

COATEST® SP FVIII - 82 4086 63

Intended use

For the photometric determination of factor VIII activity in citrated plasma, such as when identifying factor VIII deficiency or monitoring patients on replacement therapy, as well as for potency estimation of FVIII concentrates.

Measurement principle



Composition
 1. **S-2765 15.4 mg + I-2581 1 vial**
 Chromogenic substrate (N-a-Z-D-Arg-Gly-Arg-pNA), 15.4 mg, synthetic thrombin inhibitor, 0.4 mg, and manniitol added as a bulking agent.
 2. **Factor IXa + factor X 9.2 IU 1 vial**
 Lyophilized bovine factors IXa and X with bovine albumin added as a stabilizing agent.
 3. **CaCl₂ 6 ml 1 vial**
 Calcium chloride solution, 0.025 mol/L
 4. **Buffer, stock solution 20 mL 1 vial**
 20 mL concentrated Tris buffer containing NaCl and BSA. Characteristics of tenfold diluted buffer: Tris 0.05 mol/L, pH 7.3, 10 mg/L Ciprofloxacin and 1.0% BSA.
 5. **Phospholipid 2 mL 1 vial**
 Mixture of highly purified phospholipids and 10 mg/L Ciprofloxacin.

PRECAUTION AND WARNINGS
Danger
FIXa + Factor X 9.2 IU Hazard class: Resp. sens. 1, H334
Hazard statements: H334: May cause allergy or asthma symptoms or breathing difficulties if inhaled.
Precautionary statements: P261: Avoid breathing vapors/ spray; P284: [In case of inadequate ventilation] wear respiratory protection; P304 + P340: IF INHALED: Remove person to fresh air and keep comfortable for breathing; P305 + P311: If experiencing respiratory symptoms: Call a POISON CENTER/doctor. P501: Dispose of contents/container in accordance with local/regional/national/international regulation.
Supplemental hazard information: Contains Factor IXa. Up to 2.95 % of the mixture consists of component of unknown acute toxicity (oral, dermal, inhalation) for the human health and for the aquatic environment.
CaCl₂ S-2765 15.4 mg + I-2581, Buffer , Phospholipid
Hazard class: none
Hazard statements: none
Precautionary statements: none
Supplemental hazard information:
CaCl₂ EUH210: Safety data sheet available on request.
S-2765 15.4 mg + I-2581: EUH210: Safety data sheet available on request. Up to 6.14% of the mixture consists of component of unknown acute toxicity (oral, dermal, inhalation) for the human health and for the aquatic environment.
Buffer: EUH210: Safety data sheet available on request. Up to 7 % of the mixture consists of component of unknown acute toxicity (oral, dermal, inhalation) for the human health.
Phospholipid: Up to 40.4 % of the mixture consists of component of unknown acute toxicity (oral, dermal, inhalation) for the human health.
 This product is for *in vitro* diagnostic use.

Preparation
 The reagents are reconstituted according to the specific instrument application. For microplate and test tube techniques:
 1. **S-2765 + I-2581:** Reconstitute with 12.0 mL of sterile water or NCCLS type II water¹¹, to obtain a concentration of 1.8 mmol/L.
 2. **Factor IXa + Factor X:** Reconstitute with 10.0 mL of sterile water or NCCLS type II water¹¹
 3. **CaCl₂:** Ready to use.
 4. **Buffer, stock solution:** Dilute 1:10 (1+9) with sterile water or NCCLS type II water¹¹. Prepare a new buffer working solution each day.
 5. **Phospholipid:** Ready to use.

Reagent storage and stability
 When kept at 2-8°C the sealed reagents are stable until the expiry date printed on the label. Contamination by microorganisms should be avoided once the vials are opened.
 1. **S-2765 + I-2581:** Stability after reconstitution: 3 months at 2-8°C.
 2. **Factor IXa + Factor X:** Stability after reconstitution: 12 hours at 2-8°C. The solution can be stored frozen in aliquots at -20°C (or at lower temperature) for 3 months. Do not refreeze.
 3. **CaCl₂ (0.025 mol/L):** Opened vial is stable 3 months at 2-8°C.
 4. **Buffer, stock solution (Tris 0.05 mol/L, pH 7.3, 10 mg/L Ciprofloxacin and 1.0% BSA):** Once opened the buffer is stable 3 months at 2-8°C. Prepare a new buffer working solution each day.
 5. **Phospholipid:** Opened vial is stable for 3 months at 2-8°C. Shake gently before use.

Reagents and materials required but not provided
 1. Deionized water, filtered through 0.22 μm or NCCLS type II water.¹¹
 2. Acetic acid 20% or citric acid 2%.
 3. Control Plasma Abnormal and Normal calibrated against an International Standard for Factor VIII
 4. Calibration plasma calibrated against an International Standard
 5. Photometer, 405 nm (and 490 nm for microplate procedure)
 6. Heat incubator 37°C ± 0.2°C
 7. Semi-micro cuvettes
 8. Centrifuge, 2000xg
 9. Plastic test tubes
 10. Stopwatch
 11. Vortex mixer
 12. Calibrated pipettes

Standard	Plasma	Buffer working-solution	Predilution	Final dilution	Buffer working-solution
%	μL	μL	μL	μL	μL
150	-	undiluted	25	2000	
120	200	50	25	2000	
100	100	50	25	2000	
75	100	100	25	2000	
50	100	200	25	2000	
21	100	600	25	2000	

