

BIOPHEN™ FVIII:C

REF 221402 [R1] [R2] [R3] 2 x 2,5 mL, [R4] 4 x 25 mL



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


 Méthode chromogène pour dosage du Facteur VIII:C
sur plasma ou concentrés thérapeutiques.

Français, dernière révision : 09-2022

UTILISATION:

 Le coffret BIOPHEN™ FVIII:C est une méthode chromogène pour la détermination quantitative *in vitro* de l'activité du Facteur VIII (FVIII :C) sur plasma humain citraté ou concentrés thérapeutiques en utilisant une méthode amidolytique, manuelle ou automatisée.

RÉSUMÉ ET EXPLICATION:
Technique :¹⁻³

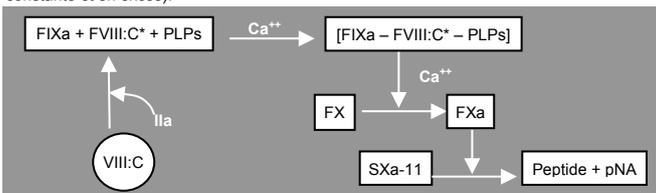
Le Facteur VIII est une protéine plasmatique d'environ 280 kDa. Il est présent dans le plasma à de très faibles concentrations (100-200 ng/mL). Dans le sang, le FVIII est stabilisé par liaison avec le Facteur von Willebrand (vWF), ce qui prolonge considérablement sa demi-vie dans la circulation sanguine. En absence de vWF, l'activité du FVIII est rapidement éliminée du sang.

Clinique :⁴⁻⁸

Un déficit en Facteur VIII (ou facteur anti-hémophilique A) entraîne la pathologie de l'hémophilie A, trouble de la coagulation congénitale. Le taux de Facteur VIII est diminué dans les maladies de von Willebrand (vWD) ou en cas de Coagulation intravasculaire disséminée (CIVD) ou d'inhibiteur acquis du FVIII. Des concentrations élevées de FVIII sont observées dans les atteintes hépatiques ou les pathologies inflammatoires, et peuvent être un indicateur de risque accru de thrombose veineuse. La concentration en FVIII est augmentée durant la grossesse.

PRINCIPE:

La méthode BIOPHEN™ FVIII:C est un dosage chromogène du cofacteur du FVIII:C. En présence de phospholipides (PLPs) et de calcium, le FVIII:C, activé par la thrombine, forme un complexe enzymatique avec le Facteur IXa pour activer le Facteur X. Le Facteur Xa ainsi formé hydrolyse le substrat chromogène qui libère de la paranitroaniline (pNa). La quantité de pNa libérée (mesurée par l'Absorbance à 405nm) est directement proportionnelle à la concentration de FVIII :C dans l'échantillon (le Facteur IXa et le Facteur X étant en quantité constante et en excès).



Nota : FVIII:C* : FVIII:C activé par la thrombine.

REACTIFS:

 [R1] **Facteur X humain**, lyophilisé. Contient un inhibiteur de polymérisation de la fibrine, de la BSA et des stabilisants.

 [R2] **Réactif activateur** (IXa – Thrombine – Calcium – Phospholipides), lyophilisé. Contient du Facteur IXa humain, en quantité constante et optimisée, de la thrombine humaine, du calcium, des phospholipides synthétiques, des agents stabilisants, et de la BSA.

 [R3] **SXa-11**, Substrat chromogène spécifique du Facteur Xa (SXa-11), lyophilisé. Contient un inhibiteur de thrombine.

 [R4] **Tampon Tris-BSA**, liquide. Contient 1% de BSA, du PEG, des stabilisants du FVIII :C et de faibles quantités d'azide de sodium (0,9 g/L) comme conservateur.

 REF 221402 → [R1] [R2] [R3] 2 flacons de 2,5 mL
[R4] 4 flacons de 25 mL

 REF 221406 → [R1] [R2] [R3] 2 flacons de 6 mL
[R4] 4 flacons de 25 mL

MISE EN GARDE ET AVERTISSEMENTS:

- Certains réactifs de ce coffret contiennent des produits d'origine humaine et animale. Lorsque du plasma humain a été utilisé dans la préparation de ces réactifs, la recherche de l'antigène HBs, des anticorps anti-HCV, anti-HIV 1 et anti-HIV 2 a été effectuée et trouvée négative. Cependant aucun test ne peut garantir de façon absolue l'absence de tout agent infectieux. Aussi, ces réactifs d'origine biologique doivent être manipulés avec les précautions d'usage s'agissant de produits potentiellement infectieux.
- L'élimination des déchets doit être effectuée conformément aux réglementations locales en vigueur.
- Utiliser uniquement les réactifs d'un même lot de coffret.
- Les études de vieillissement montrent que les réactifs peuvent être expédiés à température ambiante sans aucun dommage.
- Ce dispositif de diagnostic *in vitro* est destiné à une utilisation professionnelle en laboratoire.

