Der Inhalt dieses Dokuments dient lediglich als Beispiel, die aktuellste Version senden wir gerne zu: info@coachrom.com.
The content of this document is an example only. You may request the latest version at: info@coachrom.com

PrecisionBioLogic

IVD

CRYO*check*™ Factor VIII Inhibitor Kit

Verwendungszweck

Der CRYO*check* FVIII Inhibitor Kit wird in klinischen Laboratorien verwendet und dient, in Verbindung mit einem Aktivitätstest, der Durchführung eines modifizierten Nijmegen-Bethesda-Assay in humanem Plasma (3,2% Citrat). Der Test ermöglicht die Messung eines funktionalen Inhibitor-Titers und unterstützt damit das klinische Management von erblicher Hämophilie A bei Personen über als zwei Jahren. Zur Verwendung in der In-Vitro-Diagnostik.

Zusammenfassung

Der FVIII Inhibitor Kit dient der Vorbereitung von Proben für den modifizierten Nijmegen-Bethesda-Assay wie er von Zentren für Seuchenkontrolle und -prävention (Centers for Disease Control and Prevention, CDC) verwendet wird[1]. Inhibitoren des Blutgerinnungsfaktors VIII (FVIII) sind Antikörper, welche die FVIII-Aktivität auf zeit- und temperaturabhängige Art und Weise neutralisieren können. In der CDC-Modifizierung des Nijmegen-Bethesda-Assays wird, um den endogenen FVIII zu inaktivieren aber eventuell vorhandene FVIII Inhibitor Antikörper intakt zu lassen, das Probenplasma mit Hitze behandelt. Das derart inaktivierte Probenplasma wird anschließend mit einer exogenen FVIII-Quelle (Imidazol-gepuffertem, gepooltem Normalplasma) inkubiert. Während dieser Inkubation neutralisiert eventuell vorhandener FVIII-Inhibitor, sofern vorhanden, den FVIII. Durch die Standardisierung der hinzugefügten FVIII-Menge und der Inkubationszeit kann im Vergleich zu einer Kontrollmischung die Inhibitoraktivität im Probenplasma bestimmt werden. Zu diesem Zweck wird mit einem Faktor VIIIAktivitätstest die Menge des nicht-inhibierten Faktor VIII gemessen[2].

FVIII Inhibitor Tests werden zur Identifizierung und Überwachung von FVIII Inhibitor Antikörpern verwendet, welche aufgrund einer FVIII-Substitutionstherapie bei der Behandlung von Personen mit Hämophilie A auftreten können. Die Anwesenheit von Inhibitoren kann zum Verlust der Wirksamkeit von bestimmten Therapien führen, sodass die Erkennung und Überwachung der Inhibitoraktivität im klinischen Management von Hämophilie A Patienten wichtig ist.

Im Kit enthaltene Reagenzien

Produkt	Katalog-Nr.	5 Röhrchensets, jedes Set mit folgendem Inhalt
FVIII Inhibitor Kit	CCIK08	IB-PNP 2 x 1,5 ml (blauer Deckel) IB-BSA 2 x 1,5 ml (oranger Deckel) Negative FVIII Inhibitor Kontrolle 1 x 0,5 ml (grüner Deckel) Positive FVIII Inhibitor Kontrolle 1 x 0,5 ml (roter Deckel)

Bereitgestelltes Material

Imidazol-gepuffertes, gepooltes Normalplasma (IB-PNP): Gepooltes Normalplasma von mindestens 20 Spendern mit einem FVIII-Aktivitätswert von 95–113 % mit Imidazol auf einen pH-Wert von 7,3–7,5 gepuffert.

Imidazol-gepuffertes Rinderserumalbumin (IB-BSA): 4%ige BSA-Lösung mit Imidazol auf einen pH-Wert von 7,3–7,5 gepuffert.

Negative Faktor VIII Inhibitor Kontrolle: Gepooltes Normalplasma von mindestens fünf Spendern mit HEPES auf einen pH-Wert von 6,2–8,2 gepuffert.

Positive Faktor VIII Inhibitor Kontrolle: HEPES-gepuffertes (pH-Wert von 6,2–8,2) immundepletiertes FVIII Mangelplasma mit zugesetztem Anti-Human FVIII-Antikörper.

Alle Blutprodukte sollten als potenziell infektiös behandelt werden. Das Ausgangsmaterial, aus welchem dieses Produkt gewonnen wurde, war beim Test in Übereinstimmung mit den aktuellen von der FDA (US-Behörde für Lebens- und Arzneimittel) geforderten Tests negativ. Kein bekanntes Prüfverfahren bietet Gewissheit, dass von menschlichem Blut abgeleitete Produkte keine Infektionserreger übertragen. Dementsprechend sollten diese Produkte gemäß Empfehlungen für potenziell infektiöse Humanproben gehandhabt und entsorgt werden[3].

Gebrauch durch Fachpersonal

Erforderliche Materialien, die nicht im Kit enthalten sind

- Wasserbad mit einer stabilen Temperatur von 56 °C (± 1 °C)
- Wasserbad mit einer stabilen Temperatur von 37 °C (± 1 °C)
- Halterung für das Auftauen von Röhrchen im Wasserbad
- Zentrifuge
- Eisbad
- Manuelles oder automatisches Gerinnungsmessgerät
- FVIII-Aktivitätstest und zugehörige Kalibrations- und Kontrollplasmen
- Kunststoff-Teströhrchen mit Kappen (z. B. 12 x 75 mm)
- Gerinnungs-Reaktionsküvetten
- Mikropipette zum Pipettieren von 200 µl
- Stoppuhr

Aufbewahrung, Vorbereitung und Handhabung

Bei Aufbewahrung bei -70 °C oder niedriger ist der CRYO*check* Factor VIII Inhibitor Kit bis zum Ende des Monats, der auf der Produktverpackung ausgewiesen ist, stabil.

Tauen Sie ein Röhrchen pro Patientenprobe (siehe Beschreibung der Röhrchensets in der Tabelle *Im Kit enthaltene Reagenzien*) bei 37 °C (± 1 °C) unter Verwendung einer Auftauhalterung (separat erhältlich) in einem Wasserbad auf. Die Auftauzeiten sind wichtig und sollten strikt befolgt werden. **Von der Verwendung von Trockenbädern oder Heizblöcken zum Auftauen wird abgeraten.** Es wird empfohlen, eine Stoppuhr zu verwenden. Empfohlene Auftauzeiten für unterschiedliche Aliquot-Größen befinden sich in der Auftautabelle. Schwenken Sie jedes Röhrchen vorsichtig vor der Verwendung.

Auftautabelle	
Aliquot-Größe	**37 °C (± 1 °C) Wasserbad**
1,5 ml	5 Minuten
0,5 ml	3 Minuten

Der CRYO*check* FVIII Inhibitor Kit kann bis zu vier Stunden nach der Vorbereitung verwendet werden. Wenn der Kit nicht verwendet wird, sollte er mit aufgebrachtem Deckel in den Originalröhrchen bei 2 bis 8 °C aufbewahrt werden. Lassen Sie vor dem Gebrauch gekühlte Komponenten auf Raumtemperatur (18 bis 25 °C) aufwärmen und schwenken die Röhrchen dann vorsichtig.

***NB: Die Bestandteile des** CRYO*check Factor VIII Inhibitor Kits sind chargenspezifisch und sollten nicht mit anderen Chargennummern vermischt werden.*

Instrumente

Jedes Labor sollte die Instrumente vor Ort in Übereinstimmung mit den Gebrauchsanweisungen des Herstellers vorbereiten.

Verfahren

Probenentnahme und Vorbereitung

Patientenproben sollten in 105–109 mmol/l Natriumcitrat-Dihydrat-Gerinnungshemmern (3,2 %) in einem Verhältnis von 9 Teilen Blut zu einem Teil Gerinnungshemmer entnommen werden, entsprechend den Richtlinien des Clinical Laboratory Standards Institutes (Institut für klinische Laborstandards, CLSI)[4]. Das Patientenplasma wird durch Zentrifugation bei 1500 x g für 15 Minuten, wodurch ein thrombozytenarmes Plasma (<10.000 Thrombozyten/µl) gewonnen wird, erhalten und sollte innerhalb von vier Stunden nach der Entnahme getestet werden, sofern es bei 2 bis 4 °C aufbewahrt wird. Falls die Proben nicht innerhalb von vier Stunden getestet werden, sollte das Plasma von den Zellen entfernt werden. Eskann bei -20 °C bis zu zwei Wochen, oder bei -70 °C bis zu 12 Monate, eingefroren werden. Proben sollten vor dem Testen maximal zweimal gefroren und aufgetaut werden.

