

Stanovení aktivity faktoru VIII u pacientů s těžkou hemofilií A léčených koncentráty s prodlouženým biologickým poločasem – porovnání výsledků vybraných metod

Measuring factor VIII activity in patients with severe haemophilia A treated with extended half-life concentrates – comparison of selected assay results

Prudková M.¹⁻³, Smejkal P.^{1,3}, Chytrá D.^{1,3}, Zavřelová J.^{1,3}, Romanová G.¹⁻³, Penka M.^{1,2}, Bulíková A.^{1,2}

¹ Oddělení klinické hematologie, FN Brno

² Interní hematologická a onkologická klinika LF MU a FN Brno

³ Katedra laboratorních metod, LF MU, Brno

SOUHRN: Úvod: Adekvátní substituční léčba hemofilie zahrnuje monitorování aktivity FVIII (FVIII:C), které lze provádět buď jednofázovou koagulační metodou (*one-stage clotting assay* – OSA), nebo metodou s chromogenními substráty (*chromogenic substrate assay* – CSA). S příchodem koncentrátů FVIII s prodlouženým biologickým poločasem se však prohlubuje problém diskrepancí mezi metodami z důvodu úpravy molekuly FVIII. **Cíl:** Hodnocení míry diskrepance výsledků FVIII:C OSA a CSA u pacientů léčených koncentráty FVIII s prodlouženým poločasem. **Metody:** Stanovení FVIII:C ve vzorcích pacientů léčených koncentráty efmoctocog alfa, rurioctocog alfa pegol, turoctocog alfa pegol a damoctocog alfa pegol pomocí OSA s reagensy Cephascree® (Diagnostica Stago) a Pathromtin® SL (Siemens Healthineers) a CSA BIOPHEN™ FVIII:C (Hyphen BioMed). **Výsledky:** Výsledky obou metod dobře korelovaly u efmoctocog alfa, rozdíly byly do 21 %. U rurioctocog alfa pegol byla FVIII:C v rozsahu cca 15–200 % metodou OSA s oběma reagensy lehce nižší (průměrně o 11, resp. o 18 %), zatímco výsledky FVIII:C < 10 % byly naopak dle OSA vyšší v průměru o 54 % s Cephascree® a až o 75 % s Pathromtin® SL. Výsledky turoctocog alfa pegol byly metodou OSA nižší než CSA, pro rozsah 15–200 % průměrně o 36, resp. 25 %, přičemž pro nižší hladiny FVIII:C byly nejednoznačné, s odchýlením oběma směry. Výsledky damoctocog alfa pegol byly metodou OSA jen mírně vyšší (Cephascree® průměrně o 18 %) pro hladiny FVIII:C > 10 %, ale výrazně vyšší než CSA u FVIII:C < 10 % (průměrně o 91 % s reagensy Cephascree® a o 100 % u Pathromtin® SL). **Závěr:** Na základě našeho pozorování výsledky FVIII:C metodou OSA excelentně korelují s reagensy Cephascree® a Pathromtin® SL s CSA Hyphen u pacientů léčených koncentrátem efmoctocog alfa. Z ostatních koncentrátů korelují excelentně pouze výsledky rurioctocog alfa pegol (jen Cephascree®) a damoctocog alfa pegol, a to pouze FVIII:C > 10 %.

KLÍČOVÁ SLOVA: hemofilie A – aktivita FVIII – EHL koncentráty

SUMMARY: Introduction: Optimal substitutional treatment includes measuring FVIII activity (FVIII:C) using the one-stage clotting assay (OSA) or chromogenic substrate assay (CSA). However, with the advent of FVIII concentrates with an extended half-life, discrepancies between methods have increased due to modifications of the FVIII molecule. **Aim:** Evaluation of OSA and CSA discrepancy in patients treated with extended half-life FVIII concentrates. **Method:** FVIII:C measurement by OSA with reagents Cephascree® (Diagnostica Stago) and Pathromtin® SL (Siemens Healthineers) and by CSA BIOPHEN™ FVIII:C (Hyphen BioMed) in patients treated with efmoctocog alfa, rurioctocog alfa pegol, turoctocog alfa pegol and damoctocog alfa pegol. **Results:** The results of both methods correlated well for efmoctocog alfa, the differences being up to 21%. The results of rurioctocog alfa pegol in the range of 15–200% were slightly lower using OSA with both reagents, on average by 11% and 18%, while the results up to 10% were higher using OSA with an average difference of 54% for Cephascree® and up to 75% for Pathromtin® SL. The results of turoctocog alfa pegol were lower using OSA in the range of 15–200%, on average by 36% and 25%. The samples with FVIII:C above 10% of damoctocog alfa pegol were slightly higher using OSA (Cephascree® by 18%), but samples up to 10% were significantly higher, with Cephascree® on average by 91% and by 100% with Pathromtin® SL. **Conclusions:** OSA Cephascree® or Pathromtin® SL and CSA Hyphen correlate excellently in the case of efmoctocog alfa. Of the other concentrates, the results correlate excellently in the case of rurioctocog alfa pegol (only Cephascree®) and damoctocog alfa pegol, and only for FVIII:C > 10%.

