reconstituido) y los **plasmas de análisis normales** se diluyen en proporción 1/8 y 1/16. Añada 100 µL de plasma a 700 µL de diluyente de muestras (elemento 6), mezcle y, a continuación, añada 350 µL de esta dilución 1/8 a 350 µL de diluyente de muestra para obtener la dilución 1/16. **El plasma de control B** (elemento 4 reconstituido) y las muestras de bajo contenido del antígeno FVIII (muestras hemofílicas) se deben analizar con diluciones inferiores en proporción 1/4 y 1/8. Añada 175 µL de plasma a 525 µL de diluyente de muestras (elemento 6), mezcle y, a continuación, añada 350 µL de esta dilución 1/4 a 350 µL de diluyente de muestra para obtener la dilución 1/8.

Ensayo

PREPARACIÓN DE LAS PLACAS	Colocar el número de tiras deseado en el soporte.	
PASO	Introducir con la pipeta en cada pocillo:	
CAPTURA DE FVIII	Analizar la muestra (por duplicado)	100 µL
	Tapar las tiras con el sellador de placas e incubar durante 1 hora a temperatura ambiente.	
Vaciar los pocillos y lavar 3 veces con 300 µL de tampón de lavado diluido.		

DETECCIÓN DE ANTICUERPOS	Solución de anticuerpos de detección (reactivo 7)	100 µL
	Tapar las tiras con el sellador de placas e incubar durante 45 minutos a temperatura ambiente.	
Vaciar los pocillos y lavar 3 veces con 300 µL de tampón de lavado diluido.		
DESARROLLO DEL COLOR	Sustrato TMB (reactivo 8)	100 µL
	Dejar que se desarrolle el color durante exactamente 10 minutos a temperatura ambiente.	
	Solución de parada (reactivo 9)	100 µL (Añadir a cada pocillo en el mismo orden en que se añadió el TMB)
Realizar una lectura de la placa con una longitud de onda de 450 nm en los 30 minutos siguientes a la adición de la solución de parada. Si fuese necesario, conservar el soporte de placas para utilizarlo con las tiras restantes que no se hayan utilizado. Desechar las tiras utilizadas.		

CALIBRACIÓN

A. Calibración del ensayo

El valor de antígeno FVIII indicado en el vial del plasma de calibración se ha determinado mediante comparación con un estándar secundario del que se puede realizar un seguimiento conforme al estándar internacional de la OMS para el antígeno de factor VIII. Este valor del antígeno se debe utilizar como concentración de la dilución inicial del plasma de calibración.

Se recomienda eliminar la placa en los pocillos que tengan diluyente de muestra solo en lugar de muestra diluida (pocillos de reactivo en blanco).

B. Curva de referencia y cálculo de resultados

La curva de referencia es un gráfico de registro de los valores de absorbancia medios (eje y) frente a la concentración de antígeno factor VIII (eje x). El contenido del antígeno factor VIII de las muestras del análisis y de

los controles se puede leer a partir de la curva de referencia y multiplicar por el factor de dilución adecuado. En las condiciones descritas aquí, una muestra diluida en una proporción 1/4 tendrá un factor de dilución de 1, una dilución de 1/8 tendrá un factor de dilución de 2, y una dilución de 1/16 tendrá un factor de dilución de 4.

Ejemplo: El plasma de análisis con dilución 1/8 tiene una absorbancia correspondiente al 45% de la lectura de la curva de referencia. Este valor se multiplicaría por un factor de dilución de 2 para obtener el valor corregido de 90%.

CONTROL DE CALIDAD

El plasma control suministrado (reactivos 3 y 4) se debe analizar con todas las series de muestras que se realicen. Los valores del antígeno FVIII obtenidos para las muestras de ensayo se deben considerar dudosos si los valores obtenidos para el plasma de control se encuentran fuera del rango indicado en las etiquetas del plasma control.

