

**BIOPHEN™ FVIII variant**

REF 227102



R1 R2 R3 2 flacons x 2.5 mL

R4 4 flacons x 20 mL

Français, révision : 05-2022

UTILISATION:

Méthode chromogène pour la détermination quantitative *in vitro* de l'activité du Facteur VIII (FVIII), dans le plasma humain citraté ou concentrés en FVIII, en utilisant une méthode automatisée. Cette méthode est pour la détection des états de déficit en FVIII et le suivi de thérapie de remplacement (sauf l'Emicizumab) chez les patients qui sont suspectés de déficit congénital ou acquis, et l'estimation de la puissance des concentrés de FVIII.

Ce dispositif de diagnostic *in vitro* est destiné à une utilisation professionnelle en laboratoire.

RÉSUMÉ ET EXPLICATION:**Technique**¹⁻⁶

Le Facteur VIII est une glycoprotéine hétérodimérique constituée d'une chaîne légère liée par ion métallique et une chaîne lourde, et circule dans le plasma à une concentration approximative de 200 ng/mL. Le FVIII interagit de manière non covalente avec le Facteur von Willebrand qui prolonge considérablement sa demi-vie dans la circulation sanguine. Le FVIII activé accélère plus de 100 000 fois l'activation du Facteur X en présence de Facteur IXa, de phospholipides et d'ions calcium.

Clinique⁵⁻¹¹

L'Hémophilie A est un trouble récessif lié au chromosome X, conduisant à une déficience de FVIII fonctionnel. La tendance au saignement est directement liée au niveau d'activité du FVIII et les patients sont catégorisés comme léger (5% à 40% de FVIII), modéré (1% à 5% de FVIII) ou sévère (<1% de FVIII). Le traitement de l'hémophilie consiste à remplacer le facteur de coagulation manquant (FVIII) sur une base régulière (prophylaxie) ou épisodique (traitement sur demande). Les taux de FVIII sont diminués dans la maladie de von Willebrand (vWD) ou en cas de coagulation intravasculaire disséminée (CIVD) ou inhibiteur acquis en FVIII. Des concentrations élevées en FVIII sont observées dans le cas de maladies inflammatoires ou hépatiques et peuvent suggérer un risque accru de thrombose veineuse.

PRINCIPE:

La méthode BIOPHEN™ FVIII variant est un dosage chromogène du cofacteur du FVIII. En présence de phospholipides (PLPs) et de calcium, le FVIII, activé par la thrombine, forme un complexe enzymatique avec le Facteur IXa, qui active 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 dans l'échantillon (le Facteur IXa et le Facteur X étant en quantité constante et en excès).

Le coffret BIOPHEN™ FVIII variant est une méthode variante du BIOPHEN™ FVIII (221402 / 221406), dans laquelle le FX est d'origine bovine et qui est insensible à l'Emicizumab.

REACTIFS:

R1 Facteur X bovin à environ 7.5µg/mL, lyophilisé. Contient un inhibiteur de polymérisation de la fibrine, de la BSA et des stabilisants.

R2 Réactif activateur, Facteur IIa humain à environ 1 NIH/mL, Facteur IXa humain à environ 2 µg/mL et phospholipides synthétiques (dilution 1/40), lyophilisé. Contient de la BSA, du calcium chlorure dihydrate et des stabilisants.

R3 SXa-11, Substrat chromogène spécifique du Facteur Xa (CS-11(32)) à environ 6 mg/mL, lyophilisé. Contient des stabilisants, du sel disodique EDTA.

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

R4 Tampon Tris-BSA, liquide. Contient de la BSA, de la glycoprotéine acide (AGP) humaine, des stabilisants et des conservateurs.

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-VHC, anti-VIH 1 et anti-VIH 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.

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 **2.5 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 directement sur l'automate en suivant les instructions du Guide d'Application.

R4 Réactif prêt à l'emploi, homogénéiser en évitant la formation de mousse et charger directement sur l'automate en suivant les instructions du Guide d'Application.

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 R3 R4 La stabilité du réactif après reconstitution, sous réserve de toute contamination ou d'évaporation, conservé fermé est de :

- **72 heures** à 2-8°C.
- **Stabilité à bord de l'automate : se référer au Guide d'Application spécifique.**

Les combinaisons de conservation ne sont pas recommandées.

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:

- Etalon et contrôles spécifiques avec titration connue tels que :

Réactif	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 Factor VIII Deficient Plasma (DP040A/DP040K, HYPHEN BioMed).
- Instrument automatique pour tests chromogéniques tel que : CS-series.
- Matériel de laboratoire.

PRELEVEMENTS 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.

La collecte, 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-A5¹² pour

plus d'informations concernant le prélèvement, la manipulation et la conservation).

Pour la conservation des plasmas, se référer aux références.^{12,13,14}

PROCEDURE:

Pour la gamme basse, les 6 points de calibration doivent être pré-dilués en plasma déficient VIII pour obtenir une gamme d'environ 0.9% à 28% avant de charger sur automate.

HYPHEN BioMed fournit des Guides d'Application pour des familles d'instrument de coagulation définies. Les Guides d'Application contiennent des informations sur la manipulation et les performances spécifiques à l'instrument / test et remplacent les informations de ces notices d'utilisation.

Pour les concentrés thérapeutiques en FVIII, pré-diluer l'échantillon testé (gamme haute) en **R4**.