KEY WORDS: haemophilia A – FVIII activity – EHL concentrates

ÚVOD

Hemofilie A je geneticky podmíněné krvácivé onemocnění způsobené defektem v genu (*F8*), vedoucí ke kvalitativnímu či kvantitativnímu defektu proteinu FVIII. Dle výsledku aktivity FVIII se dělí na lehkou (5–40 %), středně těžkou (1–5 %) a těžkou (< 1 %) formu. Fyziologická hladina aktivity FVIII se pohybuje v rozsahu 50–150 %. Léčba spočívá v nahrazení chybějícího FVIII buď profylakticky, nebo *on-demand* pomocí plazmatických (pdFVIII) či rekombinantních (rFVIII) koncentrátů podávaných intravenózně. Profylakticky je možné použít i bispecifickou monoklonální protilátku emicizumab nebo v rámci studií genovou terapii. V posledních letech byly vyvinuty nové koncentráty s upravenou molekulou FVIII umožňující delší setrvávání v cirkulaci pacienta (*extended half-life* – EHL). Úprava molekuly zahrnuje fúzi rFVIII s Fc fragmentem lidského imunoglobulinu G1 (IgG), polyethylenglykolem (PEG) nebo albuminem. PEGylace prodlužuje biologický poločas FVIII, protože ho chrání před enzymatickou degradací, a fúze s Fc částí IgG či albuminem chrání FVIII před degradací lysozomy. Nespornou výhodou těchto koncentrátů je méně častá intravenózní aplikace, avšak modifikace molekuly způsobuje problémy při laboratorním monitorování, kdy dochází k falešnému nadhodnocení nebo podhodnocení výsledků [1–4].

Problematika monitorování souvisí s diskrepancí výsledků mezi metodami a tyto jsou popsány jak u koncentrátů FVIII o plné délce, tak s deletovanou B-doménou, kdy výsledky CSA metody vycházejí ve srovnání s OSA vyšší. Rozdílné výsledky se objevují nejen mezi výše zmíněnými metodami, ale i v rámci samotné OSA, což souvisí s velkou variabilitou dostupných APTT reagensů lišících se v typu povrchového aktivátoru a obsahu fosfolipidů [5–8].

Jako referenční metoda pro stanovení účinnosti koncentrátů FVIII je Evropským lékopisem stanovena metoda s chromogenními substráty [6,9]. Dle doporu-

čení Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis (SSC ISTH) by měli výrobci své koncentráty testovat proti aktuálnímu WHO Mezinárodnímu standardu (*World Health Organization International Standard* – WHO IS) pro koncentráty FVIII a použít jak OSA, tak CSA a pro stanovování aktivity FVIII OSA metodou využití rozdílné APTT reagensie. Co se týče vyšetřování vzorků od pacientů léčených koncentráty FVIII, tak dle SSC ISTH je optimální testovat vzorky proti produkt-specifickému standardu. Tento postup je však pro rutinní laboratoře obtížně implementovatelný [10].

Metody stanovení aktivity FVIII

Aktivitu FVIII lze vyšetřovat v zásadě třemi metodami – jednofázovou koagulační metodou, klasickou dvoufázovou koagulační metodou a metodou s chromogenními substráty. V klinických laboratořích je pro stanovení FVIII:C nyní nejvíce využívána jednofázová koagulační metoda, neboť je jednoduchá, rychlá a snadno automatizovatelná. Dle literatury je však pro nízké hodnoty FVIII:C citlivější metoda s chromogenními substráty [11,12].

