



BIOPHEN® Faktor VIII:C (6) Art.Nr. 221406

Testkit zur chromogenen Bestimmung der

Faktor VIII-Aktivität in Plasma oder Konzentraten

In vitro-Diagnostikum

VERWENDUNGSZWECK:

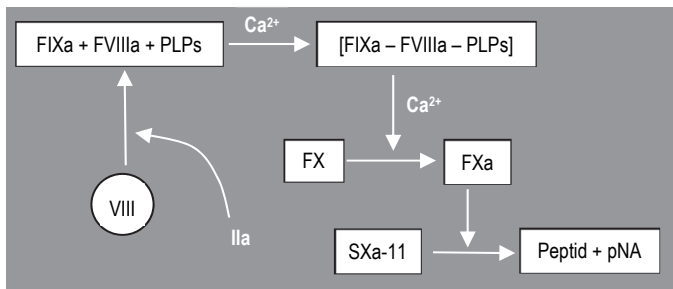
BIOPHEN® Faktor VIII:C ist ein Testkit zur chromogenen Bestimmung der Faktor VIII (FVIII)-Aktivität in humanem Citratplasma, biologischen Flüssigkeiten oder FVIII-Konzentraten und ist zur manuellen oder automatisierten Durchführung geeignet. Aufgrund des Einsatzes von Reagenzien mit Faktoren humanen Ursprungs erfasst dieser Testkit auch humanspezifische FVIII-mimetische Antikörper (z.B. Emicizumab/Hemlibra®).

KLINISCHE BEDEUTUNG:

Diagnose von angeborenen oder erworbenen FVIII-Mängeln (Hämophilie A). Überwachung von Patienten unter FVIII-Substitutionstherapie. Feststellung von erhöhten FVIII-Spiegeln im Rahmen des Thrombophilie-Screenings. Bestimmung der FVIII-Restaktivität im FVIII-Hemmkörperstest.

TESTPRINZIP:

BIOPHEN Faktor VIII:C ist ein Testkit zur chromogenen Bestimmung der Cofaktor-Aktivität von FVIII. Thrombin-aktivierter FVIII (FVIIIa) bildet einen Enzymkomplex mit Faktor IXa (FIXa), der in konstanter und überschüssiger Menge zugegeben wird. In Gegenwart von Phospholipiden (PLPs) und Calcium (Ca^{2+}) aktiviert dieser Enzymkomplex ebenfalls in konstanter und überschüssiger Menge zugesetzten Faktor X (FX) zu Faktor Xa (FXa), der in der Folge das FXa-spezifische chromogene Substrat SXa-11 spaltet. Die aus diesem Substrat freigesetzte Menge an para-Nitroanilin (pNA) ist direkt proportional zur FVIII-Aktivität in der Probe und wird durch Messung bei 405 nm bestimmt.



IM TESTKIT ENTHALTENE REAGENZIEN:

R1: Reagenz 1: Humaner FX

2 Flaschen lyophilisierter humaner FX mit einem Fibrin-Polymerisations-Inhibitor.
Mit je 6 mL Aqua dest. rekonstituieren.

R2: Reagenz 2: Aktivierungsreagenz

2 Flaschen lyophilisiertes Aktivierungsreagenz (humaner FIXa und Thrombin, synth. PLPs, Ca^{2+}).
Mit je 6 mL Aqua dest. rekonstituieren.

R3: Reagenz 3: Chromogenes Substrat SXa-11

2 Flaschen lyophilisiertes FXa-spezifisches chrom. Substrat SXa-11 mit einem Thrombin-Inhibitor.
Mit je 6 mL Aqua dest. rekonstituieren.

R4+: Reagenz 4+: Tris-BSA-Puffer

4 Flaschen gebrauchsfertiger Tris-BSA-Puffer, 25 mL. Enthält 1% bovines Serumalbumin (BSA), PEG, FVIII-Stabilisatoren und Natriumazid.