Testverfahren

1. Bereiten Sie die Reagenzien Ihres CRYO*check* Factor VIII Inhibitor Kits gemäß den Anweisungen zu Aufbewahrung, Vorbereitung und Handhabung weiter oben vor. Bereiten Sie ein Röhrchen pro Patientenprobe vor (siehe *Im Kit enthaltene Reagenzien*). Achten Sie darauf, die Röhrchentypen streng zu separieren, um mögliche Fehler bei der Probenvorbereitung zu vermeiden.
2. Bereiten Sie das Gerinnungsmessgerät gemäß den Anweisungen des Herstellers vor.
3. Bereiten Sie den FVIII-Aktivitätstest gemäß den Anweisungen des Herstellers vor.
4. Hitzeinaktivierung der Testproben (Patientenprobe, positive FVIII Inhibitor Kontrolle und negative FVIII Inhibitor Kontrolle):
   a. Inkubieren Sie die Testproben 30 Minuten in einem Wasserbad bei 56 °C, um den in der Plasmaprobe vorhandenen FVIII vor dem Test zu inaktivieren.
   b. Zentrifugieren Sie die Testproben fünf Minuten bei Raumtemperatur bei 2700 x g und übertragen Sie den Überstand in gekennzeichnete Röhrchen.
5. Bereiten Sie aus den hitzeinaktivierten Testproben Verdünnungen vor (Patientenprobe, positive FVIII Inhibitor Kontrolle und negative FVIII Inhibitor Kontrolle). Siehe *Tabelle zur Verdünnung der Testproben* unten:
   - Patientenproben, bei denen ein FVIII-Inhibitor erwartet wird, werden mit IB-BSA verdünnt. So erstellen Sie eine Probe mit einer annähernd 50%igen FVIII-Restaktivität (siehe Definition unter *Ergebnisse und Auswertung* weiter unten).
   - Die positive FVIII Inhibitor Kontrolle wird mit IB-BSA verdünnt, um eine annähernd 50%ige FVIII-Restaktivität zu erreichen.
   - Die negative FVIII Inhibitor Kontrolle erfordert keine Verdünnung und sollte im unverdünnten Zustand getestet werden.

Tabelle zur Verdünnung der Testproben

Probe/Kontrolle	Röhrchen	Teströhrchen	IB-BSA	Testprobe / Probenverdünnung	IB-PNP
Kontrollmischung	1	Kontrollmischung	0,20 ml		0,20 ml
Negative FVIII Inhibitor Kontrolle	1	Rein		0,20 ml der negativen Kontrolle	0,20 ml
Positive FVIII Inhibitor Kontrolle	1	Rein		0,20 ml der positiven Kontrolle	0,20 ml
	2*	½	0,20 ml	0,20 ml der positiven Kontrolle	0,20 ml
Testprobe	1	Rein		0,20 ml der Probe	0,20 ml
	2	½	0,20 ml	0,20 ml der Probe	0,20 ml
	3	¼	0,20 ml	0,20 ml von Röhrchen 2	0,20 ml
	8*	1/128	0,20 ml	0,20 ml von Röhrchen 7	0,20 ml

*0,20 ml nach dem Mischen von IB-BSA mit der Testprobe und vor der Zugabe von IB-PNP entsorgen

*Hinweis: Dies ist nur ein **Beispielprofil** einer schrittweisen Verdünnung. Verdünnungen sollten zu einer Restaktivität von 50 % bereitet werden.*

6. Bereiten Sie Testmischungen vor (Patientenprobe, positive FVIII Inhibitor Kontrolle und negative FVIII Inhibitor Kontrolle):
   a. Bereiten Sie eine Mischung von 1:1 von jeder unverdünnten Testprobe und IB-PNP vor (Testmischung).
      Bereiten Sie eine Mischung von 1:1 von jeder Verdünnung jeder Testprobe (sofern zutreffend) mit IB-PNP.
      Die Zugabe von IB-PNP sichert eine konstante Menge an FVIII für jede Testmischung.
   b. Schwenken Sie das Röhrchen vorsichtig fünf Mal zum Vermischen.
7. Vorbereiten einer Kontrollmischung:
   a. Bereiten Sie eine 1:1 Kontrollmischung von IB-BSA und IB-PNP.
   b. Schwenken Sie das Röhrchen vorsichtig fünf Mal zum Vermischen.
8. Inkubieren Sie alle Testmischungen aus Schritt sechs sowie die in Schritt sieben vorbereiteten Kontrollmischungen bei 37 °C für zwei Stunden in einem Wasserbad. Wenn ein FVIII Inhibitor Antikörper vorhanden ist, wird dieser den FVIII neutralisieren, welcher der Testmischung als IB-PNP hinzugefügt wurde.
9. Geben Sie die Testmischungen und die Kontrollmischung nach den zwei Stunden Inkubation für 10 Minuten in ein Eisbad, um die Reaktion zu stoppen oder führen Sie sofort einen FVIII-Test durch.
10. Messen Sie die FVIII-Aktivität in allen Testmischungen und der Kontrollmischung mithilfe eines FVIII-Aktivitätstests in einem Gerinnungsmessgerät.

Ergebnisse und Auswertung

Die FVIII-Restaktivität wird in Bethesda-Einheiten (BU)/ml konvertiert, wobei eine BU als die Inhibitormenge definiert ist, die zu einer 50%igen FVIII-Restaktivität führt. Es gilt die folgende Formel: BU = [(2 – Log %RA) / 0,30103] x Verdünnungsfaktor.

Berechnen Sie die FVIII-Restaktivität (RA) mithilfe der folgenden Formel:

%RA = (Testmischung % FVIII-Aktivität / Kontrollmischung % FVIII-Aktivität) *100

Konvertieren Sie die FVIII-Restaktivität zu Bethesda-Einheiten (BU)/ml mithilfe der Formel:

BU = [(2 – Log %RA) / 0,30103] x Verdünnungsfaktor

Beispielsweise, 100 % RA = 0 BU/ml und 50 % RA = 1 BU/ml.

Auswertung

- Ergebnisse sollten in BU/ml angebeben werden
- Proben von ≥0,6 BU/ml gelten als positiv für den FVIII Inhibitor[5].

Qualitätskontrolle

Jedes Labor sollte seine eigenen Qualitätskontrollbereiche (QK-Bereiche) für FVIII-Aktivitätstests mithilfe anerkannter statistischer Verfahren definieren. Diese QK-Bereiche können dann zur Überwachung und Validierung der Integrität der Testsysteme verwendet werden[6]. Bei sämtlichen Gerinnungstests sollte das Labor mindestens zwei Kontrollebenen für jeweils acht Betriebsstunden sowie für jede Änderung der Reagenzien inkludieren.

Die Qualitätskontrolle des FVIII Inhibitor Kits ist durch die Verwendung der positiven Faktor VIII Inhibitor Kontrolle und der negativen FVIII Inhibitor Kontrolle in das Testsystem integriert. Diese Kontrollen sollten in jedem Testlauf zur Identifizierung möglicher Fehler bzw. zum Ausschluss von möglichen Reagenzienversagen inkludiert werden.

Erwartete Werte

Die zu erwarteten Werte für die Kontrollen des FVIII Inhibitor Kit sind wie folgt:
- **Negative** Faktor VIII Inhibitor Kontrolle: <0,6 BU/ml
- **Positive** Faktor VIII Inhibitor Kontrolle: ≥0,6 BU/ml

Siehe chargenspezifisches Zertifikat für diezu erwarteten Bereiche des CRYOcheck Faktor VIII Inhibitor Kits.

Interferenzen

Interferenzstudien wurden gemäß CLSI EP7-A2 mit einer einzelnen Charge des CRYO*check* FVIII Inhibitor Kits durchgeführt[8]. Patientenplasmaproben wurden mit möglichen Störsubstanzen versetzt, und 10 Wiederholungen wurden (zusammen mit 10 Wiederholungen der entsprechenden Leerwertmatrixkontrolle) getestet. Die folgenden Substanzen zeigten keine Interferenzen bis zu den ausgewiesenen Konzentrationen:

Getestete Substanz	Getestete Konzentration
Hämoglobin	≤ 500 mg/dL
Bilirubin	≤ 29 mg/dL
Intralipid	≤ 500 mg/dL
von Willebrand Faktor	≤ 20 µg/ml

Lupus Antikoagulans-Autoantikörper stören möglicherweise die Quantifizierung von FVIII Inhibitoren mit niedrigem Titer.

Ein Rheumafaktor von ≥ 82 IE/ml führte zu Störungen bei der Quantifizierung von FVIII Inhibitoren.

Leistungsmerkmale

Alle Studien wurden mithilfe des CRYO*check* FVIII Inhibitor Kits in Verbindung mit dem chromogenen Siemens FVIII Test auf Siemens BCS XP-Instrumenten durchgeführt.

Methodenvergleich: Um die Genauigkeit des CRYO*check* FVIII Inhibitor Kit mit einem Vergleichsgerät zu beurteilen[9], wurde eine Methodenvergleichsstudie an drei Standorten (eine intern, zwei extern) gemäß CLSI EP09c durchgeführt. Aliquotierte humane Plasmaproben von Personen mit erblicher Hämophilie A (N=210) wurden an die drei Standorte verteilt und mit der gleichen Chargennummer des CRYO*check* FVIII Inhibitor Kits getestet. Ein zweites Aliquot jeder Probe wurde in einem zentralen Referenzlabor mithilfe eines chromogenen Nijmegen-Bethesda-Assays mit CDC-Modifizierung getestet, das als validierter, im Labor entwickelter Test für das Siemens BCS XP-Instrument implementiert wurde. Die Daten zeigten eine positive Übereinstimmung von 100 % (95 % CI, 97–100 %) sowie eine negative Übereinstimmung von 99 % (95 % CI, 93–100 %):

		Ergebnisse des CRYO*check* FVIII Inhibitor Kit		
		Positiv	Negativ	Gesamt
Ergebnisse der Vergleichsmessung	Positiv	133	0	133
	Negativ	1	76	77
	Gesamt	134	76	210

Ergebnisse wurden per Passing-Bablok-Regressionsanalyse und Bland-Altman-Plot verglichen. Regressionsstatistiken zeigen, dass die Ergebnisse des CRYO*check* FVIII Inhibitor Kits der Vergleichsmethode entsprechen.