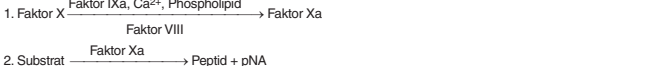
The assigned percentage values of the standard dilutions are those obtained from a normal plasma containing 1.0 IU factor VIII/mL. In case the factor VIII content of the normal plasma differs from this value, an appropriate correction factor should be used.
Preparation of plasma sample
 Use plastic test tubes.
 Test plasma or concentrate 25 μL
 Buffer working solution (2-8°C) 3000 μL
 Mix well. Keep at 2-8°C.
 The assay must be performed within 30 minutes after dilution because of the lability of factor VIII.
Assay
 NOTE: The assay should be performed in plastic material.

COATEST® SP FVIII - 82 4086 63

Verwendungszweck

Zur photochemischen Bestimmung der Faktor VIII Aktivität in Citratplasma zur Identifizierung von Faktor VIII-Mängeln und zur Überwachung einer Substitutions-therapie sowie zur Gehaltsbestimmung von Faktor VIII-Konzentrat.

Messprinzip



Reagenzien
 1. **S-2765 15.4 mg + I-2581 1 Flaschen**
 Chromogenes Substrat (N-a-Z-D-Arg-Gly-Arg-pNA), 15.4 mg, synthetischer Thrombin-Inhibitor, 0,4 mg, und Mannitol als Füllstoffzusatz.
 2. **Factor IXa + Factor X 9.2 IU 1 Flaschen**
 Lyophilisierte Faktoren IXa und X vom Rind, stabilisiert mit Rinderserumalbumin (BSA)
 3. **CaCl₂ 6 ml 1 Flaschen**
 Calciumchloridlösung, 0.025 mol/l
 4. **Puffer, Konzentrat 20 mL 1 Flaschen**
 20 ml konzentrierter Tris-Puffer, enthält NaCl and BSA. Der 10-fach verdünnte Puffer enthält: Tris 0,05 mol/l, pH 7,3, 10 mg/ml Ciprofloxacin und 1,0 % BSA.
 5. **Phospholipide 2 mL 1 Flaschen**
 Mischung hochgereinigter Phospholipide und 10 mg/l Ciprofloxacin

WARNHINWEISE
Gefahr
FIXa + Factor X 9.2 IU Gefahrenklasse: Resp. sens. 1, H334
Gefahrenhinweise: H334: Kann bei Einatmen Allergie, asthmaartige Symptome oder Atembeschwerden verursachen.
Sicherheitssätze: P261: Einatmen von Dampf/ Aerosol vermeiden; P284: [Bei unzureichender Belüftung] Atemschutz tragen; P304 + P340: BEI EINATMEN: Die Person an die frische Luft bringen und für ungehinderte Atmung sorgen; P305 + P311: Bei Symptomen der Atemwege: GIFTINFORMATIONSZENTRUM/Arzt anrufen. P501: Inhalt/Behälter gemäß lokalen/regionalen/nationalen/internationalen Vorschriften zuführen.
Ergänzende Gefahrenmerkmale: Enthält Faktor IXa. Bis 2.95 % dieses Gemisches besteht aus Inhaltsstoffen, deren akute Toxizität (oral, dermal, inhalatorische) für den Menschen und die Gewässer nicht bekannt ist.
CaCl₂ S-2765 15.4 mg + I-2581, Buffer , Phospholipid
Gefahrenklasse: Keine
Gefahrenhinweise: Keine
Sicherheitssätze: Keine
Ergänzende Gefahrenmerkmale:
CaCl₂: EUH210: Sicherheitsdatenblatt auf Anfrage erhältlich.
S-2765 15.4 mg + I-2581: EUH210: Sicherheitsdatenblatt auf Anfrage erhältlich. Bis 6,14 % dieses Gemisches besteht aus Inhaltsstoffen, deren akute Toxizität (oral, dermal, inhalatorische) für den Menschen und die Gewässer nicht bekannt ist.
Buffer: EUH210: Sicherheitsdatenblatt auf Anfrage erhältlich. Bis 7 % dieses Gemisches besteht aus Inhaltsstoffen, deren akute Toxizität (oral, dermal, inhalatorische) für den Menschen nicht bekannt ist.
Phospholipid: Bis 40.4 % dieses Gemisches besteht aus Inhaltsstoffen, deren akute Toxizität (oral, dermal, inhalatorische) für den Menschen nicht bekannt ist.
In vitro-Diagnostikum.

Preparation of the Reagents

The reagents are reconstituted according to the specific instrument application. For microplate and test tube techniques:
 1. **S-2765 + I-2581:** Mix 12.0 ml of sterile water with 12.0 mL of sterile water or NCCLS type II water¹¹ to obtain a concentration of 1.8 mmol/l to be reconstituted.
 2. **Factor IXa + Factor X:** Mix 10.0 ml of sterile water with 10.0 mL of sterile water or NCCLS type II water¹¹ to obtain a concentration of 1.8 mmol/l to be reconstituted.
 3. **CaCl₂:** Ready to use.
 4. **Buffer, stock solution:** Dilute 1:10 (1+9) with sterile water with 10.0 mL of sterile water or NCCLS type II water¹¹ to obtain a concentration of 1.8 mmol/l to be reconstituted.
 5. **Phospholipid:** Ready to use.