Warnhinweise:

- FIXa, FX und Thrombin wurden aus humanem Plasma gewonnen, das mit validierten Methoden auf HIV-Antikörper, HBs-Ag und HCV-Antikörper untersucht und für negativ befunden wurde. BSA wurde aus dem Plasma BSE-freier Tiere gewonnen, das auf die Abwesenheit von Infektionserregern getestet wurde. Kein Test kann jedoch die Abwesenheit von Infektionserregern mit absoluter Sicherheit garantieren. Sämtliche Produkte biologischen Ursprungs müssen deshalb unter Beachtung aller erforderlichen Vorsichtsmaßnahmen als potenziell infektiös behandelt werden.
- Natriumazid kann mit Blei- oder Kupferarmaturen unter Bildung hochexplosiver Metallazide reagieren. Bei Entsorgung von R4+ in den Abfluss muss mit großen Wassermengen nachgespült werden.

ERFORDERLICHE MATERIALIEN, DIE NICHT IM TESTKIT ENTHALTEN SIND:

Reagenzien:

- Aqua dest., vorzugsweise steril
- Optional: Reagenz 1 mit bovinem FX (Art.Nr. 221402-BX), das statt des im Testkit enthaltenen Reagenz 1 mit humanem FX eingesetzt wird, wenn der Testkit unempfindlich gegenüber human-spezifischen FVIII-mimetischen Antikörpern (z.B. Emicizumab/Hemlibra®) sein soll.
- Endpunkt-Methode: Essigsäure (20%) oder Zitronensäure (2%).
- Kalibrationsplasma (z.B. BIOPHEN® Kalibrationsplasma, Art.Nr. 222101) oder sonstiges Referenzmaterial (interner oder internationaler Standard) mit bekannter FVIII-Aktivität.
- Normal- und Abnormalkontrollplasmen (z.B. BIOPHEN® Kontrollplasma „Normal“, Art.Nr. 223201, und BIOPHEN® Kontrollplasma „Abnormal“, Art.Nr. 223301) oder sonstiges Referenzmaterial (interne Kontrollen) mit bekannter FVIII-Aktivität.

Geräte:

- Spektrophotometer oder Gerinnungsautomaten zur Bestimmung chromogener Tests (405 nm).
- Kalibrierte Pipetten.
- Stoppuhr.

LAGERUNG:

Ungeöffnete BIOPHEN® Faktor VIII:C Reagenzien müssen bei 2-8°C in der Originalverpackung gelagert werden. Sie sind bis zum auf dem Etikett gedruckten Verfallsdatum stabil.

VORBEREITUNG UND STABILITÄT DER REAGENZIEN:

R1: Reagenz 1: Humaner FX mit Fibrin-Polymerisations-Inhibitor

- Den Inhalt einer Flasche mit 6 mL Aqua dest. rekonstituieren und bis zur vollständigen Auflösung mischen.
- Für 30 min bei Raumtemperatur (18-25°C) inkubieren und dabei gelegentlich schütteln.
- Vor jedem Gebrauch nochmals durchmischen.

Stabilität nach Rekonstitution bei Lagerung in der Originalflasche:

- 72 Stunden bei 2-8°C.
- 24 Stunden bei Raumtemperatur (18-25°C).
- 3 Monate bei $\leq -20^\circ\text{C}$.

R2: Reagenz 2: Humaner FIXa mit Thrombin, synthetischen PLPs und Ca^{2+}

- Den Inhalt einer Flasche mit 6 mL aqua dest. rekonstituieren und bis zur vollständigen Auflösung mischen.
- Für 30 min bei Raumtemperatur (18-25°C) inkubieren und dabei gelegentlich schütteln.
- Vor jedem Gebrauch nochmals durchmischen.

Stabilität nach Rekonstitution bei Lagerung in der Originalflasche:

- 72 Stunden bei 2-8°C.
- 24 Stunden bei Raumtemperatur (18-25°C).
- 3 Monate bei $\leq -20^\circ\text{C}$.