	N	Steigung		Schnittpunkt		Pearson-Korrelationskoeffizient
		Wert	95 % CI	Wert	95 % CI	
Standort 1	68	1,543	1,404, 1,660	-0,224	-0,434, -0,127	0,977 (r_2=0,954)
Standort 2	72	1,065	0,998, 1,190	-0,113	-0,138, -0,043	0,985 (r_2=0,969)
Standort 3	70	1,373	1,225, 1,455	-0,075	-0,159, -0,023	0,980 (r_2=0,960)
Gesamt	210	1,341	1,265, 1,406	-0,145	-0,180, -0,070	0,970 (r_2=0,940)

Absolute prognostizierte Verzerrungen auf medizinischen Entscheidungsebenen werden unten erfasst.

Titer (BU/ml)	Prognostizierte Verzerrungen (BU/ml)	Unterer CI-Wert (%)	Oberer CI-Wert (%)
0,6	-2,0	-4,8	0,8
1	-1,9	-4,6	0,9
5	-0,3	-3,0	2,5
10	1,7	-0,9	4,4

Leerwertgrenze, Nachweisgrenze und Quantifizierungsgrenze: Die Leerwert-Obergrenze (Limit of Blank, LoB) wurde gemäß der CLSI EP17-A2-Richtlinie bestimmt, indem vier Leer-Plasmaproben von normalen, gesunden Spendern gemessen wurden[10]. Proben wurden dreifach mithilfe von drei Chargen des CRYO*check* FVIII Inhibitor Kits über fünf Tage gemessen. Die ermittelte LoB lag bei 0,1 BU/ml.

Die Nachweisgrenze (Limit of Detection, LoD) wurde gemäß der CLSI EP17-A2-Richtlinie bestimmt, indem vier Plasmaproben mit niedrigem Titer von Spendern mit erblicher Hämophilie A gemessen wurden[10]. Proben wurden dreifach mithilfe von drei Chargen des CRYO*check* FVIII Inhibitor Kits über fünf Tage gemessen. Die ermittelte LoD lag bei 0,2 BU/ml.

Die Quantifizierungsgrenze (Limit of Quantification, LoQ) wurde gemäß der CLSI EP17–A2-Richtlinie bestimmt[10]. Aliquote jeder der in der LoD-Studie verwendeten Proben mit niedrigem Titer wurden auch zum Testen an ein externes Labor in drei Wiederholungen an drei verschiedenen Tagen geschickt, um die zugewiesenen Werte mithilfe eines validierten, vom Labor entwickelten Nijmegen-Bethesda-Assays mit CDC-Modifizierung zu ermitteln. Die ermittelte LoQ lag bei 0,2 BU/ml.

Linearität: Eine Linearitätsstudie wurde gemäß CLSI EP06-A mithilfe einer Charge des CRYO*check* FVIII Inhibitor Kits durchgeführt[11]. Faktor VIII Inhibitor positives Plasma von einem Patienten mit erblicher Hämophilie A wurde mit dem Plasma eines Patienten mit erblicher Hämophilie A kombiniert, das keinen FVIII Inhibitor aufwies, um 12 Probenverdünnungen mit geschätzten Titern von 0 bis 100 BU/ml zu erstellen. Eine erweiterte Linearitätsstudie, in der eine Serie von 18 Probenverdünnungen aus FVIII monoklonalen Antikörpern in immundepletierten FVIII Mangelplasma mit Titern im Bereich von 0 bis 1402,9 BU/ml getestet wurde, wurde ebenfalls durchgeführt. Die Ergebnisse dieser beiden Studien indizieren einen Linearitätsbereich von 0,2 bis 1402,9 BU/ml.

Präzision: Eine interne Präzisionsstudie mit drei unterschiedlichen Chargen des CRYO*check* FVIII Inhibitor Kits wurde von einem Betreiber eines Siemens BCS XP-Analysegeräts gemäß CLSI EP05-A3 durchgeführt[12]. Die Studie quantifizierte die positive Faktor FVIII Inhibitor Kontrolle und die negative Faktor FVIII Inhibitor Kontrolle des Kits sowie vier Plasmaproben von Patienten mit erblicher Hämophilie A, die negative, niedrige, mittlere und hohe Werte des FVIII Inhibitors aufwiesen. Der Test ermöglicht die Messung eines funktionalen Inhibitor-Titers und unterstützt damit das klinische Management von erblicher Hämophilie A bei Personen älter als zwei Jahre. Die Ergebnisse zeigten eine gepoolte CV Präzision von 8 % für die positiven Proben und 0,1 BU/ml für die negative Probe.

Probe	Mittelwert (BU/ml)	Präzision innerhalb des Labors	
		SD	%CV
Negative Plasmaprobe	0,3	0,1	29,0
Geringe Plasmaprobe	1,2	0,1	8,2
Mittlere Plasmaprobe	5,3	0,4	8,3
Hohe Plasmaprobe	8,6	0,7	8,4

Reproduzierbarkeit: Reproduzierbarkeitsstudien wurden an drei Standorten (einer intern und zwei extern) durch drei verschiedene Bediener an drei verschiedenen Siemens BCS XP-Analysegeräten mithilfe einer einzigen Charge des CRYO*check* FVIII Inhibitor Kits gemäß CLSI EP05-A3 durchgeführt. Die Studie quantifizierte die positive Faktor FVIII Inhibitor Kontrolle und die negative Faktor FVIII Inhibitor Kontrolle des Kits sowie vier Plasmaproben von Patienten mit erblicher Hämophilie A, die negative, niedrige, mittlere und hohe Werte des FVIII Inhibitors aufwiesen. Jede Probe wurde in dreifacher Ausführung, zweimal täglich für fünf Tage für insgesamt 30 Wiederholungen pro Probe und Standort gemessen. Die Daten der drei Standorte wiesen eine gepoolte Reproduzierbarkeit von ≤16 % für die positiven Proben und 0,1 BU/ml SD für die negative Plasmaprobeauf:

Probe	Mittelwert (BU/ml)	Innerhalb des Durchlaufs (Wiederholbarkeit)		Zwischen Durchläufen		Zwischen Tagen		Zwischen Standorten		Reproduzierbarkeit	
		SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV
Negative FVIII Inhibitor Kontrolle	0,0	0,1	399,4	0,0	138,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	422,7
Positive FVIII Inhibitor Kontrolle	1,8	0,2	8,9	0,1	3,3	0,1	3,4	0,2	12,4	0,3	16,0
Negative Plasmaprobe	0,3	0,1	26,9	0,0	0,0	0,0	9,0	0,0	2,2	0,1	28,4
Geringe Plasmaprobe	1,4	0,1	10,2	0,0	0,0	0,0	2,9	0,0	0,0	0,1	10,6
Mittlere Plasmaprobe	5,5	0,4	7,8	0,1	1,9	0,1	2,2	0,0	0,0	0,5	8,3
Hohe Plasmaprobe	9,6	0,7	7,8	0,4	4,0	0,3	3,4	0,9	9,2	1,3	13,2

Literaturverzeichnis

1. Miller CH, Platt SJ, Rice AS, et al. Validation of Nijmegen-Bethesda assay modifications to allow inhibitor measurement during replacement therapy and facilitate inhibitors surveillance. *J Thromb Haemostas.* 2012; 10:1055–61.
2. Verbruggen B, Novakova I, Wessels H, et al. The Nijmegen modification of the Bethesda assay for factor VIII:c inhibitors: improved specificity and reliability. *Thromb Haemost.* 1995; 73:247–51.
3. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories 5th ed. Centers for Disease Control and Prevention / National Institutes of Health, 2009.
4. CLSI. Collection, Transport, and Processing of Blood Specimens for Testing Plasma-Based Coagulation Assays and Molecular Hemostasis Assays; Approved Guideline-Fifth Edition. H21-A5. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA (USA); 2008.
5. Srivastava A, Brewer AK, Mauser-Bunschoten EP, Key NS, Kitchen S, Llinas A, et al. (2013). Guidelines for the Management of Hemophilia, 2nd Edition. *Haemophilia* 2013, 19 (1), e1-47.
6. Cembrowski GS, Carey RN. Laboratory Quality Management. ASCP Press 1989; 166-172.
7. CLIA 2004 – Code of Federal Regulations, 42CFR493.1253, 2004.
8. CLSI. Interference Testing in Clinical Chemistry; Approved Guideline-Second Edition. EP07-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA (USA); 2005.
9. CLSI. Measurement Procedure Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples. Third Edition. EP09c. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA (USA); 2018
10. CLSI. Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-Second Edition. EP17-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA (USA); 2012.
11. CLSI. Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures; A Statistical Approach; Approved Guideline. EP06-A Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA (USA); 2003.
12. CLSI. Evaluation of Precision of Quantitative Measurement Procedures; Approved Guideline – Third Edition. EP05-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA (USA); 2014.