Jednofázová koagulační metoda

Metoda je založena na principu aktivovaného parciálního tromboplastinového testu, kdy je k ředěné testované plazmě přidána v ekvivalentním množství FVIII-deficitní plazma a následně APTT reagensie obsahující fosfolipidy a povrchový aktivátor. Po přidání vápenatých iontů se měří čas do vytvoření fibrinových vláken, která jsou detekována mechanicky nebo opticky dle principu analyzátoru. FVIII-deficitní plazma musí obsahovat všechny ostatní koagulační faktory, vyjma FVIII, v normální aktivitě, tak aby výsledný koagulační čas závisel pouze na aktivitě FVIII v testovaném vzorku. Výsledek FVIII:C v % je odečten z kalibrační křivky, která je získána měřením různých ředění standardu s přesně udanou aktivitou FVIII [2,12,13]. V závislosti na použitém aktivátoru a fosfolipi-

dech je metoda různě citlivá na deficit koagulačních faktorů, přítomnost protilátek typu lupus antikoagulans či léčbu heparinem [2,11].

V současné době mají laboratoře k dispozici množství APTT reagensů lišících se v typu povrchového aktivátoru a obsahu fosfolipidů. Bylo prokázáno, že právě typ aktivátoru má velký vliv na výsledky FVIII:C při substituční léčbě hemofilie, především EHL koncentráty. Jako povrchový aktivátor slouží kaolin, křemičitany, kyselina ellagová nebo polyfenoly. Je třeba dodat, že zároveň existují rozdílné aktivátory typu křemičitanů (např. koloidní křemičitany) a kyseliny ellagové, což znamená, že ne všechny APTT reagensie s obsahem křemičitanů či kyseliny ellagové poskytují stejné výsledky FVIII:C [1].

Metoda s chromogenními substráty

Metoda s chromogenními substráty je založena na podobném principu jako dvoufázová koagulační metoda. V prvním kroku probíhá inkubace testované plazmy spolu s faktorem IXa (FIXa), trombinem, fosfolipidy, vápenatými ionty a nadbytkem faktoru X (FX). Během inkubace dochází k aktivaci FVIII trombinem a vytvoření koagulačně aktivního komplexu – vnitřní tenázy, která aktivuje FX na FXa. V druhém kroku probíhá hydrolytické štěpení specifického chromogenního substrátu aktivovaným FXa za vzniku p-nitroanilinu. Měřena je absorbance určité vlnové délky. Intenzita barvy vzniklého p-nitroanilinu odpovídá aktivovanému FX a tím i aktivitě FVIII v testovaném vzorku. Aktivita FVIII v % je odečtena z kalibrační křivky, která je získána měřením několika ředění standardu s přesně udanou aktivitou FVIII.

Komerčně dostupné jsou různé diagnostické sety, které se liší původem obsažených proteinů (humánní nebo boviní). Výhodou CSA je, že není citlivá na pre-aktivaci FVIII trombinem a díky většímu ředění vzorku ani na nespecifické inhibitory, heparin nebo přímá orální antikoagulantia (DOACs) [1,11,12,14].

Tab.1. Hodnocení vybraných APTT reagensů pro měření FVIII:C EHL koncentrátů dle literatury. Hodnoceno jako vhodné, podhodnocení, nadhodnocení nebo neznámo.

	Efmoroctocog alfa	Rurioctocog alfa pegol	Turoctocog alfa pegol	Damoctocog alfa pegol
Reagencie na bázi oxidu křemičitého				
STA® PTT-A	vhodné*	vhodné #	podhodnocení *	podhodnocení *
Pathromtin® SL	vhodné *	vhodné #	vhodné *	vhodné *
SynthASil™	vhodné *	vhodné #	vhodné #	vhodné *
APTT-SP™	Neznámo #	Neznámo #	podhodnocení *	podhodnocení *
Triniclot™ Auto	vhodné #	vhodné #	podhodnocení *	neznámo #
Triniclot™ HS	vhodné #	vhodné #	podhodnocení *	neznámo #
Reagencie na bázi kyseliny elagové				
Actin® FS	vhodné *	vhodné #	vhodné *	nadhodnocení *
Actin® FSL	vhodné *	vhodné #	vhodné #	vhodné *
SynthAFax™	neznámo #	vhodné #	vhodné *	vhodné #
Reagencie na bázi kaolinu				
CK Prest®	vhodné *	vhodné #	vhodné #	nadhodnocení *
Reagencie na bázi polyfenolů				
Cephascree®	vhodné *	vhodné #	vhodné #	vhodné #