PRÉPARATION DES REACTIFS:

Retirer délicatement le bouchon de lyophilisation, pour s'affranchir de toute perte de produit à l'ouverture du flacon.

[R1] [R2] [R3] Reconstituer chaque flacon avec exactement :

REF 221402 → [R1] [R2] [R3] 2,5 mL d'eau distillée

REF 221406 → [R1] [R2] [R3] 6 mL d'eau distillée

 Agiter vigoureusement jusqu'à **dissolution complète** (vérifier l'absence de dépôt sur le fond du flacon [R3] si nécessaire, laisser stabiliser chaque flacon de [R3] au moins 15 minutes à 37°C et homogénéiser avant utilisation), en évitant la formation de mousse et charger sur l'automate en suivant les instructions du guide d'application.

Pour la méthode manuelle, laisser stabiliser pendant 30 min à température ambiante (18-25°C), homogénéiser avant utilisation.

[R4] Réactif prêt à l'emploi, homogénéiser et charger sur l'automate en suivant les instructions du guide d'application.

Pour la méthode manuelle, laisser stabiliser pendant 30 min à température ambiante (18-25°C), homogénéiser avant utilisation.

STOCKAGE ET STABILITE:

Les réactifs non ouverts doivent être conservés à 2-8°C dans leur emballage d'origine. Ils sont alors utilisables jusqu'à la date de péremption imprimée sur le coffret.

[R1] [R2] La stabilité du réactif après reconstitution, sous réserve de toute contamination ou d'évaporation, conservé fermé est de :

- 72 heures à 2-8°C.
- 24 heures à température ambiante (18-25°C).
- 3 mois congelé à -20°C ou moins*
- Stabilité à bord de l'automate : se référer à l'application spécifique.

[R3] La stabilité du réactif après reconstitution, sous réserve de toute contamination ou d'évaporation, conservé fermé est de :

- 3 mois à 2-8°C.
- 7 jours à température ambiante (18-25°C).
- 3 mois congelé à -20°C ou moins*
- Stabilité à bord de l'automate : se référer à l'application spécifique.

*Décongeler une seule fois le plus rapidement possible à 37°C et utiliser immédiatement. Procéder à une nouvelle calibration avec le réactif congelé.

[R4] Dans son emballage d'origine, et conservé à 2-8°C, le réactif est stable jusqu'à la date de péremption indiquée sur le coffret, sous réserve de toute contamination ou d'évaporation.

Si le substrat devient jaune, cela indique une contamination. Le flacon doit être jeté et un nouveau utilisé.

REACTIFS ET MATERIELS REQUIS MAIS NON FOURNIS:
Réactifs:

- Eau distillée.
- Acide acétique à 20% ou acide citrique à 2% (méthode en point final).
- Matériel de référence pour dosage des concentrés thérapeutiques en FVIII :C (international ou interne).
- Étalon et contrôles spécifiques avec titration connue tels que :

Nom du produit	Référence
BIOPHEN™ Plasma Calibrator	222101
BIOPHEN™ Normal Control Plasma	223201
BIOPHEN™ Abnormal Control Plasma	223301

- Pour réaliser l'étalonnage en gamme basse, diluer l'étalon en plasma déficient FVIII :C (DP040A/K).

Se référer également au guide d'application spécifique de l'automate utilisé.

Matériels:

- Spectrophotomètre, ou automates pour dosage chromogène.
- Chromomètre, Pipettes calibrées, tubes pour tests en plastique ou microplaque.