LIMITACIONES E INTERFERENCIAS

Los valores del antígeno factor VIII obtenidos mediante este ensayo no se deben utilizar aisladamente para el diagnóstico de enfermedades. Se deben tener en cuenta también el historial del paciente, el cuadro clínico y los resultados de otros procedimientos de diagnóstico. Se sabe que existen estados clínicamente significativos en los que los niveles plasmáticos de antígeno factor VIII son normales o casi normales en presencia de una reducción significativa de la actividad del factor VIII⁸.

Este kit se ha desarrollado para su uso con plasma citrato. No se recomienda utilizar muestras con un contenido de anticoagulante que no sea citrato sódico al 3,2%.

Aunque no se han comunicado interferencias en el ensayo debidas a la presencia de fármaco o de anticuerpos heterofílicos de tipo anticoagulante de lupus (LA), no se puede excluir la posibilidad de interferencia de niveles elevados de anticuerpos heterofílicos. La presencia de factor reumatoide en las muestras de análisis interferirá en el ensayo. La posibilidad teórica de analizar muestras que contengan anticuerpos contra la inmunoglobulina de oveja también puede interferir en el ensayo.

VALORES ESPERADOS

El rango normal del factor VIII indicado en la literatura es de 0,5-1,8 UI/mL¹². Cada laboratorio debe determinar un rango normal de manera independiente, pero los resultados de tres lotes medidos en 99 individuos sanos indican un intervalo de referencia normal de 0,64-1,89 UI/mL (media = 1,268 UI/mL, SD = 0,3116).

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

A. Especificidad

Este ensayo mide el antígeno factor VIII en plasma humano, concentraciones terapéuticas de factor VIII y preparaciones recombinantes de factor VIII.

B. Límite de detección

Si se realiza el ensayo de la manera indicada en la sección C, Procedimiento de ensayo, el límite de detección del mismo es de 0,008 UI/mL (0,8 %) de factor VIII. El límite de detección superior puede variar en cada lote, en función del valor analizado del plasma calibrador suministrado con el kit. Las muestras con valores fuera del rango de la curva de referencia se deberían volver a analizar en la dilución adecuada para poder obtener resultados precisos.

C. Comparación del método:

Los resultados medios de tres lotes del kit de antígeno *VisuLize™* Factor VIII se compararon internamente con el ensayo Coamatic® FVIII en 142 muestras de pacientes con niveles de factor VIII en todo el rango de detección. El coeficiente de correlación (r) fue 0,970 ($R^2 = 0,940$, $y = 1,2059x + 0,1053$). El kit de antígeno *VisuLize™* Factor VIII también se comparó en dos laboratorios externos con el ensayo Coamatic® FVIII en muestras de pacientes con niveles de factor VIII en todo el rango de detección. En el laboratorio externo nº 1 se analizaron 110 muestras y el coeficiente de correlación (r) obtenido fue 0,969 ($R^2 = 0,9381$, $y = 1,2261x + 0,1085$). En el laboratorio externo nº 2 se analizaron 81 muestras y el coeficiente de correlación (r) obtenido fue 0,974 ($R^2 = 0,9488$, $y = 1,1768x + 0,0242$).

D. Precisión

Precisión intraensayo, método 1: Se analizaron muestras de plasma normales y anormales en un total de 4 ensayos en cada uno de los tres lotes, con 38 repeticiones por muestra y placa. El coeficiente de variación media (CV) de todos los resultados fue de 4,56%

Precisión intraensayo, método 2: Se analizaron tres muestras de plasma con distintas concentraciones del antígeno factor VIII en repeticiones de 8 en 20 análisis con 3 lotes de producto. El coeficiente de variación intraensayo (CV) se calculó según las indicaciones EP5-A de NCCLS¹³, cuyos resultados se indican en el resumen siguiente para cada nivel de factor VIII. La media del CV de todos los resultados de este método fue de 4,51%.

	Lote 1	Lote 2	Lote 3
Muestra de 1,35-1,75 UI/mL	2,17%	2,85%	3,89%
Muestra de 0,6-0,9 UI/mL	2,85%	3,33%	5,19%
Muestra <0,055 UI/mL	5,23%	6,83%	8,25%

Precisión interensayo: Se analizaron tres muestras de plasma con distintas concentraciones del antígeno factor VIII en repeticiones de 8 en 20 análisis con 3 lotes de producto. El coeficiente de variación interensayo (CV) se calculó según las indicaciones EP5-A de NCCLS¹³, cuyos resultados se indican en el resumen siguiente para cada nivel de factor VIII. La media del CV de todos los resultados de este método fue de 4,69%.