* dle Jeanpierre et al. (2020) a Gray et al. (2020) [5,6]; #dle Young et al. (2019) a Pruthi et al. (2016) [1,3]

Diskrepance výsledků a doporučení pro monitorování EHL

Diskrepance výsledků FVIII:C mezi metodami jsou popisovány jak pro koncentráty rFVIII o plné délce, tak s deletovanou B-doménou. Literatura uvádí, že výsledky FVIII:C CSA metody jsou vyšší ve srovnání s OSA, klinicky však tato diskrepance není u koncentrátů o plné délce významná, neboť se pohybuje do 20 %. Významné rozdíly jsou u rFVIII s deletovanou B-doménou, kdy výsledky OSA jsou nižší oproti CSA s rozdílem 20–50 %. Uvádí se, že nejen koncentráty s deletovanou B-doménou, ale i takové, které mají B-doménu zkrácenou, vedou k diskrepancím [1,5–7,11]. Dle Peyvandi et al. (2016) se tento problém tolik netýká plazmatických derivátů FVIII. Např. pro Fanhdi® (Grifols) se v literatuře uvádí poměr CSA/OSA 0,97–1,11 [11].

Jak již bylo zmíněno výše, nejvíce problematické je monitorování modifikovaných rekombinantních koncentrátů. Klinicky významné diskrepance jsou popsány pro PEGylované rFVIII koncentráty turoctocog alfa pegol a damoctocog alfa pegol, způsobené pravděpodobně in-

terakcí s křemičitany obsaženými v APTT reagensii, která vede k horšímu zpřístupnění pegylovaného rFVIII pro štěpení trombinem a tím k podhodnocení výsledků OSA metody. Zdá se, že PEGylované koncentráty je možné monitorovat pomocí OSA s kyselinou ellagovou či polyfenoly. Naproti tomu u koncentráty rurioctocog alfa pegol, který je rovněž PEGylovaný, ale s molekulou rFVIII o plné délce, jednoznačné diskrepance popsány nebyly, ale zároveň se uvádí, že je nezbytné provést další testování [1,5–7,11]. Vhodnost použití vybraných APTT reagensů pro monitorování jednotlivých EHL koncentrátů shrnuje tab. 1.

Efmoroctocog alfa (rFVIII-Fc; Elocta®)

Rekombinantní molekula FVIII zkrácená o B-doménu navázaná na Fc doménu lidského IgG1. Dle Souhrnu údajů o přípravku (*Summary of Product Characteristics* – SPC) lze monitorování provádět jak OSA, tak CSA. U OSA je však nutno brát zřetel na to, že výsledky mohou být ovlivněny typem APTT reagensie a referenčním standardem [15]. Podle ně-

kolika studií jsou výsledky FVIII:C CSA metody vyšší ve srovnání s OSA [3,16]. Světová hemofilická federace (*World Federation of Hemophilia* – WFH) doporučuje k monitorování pacientů metodu OSA nebo CSA s kalibrací pomocí plazmatického standardu s návazností na WHO IS [13].

Rurioctocog alfa pegol (Adynovi®)

Pegylovaná rekombinantní molekula FVIII o plné délce. Jedná se vlastně o octocog alfa s navázaným 20 kDa polyethylenglykolem. V EU/UK je doporučeno účinnost koncentráty stanovovat CSA metodou. Dle SPC není doporučena konkrétní metoda k monitorování této léčby a lze použít jak OSA, tak CSA [17]. Dle studie Bulla et al. (2017) výsledky vzorků FVIII deficitní plazmy obohacené o přesné množství rurioctocog alfa pegol (30–80 %) jsou nadhodnoceny OSA metodou o 28–32 % a CSA o 69–82 %. Nadhodnocení výsledků bylo navíc výraznější u nízkých hladin. Odpovídajících výsledků bylo dosaženo při kalibraci pomocí produkt-specifického standardu [5]. V terénní studii Turecek