R3: Reagenz 3: FXa-spezifisches chromogenes Substrat (SXa-11)

- Den Inhalt einer Flasche mit 6 mL aqua dest. rekonstituieren und bis zu seiner vollständigen Auflösung mischen.
- Für 30 min bei Raumtemperatur (18-25°C) inkubieren und dabei gelegentlich schütteln.
- Vor jedem Gebrauch nochmals durchmischen.

Stabilität nach Rekonstitution bei Lagerung in der Originalflasche:

- 3 Monate bei 2-8°C.
- 7 Tage bei Raumtemperatur (18-25°C).
- 3 Monate bei $\leq -20^\circ\text{C}$.

R4+: Reagenz 4+: Tris-BSA-Puffer

Gebrauchsfertig. Vor jedem Gebrauch durchmischen.

In der Originalflasche gelagert ist R4+ nach dem Öffnen 7 Tage bei 2-8°C stabil.

Anmerkungen:

- Um die Stabilität der Reagenzien zu gewährleisten, sind diese nach jedem Gebrauch mit der jeweiligen Originalschraubkappe (weiße Kappe für R1, rote Kappe für R2, gelbe Kappe für R3 und weiße Kappe für R4+) zu verschließen und nach obigen Angaben zu lagern.
- Um Kontamination zu vermeiden, sind die Reagenzien während ihres Gebrauchs sorgfältig zu handhaben. Bei Gelbfärbung ist R3 kontaminiert und muss verworfen werden.
- R1, R2 und R3 sind unter Vakuum verschlossen. Um den Verlust von deren Inhalt beim Öffnen zu vermeiden, sind die Verschlüsse vorsichtig zu entfernen.
- Bei einer automatisierten Durchführung können die Rekonstitutionsvolumina je nach verwendetem Gerinnungsautomaten von obigen Angaben abweichen und sind den jeweiligen Applikationsvorschriften zu entnehmen.
- Es dürfen ausschließlich Reagenzien aus Testpackungen mit übereinstimmender Chargennummer verwendet werden. Zur Testdurchführung dürfen keine Reagenzien aus Testpackungen mit unterschiedlichen Chargennummern eingesetzt werden. Die Kombination der Reagenzien R1, R2 und R3 ist in Bezug auf die Testcharge optimiert.
- Stabilitätsstudien bei 30°C haben gezeigt, dass die Testkits ohne Beeinträchtigung der darin enthaltenen Reagenzien bei Raumtemperatur (18-25°C) versendet werden können.

PROBENMATERIAL

Humanes Citratplasma, biologische Flüssigkeiten oder FVIII-Konzentrate.

Gewinnung, Handhabung und Lagerung der Proben:

Blut (9 Volumenteile) wird vorsichtig in 0,109 M Trisnatriumcitrat (1 Volumenteil) abgenommen und z.B. für 15 min bei 2.000 g und Raumtemperatur (18-25°C) zentrifugiert. Das aus dem Überstand gewonnene Citratplasma kann bis zu

- 1 Stunde bei Raumtemperatur (18-25°C)
 - 8 Stunden bei 2-8°C oder in einem Eisbad
 - 1 Monat bei $\leq -20^\circ\text{C}$
- gelagert werden. Gefrorenes Citratplasma muss vor Gebrauch für 15 min bei 37°C aufgetaut werden.

Anmerkung: Weitere Vorschriften für die Probengewinnung, -handhabung und -lagerung sind im NCCLS Dokument H21-A2 veröffentlicht.

TESTDURCHFÜHRUNG:

BIOPHEN® Faktor VIII:C (6) kann manuell (als Endpunkt- oder kinetische Methode) oder automatisiert (als kinetische Methode) durchgeführt werden. Applikationsvorschriften für die verschiedenen Gerinnungsautomaten sind auf Anfrage erhältlich. Der Test wird bei einer kontrollierten Temperatur von 37°C durchgeführt und die Farbentwicklung bei 405 nm gemessen.