	Lote 1	Lote 2	Lote 3
Muestra de 1,35-1,75 UI/mL	2,12%	3,92%	4,11%
Muestra de 0,6-0,9 UI/mL	1,63%	3,19%	7,30%
Muestra <0,055 UI/mL	6,79%	5,49%	7,71%

E. Variabilidad entre lotes

Para determinar la precisión del ensayo entre lotes se analizaron por duplicado 94 muestras de control con valores de factor VIII entre 0,23 y 2,3 UI/mL en tres lotes. La variabilidad media entre lotes fue de 7,78%.

REFERENCES/REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES/ LITERATURHINWEISE/BIBLIOGRAFIA/REFERENCIAS

- Pittman, D.D., Kaufman, R.J. Structure-Function Relationships of Factor VIII Elucidated through Recombinant DNA Technology. *Thromb. Haemostas.*, 61(2), pp. 161-165, 1989.
- Hoyer LW, Wyshock EG, Colman RW, "Coagulation Cofactors: Factor V and VIII" in Hemostasis and Thrombosis, 3rd Edition, eds. RW Colman, J Hirsh, VJ Marder and EW Salzman, pp. 109-133, J.B. Lippincott Co., Philadelphia, 1994.
- Brettler, D.B., Levine, P.H., "Clinical Manifestations and Therapy of Inherited Coagulation Factor Deficiencies" in Hemostasis and Thrombosis, 3rd Edition, eds. RW Colman, J Hirsh, VJ Marder and EW Salzman, pp. 169-183, J. B. Lippincott Co., Philadelphia, 1994.
- Lenting, P.J., van Mourik, J.A., Mertens, K. The Life Cycle of Coagulation Factor VIII in View of its Structure and Function. *Blood*, 92(11), pp. 3983-3996, 1998.
- Furie B, Limentani SA, Rosenfield CG. A Practical Guide to the Evaluation and Treatment of Hemophilia, Blood, 1994, 84(1), pp. 3-9.
- Hedner, U., Ginsburg, D., Lusher, J.M., High, K. A. Congenital Hemorrhagic Disorders: New Insights into the Pathophysiology and Treatment of Hemophilia. *Hematology*, pp. 241- 290, 2000.
- White GC, Rosendaal F, Aledort LM, Lusher JM, Rothschild C, Ingerslev J. Definitions in Hemophilia, Recommendation of the Scientific Subcommittee on Factor VIII and Factor IX of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Thrombosis and Haemostasis, 2001, 85, p. 560.
- Amano, K., Sarkar, R., Perberton, S., Kembell-Cook, G., Kazazian, H.H., Kaufman, R.J. The Molecular Basis for Cross-Reacting Material-Positive Hemophilia A Due to Missense Mutations Within the A2-Domain of Factor VIII. *Blood*, 91(2), pp. 538-548, 1998.
- Feinstein, D.I., in Hemostasis and Thrombosis, 3rd Edition, eds. RW Colman, J Hirsh, VJ Marder and EW Salzman, pp. 881-905, J.B. Lippincott Co., Philadelphia, 1994.
- Bhopale, G.M., Nanda, R.K., Blood Coagulation Factor VIII: An overview, *J. Biosci*, 28(6), 783-789, 2003.
- "Collection, Transport and Processing of Blood Specimens for Coagulation Testing and General Performance of Coagulation Assays, Approved Guideline, Third Edition. H21-A5, CLSI, Vol. 28. No. 55, 2008.
- Kasper, C.K., Hereditary Clotting Factor Deficiencies and Their Management, 2005, Monograph.
- "Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices; Approved Guideline", EP5-A, NCCLS, Vol. 19, No. 2, Feb. 1999.
- "Medical Devices. Symbols to be used with medical device labels, labeling and information to be supplied. General Requirements", EN ISO 15223-1:2016, European Committee for Standardization, 2016.

