

Geharmoniseerd protocol Factor VIII remmer bepaling

Namens de werkgroep van laboratoriumspecialisten van hemofiliebehandelcentra in Nederland en België van de VHL.

An Stroobants, Caroline Klopper, Clint van Duren, Moniek de Maat, Marie-Berthe Maes, Yvonne Henskens, Katrien Devreese, Michael Lukens, Ciska Hudig, Anne Demulder, Philip Kuijper, Kristin Jochmans, Tim Schuijt, Albert Huisman, Paul Verhezen, Claudia van Rijn, Francois Mullier, Marc Jacquemin.

Datum: 20-2-2020

De oorspronkelijke methode om remmers tegen factor VIII te bepalen was de Bethesda assay. Deze methode is verbeterd in de vorm van de Nijmegen modified Bethesda assay (zie bijlage). Uit ECAT-resultaten blijkt echter nog steeds een grote variatie. Daarom werd geïnventariseerd welke methode gebruikt werden en waarom in de laboratoria van hemofilie behandelcentra in Nederland en België. De Nijmegen modified Bethesda assay werd nauwelijks gebruikt omdat de test te duur werd gevonden en te lang duurde. Uit evaluatie en overleg met de werkgroep zijn modificaties aangebracht aan de Nijmegen modified Bethesda assay: het geharmoniseerde protocol van de VHL. De belangrijkste wijzigingen zijn het gebruik van albumine oplossing in plaats van deficiënt plasma of pool en het deactiveren voor 30 minuten i.p.v. 90 minuten.

Op basis van de Nijmegen modified BE assay:

- Normaal poolplasma (NPP) instellen op 100% (95-105%); hier is ook de rekenformule om het aantal BE mee te bepalen op gebaseerd:

Formule voor het berekenen van de Bethesda eenheden (BE): *Anti-factor VIII (BE) = 2-log(residuaal factor VIII)/ 0.30103*

- Gebruik (vers) gebufferde normaalpoo plasma (NP) m.b.v. Imidazol 4M buffer, pH 7.3-7.4.
- Denatureer patiëntenmonsters 30 minuten bij 58°C (waterbad).
- Verdun de monsters in 4% bovine serumalbumine (BSA)-citraatbuffer, pH 7,3-7,5.
- Verdunningsreeks: Tot 2.0 BE altijd de onverdunde uitslag doorgeven. De remmer wordt anders te snel uit verdund.

Bij uitslag > 2.0 BE verder verdunnen: ½, ¼, 1/8, 1/10, 1/15, 1/20, 1/25 enz.

- Blanco = 1 deel gebufferde NP + 1 deel 4 % BSA/citraat buffer.
- Positieve controle monster(s) meenemen (ten behoeve van het bepalingsverloop van de anti-FVIII).
- Na 2 uur bij 37°C (waterbad) de monsters direct op ijs zetten tot bepaling.
- Titer anti-FVIII (type 2) aflezen bij 50 % FVIII-c restactiviteit en verder altijd aflezen tussen de 25-75% FVIII restactiviteit (type 1 remmer).
- Referentie waarde < 0.4 BE (per laboratorium bevestigen).