Reagents and Stability of the Reagents
 The reagents are reconstituted according to the specific instrument application. For microplate and test tube techniques:
 1. **S-2765 + I-2581:** Stability after reconstitution: 3 months at 2-8°C.
 2. **Factor IXa + Factor X:** Stability after reconstitution: 12 hours at 2-8°C. The solution can be stored frozen in aliquots at -20°C (or at lower temperature) for 3 months. Do not refreeze.
 3. **CaCl₂ (0.025 mol/L):** The reagent is stable for 3 months after opening the vial at 2-8°C.
 4. **Buffer, stock solution (Tris 0.05 mol/L, pH 7.3, 10 mg/L Ciprofloxacin and 1.0 % BSA):** After opening the vial, the buffer is stable for 3 months at 2-8°C. Prepare a new buffer working solution each day.
 5. **Phospholipid:** The reagent is stable for 3 months after opening the vial at 2-8°C. Shake gently before use.

Additional Reagents and Materials
 1. Deionized water, filtered through 0.22 μm or NCCLS type II water.¹¹
 2. 20 %ige Essigsäure oder 2 %ige Zitronensäure.
 3. Normale und pathologische Kontrollplasmen, die gegen einen Internationalen Standard für Faktor VIII kalibriert sind.
 4. Kalibrationsplasma, das gegen einen Internationalen Standard für Faktor VIII kalibriert ist.
 5. Photometer, 405 nm (und 490 nm für Mikrotiter-Methoden).
 6. Inkubator, 37°C (± 0,2°C).
 7. Semi-Mikrovollröhrchen.
 8. Zentrifuge, 2000 x g.
 9. Teströhrchen aus Kunststoff.
 10. Stoppuhr.
 11. Vortex-Mixer.
 12. Geeichte Pipetten.

Standard	Plasma	Puffer-Arbeitslösung	Verdünnung	Endverdünnung	Puffer-Arbeitslösung
%	μL	μL	μL	μL	μL
150	-	undiluted	25	2000	
120	200	50	25	2000	
100	100	50	25	2000	
75	100	100	25	2000	
50	100	200	25	2000	
21	100	600	25	2000	

Specimen collection

Nine parts of freshly drawn venous blood are collected into one part trisodium citrate.
 Centrifugation: 2000 x g for 10-20 minutes at 20-25°C. Refer to NCCLS document H21-A4 for further instructions on specimen collection, handling and storage.¹²

Quality Control

Normal and abnormal controls for plasma or concentrates are recommended for reliable quality control.¹³ Assigned values of Controls should be traceable to the International Standard. Periodically within each run a control should be analyzed. The control material should be treated in the same way as a test sample. A range of allowable variation should be established for controls in each laboratory. If a value outside the established control range is obtained, a complete check of calibration, reagents and instrument performance should be made.

Results

Factor VIII results are reported in % activity (100% factor VIII activity is equivalent to 1.0 IU/mL).

Expected values

Range: 49 - 126 % (2 SD, n=121) in a normal healthy population evaluated with Coatest SP Factor VIII (test tube method).

Due to the many variables that may affect results, each laboratory should establish its own normal range, avoiding inadvertent losses of factor VIII activity.

Procedure

NOTE: All conditions included in this package insert refer to the manual method. Detailed settings for the ACL 8000/9000/10000 including instructions for preparation of the reagents are available on request from Chromogenix.

Two ranges of factor VIII are defined (20-150% and 1-20%).
Range 20-150%:
 Prepare a solution of phospholipid-factor IXa and factor X reagent by mixing:
 • 1 volume of phospholipid
 • 5 volumes of factor IXa+factor X reagent
 Keep on ice or at 2-8°C.
 Shake gently just before use.

Calibration
 A standard curve is required for each Coatest SP Factor VIII kit. Normal human plasma, calibrated against an International Standard, is used for preparation of standard dilutions in plastic tubes using pre-cooled buffer working solution according to the table below:

Standard	Plasma	Buffer working-solution	Predilution	Final dilution	Buffer working-solution
%	μL	μL	μL	μL	μL
150	-	undiluted	25	2000	
120	200	50	25	2000	
100	100	50	25	2000	
75	100	100	25	2000	
50	100	200	25	2000	
21	100	600	25	2000	

The assigned percentage values of the standard dilutions are those obtained from a normal plasma containing 1.0 IU factor VIII/mL. In case the factor VIII content of the normal plasma differs from this value, an appropriate correction factor should be used.

Preparation of plasma sample
 Use plastic test tubes.
 Test plasma or concentrate 25 μL
 Buffer working solution (2-8°C) 3000 μL
 Mix well. Keep at 2-8°C.
 The assay must be performed within 30 minutes after dilution because of the lability of factor VIII.
Assay
 NOTE: The assay should be performed in plastic material.