KALIBRATION:

Hoher Messbereich (0 bis 200%):

Zur Messung der FVIII-Aktivität in Citratplasma wird BIOPHEN® Faktor VIII:C mit einem auf den aktuellen WHO-Plasmastandard rückführbaren Kalibrationsplasma (z.B. BIOPHEN® Kalibrationsplasma, Art.Nr. 222101) mit bekannter FVIII-Aktivität von „C“ (ca. 1 IE/mL bzw. 100%) kalibriert. Für den hohen Messbereich sieht der Test eine Probenverdünnung von 1:40 in Tris-BSA-Puffer (R4+) vor. Somit entspricht eine 1:40-Verdünnung des Kalibrationsplasmas der bekannten FVIII-Aktivität von „C“ (ca. 100%), während eine 20x C:100-Verdünnung einer FVIII-Aktivität von 200% entspricht. Durch serielle Verdünnung dieser Ausgangslösung werden Kalibrationslösungen wie folgt vorbereitet:

% FVIII	200% FVIII-Kalibrator (µL)	Tris-BSA-Puffer R4+ (µL)
200	500	0
100	250	250
50	125	375
0	0	500

Zur Messung der FVIII-Aktivität in FVIII-Konzentraten erfolgt die Kalibration mit internationalen bzw. internen Referenzstandards für FVIII-Konzentrate. Unmittelbar vor der Kalibration wird der Referenzstandard mit R4+ auf eine FVIII-Aktivität von 2 IE/mL bzw. 200% vorverdünnt und ausgehend davon Kalibrationslösungen wie in obiger Tabelle hergestellt. Kontrollen und Proben werden so vorverdünnt, dass die erwartete FVIII-Aktivität im Bereich von 0,2 bis 2 IE/mL bzw. 20 bis 200% liegt, und anschließend 1:40 mit R4+ weiterverdünnt.

Niedriger Messbereich (0 bis 25%):

Für den niedrigen Messbereich sieht der Test eine Probenverdünnung von 1:10 vor. Unmittelbar vor der Kalibration wird das Kalibrationsplasma mit Faktor 4x C:100 mit FVIII-Mangelplasma (z.B. Art.Nr. DP040A/K) vorverdünnt und anschließend 1:10 mit R4+ weiterverdünnt. Durch serielle Verdünnung dieser Ausgangslösung mit einer FVIII-Aktivität von 25% werden weitere Kalibrationslösungen wie folgt vorbereitet:

% FVIII	25% FVIII-Kalibrator (µL)	Tris-BSA-Puffer R4+ (µL)
25	500	0
12,5	250	250
6,25	125	375
0	0	500

Um die vollständige Leistung des Tests zu gewährleisten und den Abbau von FVIII zu vermeiden, dürfen die Kalibratoren erst kurz vor Testdurchführung hergestellt werden.

TESTDURCHFÜHRUNG:

Manuelle Methode:

Hoher Messbereich: Proben und Kontrollen werden in einer 1:40-Verdünnung mit Tris-BSA-Puffer (R4+) gemessen. Therapeutische Konzentrate werden auf eine Konzentration von 0,005 bis 0,05 IE/mL vorverdünnt (entsprechend 20 bis 200% FVIII bei 1:40 Verdünnung).

Niedriger Messbereich: Proben und Kontrollen werden in einer 1:10-Verdünnung mit Tris-BSA-Puffer (R4+) gemessen.

Die Mikrotiterplatten oder Kunststoff-Teströhrchen werden bei 37°C vorinkubiert und anschließend wie folgt hinzu pipettiert:

Reagenz	Mikrotiterplatte	Teströhrchen
Kalibrationslösungen, Kontrollen und Proben	50 µL	100 µL
R1 : Humaner oder boviner FX vorinkubiert bei 37°C	50 µL	100 µL
R2 : Aktivierungsreagenz vorinkubiert bei 37°C	50 µL	100 µL
Mischen und für 5 min bei 37°C inkubieren, danach		
R3: SXa-11 Chrom. Substrat vorinkubiert bei 37°C	50 µL	100 µL
Mischen und exakt für 5 (humanes R1) oder 2 (bovines R1) min bei 37°C inkubieren		
Stoppen der Reaktion durch Zugabe von:		
20% Essigsäure oder 2% Zitronensäure	50 µL	200 µL
Mischen, die Absorption bei 405 nm messen und den jeweiligen Probenleerwert abziehen.		