EC REP

EMERGO EUROPE
Prinsessegracht 20
2514 AP The Hague
The Netherlands

CE

Verwendete Symbole

IFU.CCIK08.DE

REV 04 May 2021

IVD	LOT					EC REP	Rx ONLY
In-vitro-Diagnostikum	Charge	Haltbarkeit	Lager-temperatur	Biologische Risiken	Hersteller	Bevollmächtigter Vertreter in der EU	Nur gegen Rezept

Precision BioLogic Inc. • 140 Eileen Stubbs Avenue • Dartmouth, NS • B3B 0A9 • Kanada
Tel.: 1.800.267.2796 / +1.902.468.6422 • Fax 1.800.267.0796 / +1.902.468.6421 • www.precisionbiologic.com

CRYO*check*™ IVD
Factor VIII Inhibitor Kit

COA CHROM DIAGNOSTICA

Der Inhalt dieses Dokuments dient lediglich als Beispiel, die aktuelleste Version senden wir gerne zu: info@coachrom.com.
The content of this document is an example only. You may request the latest version at: info@coachrom.com

PrecisionBioLogic

CRYO*check*™

Factor VIII Inhibitor Kit

Intended Use

The CRYO*check* FVIII Inhibitor Kit is for clinical laboratory use in conjunction with a factor VIII activity assay to enable performance of a modified Nijmegen-Bethesda assay using 3.2% citrated human plasma. It enables the determination of a functional FVIII inhibitor titer to aid in the clinical management of congenital hemophilia A in individuals aged 2 years and older. For in vitro diagnostic use.

Summary and Principle

The FVIII Inhibitor Kit is used to prepare samples for the Centers for Disease Control and Prevention (CDC) modification of the Nijmegen-Bethesda assay[1]. Factor VIII (FVIII) inhibitors are antibodies that neutralize FVIII activity in a time and temperature dependent manner. In the CDC modification of the Nijmegen-Bethesda assay, a heat inactivation of the test plasma is performed to inactivate endogenous FVIII, leaving any FVIII inhibitor antibodies intact. The inactivated test plasma is then incubated with an exogenous FVIII source (Imidazole Buffered Pooled Normal Plasma), during which time FVIII inhibitor, if present, will progressively neutralize the FVIII. By standardizing the amount of FVIII added and the incubation time, the activity of the inhibitor in the test plasma can subsequently be determined according to how much of the added FVIII is inactivated relative to a control mixture as measured by a FVIII activity assay[2].

FVIII inhibitor testing is used to identify and monitor the presence of FVIII inhibitory antibodies that can occur because of the use of FVIII replacement therapies for treatment of persons with hemophilia A. The presence of inhibitors results in a loss of effectiveness of a particular therapy; thus, detecting and monitoring FVIII inhibitor activity is important in the clinical management of persons with hemophilia A.

Reagents and Availability

Product	Catalog #	5 Vial Sets, Each Set Containing
FVIII Inhibitor Kit	CCIK08	IB-PNP 2 x 1.5 mL (blue cap) IB-BSA 2 x 1.5 mL (orange cap) Negative FVIII Inhibitor Control 1 x 0.5 mL (green cap) Positive FVIII Inhibitor Control 1 x 0.5 mL (red cap)

Materials Provided

Imidazole Buffered Pooled Normal Plasma (IB-PNP): Pooled normal plasma from a minimum of 20 donors with a FVIII activity value of 95-113% and buffered with imidazole to a pH of 7.3-7.5.

Imidazole Buffered Bovine Serum Albumin (IB-BSA): A 4% BSA solution buffered with imidazole to a pH of 7.3-7.5.

Negative Factor VIII Inhibitor Control: Pooled normal plasma from a minimum of five donors buffered with HEPES to a pH of 6.2-8.2.

Positive Factor VIII Inhibitor Control: HEPES buffered (pH 6.2-8.2) immunodepleted FVIII deficient plasma to which anti-human FVIII antibodies have been added.

All blood products should be treated as potentially infectious. Source material from which this product was derived was found to be negative when tested in accordance with current FDA required tests. No known test methods can offer assurance that products derived from human blood will not transmit infectious agents. Accordingly, these human blood based products should be handled and discarded as recommended for any potentially infectious human specimen[3].

For prescription use only.

Materials Required but not Provided

- Waterbath capable of maintaining 56 °C (± 1 °C)
- Waterbath capable of maintaining 37 °C (± 1 °C)
- Floatie for thawing vials in waterbath
- Microcentrifuge
- Ice Bath
- Coagulation i nstrument or assay system
- FVIII activity assay and associated calibration and control plasmas as applicable
- Plastic test tubes with caps (e.g. 12 x 75 mm)
- Coagulation reaction cuvettes
- Micropipette capable of pipetting 200 µl
- Timer

Storage, Preparation and Handling

When stored at -70 °C or below, CRYO*check* Factor VIII Inhibitor Kit is stable to the end of the month indicated on the product packaging.

Thaw one vial set per patient sample (see *Reagents and Availability* table for vial set description) at 37 °C (± 1 °C) in a waterbath using the waterbath "floatie" thawing device (available separately). Thawing times are important and should be strictly adhered to. **The use of a dry bath or heating block for thawing is not recommended.** The use of a timer is recommended. Refer to the Thawing Table for recommended thawing times according to aliquot size. Invert each vial gently prior to use.

Thawing Table	
Aliquot Size	**37 °C (± 1 °C) Waterbath**
1.5 mL	5 minutes
0.5 mL	3 minutes

CRYO*check* FVIII Inhibitor Kit may be used for up to four hours after preparation. When not in use, CRYO*check* FVIII Inhibitor Kit should be capped in the original vials and maintained at 2 to 8 °C. Allow refrigerated components to acclimate to room temperature (18 to 25 °C) and invert gently prior to use.

NB: *CRYO*check *Factor VIII Inhibitor Kit components are lot-specific and should not be interchanged with other lot numbers.*

Instruments

Each lab should prepare the local instrument in accordance with the manufacturer's instructions for use.

Procedure

Specimen Collection and Preparation

Patient samples should be collected into 105 – 109 mmol/L sodium citrate dihydrate anticoagulant (3.2%) in a ratio of 9 parts blood to 1 part anticoagulant in accordance with the Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines[4]. Patient plasma is derived by centrifugation at 1500 x g for 15 minutes in order to achieve platelet-poor plasma (< 10,000 platelets/µL) and should be tested within four hours of collection when maintained at 2 to 4 °C. If samples are not to be tested within four hours, then plasma should be removed from the cells and frozen at -20 °C for up to two weeks or -70 °C for up to twelve months. Samples should not undergo more than two freeze-thaw cycles prior to testing.

Assay Procedure

1. Prepare CRYO*check* Factor VIII Inhibitor Kit reagents according to *Storage, Preparation and Handling* instructions above. Prepare one vial set per patient sample (see *Reagents and Availability*). Take extra care to ensure that vial types are kept separate to avoid potential sample preparation error.
2. Prepare instrument according to the manufacturer's instructions for use.
3. Prepare FVIII activity assay according to the manufacturer's instructions for use.
4. Heat inactivation of test samples (patient sample, Positive FVIII Inhibitor Control and Negative FVIII Inhibitor Control):
   a. Incubate test samples at 56 °C for 30 minutes in a waterbath to inactivate FVIII present in the plasma sample before testing.
   b. Centrifuge test samples at room temperature at 2700 x g for five minutes and transfer supernatant to appropriately labeled vials.
5. Prepare dilutions of heat inactivated test samples (patient sample, Positive FVIII Inhibitor Control, and Negative FVIII Inhibitor Control). See *Test Sample Dilution Table* below:
   - For patient sample, if a FVIII inhibitor is expected, test samples are diluted with IB-BSA to achieve a sample that is close to 50% residual FVIII activity (see *Results and Interpretation*, below, for definition).
   - The Positive FVIII Inhibitor Control is diluted with IB-BSA in order to achieve approximately 50% residual FVIII activity.
   - The Negative FVIII Inhibitor Control does not require dilution and should be tested neat.

Test Sample Dilution Table

Sample/Control	Vial	Test Vial	IB-BSA	Test Sample/ Sample Dilution	IB-PNP
Control Mix	1	Control mix	0.20 mL		0.20 mL
Negative FVIII Inhibitor Control	1	Neat		0.20 mL of Negative Control	0.20 mL
Positive FVIII Inhibitor Control	1	Neat		0.20 mL of Positive Control	0.20 mL
	2*	½	0.20 mL	0.20 mL of Positive Control	0.20 mL
Test Sample	1	Neat		0.20 mL of sample	0.20 mL
	2	½	0.20 mL	0.20 mL of sample	0.20 mL
	3	¼	0.20 mL	0.20 mL of vial 2	0.20 mL
	8*	1/128	0.20 mL	0.20 mL of vial 7	0.20 mL

*discard 0.20 mL after mixing IB-BSA with test sample and before adding IB-PNP

Note: This is an ***example only*** *of a serial dilution profile. Dilutions should be prepared until a residual activity of 50% is reached.*

6. Prepare test mixes (patient sample, Positive FVIII Inhibitor Control, and Negative FVIII Inhibitor Control):
   a. Prepare a 1:1 mix of each undiluted (neat) test sample and IB-PNP (test mix). Prepare a 1:1 mix of each dilution of each test sample (if applicable) with IB-PNP. The addition of IB-PNP provides a consistent amount of FVIII to each test mix.
   b. Invert vial gently five times to mix.
7. Prepare a control mix:
   a. Prepare a 1:1 control mix of IB-BSA and IB-PNP.
   b. Invert vial gently five times to mix.
8. Incubate all test mixes prepared in step six and control mix prepared in step seven at 37 °C for two hours in a waterbath. If a FVIII inhibitor antibody is present, it will neutralize the FVIII that was added to the test mix as IB-PNP.
9. After the two hour incubation, place the test mixes and the control mix in an ice bath for 10 minutes to halt the reaction or perform a FVIII assay immediately.
10. Measure FVIII activity in all test mixes and the control mix using a FVIII activity assay on a coagulation analyzer.