% FVIII	Acid-stopped method	Initial rate method
Phospholipid+ FIXa + FX (2-8°C)	200 μL	200 μL
Test plasma or standard dilution (2-8°C)	100 μL	100 μL
Mix and incubate at 37°C 4-5 min		
CaCl ₂ (37°C)	100 μL	100 μL
Mix and incubate at 37°C exactly 5 min		
S-2765+I-2581 (37°C)	200 μL	200 μL
Mix and incubate at 37°C exactly 5 min		
Acetic acid 20% or citric acid 2% (20-25°C)	100 μL	

Acid-stopped method: Read the absorbance of the sample against a reagent blank (buffer working solution instead of sample) within 4 hours.
 Because of the large dilution of the plasma, no sample blanks have to be included.

Initial rate method: Transfer immediately to a 1 cm semi-micro cuvette (pre-heated to 37°C) and measure the absorbance change at 405 nm.

Range 1-20%:
 Prepare a solution of phospholipid-factor IXa and factor X reagent by mixing:
 • 1 volume of phospholipid
 • 5 volumes of factor IXa+factor X reagent
 Keep on ice or at 2-8°C.
 Shake gently just before use.
 The mixture is stable for 4 hours at 2-8°C or 12 hours on ice.
Calibration
 A standard curve is required for each Coatest SP Factor VIII kit. Normal human plasma, calibrated against the

Standard	Plasma	Puffer-Arbeitslösung	Verdünnung	Endverdünnung	Puffer-Arbeitslösung
%	μL	μL	μL	μL	μL
150	-	undiluted	25	2000	
120	200	50	25	2000	
100	100	50	25	2000	
75	100	100	25	2000	
50	100	200	25	2000	
21	100	600	25	2000	

COATEST® SP FVIII - 82 4086 63

Probengewinnung

Neun Teile frisch gewonnenes venöses Vollblut mit 1 Teil Natriumcitrat mischen und bei 2000 x g für 10-20 Minuten bei 20-25°C zentrifugieren. Weitere Anweisungen bezüglich Entnahme, Behandlung und Lagerung von Probenmaterial gemäß NCCLS Dokument H21-A4.12.

Qualitätskontrolle

Normale und pathologische Kontrollmaterialien für Plasma bzw. Konzentrate werden zur Durchführung einer zuverlässigen Qualitätskontrolle empfohlen. Die spezifizierten Werte der Kontrollen sollten auf einen internationalen Standard rückführbar sein. Regelmäßig während einer Analysenserie sollten Kontrollmessungen stattfinden. Das Kontrollmaterial sollte entsprechend den Proben behandelt werden. Der Bereich tolerierbarer Abweichungen für die Kontrollen sollte in jedem Labor ermittelt werden. Falls ein Wert außerhalb dieses Vertrauensbereiches liegt, sollte eine vollständige Überprüfung von Kalibration, Reagenzien und Analysengerät durchgeführt werden.

Ergebnisse

Die Faktor VIII-Messwerte werden als % Aktivität angegeben (100 % Faktor VIII-Aktivität entspricht 1,0 IU/ml).

Erwartete Werte

Reich: 49-126 % (2 SD-Bereich, n = 121) in einer gesunden Normalpopulation, gemessen mit COATEST SP Faktor VIII (Teströhrchen-Methode). Auf Grund der vielfältigen Variablen, die das Testergebnis beeinflussen können, sollte jedes Labor unter Vermeidung von Faktor VIII-Aktivitätsverlusten einen eigenen Normalbereich erstellen.

Testdurchführung

ANMERKUNG: Alle Angaben in dieser Gebrauchsanweisung beziehen sich auf die manuelle Durchführung der Methode. Genaue Angaben für die Durchführung der Methode auf ACL 8000/9000/10000 incl. der Vorbereitung der Reagenzien sind auf Nachfrage von Chromogenix erhältlich.
 Zwei Bereiche der Faktor VIII-Aktivität werden unterschieden (20-150 % und 1-20 %).
Bereich 20-150%
 Lösung aus Phospholipid und Faktor IXa + Faktor X-Reagenz mischen:
 • 1 Volumenteil Phospholipid
 • 5 Volumenteile Faktor IXa + Faktor X-Reagenz
 Auf Eis oder bei 2-8°C lagern
 Vor Gebrauch vorsichtig mischen.
 Die Mischung ist bei 2-8°C für 4 Stunden, auf Eis für 12 Stunden haltbar.

Kalibration

Eine Standardkurve ist für jede Testpackung COATEST SP Faktor VIII erforderlich. Humanes Normalplasma, das gegen einen Internationalen Standard kalibriert ist, wird zur Herstellung von Standardverdünnungen in Kunststoff-Röhrchen, unter Verwendung gekühlter Puffer-Arbeitslösung entsprechend nachstehender Tabelle, verwendet:

Standard	Plasma	Puffer-Arbeitslösung	Verdünnung	Endverdünnung	Puffer-Arbeitslösung
%	μL	μL	μL	μL	μL
150	-	undiluted	25	2000	
120	200	50	25	2000	
100	100	50	25	2000	
75	100	100	25	2000	
50	100	200	25	2000	
21	100	600	25	2000	

Die angegebenen %-Werte der Faktor VIII-Aktivität der Standardverdünnungen ergeben sich bei Verwendung eines Normalplasmas mit einer Faktor VIII-Aktivität von 1,0 IU/ml. Falls der Faktor VIII-Gehalt des Normalplasmas von diesem Wert abweicht, ist bei der Angabe der %-Werte der Faktor VIII-Aktivität der Standardverdünnungen ein entsprechender Korrekturfaktor zu berücksichtigen.