et al (2016), ve které byly testovány rovněž vzorky FVIII deficitní plazmy obsahující definované koncentrace ruriotocog alfa pegol (5 %, 20 % a 80 %), však takto výrazné nadhodnocení publikované nebylo. Výsledky průměrného *recovery* OSA a CSA metody napříč všemi koncentracemi byly 113 % a 114 % [18]. Young et al. (2019) ve své práci zmiňují, že reagentie obsahující křemičitany vedou k nižším hladinám FVIII:C než reagentie s kyselinou ellagovou nebo polyfenoly [1]. Výsledky dalších prací výrazné diskrepance nepotvrdily. Z důvodu protichůdných výsledků uvedených v současné literatuře WFH nevydala konkrétní doporučení pro monitorování léčby tímto koncentrátem [13].

Turoctocog alfa pegol (Esperoct®)

Turoctocog alfa pegol je rekombinantní molekula FVIII se zkrácenou B-doménou a navázanou molekulou polyethylenglykolu o molekulové hmotnosti 40 kDa. Dle SPC nejsou k monitorování léčby vhodné reagentie na bázi oxidu křemičitého, protože způsobují podhodnocení. Aktivátor na bázi oxidu křemičitého totiž způsobuje zpomalení aktivace molekuly turoctocog alfa pegol trombinem ve srovnání s nativním FVIII. WFH doporučuje stejné reagentie/metody jako UHKCDO a BIMHO (tab. 1) [1,5–7,11,13,19,20].

Damoctocog alfa pegol (Jivi®)

Jedná se o rekombinantní FVIII s deletovanou B-doménou a navázaným 60 kDa polyethylenglykolem, přesněji s dvěma 30 kDa molekulami polyethylenglykolu. SPC uvádí, že přesnou aktivitu je možné vyšetřit CSA nebo OSA metodou se specifickými reagentiemi. Reagentie na bázi oxidu křemičitého (např. APTT-SP™ nebo STA® – PTT) mohou podhodnotit aktivitu FVIII, a naopak některé reagentie na bázi kaolinu mohou způsobit nadhodnocení [21,22].

MATERIÁL A METODIKA

Ve vzorcích plazmy pacientů, kteří byli léčeni koncentráty FVIII s prodlouže-

nou dobou účinku – efmoroctocog alfa (10 pacientů), ruriotocog alfa pegol (13 pacientů), turoctocog alfa pegol (5 pacientů) a damoctocog alfa pegol (7 pacientů) –, byla vyšetřena aktivita FVIII dvěma metodami. Vzorky byly vyšetřovány v letech 2019–2023 na Oddělení klinické hematologie Fakultní nemocnice Brno v rámci standardní péče o pacienty s hemofilií. Měření probíhalo na přístroji STA R MAX (Stago, Francie) metodou s chromogenními substráty BIOPHEN™ FVIII:C (HYPHEN BioMed, Francie) a jednofázovou koagulační metodou s využitím dvou APTT reagentií. Do května roku 2023 byla pro metodu OSA využívána reagentie Cephascreen® (Diagnostics Stago, Francie) obsahující polyfenolický aktivátor a poté, co byla ukončena výroba této reagentie, Pathromtin® SL (Siemens Healthineers, Německo) obsahující aktivátor oxid křemičitý. Metody byly kalibrovány vůči plazmatickému standardu s návazností na WHO IS. Pro každou metodu byly vytvořeny dvě kalibrační křivky, pro nízké a vysoké rozmezí FVIII:C, v rozsahu přibližně 1,2–25 % a 6–110 % pro OSA Cephascreen®, v rozsahu přibližně 0,2–15 % a 10–150 % pro OSA Pathromtin® SL a v rozsahu přibližně 1,6–25 % a 10–200 % pro CSA Hyphen.

Pacientům bylo odebráno standardní množství žilní krve do zkumavek s antikoagulačním roztokem citrátem sodným 0,106 mol/l. Centrifugací 2 500 g 15 min byly získány vzorky citrátové plazmy, které byly šokově zmrazeny v tekutém dusíku při –196 °C a skladovány při –80 °C v hlubokomrazícím boxu.