PRÉLEVEMENTS ET PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS:

 Le sang (9 volumes) doit être collecté sur l'anticoagulant citrate trisodique (1 volume) (0,109M, 3,2%) avec précautions, par ponction veineuse franche. Le premier tube doit être éliminé. La préparation et la conservation des échantillons doivent être réalisées selon les recommandations locales en vigueur (pour les États-Unis, se référer aux recommandations du CLSI H21-A5⁹ pour plus d'informations concernant le prélèvement, la manipulation et la conservation).

 Pour la conservation des plasmas, se référer aux références^{9,10,11}.

PROCEDURE:

Le coffret peut être utilisé en méthode cinétique, automatisée, ou en méthode manuelle (point final). Le test est réalisé à 37°C et l'intensité de la coloration est mesurée à 405nm.

Pour une méthode automatisée, les guides d'applications sont disponibles sur demande. Se référer aux guides d'application et aux précautions spécifiques pour chaque automate.

Méthode de dosage:

1. Reconstituer les étalons et les contrôles comme indiqué dans les notices spécifiques. Les étalons doivent être dilués dans du tampon [R4] comme décrit dans le tableau ci-dessous afin de préparer la gamme de calibration ("C" définit la concentration en FVIII :C).

Gamme haute (0 à 200%) :

Lorsque la gamme de calibration est réalisée à l'aide d'un plasma étalon commercial (ex : BIOPHEN™ Plasma Calibrator), la dilution au 1/40 correspond à la concentration (C) en FVIII :C indiquée, et le 1/20 à deux fois cette concentration. Pour un étalon titrant C, le taux de 200% (dans les conditions du dosage) est obtenu en diluant cet étalon par le facteur suivant : 20x(C)/100.

La gamme de calibration peut également être réalisée à l'aide d'un pool de plasma citratés normaux (au moins 30 individus normaux, hommes et femmes, de 18 à 55 ans, sans traitement ou pathologie connus), qui par définition titre 100% de FVIII :C. Le dosage intègre une dilution du plasma au 1/40, qui représente par définition le taux 100% de FVIII :C. La gamme de calibration va de 0 à 200% de FVIII :C. La dilution au 1/20 en tampon [R4] représente 200% de FVIII :C.

Préparer 1 mL de la dilution 1/20 du pool de plasmas normaux, ou une dilution (20xC/100) du plasma étalon titré en FVIII :C (soit C1). Cette solution titre 200% FVIII :C ; préparer la gamme d'étalonnage suivante par dilutions successives dans le tampon [R4] comme décrit dans le tableau ci-dessous afin d'effectuer la gamme de calibration:

Etalon	C1	C2	C3	C4
FVIII:C (%)	200	100	50	0
Volume Etalon 200% FVIII:C	500 µL	250 µL	125 µL	0 µL
Volume Tampon [R4]	0 µL	250 µL	375 µL	500 µL

La gamme d'étalonnage peut également être réalisée à partir d'un matériel de référence titré en FVIII :C (standard international ou standard interne).

Prédiluer ce matériel en tampon [R4] pour obtenir une solution à 1 UI/mL puis effectuer une dilution au 1/20 en [R4] pour obtenir une solution à 200% (2 UI/mL) de FVIII:C. Effectuer à partir de cette solution une gamme d'étalonnage en tampon [R4] comme expliqué précédemment.

Gamme basse (0 à 25%) :

L'étalonnage peut être réalisé à l'aide d'un pool de plasmas citratés normaux ou d'un plasma étalon commercial à taux de FVIII:C connu, soit C. Diluer ce plasma avec du plasma déficient en FVIII:C (DP040A/K) de façon à obtenir un taux de 25% (le facteur de dilution en plasma déficient est de 4 pour le pool normal, ou de 4xC/100 pour un étalon avec une concentration C). Le dosage intègre une dilution du plasma au 1/10. La gamme de calibration va de 0 à 25% de FVIII :C. La dilution au 1/10 en tampon [R4] représente 25% de FVIII :C.

A partir de cette solution faire la gamme d'étalonnage suivante dans le tampon [R4] :

FVIII:C (%)	0	6.25	12.5	25
Volume Etalon 25% FVIII:C	0µL	125µL	250µL	500µL
Volume Tampon [R4]	500µL	375µL	250µL	0µL

Réaliser la gamme extemporanément afin d'éviter toute dégradation du FVIII :C.