Anmerkungen:

- Die nach Stoppen der Reaktion durch Zugabe von Essig- oder Zitronensäure erhaltene Gelbfärbung ist für 2 Stunden stabil.
- Die Probenleerwerte werden durch Pipettierung der Reagenzien in umgekehrter Reihenfolge (Essig- oder Zitronensäure, SXa-11, die jeweilige Probe, Faktor Xa und Aktivierungsreagenz) hergestellt.

Automatisierte Methode:

Applikationsvorschriften für die verschiedenen Gerinnungsautomaten sind auf Anfrage erhältlich. Automatisierte Methoden werden kinetisch gemessen, die Testreaktion muss daher nicht gestoppt werden und der Probenleerwert wird automatisch berücksichtigt.

Anmerkungen:

- Falls die verwendete Methode andere Reagenzvolumenta als die oben beschriebenen erfordert, müssen die Verhältnisse der Reaktionsvolumenta eingehalten werden.
- Bei lipämischen, ikterischen, hämolytischen oder im Allgemeinen ungewöhnlich aussehenden Citratplasmen muss gegen einen Probenleerwert gemessen werden.

ERGEBNISSE:

- Bei der Endpunktmethode wird auf bi-logarithmischen Millimeterpapier für den hohen Messbereich und auf linearem Millimeterpapier für den niedrigen Messbereich die Faktor VIII:C Konzentration in % (x-Koordinate) gegen die korrespondierende Absorption A₄₀₅ (y-Koordinate) aufgetragen.
- Bei automatisierter Testdurchführung erfolgt die Ermittlung der Kalibrationskurve automatisch.
- Der dynamische Bereich liegt zwischen 5 und 200% beim hohen Messbereich und zwischen 1 und 25% beim niedrigen Messbereich.

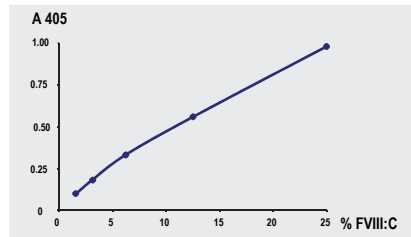
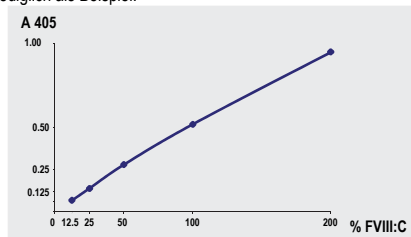
Wurden die Proben und Kontrollen anders als 1:40 (im hohen Messbereich) bzw. 1:10 (im niedrigen Messbereich) verdünnt, muss die ermittelte FVIII:C-Aktivitäten unter Berücksichtigung des jeweiligen Verdünnungsfaktors D mit D:40 bzw. D:10 multipliziert werden.

QUALITÄTSKONTROLLE:

Die Qualitätskontrolle ermöglicht die Validierung der Kalibration und der Messungen sowie die Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Messungen von Testansatz zu Testansatz. Sie kann mit kommerziell erhältlichen Normal- und Abnormalkontrollplasmen (z.B. BIOPHEN® Kontrollplasma „Normal“, Art.Nr. 223201, und BIOPHEN® Kontrollplasma „Abnormal“, Art.Nr. 223301) oder sonstigem Referenzmaterial (internen Kontrollen) mit bekannter FVIII:C-Aktivität durchgeführt werden. Für den Testansatz werden die Kontrollen auf die gleiche Weise wie die Proben vorbereitet.