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:

- La concentration de FVIII (%) dans l'échantillon à doser est déduite directement de la courbe de calibration, lorsque la dilution standard est utilisée.
- Pour les concentrés en FVIII, les concentrations mesurées devraient alors être multipliées par le facteur de « pré-dilution ».
- La variabilité inter-lots mesurée sur 3 lots est de : CV% ≤ 10%.
- 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 ne présentant pas d'aspect limpide ou présentant des signes de contamination doit être rejeté.
- Tout échantillon suspect ou présentant des signes d'activation doit être rejeté.
- Les modifications définies par l'utilisateur ne sont pas prises en charge par HYPHEN BioMed car elles peuvent affecter les performances du système et les résultats des tests. Il est de la responsabilité de l'utilisateur de valider les modifications apportées à ces instructions ou l'utilisation des réactifs sur d'autres instruments que ceux inclus dans les Guides d'Application HYPHEN BioMed ou ces instructions d'utilisation.
- Le dosage du FVIII est sensible aux anti-Xa directs.
- Selon le variant et le concentré, une disparité entre les dosages chromogéniques et coagulants est rapportée^{5,6,9,16}.

VALEURS ATTENDUES:

Chaque laboratoire doit établir son propre intervalle normal.

PERFORMANCES:

Les analyses mathématiques sont réalisées en utilisant un logiciel de statistique validé construit conformément aux recommandations CLSI. Les études de performances ont été menées conformément aux recommandations du CLSI.

Les données de performance suivantes représentent des résultats typiques et ne doivent pas être considérées comme des spécifications pour BIOPHEN™ FVIII variant.

Performances analytiques

Zone de mesure

La zone de mesure est définie par le système d'analyses utilisé et est documentée dans les Guides d'Application des instruments respectifs.

Précision

Des études de précision ont été évaluées à l'aide de contrôles du laboratoire et de plasmas groupés, surchargés, sur une période de 5 jours, 2 séries par jour et 2 répétitions dans chaque série pour un niveau d'échantillon. Le coefficient de variation (CV) pour tous les

échantillons est inférieur à 10% et est documenté dans les Guides d'Application des instruments respectifs.

Substances interférentes

Les interférences sont définies par le système d'analyses utilisé et sont documentées dans les Guides d'Application des instruments respectifs.

Le dosage du FVIII est insensible à l'Emicizumab¹⁵.

Performances cliniques

Agrément

CS-series (n=93)			
Analyte	Régression linéaire	r	Méthode de référence / comparaison
Factor VIII	y = 0.96x + 0.31	0.999	Factor VIII Chromogenic assay (Siemens)

Sensibilité/Spécificité

CS-series (n=93)			
Analyte	Sensibilité	Spécificité	Aire sous la courbe
Factor VIII	0.939	0.955	0.968

REFERENCES:

1. Wagenvoort RJ *et al.* Development of a simple chromogenic factor VIII assay for clinical use. Haemostasis. 1989.
2. Hubbard AR. *et al.* Potency estimation of recombinant factor VIII: effect of assay method and standard. Br. J Haematol. 2001.
3. Raut S. *et al.* A collaborative study to establish the 6th International Standard for factor VIII concentrate. Thromb. Haemost. 2001.
4. Mazurkiewicz-Pisarek A. *et al.* The factor VIII protein and its function. Acta Biochimica Polonica. 2016.
5. Ovanesov M.V. *et al.* Summary of the WHO hearing on the development of product-specific reference materials for coagulation factor VIII and factor IX products. Biologicals. 2020.
6. Peyvandi F. *et al.*, A critical appraisal of one-stage and chromogenic assays of factor VIII activity. Journal of Thrombosis and Haemostasis. 2016.
7. 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.
8. Vince Jenkins P. *et al.*, Elevated factor VIII levels and risk of venous thrombosis. British Journal of Haematology. 2012.
9. Bowyer A.E. *et al.* Role of chromogenic assays in haemophilia A and B diagnosis. Haemophilia. 2018.
10. 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.
11. Srivastava A. *et al.* WFH Guidelines for the Management of Hemophilia 3rd edition. Haemophilia. 2020.
12. CLSI Document H21-A5: "Collection, transport, and processing of blood specimens for testing plasma -based coagulation assays and molecular hemostasis assays; approved guideline". 2008
13. Woodhams B. *et al.* Stability of coagulation proteins in frozen plasma. Blood coagulation and Fibrinolysis. 2001.
14. Mauge L. and Alhenc-Gelas M. Stabilité pré-analytique des paramètres de la coagulation: revue des données disponibles. Ann Biol Clin. 2014.
15. Schmitt C. *et al.* Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Emicizumab in Persons with Hemophilia A with Factor VIII Inhibitors: HAVEN 1 Study. Emicizumab Pharmacokinetics and Pharmacodynamics. 2020.
16. Van Moort I. *et al.* Analytical variation in factor VIII one-stage and chromogenic assays: Experiences from the ECAT external quality assessment programme. WILEY Hemophilia. 2018.

La notice d'utilisation électronique est disponible sur le site internet de HYPHEN BioMed.

Les symboles suivants peuvent apparaître dans l'étiquetage du produit :

REF	Référence catalogue	LOT	Désignation du lot	IVD	Dispositif médical de diagnostic <i>in-vitro</i>
Rx	Identification numérique < x> du réactif		Lire le mode d'emploi	WHO STD	Code du standard OMS
	Températures limites de conservation		Fabricant		Utilisable jusqu'à YYYY-MM-DD
CE	Marquage de conformité CE avec le numéro d'identification de l'organisme notifié		Volume de reconstitution	CONTENTS	Contenu
Cx	Identification numérique < x> du contrôle	i-MA	Consulter les instructions fournies dans le guide d'application de la méthode	CONTAINS	Contient
EXP	Date d'expiration		Suffisant pour <n> tests	UNIT	Unité de mesure
TARGET VALUE	Valeur cible		Maintenir hors de portée de la lumière du soleil et de la chaleur	CALx	Identification numérique < x> du calibrateur
ACCEPTANCE RANGE	Intervalle d'acceptation				Risque biologique