SYMBOL LEGEND ¹⁴/LEGENDE DES SYMBOLES ¹⁴

SYMBOLLEGENDE ¹⁴/LEGENDA DEI SIMBOLI ¹⁴

LEYENDAS DE SÍMBOLOS ¹⁴



For *in vitro* diagnostic use/Pour utilisation diagnostique *in vitro*/für *In-Vitro*-Diagnose/Per uso diagnostico *in vitro*/Para uso en diagnóstico *in vitro*



Batch code/Code du lot/Chargencode/Codice lotto/Código de lote



Authorized Representative/Représentant agréé/Autorisierter Vertreter/Rappresentante autorizzato/Representante autorizado



Expiry date/Date d'expiration/Verfallsdatum/Data di scadenza/Fecha de caducidad



Catalogue Number/Référence du catalogue/Katalognummer/Numero di catalogo/Número de catálogo



Temperature limitation/Limite de température/Temperaturgrenzwert/Limite di temperatura/Limite de temperatura



Manufacturer/Fabricant/Hersteller/Produttore/Fabricante



Consult instructions for use/Consulter le mode d'emploi/Gebrauchsanleitung konsultieren/Consultare le istruzioni per l'uso/Consultar las instrucciones de uso



Contains sufficient for <n> tests/Contient suffisamment de réactif pour <n> tests/Inhalt ausreichend für <n> Tests/Contiene reagente sufficiente per <n> test/Contiene material suficiente para <n> análisis



Biological Risks/Risques biologiques/Biologische Risiken/Rischio Biológico/Riesgos biológicos



Corrosive/Corrosif/Korrosiv/Corrosivo/Corrosivo



Health Hazard/ Risque pour la santé/Gesundheitsgefährdung/ Pericolo per la salute/Peligro para la salud

Limited Warranty: This product is warranted to perform in accordance with its labelling and literature. Affinity Biologicals Inc. disclaims any implied warranty of merchantability or fitness for any other purposes, and in no event will Affinity Biologicals Inc. be liable for any consequential damages arising out of aforesaid express warranty.

Limite de garantie: Ce produit est garanti pour une utilisation conforme à son étiquetage et à la documentation qui l'accompagne. Affinity Biologicals Inc. n'offre aucune garantie implicite quant à l'adéquation de ce produit à tout autre usage ou à la commercialisation, et Affinity Biologicals Inc. ne pourra en aucun cas être tenue responsable de dommages indirects survenant dans le cadre de la garantie expresse susmentionnée.

Eingeschränkte Gewährleistung: Für dieses Produkt wird eine Gewährleistung entsprechend Kennzeichnung und Fachliteratur zugesichert. Affinity Biologicals Inc. lehnt jede indirekte Haftung für die Eignung zu einem bestimmten Zweck oder die Handelbarkeit ab; in keinem Fall haftet Affinity Biologicals Inc. für Folgeschäden, die aus der oben erwähnten ausdrücklichen Gewährleistung entstehen.

Garanzia limitata: Si garantisce che il prodotto funzionerà in base a quanto stabilito nella documentazione e sulle etichette. Affinity Biologicals Inc. non riconosce alcuna garanzia implicita di commerciabilità o idoneità per ogni altro scopo e in nessun caso Affinity Biologicals Inc. potrà essere ritenuta responsabile di eventuali danni consequenziali connessi alla garanzia espressa di cui sopra.

Garantía limitada: Se garantiza el rendimiento de este producto de acuerdo a su etiquetado y literatura. Affinity Biologicals Inc. no ofrece ninguna garantía para su comercialización o adaptación para cualquier otro fin y no será responsable en ningún caso de ningunos daños y perjuicios excepto en los casos indicados en la garantía expresa anterior.



AFFINITY BIOLOGICALS INC.
1348 Sandhill Drive
Ancaster, ON
CANADA L9G 4V5
Tél : (905) 304-9896
(800) 903-6020
Fax : (905) 304-9897
info@affinitybiologicals.com



Emergo Europe
Westervoortsedijk 60
6827 AT Arnhem
The Netherlands