Probenvorbereitung

Kunststoffröhrchen verwenden.
 Testplasma oder Konzentrat 25 μL
 Puffer-Arbeitslösung (2-8°C) 3000 μL
 Gut mischen und bei 2-8°C lagern.
 Auf Grund der Instabilität des Faktor VIII muss der Test innerhalb von 30 Minuten nach Verdünnung durchgeführt werden.

Testdurchführung

ANMERKUNG: Für die Testdurchführung ausschließlich Kunststoffmaterial verwenden.
Endpunkt-Methode
 Phospholipid+ FIXa + FX (2-8°C) 200 μL
 Testplasma oder Standardverdünnung (2-8°C) 100 μL
 Mischen und 4-5 min bei 37°C inkubieren
 CaCl₂ (37°C) 100 μL
 Mischen und exakt 5 min bei 37°C inkubieren
 S-2765+I-2581 (37°C) 200 μL
 Mischen und exakt 5 min bei 37°C inkubieren
 20 %ige Essigsäure oder 2 %ige Zitronensäure (20-25°C) 100 μL

Endpunkt-Methode: Die Absorption der Proben bei 405 nm innerhalb von 4 Stunden gegen einen Reagenzienleerwert (Arbeitspuffer an Stelle des Testplasmas) ablesen. Aufgrund der hohen Verdünnung der Testplasmen ist ein Probenleerwert nicht erforderlich.
Kinetische Methode: Das Testgemisch sofort in eine auf 37 °C vorgewärmte Semi-Mikrovollröhrchen überführen und die Absorptionsänderung bei 405 nm aufzeichnen.
Bereich 1-20%
 Lösung aus Phospholipid und Faktor IXa + Faktor X-Reagenz mischen:
 • 1 Volumenteil Phospholipid
 • 5 Volumenteile Faktor IXa + Faktor X-Reagenz
 Auf Eis oder bei 2-8°C lagern
 Vor Gebrauch vorsichtig mischen.
 Die Mischung ist bei 2-8 °C für 4 Stunden, auf Eis für 12 Stunden haltbar.

Kalibration

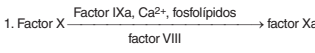
Eine Standardkurve ist für jede Testpackung COATEST SP Faktor VIII erforderlich. Humanes Normalplasma, das gegen einen Internationalen Standard kalibriert ist, wird zur Herstellung von Standardverdünnungen in Kunststoff-Röhrchen, unter Verwendung gekühlter Puffer-Arbeitslösung entsprechend nachstehender Tabelle, verwendet:

Standard	Plasma	Puffer-Arbeitslösung	Verdünnung	Endverdünnung	Puffer-Arbeitslösung
%	μL	μL	μL	μL	μL
150	-	undiluted	25	2000	
120	200	50	25	2000	
100	100	50	25	2000	
75	100	100	25	2000	

Aplicación

Para la determinación fotométrica de la actividad del Factor VIII en plasma citratado, en el estudio de deficiencias de Factor VIII o en la monitorización de pacientes bajo terapia de sustitución, así como para la estimación de concentrados de FVIII.

Principio



En presencia de calcio y fosfolípidos, el factor X se activa a factor Xa gracias al Factor IXa. Este proceso está estimulado por el factor VIII, el cual puede considerarse como cofactor de esta reacción. Utilizando cantidades óptimas de Ca²⁺ y fosfolípidos y exceso de factores IXa y X, el grado de activación de factor X depende únicamente de la cantidad de factor VIII. El Factor Xa hidroliza el sustrato cromogénico S-2765 liberándose así el grupo cromóforo pNA. El color se lee fotométricamente a 405 nm. La cantidad de Factor Xa generado y la intensidad de color producida, es proporcional a la actividad del factor VIII de la muestra. La hidrólisis del sustrato S-2765 por parte de la trombina formada, se evita con la adición de un inhibidor sintético de la trombina, I-2581, conjuntamente con el sustrato.

Composición

- S-2765 15.4 mg + I-2581** 1 vial
Sustrato Cromogénico (N-a-Z-D-Arg-Gly-Arg-pNA), 15.4 mg, inhibidor sintético de la Trombina, 0.4 mg, y manitol añadido como excipiente
- Factor IXa + Factor X 9.2 IU** 1 vial
Factores IXa y X bovinos liofilizados con albúmina bovina añadida como agente estabilizante
- CaCl₂ 6 ml** 1 vial
Solución de Cloruro Cálcico, 0,025 mol/L
- Buffer, stock solution 20 mL** 1 vial
20 mL Tampón Tris concentrado que contiene NaCl y BSA. Características del tampón diluido 1:10 (1+9): Tris 0.05 mol/L, pH 7.3, 10 mg/L Ciprofloxacina y 1.0% BSA.
- Phospholipid 2 mL** 1 vial
Mezcla de fosfolípidos altamente purificados y 10 mg/L Ciprofloxacina.

PRECAUCIÓN Y ALERTAS

Peligro
FIXa + Factor X 9.2 IU
Clase de peligro: Resp. sens. 1, H334
Indicaciones de peligro: H334: Puede provocar síntomas de alergia o asma o dificultades respiratorias en caso de inhalación.