Results and Interpretation

Residual FVIII activity is converted to Bethesda Units (BU)/mL, with one BU defined as the amount of inhibitor that results in 50% residual FVIII activity, using the formula: BU = [(2 – Log %RA) / 0.30103] x dilution factor.

Calculate residual FVIII activity (RA) using the following formula:

%RA = (test mix % FVIII activity / control mix % FVIII activity) *100

Convert residual FVIII activity to Bethesda units (BU)/mL using the formula:

BU = [(2 – Log %RA) / 0.30103] x dilution factor

For example, 100% RA = 0 BU/mL and 50% RA =1 BU/mL.

Interpretation

- Results should be expressed in BU/mL
- Samples ≥ 0.6 BU/mL are considered positive for FVIII inhibitor[5].

Quality Control

Each laboratory should establish its own quality control (QC) ranges for FVIII activity assay using acceptable statistical methods. These QC ranges may then be used to monitor and validate the integrity of the testing system[6]. For all coagulation tests, the laboratory must include at least two levels of control for every eight hours of operation and any time a change in reagents occurs[7].

Quality control of the Factor VIII Inhibitor Kit is built into the test system by the inclusion of the Positive Factor VIII Inhibitor Control and the Negative FVIII Inhibitor Control. These controls should be included in each test run to help identify if errors or reagent failures have occurred.

Expected Values

Expected results for the FVIII Inhibitor Kit controls are as follows:

- Negative Factor VIII Inhibitor Control: < 0.6 BU/mL
- Positive Factor VIII Inhibitor Control: ≥ 0.6 BU/mL

Refer to the Assay Certificate for the expected ranges specific to each lot number of CRYO*check Factor VIII Inhibitor Kit.*

Interferences

Interference studies were conducted according to CLSI EP7-A2 using a single lot of CRYO*check* FVIII Inhibitor Kit[8]. Patient plasma samples were spiked with possible interferents and 10 replicates were tested alongside 10 replicates of the corresponding blank matrix control. The following substances showed no interference up to the concentrations indicated:

Substance Tested	Test Concentration
Hemoglobin	≤ 500mg/dL
Bilirubin	≤ 29mg/dL
Intralipid	≤ 500mg/dL
von Willebrand factor	≤ 20 µg/mL

Lupus anticoagulant autoantibodies may interfere with the quantification of low titer FVIII inhibitors.

Rheumatoid Factor at ≥ 82 IU/mL showed interference with the quantification of FVIII inhibitors.

Performance Characteristics

All studies were performed using the CRYO*check* FVIII Inhibitor Kit in conjunction with the Siemens FVIII chromogenic assay on Siemens BCS XP instruments.

Method Comparison: A method comparison study was conducted at three sites (one internal and two external) according to CLSI EP09c to compare the accuracy of the CRYO*check* FVIII Inhibitor Kit relative to a comparator device[9]. Aliquots of human plasma samples from individuals with congenital hemophilia A (N=210) were distributed across three sites and tested using a single lot of CRYO*check* FVIII Inhibitor Kit. A second aliquot of each sample was tested at a central reference laboratory using a chromogenic CDC-Modified Nijmegen-Bethesda Assay that has been implemented as a validated Laboratory-Developed Test on a Siemens BCS XP instrument. The data demonstrated positive agreement of 100% (95% CI, 97-100%) and negative agreement of 99% (95% CI, 93-100%), as summarized below.

		CRYO*check* FVIII Inhibitor Kit results		
		Positive	**Negative**	**Total**
Comparator device results	**Positive**	133	0	133
	Negative	1	76	77
	Total	134	76	210

Results were compared by Passing-Bablok regression analysis and Bland-Altman plots. Regression statistics show that the CRYO*check* FVIII Inhibitor Kit performed equivalently to the comparator method.

	N	Slope		Intercept		Pearson Correlation Coefficient
		Value	95% CI	Value	95% CI	
Site 1	68	1.543	1.404, 1.660	-0.224	-0.434, -0.127	0.977 (r^2=0.954)
Site 2	72	1.065	0.998, 1.190	-0.113	-0.138, -0.043	0.985 (r^2=0.969)
Site 3	70	1.373	1.225, 1.455	-0.075	-0.159, -0.023	0.980 (r^2=0.960)
Overall	210	1.341	1.265, 1.406	-0.145	-0.180, -0.070	0.970 (r^2=0.940)

Absolute predicted biases at medical decision levels are reported below.

Titer (BU/mL)	Predicted Bias (BU/mL)	Lower CI (%)	Upper CI (%)
0.6	-2.0	-4.8	0.8
1	-1.9	-4.6	0.9
5	-0.3	-3.0	2.5
10	1.7	-0.9	4.4

Limit of Blank, Limit of Detection and Limit of Quantification: The limit of blank (LoB) was determined following the CLSI EP17-A2 guideline by measuring four blank plasma samples obtained from normal healthy donors[10]. Samples were measured in triplicate using three lots of CRYO*check* FVIII Inhibitor Kit over five days. The LoB was determined to be 0.1 BU/mL.

The limit of detection (LoD) was determined following the CLSI EP17-A2 guideline by measuring four low titer plasma samples obtained from congenital hemophilia A donors[10]. Samples were measured in triplicate using three lots of CRYO*check* FVIII Inhibitor Kit over five days. The LoD was determined to be 0.2 BU/mL.

The limit of quantitation (LoQ) study was determined according to the CLSI EP17- A2 guideline[10]. Aliquots of each low titer sample used in the LoD study were sent to an external laboratory for testing in three replicates on three different days to determine assigned values using a validated, laboratory-developed, CDC-modified Nijmegen-Bethesda assay. The LoQ was determined to be 0.2 BU/mL.

Linearity: A linearity study was conducted in accordance with CLSI EP06-A using one lot of CRYO*check* FVIII Inhibitor Kit[11]. Factor VIII inhibitor positive plasma from a congenital hemophilia A patient was combined with congenital hemophilia A patient plasma containing no FVIII inhibitor to create twelve sample dilutions with estimated titers in the range of 0 to 100 BU/mL. An expanded linearity study was also conducted, in which a series of eighteen sample dilutions comprised of FVIII monoclonal antibody in immunodepleted FVIII deficient plasma with titers in the range of 0 to 1402.9 BU/mL were tested. The results of these two studies support a linearity range of 0.2 to 1402.9 BU/mL.

Precision: An internal precision study was performed using three different lots of CRYO*check* FVIII Inhibitor Kit by one operator on a Siemens BCS XP analyzer in accordance with CLSI EP05-A3[12]. The study quantified the kit's Positive Factor VIII Inhibitor Control and Negative Factor VIII Inhibitor Control as well as four plasma samples from congenital hemophilia A patients representing negative, low, mid and high levels of FVIII inhibitor. Each sample was measured with each product lot in duplicate, twice a day for 20 days for a total of 80 replicates per sample per lot. The results demonstrated a pooled precision of 8% CV for the positive samples and 0.1 BU/mL SD for the negative sample.

Sample	Mean Value (BU/mL)	Within-Laboratory Precision	
		SD	%CV
Negative Plasma Sample	0.3	0.1	N/A
Low Plasma Sample	1.2	0.1	8.2
Mid Plasma Sample	5.3	0.4	8.3
High Plasma Sample	8.6	0.7	8.4

Reproducibility: Reproducibility studies were conducted at three sites (one internal and two external) by three different operators on three different Siemens BCS XP analyzers using a single lot of CRYO*check* FVIII Inhibitor Kit in accordance with CLSI EP05-A3. The study quantified the kit's Positive Factor VIII Inhibitor Control and Negative Factor VIII Inhibitor Control as well as four plasma samples from congenital hemophilia A patients representing negative, low, mid and high levels of FVIII inhibitor. Each sample was measured in triplicate, twice a day for five days for a total of 30 replicates per sample per site. The data across three sites demonstrated a pooled reproducibility of ≤ 16% CV for the positive samples and 0.1 BU/mL SD for the negative plasma sample as summarized below.