2. Diluer les échantillons dans du tampon R4 comme décrit dans le tableau ci-dessous :

Echantillons	Référence	Gamme		Dilution
		Haute	Basse	
Contrôle	223201/223301	Haute	Basse (après prédilution 1/10 en Déficient FVIII :C)	1/40
		Haute	Basse	1/10
Echantillons	N.A.	Haute	Basse	1/40
		Haute	Basse	1/10

Pour les concentrés thérapeutiques de FVIII :C, l'échantillon à tester (en gamme haute) doit être pré-dilué en [R4] pour cibler une concentration de FVIII:C d'environ 1 UI/mL. Il est recommandé d'effectuer une pré-dilution, afin d'amener la concentration théorique de FVIII:C entre 0,2 et 2 UI/mL, puis une dilution 1/40 en [R4] pour la réalisation du test. La concentration en FVIII :C attendue se situe ainsi entre 20 et 200%. (La concentration mesurée doit ensuite être multipliée par le facteur de « pré-dilution »).

Réaliser la gamme de calibration et la tester avec les contrôles de qualité. Les échantillons dilués doivent être testés rapidement, s'ils sont conservés à température ambiante (18-25°C). Les concentrations exactes des étalons et des contrôles sont indiquées pour chaque lot sur le papillon fourni avec le coffret.

3. Introduire dans les puits d'une microplaque ou dans un tube plastique incubé à 37°C:

	Microplaque	Tube
Echantillon, contrôle ou étalon dilués dans [R4]	50 µL	100 µL
[R1] Facteur X humain Préincubé à 37°C	50 µL	100 µL
[R2] Réactif activateur Préincubé à 37°C	50 µL	100 µL
Mélanger et incubé à 37°C, pendant 5 minutes puis introduire :		
[R3] Sxa-11 Préincubé à 37°C	50 µL	100 µL
Mélanger et incubé à 37°C pendant 5 minutes exactement		
Arrêter la réaction en introduisant :		
Acide citrique (2%)*	50 µL	200 µL
Mélanger et mesurer la densité optique à 405nm contre le blanc correspondant.		

*Ou acide acétique (20%). La couleur jaune est stable pendant 2 heures. Le blanc échantillon est obtenu par mélange des réactifs dans l'ordre inverse à celui du test : Acide Citrique (2%), R3, R2, R1, échantillon dilué. Mesurer la densité optique à 405 nm. La valeur du blanc mesurée doit être soustraite de l'absorbance mesurée pour le test correspondant.

Faire un blanc plasma si l'échantillon est icterique, lipémique, hémolysé ou présente une coloration différente des plasmas étalons.

Méthode cinétique :

Le dosage peut être réalisé par méthode cinétique en mesurant le changement d'absorbance entre 10 et 100 secondes après l'addition du substrat (soit ΔA405). Dans ce cas il n'est pas nécessaire de soustraire le blanc échantillon, ni d'arrêter la réaction.

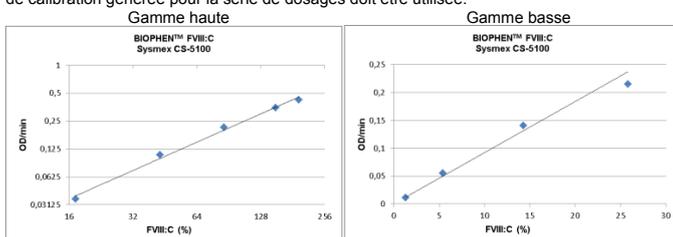
Si un volume réactionnel différent de celui indiqué ci-dessus est requis pour la méthode utilisée, le rapport des volumes doit être strictement respecté afin de garantir les performances du dosage. L'utilisateur est responsable de la validation des modifications et de leur impact sur tous les résultats.

CALIBRATION:

Le test BIOPHEN™ FVIII :C peut être calibré pour le dosage du FVIII :C sur plasmas ou concentrés thérapeutiques. L'étalon plasmatique couvrant la zone calibration est disponible chez HYPHEN BioMed (Voir paragraphe REACTIFS ET MATERIEL REQUIS MAIS NON FOURNIS) et peut être utilisé pour générer la courbe de calibration.

- La zone de calibration est environ de 17 à 195% (en gamme haute) ou de 0,7 à 26% (en gamme basse) sur Sysmex CS-series.

Les courbes de calibration ci-dessous, sont indiquées à titre d'exemple uniquement. La courbe de calibration générée pour la série de dosages doit être utilisée.