Consejos de prudencia: P261: Evitar respirar los vapores/el aerosol. P284: [En caso de ventilación insuficiente.] llevar equipo de protección respiratoria. P304 + P340: EN CASO DE INHALACIÓN: Transportar a la persona al aire libre y mantenerla en una posición que le facilite la respiración. P342 + P311: En caso de síntomas respiratorios: Llamar a un CENTRO DE TOXICOLOGÍA/médico. P501: Eliminar el contenido/el recipiente de conformidad con la normativa local, regional, nacional o internacional.

Información suplementaria sobre los peligros: Contiene Factor IXa. Hasta el 2.95 % de la mezcla está constituido por componentes con una toxicidad aguda (oral, dérmica, por inhalación) para los seres humanos y un peligro para el medio ambiente no conocidos.

CaCl₂, S-2765 15.4 mg + I-2581, Buffer , Phospholipid

Clase de peligro: Ninguna

Indicaciones de peligro: Ninguna

Consejos de prudencia: Ninguna

Información suplementaria sobre los peligros:

CaCl₂: EUH210: Puede solicitarse la ficha de datos de seguridad.

S-2765 15.4 mg + I-2581: EUH210: Puede solicitarse la ficha de datos de seguridad. Hasta el 6.14 % de la mezcla está constituido por componentes con una toxicidad aguda (oral, dérmica, por inhalación) para los seres humanos y un peligro para el medio ambiente no conocidos.

Buffer: EUH210: Puede solicitarse la ficha de datos de seguridad. Hasta el 7 % de la mezcla está constituido por componentes con una toxicidad aguda (oral, dérmica, por inhalación) para los seres humanos no conocidos.

Phospholipid: Hasta el 40.4 % de la mezcla está constituido por componentes con una toxicidad aguda (oral, dérmica, por inhalación) para los seres humanos no conocidos. Este producto es para el diagnóstico *in vitro*.

Preparación

Los reactivos se reconstituyen de acuerdo a las adaptaciones específicas de cada instrumento. Para las técnicas en microplaca y tubo:

- S-2765 + I-2581:** Reconstituir con 12.0 mL de agua destilada tipo II NCCLS¹¹, para obtener una concentración de 1.8 mmol/L.
- Factor IXa + Factor X:** Reconstituir con 10.0 mL de agua destilada tipo II NCCLS¹¹
- CaCl₂:** Listo para usar.
- Buffer, stock solution:** Diluir 1:10 (1+9) con agua destilada tipo II NCCLS¹¹ Prepare esta solución nueva cada día.
- Phospholipid:** Listo para usar.

Conservación y estabilidad de los reactivos

Los reactivos que no hayan sido abiertos son estables hasta la fecha de caducidad indicada en el vial si se mantienen a 2-8°C. Una vez abierto el vial debe evitarse la contaminación por microorganismos.

- S-2765 + I-2581:** Estabilidad después de la reconstitución: 3 meses a 2-8°C.
- Factor IXa + Factor X:** Estabilidad después de la reconstitución: 12 horas a 2-8°C. Alicuotas congeladas de esta solución son estables a -20°C (o temperaturas menores) durante 3 meses. No congelar de nuevo.
- CaCl₂ (0.025 mol/L):** El vial abierto es estable 3 meses a 2-8°C.
- Buffer, stock solution (Tris 0.05 mol/L, pH 7.3, 10 mg/L Ciprofloxacina y 1.0% BSA):** Una vez abierto el tampón es estable 3 meses a 2-8°C. Prepare esta solución nueva cada día.
- Phospholipid:** El vial abierto es estable 3 meses a 2-8°C. Mezclar vigorosamente antes de usar.

Reactivos y materiales requeridos pero no suministrados

- Agua desionizada, filtrada con un filtro 0.22 mm o agua destilada tipo II NCCLS¹¹
- Ácido Acético al 20% o ácido cítrico al 2%.
- Plasma Control Anormal y Normal calibrado contra el estándar internacional de Factor VIII
- Plasma Calibrador titulado contra un estándar internacional
- Fotómetro, 405 nm (y 490 nm para procedimiento en microplaca)
- Incubador 37°C ± 0.2°C
- Cubetas semi-micro
- Centrífuga, 2000xg
- Tubos de plástico
- Cronómetro
- Vórtex
- Pipetas calibradas

Recolección de las Muestras

Recoger nueve partes de sangre recién extraída por punción venosa y una parte de anticoagulante citrato trisódico. Centrifugar: 2000 x g durante 10-20 minutos a 20-25°C. Referirse al documento NCCLS documento H21-A4 para más información sobre la recolección, transporte y almacenamiento de muestras.¹²

Control de Calidad

Se recomienda el uso de los controles de plasma normales y anormales de IL para realizar un completo programa de Control de Calidad.¹³ Los valores asignados a los controles deben guardar trazabilidad con el Estándar Internacional. Los controles deben ser procesados dentro de cada sesión. Los controles deben ser tratados del mismo modo que las muestras. Cada laboratorio debe establecer la media y desviación estándar de sus controles. Si se obtienen resultados fuera del rango establecido para ese control, compruebe la calibración, reactivos y procedimiento del test.

Resultados

Los resultados del Factor VIII se informan en % de actividad (el 100% de actividad del factor VIII equivale a 1.0 IU/mL).