Sample	Mean Value (BU/mL)	Within-Run (Repeatability)		Between-Run		Between-Day		Between-Site		Reproducibility	
		SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV
Negative FVIII Inhibitor Control	0.0	0.1	N/A	0.0	N/A	0.0	N/A	0.0	N/A	0.1	N/A
Positive FVIII Inhibitor Control	1.8	0.2	8.9	0.1	3.3	0.1	3.4	0.2	12.4	0.3	16.0
Negative Plasma Sample	0.3	0.1	N/A	0.0	N/A	0.0	N/A	0.0	N/A	0.1	N/A
Low Plasma Sample	1.4	0.1	10.2	0.0	0.0	0.0	2.9	0.0	0.0	0.1	10.6
Mid Plasma Sample	5.5	0.4	7.8	0.1	1.9	0.1	2.2	0.0	0.0	0.5	8.3
High Plasma Sample	9.6	0.7	7.8	0.4	4.0	0.3	3.4	0.9	9.2	1.3	13.2

CRYO*check*™

Factor VIII Inhibitor Kit

Utilisation du produit
Le CRYO*check* FVIII Inhibitor Kit est destiné à être utilisé en laboratoire clinique conjointement à un test de détermination de l'activité du facteur VIII (FVIII) pour procéder à un dosage Bethesda-Nijmegen modifié avec du plasma humain citraté à 3,2 %. Il permet de déterminer le titre d'inhibiteurs du FVIII fonctionnel pour contribuer à la prise en charge clinique de l'hémophilie A congénitale chez les personnes de deux ans et plus. Destiné à un usage diagnostic in vitro.

Résumé et principe
Le FVIII Inhibitor Kit sert à la préparation d'échantillons pour le dosage Bethesda-Nijmegen modifié des CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*)[1]. Les inhibiteurs du facteur VIII (FVIII) sont des anticorps qui neutralisent l'activité du FVIII de façon dépendante du temps et de la température. Dans la version modifiée des CDC du dosage Bethesda-Nijmegen, une inactivation par la chaleur du plasma testé est menée pour inactiver le FVIII endogène tout en gardant les anticorps inhibiteurs du FVIII intacts. Le plasma testé inactivé est ensuite incubé avec une source de FVIII exogène (plasma normal issu d'un pool de plasma tamponné à l'imidazole). Pendant l'incubation, si des inhibiteurs du FVIII sont présents, ils neutralisent alors progressivement le FVIII. En normalisant la quantité de FVIII ajoutée et la durée d'incubation, l'activité de l'inhibiteur dans le plasma testé peut ensuite être déterminée d'après la quantité de FVIII ajouté qui est inactivée par rapport à un mélange témoin selon un dosage de l'activité du FVIII[2].

Le dosage des inhibiteurs du FVIII sert à déterminer et à surveiller la présence d'anticorps inhibiteurs du FVIII qui peut se produire en raison de l'utilisation de traitements de remplacement du FVIII dans le traitement des personnes atteintes d'hémophilie A. La présence d'inhibiteurs mène à la perte d'efficacité d'un traitement donné. C'est pourquoi, il est important de détecter et de surveiller l'activité des inhibiteurs du FVIII dans la prise en charge clinique des personnes atteintes d'hémophilie A.

Réactifs et disponibilité

Produit	N° de catalogue	Ensembles de 5 flacons, chaque ensemble contenant ce qui suit :
FVIII Inhibitor Kit	CCIK08	IB-PNP 2 x 1,5 mL (bouchon bleu) IB-BSA 2 x 1,5 mL (bouchon orange) Contrôle négatif en inhibiteurs du FVIII 1 x 0,5 mL (bouchon vert) Contrôle positif en inhibiteurs du FVIII 1 x 0,5 mL (bouchon rouge)

Matériel fourni
Mélange de plasmas normaux tamponné à l'imidazole (IB-PNP) : Plasma normal issu d'un pool de plasma d'un minimum de 20 donneurs avec une valeur d'activité du FVIII de 95 % à 113 % et tamponné à l'imidazole à un pH de 7,3 à 7,5.
Albumine sérique bovine tamponnée à l'imidazole (IB-BSA) : Solution d'albumine sérique bovine à 4 % tamponnée à l'imidazole à un pH de 7,3 à 7,5.
Contrôle négatif en inhibiteurs du facteur VIII : Plasma normal issu d'un pool de plasma d'un minimum de cinq donneurs et tamponné à l'HEPES à un pH de 6,2 à 8,2.
Contrôle positif en inhibiteurs du facteur VIII : Plasma déficitaire en FVIII, immunodéplété et tamponné à l'HEPES (pH 6,2 – 8,2) avec ajout d'anticorps anti-FVIII humain.

Tous les produits sanguins doivent être considérés comme potentiellement infectieux. La matière première dont ce produit est dérivé a obtenu un résultat négatif aux tests actuellement requis par la FDA. Aucune méthode de test connue ne peut garantir que les produits dérivés de sang humain ne transmettront pas d'agents infectieux. C'est pourquoi ces produits à base de sang humain doivent être manipulés et jetés comme recommandé pour les spécimens humains potentiellement infectieux[3].

Uniquement sur ordonnance.

Matériel requis non inclus
- Un bain-marie pouvant maintenir une température de 56 °C (± 1 °C)
- Un bain-marie pouvant maintenir une température de 37 °C (± 1 °C)
- Un flotteur pour décongeler les flacons dans le bain
- Une microcentrifugeuse
- Un bain de glace
- Un instrument ou un système de test pour la coagulation
- Un test de détermination de l'activité du FVIII et les produits plasmatiques témoins et de calibration associés, le cas échéant
- Des tubes à essai en plastique munis de bouchons (p. ex. 12 x 75 mm)
- Des cuvettes pour les réactions de coagulation
- Une micropipette permettant de pipetter 200 µl
- Un minuteur

Entreposage, préparation et manipulation
Le CRYO*check* Factor VIII Inhibitor Kit est stable jusqu'à la fin du mois inscrit sur l'emballage du produit lorsqu'il est entreposé à – 70 °C ou moins.

Ne décongeler qu'un ensemble de flacons par échantillon de patient (voir le tableau *réactifs et disponibilité* pour la description de l'ensemble de flacons) dans un bain à 37 °C (± 1 °C) et en utilisant le dispositif de décongélation « flotteur » pour le bain (non compris dans l'ensemble). La durée de la décongélation est importante et doit être scrupuleusement respectée. **Il n'est pas recommandé d'utiliser un bain à sec ou un bloc chauffant pour la décongélation.** L'utilisation d'un minuteur est recommandée. Consulter le tableau de décongélation pour connaître les durées de décongélation recommandées proportionnelles à la taille des aliquotes. Retourner doucement chaque flacon avant de s'en servir.

Tableau de décongélation	
Taille des aliquotes	**Bain-marie à 37 °C (± 1 °C)**
1,5 mL	5 minutes
0,5 mL	3 minutes

Le CRYO*check* FVIII Inhibitor Kit peut être utilisé dans les quatre heures qui suivent la préparation. Lorsqu'il n'est pas en cours d'utilisation, le CRYO*check* FVIII Inhibitor Kit doit être gardé dans les flacons d'origine, munis de bouchons, et maintenu à une température de 2 à 8 °C. Il faut laisser les éléments réfrigérés s'acclimater à la température ambiante (18 à 25 °C), puis les retourner doucement de haut en bas avant de s'en servir.

N. B. *Les composants du CRYO*check* Factor VIII Inhibitor Kit sont propres à chaque lot et ne doivent pas être interchangés avec des composants d'autres numéros de lot.*

Instruments
Chaque laboratoire doit préparer l'instrument local en suivant le mode d'emploi du fabricant.

Procédure
Collecte et préparation des spécimens
Les échantillons des patients doivent être recueillis dans un anticoagulant de citrate de sodium dihydraté (3,2 %) à 105 à 109 mmol/L dans une proportion de neuf parts de sang pour une part d'anticoagulant, selon les recommandations du Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI)[4]. Le plasma des patients est séparé par centrifugation à 1500 x g pendant 15 minutes afin d'obtenir un plasma pauvre en plaquettes (< 10 000 plaquettes/µL) et doit être testé dans les quatre heures suivant le prélèvement s'il est conservé entre 2 et 4 °C. Si les échantillons ne peuvent pas être testés dans les quatre heures qui suivent, il faudra prélever rapidement le plasma en prenant soin de ne prélever aucune cellule et le congeler à – 20 °C pour un maximum de deux semaines ou un maximum de douze mois s'il est gardé à température inférieure à – 70 °C. Les échantillons ne doivent pas subir plus de deux cycles congélation-décongélation avant de servir au test.