Reliabilita (vzájemná shoda) výsledků FVIII:C obou metod byla zjištěna pomocí koeficientu vnitrotřídní korelace ICC (*intra-class correlation coefficient* – ICC) s hladinou významnosti 0,05. U tohoto testu je nulovou hypotézou předpoklad nulové hodnoty ICC. P-hodnota vypovídá o shodě metod. Pokud je p menší než 0,05, zamítáme nulovou hypotézu, a jde tak o statisticky významnou korelaci metod. Hodnocen byl i samotný výsledek ICC – interpretace dle Koo a Li

(2016) je následující: ICC menší než 0,5: nízká míra shody; ICC 0,5–0,75: mírná až střední míra shody; ICC 0,75–0,90: vysoká míra shody; ICC větší než 0,90: excelentní míra shody [23]. Výsledky s nízkou hodnotou ICC byly vizualizovány formou Bland-Altmanových grafů (hodnoty difference metod vyjádřené v % proti průměrům dvojic výsledků obou metod). Pro orientační posouzení, zda jsou výsledky OSA metody vyšší či nižší ve srovnání s CSA, byly spočítány průměry a průměrná procentuální odchylka: $[OSA/CSA] \times 100$ (%). Za akceptovatelnou jsme považovali diskrepanci do 25 %.