CONTRÔLE QUALITE:

L'utilisation de contrôles de qualité permet de valider la conformité de la méthode ainsi que l'homogénéité des dosages entre les différents essais pour un même lot de réactifs. Inclure des contrôles qualité dans chaque série, selon les bonnes pratiques de laboratoire, afin de valider le test. Une nouvelle courbe de calibration doit être établie, de préférence, pour chaque série d'essai, et au moins pour chaque nouveau lot de réactif ou après chaque maintenance de l'automate, ou quand les valeurs des contrôles de qualité sont mesurées en dehors de la zone d'acceptation définie pour la méthode. Chaque laboratoire doit établir les zones d'acceptation et vérifier les performances attendues dans son système analytique.

RESULTATS:

- Pour la méthode manuelle, en point final, tracer la droite de calibration log-log (gamme haute) ou lin-lin (gamme basse), en portant en ordonnées la DO à 405 nm et en abscisses la concentration de FVIII :C en %. Quand la méthode cinétique est utilisée, utiliser les ΔDO 405 au lieu des DO 405.
- La concentration de FVIII :C (%) dans l'échantillon à doser est déduite directement de la courbe de calibration, lorsque la dilution standard est utilisée.
- Si d'autres dilutions sont utilisées le taux obtenu doit être multiplié par le facteur de dilution complémentaire utilisé.
- Les résultats doivent être interprétés selon l'état clinique et biologique du patient.

LIMITATIONS:

- Pour obtenir les performances optimales du test et répondre aux spécifications, suivre scrupuleusement les instructions techniques validées par HYPHEN BioMed.
- Tout réactif présentant un aspect inhabituel ou des signes de contamination doit être rejeté.
- Tout échantillon suspect ou présentant des signes d'activation doit être rejeté.
- Le résultat du FVIII :C peut être apparemment affecté chez les patients traités avec inhibiteur direct du Xa ou présentant une mutation particulière du FVIII.
- Le dosage du FVIII est sensible aux anti-Xa directs et aux anticorps bispécifiques imitant le FVIII¹².

VALEURS ATTENDUES:

La valeur normale en FVIII:C d'un plasma adulte est généralement comprise entre 50 et 150%. Cependant, chaque laboratoire doit établir son propre intervalle normal.

PERFORMANCES:

- La limite basse de détection dépend du système analytique utilisé (<2% en gamme haute et <0,5% en gamme basse sur Sysmex CS-5100).
- La zone de mesure dépend du système analytique utilisé, environ de 2,5% à 250% pour la gamme haute et de 0,25% à 30% pour la gamme basse sur Sysmex CS-series.
- Les études de performances ont été réalisées en interne sur Sysmex CS-5100. Les performances ont été évaluées avec les contrôles du laboratoire sur 20 jours, 2 séries par jour et 2 répétitions à chaque série pour un niveau de contrôle. Les résultats suivants ont été obtenus :

	Contrôle	Intra-essai				Inter-essais			
		N	Moy.	CV%	SD	n	Moy.	CV%	SD
Gamme haute	Normal	30	93,6	1,5	1,4	120	99,0	2,7	2,7
	Anormal	30	35,3	1,1	0,4	120	37,2	2,8	1,1
Gamme basse	Normal	30	9,9	1,9	0,2	120	10,1	4,4	0,4
	Anormal	30	4,0	3,3	0,1	120	3,9	4,7	0,2

- Corrélation avec une autre méthode (Factor VIII chromogenic assay (SIEMENS) vs BIOPHEN™ Factor VIII:C sur Sysmex CS-5100) : n = 86 y = 1,07x - 7,19 r = 0,989

Interférences:

Aucune interférence, sur l'automate Sysmex CS-5100 (gamme haute) n'a été observée avec les molécules et jusqu'aux concentrations suivantes:

Hémoglobine	Bilirubine (C/L)	Heparines (HBPM/HNF)	Intralipides	Apixabine	Dabigatran
1000 mg/dL	60 mg/dL	2 UI/mL	600 mg/dL	50 ng/mL	50 ng/mL

Se référer également au guide d'application spécifique de l'automate utilisé.

REFERENCES:

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

SYMBLES:

Symboles utilisés et signes énumérés dans la norme ISO 15223-1, se référer au document Définition des symboles.

[R3] H373 : Peut endommager les organes en cas d'exposition prolongée ou répétée.

Changements par rapport à la précédente version.