Procédure de dosage
1. Préparer les réactifs du CRYO*check* Factor VIII Inhibitor Kit selon les instructions *d'entreposage, de préparation et de manipulation* mentionnées plus haut. Préparer un jeu de flacons par échantillon de patient (voir la section *réactifs et disponibilité*). Porter une attention particulière à bien séparer les flacons de différents types pour éviter les erreurs potentielles de préparation des échantillons.
2. Préparer l'instrument de mesure en suivant le mode d'emploi du fabricant.
3. Préparer le test de détermination de l'activité du FVIII en suivant le mode d'emploi du fabricant.
4. Inactiver par la chaleur les échantillons à tester (échantillon du patient, contrôle positif en inhibiteurs du FVIII et contrôle négatif en inhibiteurs du FVIII) :
   a Laisser les échantillons de test incuber dans un bain à 56 °C pendant 30 minutes pour inactiver le FVIII présent dans l'échantillon de plasma avant le test.
   b Centrifuger les échantillons à tester à température ambiante à 2700 x g pendant cinq minutes et transférer le surnageant dans des flacons identifiés de façon appropriée.
5. Préparer les dilutions des échantillons à tester inactivés par la chaleur (échantillon du patient, contrôle positif en inhibiteurs du FVIII et contrôle négatif en inhibiteurs du FVIII). Voir le *tableau de dilution des échantillons de test* ci-dessous :
   - Pour l'échantillon du patient, si on s'attend à ce que des inhibiteurs du FVIII soient présents, diluer les échantillons de test avec le tampon IB-BSA pour obtenir un échantillon avec une activité résiduelle du FVIII proche de 50 % (consulter les définitions dans la section *résultats et interprétation* plus loin).
   - Le contrôle positif en inhibiteurs du FVIII est dilué avec le tampon IB-BSA afin d'obtenir une activité résiduelle du FVIII d'environ 50 %.
   - Le contrôle négatif en inhibiteurs du FVIII ne requiert aucune dilution et doit être testé directement.

Tableau de dilution des échantillons à tester

Échantillon/ Contrôle	Flacon	Flacon à tester	IB-BSA	Échantillon à tester/dilution de l'échantillon	IB-PNP
Mélange témoin	1	Mélange témoin	0,20 mL		0,20 mL
Contrôle négatif des inhibiteurs du FVIII	1	Sans dilution		0,20 mL de contrôle négatif	0,20 mL
Contrôle positif des inhibiteurs du FVIII	1	Sans dilution		0,20 mL de contrôle positif	0,20 mL
	2*	½	0,20 mL	0,20 mL de contrôle positif	0,20 mL
Échantillon à tester	1	Sans dilution		0,20 mL de l'échantillon	0,20 mL
	2	½	0,20 mL	0,20 mL de l'échantillon	0,20 mL
	3	¼	0,20 mL	0,20 mL du flacon 2	0,20 mL
	8*	1/128	0,20 mL	0,20 mL du flacon 7	0,20 mL

* Jeter 0,20 mL après avoir mélangé l'IB-BSA avec l'échantillon de test et avant d'ajouter l'IB-PNP.

Remarque : Il ne s'agit ***que d'un exemple*** *de profil de dilution en série. Les dilutions doivent être préparées jusqu'à ce qu'une activité résiduelle de 50 % soit atteinte.*

6. Préparer les mélanges à tester (échantillon du patient, contrôle positif en inhibiteurs du FVIII et contrôle négatif en inhibiteurs du FVIII) :
   a Préparer un mélange dans une proportion de 1:1 de chaque échantillon de test non dilué (sans dilution) et de solution IB-PNP (mélange test). Préparer un mélange dans une proportion 1:1 de chaque dilution de tous les échantillons de test (le cas échéant) avec l'IB-PNP. La quantité de FVIII apportée par l'ajout de l'IB-PNP à chaque mélange de test est toujours la même.
   b Retourner doucement le flacon cinq fois de haut en bas pour en mélanger le contenu.
7. Préparer un mélange témoin :
   a Préparer un mélange témoin dans une proportion 1:1 d'IB-BSA et d'IB-PNP.
   b Retourner doucement le flacon cinq fois pour en mélanger le contenu.
8. Laisser incuber dans un bain à 37 °C pendant deux heures tous les mélanges à tester, préparés à l'étape six, ainsi que le mélange témoin préparé à l'étape sept. En présence d'anticorps inhibiteurs du FVIII, le FVIII ajouté au mélange à tester par l'IB-PNP sera neutralisé.
9. Après l'incubation de deux heures, placer les mélanges à tester et le mélange témoin dans un bain glacé pendant 10 minutes pour mettre fin à la réaction. ou effectuer un dosage de FVIIII immédiatement
10. Faire un dosage de l'activité du FVIII sur un analyseur de coagulation pour mesurer l'activité du FVIII de tous les mélanges à tester incluant le mélange témoin.

Résultats et interprétation
L'activité résiduelle du FVIII est convertie en unités Bethesda (UB)/mL (on définit une UB comme la quantité d'inhibiteur nécessaire pour obtenir une activité résiduelle du FVIII de 50 %) grâce à cette formule : UB = [(2 – Log % d'AR) / 0,30103] x facteur de dilution.

Calculer l'activité résiduelle (AR) du FVIII grâce à cette formule :

% d'AR = (% d'activité du FVIII du mélange à tester / % d'activité du FVIII du mélange témoin) *100

Convertir l'activité résiduelle du FVIII en unités Bethesda (UB)/mL grâce à la formule :

UB = [(2 – Log % d'AR) / 0,30103] x facteur de dilution

Par exemple, une AR de 100 % = 0 UB/mL et une AR de 50 % = 1 UB/mL.

Interprétation
- Les résultats doivent être exprimés en UB/mL.
- On considère les échantillons ≥ 0,6 UB/mL positifs pour la présence d'inhibiteurs du FVIII[5].

Contrôle de la qualité
Chaque laboratoire doit définir ses propres intervalles de valeurs pour le contrôle de qualité (CQ), des tests de détermination de l'activité du FVIII au moyen de méthodes statistiques acceptables. Ces intervalles de CQ peuvent ensuite servir à surveiller et à valider l'intégrité du système de test[6]. Le laboratoire doit utiliser, pour tous les tests de coagulation, au moins deux niveaux de contrôle pour chaque tranche de huit heures de fonctionnement et chaque fois qu'un réactif est changé[7].

Le contrôle de la qualité du Factor VIII Inhibitor Kit fait partie intégrante du système de test grâce à la présence du contrôle positif en inhibiteurs du facteur VIII et du contrôle négatif en inhibiteurs du facteur VIII. Ces contrôles doivent être utilisés pour chacun des tests effectués pour aider à déceler les éventuelles erreurs et mauvais fonctionnements des réactifs, le cas échéant.

Valeurs attendues
Voici les résultats attendus pour les contrôles du FVIII Inhibitor Kit :
- Contrôle négatif en inhibiteurs du facteur VIII : < 0,6 UB/mL
- Contrôle positif en inhibiteurs du facteur VIII : ≥ 0,6 UB/mL

*Consulter le certificat de test pour connaître les intervalles attendus propres à chaque numéro de lot du CRYO*check Factor VIII Inhibitor Kit.*

Interférences
Des études d'interférence ont été menées en vertu des lignes directrices EP7-A2 des CLSI sur un lot unique du CRYO*check* FVIII Inhibitor Kit[8]. D'éventuels interférants ont été ajoutés aux échantillons plasmatiques des patients et 10 réplicats ont été testés en plus de 10 réplicats des témoins sans interférants. Aucune interférence n'a été observée pour les substances aux concentrations suivantes :

Substance testée	Concentration testée
Hémoglobine	≤ 500 mg/dL
Bilirubine	≤ 29 mg/dL
Intralipide	≤ 500 mg/dL
Facteur de von Willebrand	≤ 20 µg/mL

Les autoanticorps anticoagulants lupiques peuvent interférer avec le dosage des faibles titres d'inhibiteurs du FVIII.

On a observé des interférences avec le dosage des inhibiteurs du FVIII pour un facteur rhumatoïde ≥ 82 UI/mL.

Caractéristiques de rendement
Toutes les études ont été menées avec le CRYO*check* FVIII Inhibitor Kit conjointement au dosage chromogénique du FVIII de Siemens sur des instrument BCS XP de Siemens.

Comparaison des méthodes : Une étude de comparaison des méthodes a été menée dans trois centres (un centre interne et deux centres externes) en suivant les lignes directrices EP09c des CLSI pour comparer la précision du CRYO*check* FVIII Inhibitor Kit à celle d'une méthode de comparaison[9]. Des aliquotes d'échantillons de plasma humain de personnes atteintes d'hémophilie A congénitale (n = 210) ont été distribués dans trois centres et testés au moyen d'un lot unique de CRYO*check* FVIII Inhibitor Kit. Une deuxième aliquote de chaque échantillon a été testée dans un laboratoire central de référence à l'aide d'un dosage Nijmegen-Bethesda chromogénique validé par les CDC, utilisé comme test validé et développé en laboratoire à l'aide d'équipement BCS XP de Siemens. Les données ont démontré une correspondance positive de 100 % (IC à 95 %, 97 à 100 %) et une correspondance négative de 99 % (IC à 95 %, 93 à 100 %), comme résumé plus bas.

		Résultats du CRYO*check* FVIII Inhibitor Kit		
		Positif	**Négatif**	**Total**
Résultats de la méthode de comparaison	**Positif**	133	0	133
	Négatif	1	76	77
	Total	134	76	210

Les résultats ont été comparés au moyen de l'analyse de régression de Passing-Bablok et de graphiques de Bland-Altman. Les statistiques de régression montrent que le CRYO*check* FVIII Inhibitor Kit a eu des résultats équivalents à la méthode de comparaison.

	N	Pente		Interception		Coefficient de corrélation de Pearson
		Valeur	IC à 95 %	Valeur	IC à 95 %	
Centre 1	68	1,543	1,404, 1,660	-0,224	-0,434, -0,127	0,977 (r^2 = 0,954)
Centre 2	72	1,065	0,998, 1,190	-0,113	-0,138, -0,043	0,985 (r^2 = 0,969)
Centre 3	70	1,373	1,225, 1,455	-0,075	-0,159, -0,023	0,980 (r^2 = 0,960)
Global	210	1,341	1,265, 1,406	-0,145	-0,180, -0,070	0,970 (r^2 = 0,940)

Les biais prédits absolus au niveau de la décision médicale sont représentés ci-dessous.