VÝSLEDKY

EFMOROCTOCOG ALFA

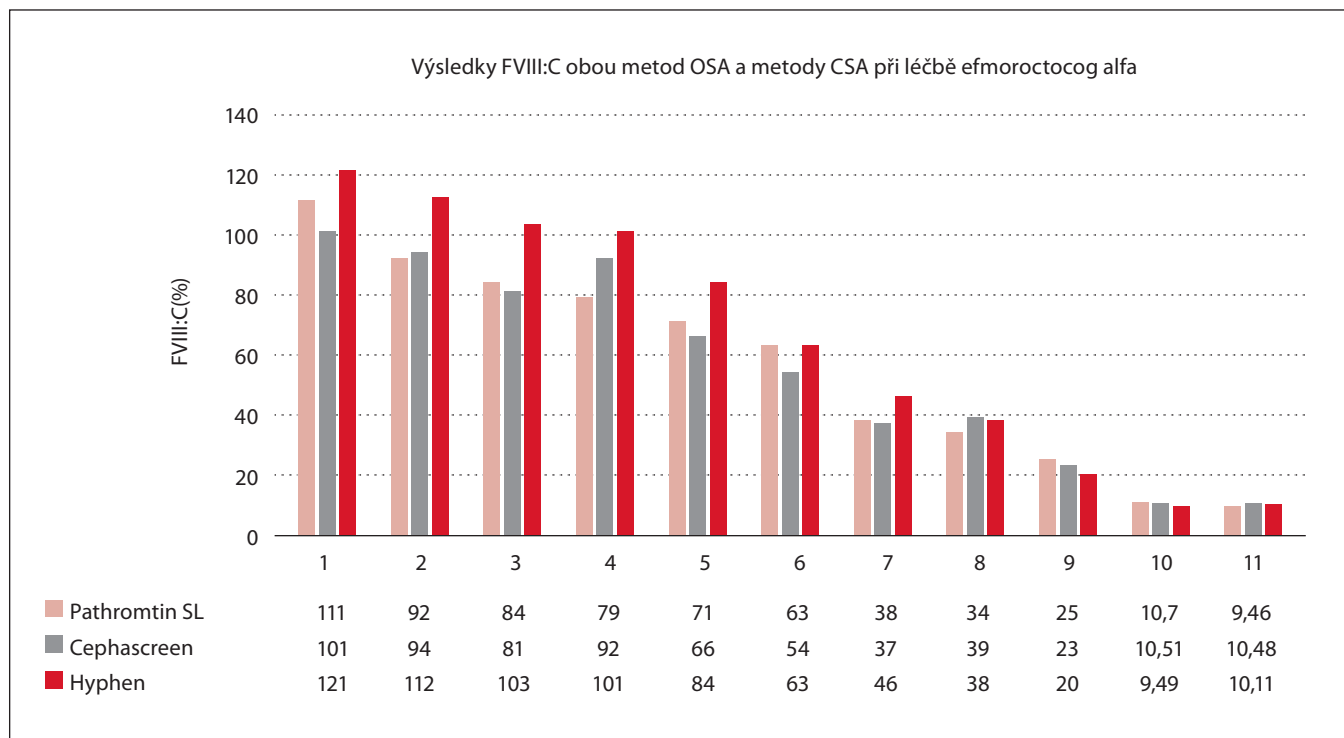
OSA Cephascreen®–CSA Hyphen

Celkem bylo vyšetřeno 65 vzorků, 32 vzorků mělo hodnotu FVIII:C v rozsahu přibližně 10–200 % a 33 vzorků v rozsahu přibližně 1–14 %. Pro vzorky s FVIII:C 10–200 % je ICC 0,961 ($p < 0,001$) a pro 1–14 % ICC 0,922 ($p = 0,000677$), což odpovídá excelentní míře shody. Porovnáním průměrných hodnot obou metod bylo zjištěno, že výsledky FVIII:C rozsahu 10–200 % jsou OSA metodou v průměru o 10 % nižší ve srovnání s CSA (průměrná hodnota OSA je 62 %, medián 56 % a CSA 70 %, medián 59 %). Výsledky FVIII:C v rozsahu 1–14 % jsou OSA metodou naopak v průměru o 21 % vyšší než CSA (průměrná hodnota OSA činí 5,01 %, medián 4,06 % a CSA 4,15 %, medián 3,38 %).

OSA Pathromtin® SL–CSA Hyphen

Těmito metodami bylo vyšetřeno celkem 21 vzorků; 12 vzorků mělo FVIII:C v rozsahu 20–120 % a 9 vzorků v rozsahu 1–10 %. Výsledek ICC pro rozsah FVIII:C 20–120 % je 0,92 ($p = 0,00517$) a pro FVIII:C 1–10 % ICC 0,963 ($p = 0,00111$). Výsledky ICC odpovídají rovněž excelentní míře shody.

Výsledky OSA metody jsou v průměru o 15 % nižší než CSA v rozsahu FVIII:C 20–120 % (průměrná hodnota OSA 65 %, medián 73 % a CSA 76 %, medián



Graf 1. Porovnání výsledků metod OSA s reagensy Pathromtin® SL a Cephascreeen® a CSA Hyphen při léčbě efmorotocog alfa. Výsledky CSA metody jsou u vzorků s FVIII:C nižší než 38 % lehce vyšší než metodami OSA. CSA – metoda s chromogenními substráty; OSA – jednofázová koagulační metoda

85 %). Vzorky s FVIII:C 1–10 % vycházejí naopak v průměru o 18 % OSA metodou vyšší (průměrná hodnota OSA je 4,53 %, medián 3,40 % a CSA 3,84 %, medián 2,68 %).

Graf 1 demonstruje srovnání výsledků FVIII:C OSA s reagensy Cephascreeen®, Pathromtin® SL a CSA Hyphen, z kterého vyplývá, že v rozsahu přibližně 40–100 % jsou výsledky obou OSA mírně nižší než CSA.

RURIOCTOCOG ALFA PEGOL

OSA Cephascreeen®–CSA Hyphen

Celkem bylo vyšetřeno 55 vzorků; FVIII:C 27 vzorků byla v rozsahu přibližně 15–200 % a 28 vzorků 1–13 %. Výsledek ICC pro rozsah 15–200 % dosahuje hodnoty 0,962 ($p < 0,001$), ale pro vzorky s FVIII:C 1–13 % pouze 0,582 ($p = 0,0177$). Diference nízkých výsledků jsou znázorněny formou Bland-Altmanova grafu (graf 2).

Výsledky FVIII:C v rozsahu 15–200 % jsou průměrně o 11 % nižší metodou OSA (průměrná hodnota OSA je 68 %, medián 66 % a CSA 76 %, me-

dián 79 %), ale výsledky FVIII:C 1–13 % jsou naopak metodou OSA vyšší, průměrně o 54 % (průměrná hodnota OSA je 5,22 %, medián 4,96 % a CSA 3,38 %, medián 2,96 %).

Z grafu 2 je patrné, že větší rozdíly mezi výsledky můžeme pozorovat u FVIII:C 10–13 %. Výsledky pod 10 % jsou OSA metodou vyšší pouze o 35 % ve srovnání s CSA.