Valores esperados

Rango: 49 - 126 % (2 SD, n=121) en población sana evaluada con Coatest SP Factor VIII (método en tubo). Debido a las diferentes variables que pueden afectar a los resultados, cada laboratorio debe establecer su propio rango de normalidad, para evitar pérdidas inadvertidas de actividad de factor VIII.

Procedimiento

NOTA: Todas las condiciones del prospecto se refieren al método manual. Las instrucciones de preparación de los reactivos y configuración de la técnica para el ACL 8000/9000/10000 pueden solicitarse a Chromogenix. Se han definido dos rangos de factor VIII (20-150% y 1-20%).

Rango 20-150%:
Prepare una solución de reactivos de fosfolípidos + factor IXa y factor X mezclando:

- 1 volumen de fosfolípidos
- 5 volúmenes de reactivo factor IXa + factor X

Mantenga la mezcla en hielo o a 2-8°C

Agite vigorosamente antes de usar.

La mezcla es estable 4 horas a 2-8°C o 12 horas en hielo.

Calibración

Es necesario realizar una curva estándar para cada kit de Coatest Factor VIII. Se utiliza plasma humano normal, calibrado contra un Estándar Internacional, para preparar las diluciones de los estándares. Prepare las diluciones en tubos de plástico utilizando el tampón de trabajo precalentado según la tabla inferior:

Estandar	Plasma	Preditución		Dilución Final	
		Tampón de trabajo	Preditución	Tampón de trabajo	Dilución Final
%	µL	µL	µL	µL	µL
150	-	Sin diluir	25	200	2000
120	200	50	25	25	2000
100	100	50	25	25	2000
75	100	100	25	25	2000
50	100	200	25	25	2000
21	100	600	25	25	2000

El valor del porcentaje de cada dilución es la obtenida de un plasma normal con 1.0 IU factor VIII/mL. La concentración o actividad de un plasma normal puede diferir de este valor, utilice el factor de corrección apropiado.

Preparación de la muestra de plasma

Utilice tubos de plástico.

Volumen de plasma o concentrado 25 µL

Tampón de Trabajo (2-8°C) 3000 µL

Mezclar. Mantener a 2-8°C.

El test debe realizarse dentro de los 30 minutos posteriores a la dilución debido a la labilidad del factor VIII.

Ensayo

NOTA: El ensayo debe realizarse en material de plástico.

	Método de parada con ácido	Método del ratio inicial
Fosfolípido+ FIXa + FX (2-8°C)	200 µL	200 µL
Plasma o dilución estándar (2-8°C)	100 µL	100 µL
Mezclar e incubar a 37°C 4-5 min	100 µL	100 µL
CaCl ₂ (37°C)		
Mezclar e incubar a 37°C exactamente 5 min		
S-2765+I-2581 (37°C)	200 µL	200 µL
Mezclar e incubar a 37°C exactamente 5 min		
Ácido acético 20% o ácido cítrico 2% (20-25°C)	100 µL	

Método de parada con ácido: Lea las absorbancia de la muestra contra el blanco de reactivo (tampón de trabajo en lugar de muestra) dentro de las 4 horas. Debido a la gran dilución del plasma, no se debe incluir blancos de muestra.

Método de ratio inicial: Transferir inmediatamente a una cubeta semi-micro de 1 cm (pre-calentada a 37°C) y medir el cambio de absorbancia a 405 nm.

Rango 1-20%:

Prepare una solución de reactivos de fosfolípidos + factor IXa y factor X mezclando:

- 1 volumen de fosfolípidos
- 5 volúmenes de reactivo factor IXa + factor X

Mantenga la mezcla en hielo o a 2-8°C

Agite vigorosamente antes de usar.

La mezcla es estable 4 horas a 2-8°C o 12 horas en hielo.

Calibración

Es necesario realizar una curva estándar para cada kit de Coatest Factor VIII. Se utiliza plasma humano normal, calibrado contra un Estándar Internacional, para preparar las diluciones de los estándares. Prepare las diluciones en tubos de plástico utilizando el tampón de trabajo precalentado según la tabla inferior:

Estandar	Plasma	Preditución		Dilución Final	
		Tampón de trabajo	Preditución	Tampón de trabajo	Dilución Final
%	µL	µL	µL	µL	µL
20	50	200	25	200	2000
14,3	50	300	25	25	2000
9,1	50	500	25	25	2000
4,8	25	500	25	25	2000
1,2	25	2000	25	25	2000

El valor del porcentaje de cada dilución es la obtenida de un plasma normal con 1.0 IU factor VIII/mL. La concentración o actividad de un plasma normal puede diferir de este valor, utilice el factor de corrección apropiado.

Preparación de la muestra de plasma

Utilice tubos de plástico.

Volumen de plasma o concentrado 25 µL

Tampón de Trabajo (2-8°C) 2000 µL

Mezclar. Mantener a 2-8°C.

El test debe realizarse dentro de los 30 minutos posteriores a la dilución debido a la labilidad del factor VIII.

Ensayo

Debido a la escasa generación de FXa en muestras con <5% de factor VIII, se recomienda el método de parada con ácido para ese rango de factor VIII.

NOTA: El ensayo debe realizarse en material de plástico.