Dosage (UB/mL)	Biais prédit (UB/mL)	Limite inférieure de l'IC (%)	Limite supérieure de l'IC (%)
0,6	-2,0	-4.8	0,8
1	-1,9	-4,6	0,9
5	-0,3	-3,0	2,5
10	1,7	-0,9	4,4

Limite du blanc, limite de détection et limite de quantification : La limite du blanc (LoB) a été définie selon les lignes directrices EP17-A2 des CLSI en mesurant quatre échantillons plasmatiques négatifs à obtenus de donneurs sains normaux[10]. Les échantillons ont été mesurés trois fois avec trois lots de CRYO*check* FVIII Inhibitor Kit pendant cinq jours. La LoB a été mesurée à 0,1 UB/mL.

La limite de détection (LoD) a été définie selon les lignes directrices EP17-A2 des CLSI en mesurant quatre échantillons de plasma avec un faible titre obtenus de donneurs atteints d'hémophilie A congénitale[10]. Les échantillons ont été mesurés trois fois avec trois lots de CRYO*check* FVIII Inhibitor Kit pendant cinq jours. La LoD a été mesurée à 0,2 UB/mL.

L'étude de la limite de quantification (LoQ) a été définie selon les lignes directrices EP17-A2 des CLSI[10]. Les aliquotes de chaque échantillon à faible titre utilisé pour l'étude de la LoD ont été envoyés à un laboratoire externe pour faire l'objet de tests en trois réplicats sur trois jours différents afin de déterminer les valeurs assignées par un dosage Bethesda-Nijmegen modifié par les CDC validé et développé en laboratoire. La LoQ a été mesurée à 0,2 UB/mL.

Linéarité : Une étude de linéarité a été menée en suivant les lignes directrices EP06-A des CLSI pour un lot du CRYO*check* FVIII Inhibitor Kit[11]. Du plasma positif avec des inhibiteurs du facteur VIII issu d'un patient atteint d'hémophilie A congénitale a été combiné à du plasma dépourvu d'inhibiteurs du FVIII et issu de patients atteints d'hémophilie A congénitale afin de créer douze dilutions d'échantillons avec des titres estimés allant de 0 à 100 UB/mL. Une étude de linéarité étendu a également été menée, dans laquelle une série de dix-huit dilutions d'échantillons composées d'anticorps monoclonal anti-FVIII dans du plasma déficient en FVIII, immunodépleté, avec des titres compris entre 0 et 1402,9 UB/mL ont été testés. Les résultats de ces deux études suggèrent un intervalle de linéarité de 0,2 à 1402,9 UB/mL.

Précision : Une étude de précision a été menée en interne avec trois lots différents de CRYO*check* FVIII Inhibitor Kit par un seul opérateur utilisant un analyseur BCS XP de Siemens et en suivant les lignes directrices EP05-A3 des CLSI[12]. Au cours de l'étude, on a mesuré le contrôle positif en inhibiteurs du facteur VIII et le contrôle négatif en inhibiteurs du facteur VIII de la trousse ainsi que quatre échantillons plasmatiques issus de patients atteints d'hémophilie A congénitale correspondant à des niveaux d'inhibiteurs du FVIII négatifs, faibles, moyens et élevés. Chaque échantillon a été mesuré deux fois avec chaque lot de produit, et ce, deux fois par jour pendant 20 jours pour un total de 80 réplicats par échantillon par lot. Les résultats ont montré une précision combinée avec un CV de 8 % pour les échantillons positifs et un É.-T. de 0,1 UB/mL pour l'échantillon négatif.

Échantillon	Valeur moyenne (BU/mL)	Précision en laboratoire	
		ecart type (É.-T.)	%CV
Échantillon plasmatique négatif	0,3	0,1	N/A
Échantillon plasmatique faible	1,2	0,1	8,2
Échantillon plasmatique moyen	5,3	0,4	8,3
Échantillon plasmatique élevé	8,6	0,7	8,4

Reproductibilité : Des études de reproductibilité ont été menées dans trois centres (un centre interne et deux centres externes) par trois opérateurs différents sur trois analyseurs BCS XP de Siemens différents avec un seul lot de CRYO*check* FVIII Inhibitor Kit et en suivant les lignes directrices EP05-A3 des CLSI. On a mesuré au cours de l'étude le contrôle positif en inhibiteurs du facteur VIII et le contrôle négatif en inhibiteurs du facteur VIII de la trousse ainsi que quatre échantillons plasmatiques issus de patients atteints d'hémophilie A congénitale correspondant à des niveaux d'inhibiteurs du FVIII négatifs, faibles, moyens et élevés. Chaque échantillon a été mesuré trois fois, et ce, deux fois par jour pendant cinq jours pour un total de 30 réplicats par échantillon par centre. Les données des trois centres ont montré une reproductibilité combinée avec un CV ≤ 16 % pour les échantillons positifs et un É.-T. de 0,1 UB/mL pour les échantillons plasmatiques négatifs, comme expliqué ci-dessous.

Échantillon	Valeur moyenne (UB/mL)	Même test (répétabilité)		Entre les tests		Entre les jours		Entre les centres		Reproductibilité	
		É.-T.	%CV	É.-T.	%CV	É.-T.	%CV	É.-T.	%CV	É.-T.	%CV
Contrôle négatif en inhibiteurs du FVIII	0,0	0,1	N/A	0,0	N/A	0,0	N/A	0,0	N/A	0,1	N/A
Contrôle positif en inhibiteurs du FVIII	1,8	0,2	8,9	0,1	3,3	0,1	3,4	0,2	12,4	0,3	16,0
Échantillon plasmatique négatif	0,3	0,1	N/A	0,0	N/A	0,0	N/A	0,0	N/A	0,1	N/A
Échantillon plasmatique faible	1,4	0,1	10,2	0,0	0,0	0,0	2,9	0,0	0,0	0,1	10,6
Échantillon plasmatique moyen	5,5	0,4	7,8	0,1	1,9	0,1	2,2	0,0	0,0	0,5	8,3
Échantillon plasmatique élevé	9,6	0,7	7,8	0,4	4,0	0,3	3,4	0,9	9,2	1,3	13,2

Bibliography / Bibliographie

1. Miller CH, Platt SJ, Rice AS, et al. Validation of Nijmegen-Bethesda assay modifications to allow inhibitor measurement during replacement therapy and facilitate inhibitors surveillance. *J Thromb Haemostas.* 2012; 10:1055–61.
2. Verbruggen B, Novakova I, Wessels H, et al. The Nijmegen modification of the Bethesda assay for factor VIII:c inhibitors: improved specificity and reliability. *Thromb Haemost.* 1995; 73:247–51.
3. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories 5th ed. Centers for Disease Control and Prevention / National Institutes of Health, 2009.
4. CLSI. Collection, Transport, and Processing of Blood Specimens for Testing Plasma-Based Coagulation Assays and Molecular Hemostasis Assays; Approved Guideline-Fifth Edition. H21-A5. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA (USA); 2008.
5. Srivastava A, Brewer AK, Mauser-Bunschoten EP, Key NS, Kitchen S, Llinas A, et al. (2013). Guidelines for the Management of Hemophilia, 2nd Edition. *Haemophilia* 2013, 19 (1), e1-47.
6. Cembrowski GS, Carey RN. Laboratory Quality Management. ASCP Press 1989; 166-172.
7. CLIA 2004 – Code of Federal Regulations, 42CFR493.1253, 2004.
8. CLSI. Interference Testing in Clinical Chemistry; Approved Guideline-Second Edition. EP07-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA (USA); 2005.
9. CLSI. Measurement Procedure Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples. Third Edition. EP09c. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA (USA); 2018
10. CLSI. Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-Second Edition. EP17-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA (USA); 2012.
11. CLSI. Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures; A Statistical Approach; Approved Guideline. EP06-A Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA (USA); 2003.
12. CLSI. Evaluation of Precision of Quantitative Measurement Procedures; Approved Guideline – Third Edition. EP05-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA (USA); 2014.

Symbols Used / Symboles utilisés 09.60.00070 Rev. 05 May / Mai 2021

IVD	LOT					EC REP	Rx ONLY
In vitro diagnostic medical device	Batch code	Use by	Temperature limitation	Biological risks	Manufacturer	Authorized representative	For prescription use only
Dispositif médical de diagnostic *in vitro*	Numéro de lot	Date de péremption	Températures limites de conservation	Risques biologiques	Fabricant	Mandataire	Uniquement sur ordonnance

EC REP European Authorized Representative (Regulatory affairs only)
Emergo Europe—Prinsessegracht 20, 2514 AP The Hague, The Netherlands

CE

Precision BioLogic Inc. • 140, Eileen Stubbs Avenue • Dartmouth, NS • B3B 0A9 • Canada
Tel: 1.800.267.2796 / +1.902.468.6422 • Fax 1.800.267.0796 / +1.902.468.6421 • www.precisionbiologic.com