BEISPIEL FÜR DIE KALIBRATIONSKURVEN:

Nachstehende Kalibrationskurven im hohen bzw. niedrigen Messbereich wurden automatisiert (STA-R) erstellt und dienen lediglich als Beispiel:



LEISTUNGSMERKMALE:

Die untere Nachweisgrenze von BIOPHEN® Faktor VIII:C wird durch Messung der scheinbaren FVIII:C-Aktivität bestimmt. Diese entspricht dem mittleren A₄₀₅-Wert einer FVIII:C-freien Probe zuzüglich dreier Standardabweichungen und liegt im hohen Messbereich bei ca. 10% bzw. im niedrigen Messbereich bei ca. 2% FVIII:C-Aktivität.

Präzision bei der automatisierten Messung (STA-R) von verschiedenen Faktor VIII:C Konzentrationen:

Probe	% VIII:C	Intra-assay CV %	N	Inter-assay CV %	N
1	76	2,8	7	6,1	7
2	58	4,2	7	4,8	7
3	46	2,8	7	3,4	7

ERWARTETE BEREICHE:

Der Normalbereich für Faktor VIII:C liegt zwischen 50 und 200%.

Faktor VIII:C ist bei Hämophilie A oder der von Willebrand-Krankheit (VWD) verringert. Erhöhte Konzentrationen von Faktor VIII:C werden bei Entzündungen oder Lebererkrankungen beobachtet.

BIOCHEMISCHE EIGENSCHAFTEN:

Faktor VIII:C ist ein Plasmaprotein mit einem Molekulargewicht von ca. 230 kDa. Es wird vermutet, dass FVIII:C in Endothelzellen synthetisiert wird. Faktor VIII:C liegt in sehr niedrigen Konzentrationen (<100 ng / ml) im Blutplasma vor und wird durch seine Bindung an den von Willebrand-Faktor (vWF, ein multimeres Glykoprotein, MW: 1 bis 20 x 10⁶ Dalton), stabilisiert, wodurch sich die Halbwertszeit im Blutkreislauf verlängert. In Abwesenheit von vWF kommt es rasch zur Verringerung der Faktor VIII:C-Aktivität im Blut.

REFERENZEN:

1. Wagenvoort RJ et al. Development of a simple chromogenic factor VIII assay for clinical use. *Haemostasis* Vol. 19, N°4, 196-204 (1989).
2. Mikaelsson M. et al. Influence of phospholipids on the assessment of factor VIII activity. *Haemophilia* Vol. 4, N°4, 646-50 (1998).
3. Lee CA. et al. Pharmacokinetics of recombinant factor VIII (recombinant) using one-stage clotting and chromogenic factor VIII assay. *Thromb. Haemost.* Vol. 82, N° 6, 1644-7 (1999).
4. Lundblad RL. et al. Issues with the assay of factor VIII activity in plasma and factor VIII concentrates. *Thromb. Haemost.* Vol 84, N° 6, 942-8 (2000).
5. Hubbard AR. et al. Potency estimation of recombinant factor VIII: effect of assay method and standard. *Br. J Haematol* Vol. 113, N° 2, 533-6 (2001).
6. Raut S. et al. A collaborative study to establish the 6th International Standard for factor VIII concentrate. *Thromb. Haemost.* Vol. 85, N° 6, 1071-8 (2001).
7. Barrowcliffe TW. et al. Coagulation and chromogenic assays of factor VIII activity: general aspects, standardization, and recommendations. *Semin. Thromb. Hemost.* Vol 28, N° 3, 247-56 (2002).
8. Kirschbaum N. et al. Calibration of the Ph. Eur. BRP Batch 3/Mega 2 (US/FDA) standard for human coagulation factor VIII concentrate for use in the potency assay. *Pharmaceutical Spec Issue Biol* Vol 1, 31-64 (2002).
9. Mikaelsson M. et al. Assaying the circulating factor VIII activity in haemophilia A patients treated with recombinant factor VIII products. *Semin. Thromb. Hemost.* Vol 28, N° 3, 257-64 (2002).