Fosfolípido+ FIXa + FX (2-8°C) 200 µL

Plasma o dilución estándar (2-8°C) 100 µL

Mezclar e incubar a 37°C 4-5 min

CaCl₂ (37°C) 100 µL

Mezclar e incubar a 37°C exactamente 10 min

S-2765+I-2581 (37°C) 200 µL

Mezclar e incubar a 37°C exactamente 10 min

Ácido acético 20% o ácido cítrico 2% (20-25°C) 100 µL

Lea la absorbancia de la muestra contra el blanco de reactivo (tampón de trabajo en lugar de muestra) dentro de las 4 horas. Debido a la gran dilución del plasma, no se debe incluir blancos de muestra.

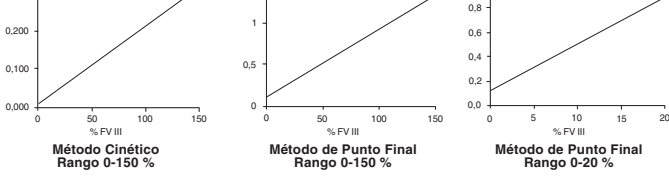
NOTA: El ensayo arriba descrito también puede realizarse en micropocillos reduciendo a una cuarta parte todos los volúmenes, y manteniendo todas las demás condiciones (incubación, tiempos de hidrólisis). En este caso la absorbancia debe leerse a 405 nm y 490 nm. Reste la A₄₉₀ de la A₄₀₅ para corregir las diferencias de los pocillos de la microplaca.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

La reacción de activación debe realizarse en material de plástico ya que las superficies de cristal pueden interferir con la generación de factor Xa. El Factor VIII es un factor de la coagulación muy lábil, de modo que es muy importante seguir al pie de la letra y estandarizando al máximo todo el proceso de trabajo para asegurar unos buenos resultados.

Cálculo

Introduzca los cambios de absorbancia por minuto (ΔA/min) o absorbancia (A) para todos los estándares contra sus concentraciones de factor VIII en un papel de gráficos lineales. Con la absorbancia obtenida de la muestra y calcule el valor en % de FVIII utilizando la curva estándar.



Características Técnicas

Especificidad y Factores de interferencia

Los resultados de FVIII no se ven afectados por concentraciones de: Triglicéridos < 700 mg/dL, Bilirubina < 20 mg/dL, Hemoglobina < 100 mg/dL y Heparina no fraccionada (UF) < 1.0 IU/mL.

NOTA: No deberían analizarse muestras hemolizadas en el rango bajo.

Debido a las diluciones tan grandes que se utilizan, no hay una infravaloración de actividad de factor VIII en muestras con anticoagulante tipo Lupus.

Precisión

La precisión total e intraserie se establecieron sobre múltiples series.

Sistema	%CV (Intraserie)	n	%CV (Total)	N
Método en tubo Media % FVIII				
83 %	3,4	2	5,3	80
14 %	4,3	2	5,6	80

Correlación:	Pendiente	Intercepción	r	Método de Referencia	n
Método en tubo	1.0851	-4.80	0.9873	Coatest Factor VIII (fosfolípidos porcinos naturales)	181

Este estudio (n=181) se realizó utilizando muestras procedentes de individuos sanos, así como de pacientes con diferentes niveles de deficiencia de FVIII, enfermedad de von Willebrand y otras patologías.

Linealidad del Sistema

Método en tubo: 0 -150% factor VIII

Límite de detección del Sistema

Método en tubo: El ensayo permite la detección de 1% de actividad de factor VIII.

Sensibilidad del Sistema

Método en tubo: ΔA₄₀₅ por 1% de actividad de FVIII: rango bajo 0.034
rango normal 0.009

Determinaciones/kit

Método en microplaca: 240 Método en tubo: 60

Symbols used / Verwendete Symbole / Símbolos utilizados / Symboles utilisés / Simboli impiegate / Χρησιμοποιημένα σύμβολα

IVD In vitro Diagnostic Medical Device In vitro Diagnostikum Dispositif médical de diagnostic <i>in vitro</i> Producto sanitario para diagnóstico <i>in vitro</i> Dispositivo medicodiagnostico <i>in vitro</i>	LOT Batch code Charngenbezeichnung Codigo de lote Code du lot Codice del lotto	 Use by Verwendbar bis Fecha de caducidad Utiliser jusque Utilizzare entro	 Temperature limitation Zulässiger Temperaturbereich Limite de temperatura Limites de température Limite di temperatura	 Consult instructions for use Gebrauchsanweisung beachten Consulte las instrucciones de uso Consultez les instructions d'utilisation Consultare le istruzioni per l'uso	CONTROL Control Kontrollen Control Contrôle Controllo	 Biological risks Biologisches Risiko Riesgo biológico Risques biologique Rischio biologico	 Manufacturer Hersteller Fabricante Fabricant Fabbricante	EC REP Authorised representative Bevollmächtigter Representante autorizado Mandataire Rappresentanza autorizzata
---	--	---	---	--	---	--	--	--

Printed Insert Sheet: 303413
Revision: R4
Issued: 02/2016
C.O.: 462733

LANGUAGES

ENGLISH
DEUTSCH
ESPAÑOL

TECHNICAL SPECS

PAPER: White paper, 50-60 g/m² weight.
SIZE: 11 x 17" (280 x 432 mm.).
PRINT: Front/Back.
PRINT COLOR: Front - Top rule Orange Pantone 137, all remaining type in black
PMS 179 RED where used.
Back - All type in black.
PMS 179 RED where used.