OSA Pathromtin® SL–CSA Hyphen

Vyšetřeno bylo 18 vzorků, v rozsahu FVIII:C 80–150 % 4 vzorky a 14 vzorků s FVIII:C menší než 10 %. Výsledek ICC pro rozsah 80–150 % činí 0,726 ($p = 0,0713$) a pro FVIII:C menší než 10 % 0,71 ($p = 0,00112$). Hodnoty ICC odpovídají pouze střední shodě. Výsledky v rozsahu 80–150 % nedosahují statisticky významné korelace pravděpodobně z důvodu malého počtu pozorování.

Výsledky v rozsahu 80–150 % jsou v průměru o 18 % nižší OSA metodou (průměr OSA je 95 %, medián 105 % a CSA 116 %, medián 132 %), výsledky

FVIII:C menší než 10 % jsou metodou OSA v 6 případech vyšší, průměrně o 75 %, zatímco v 8 případech jsou shodné (celkový průměr OSA 4,1 %, medián 2,62 a CSA 4,5 %, medián 2,94 %).

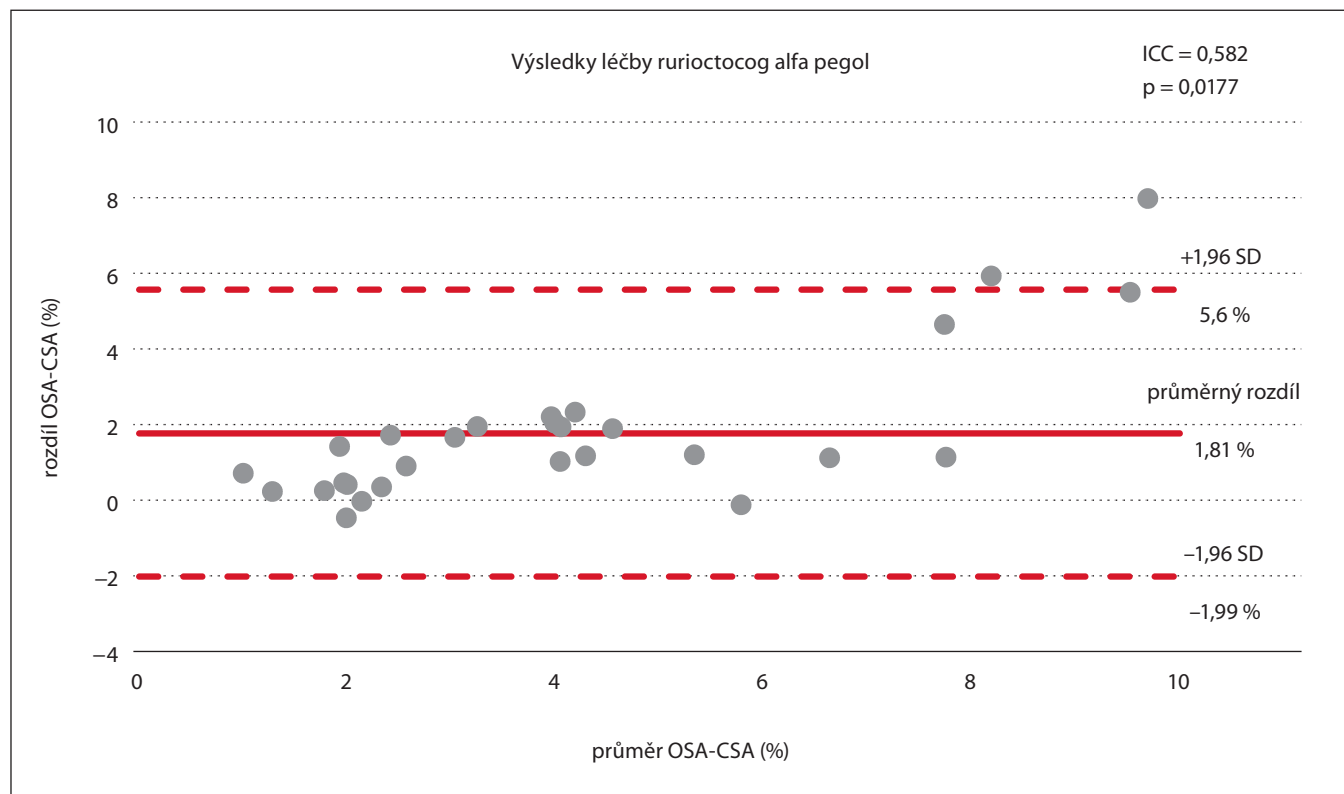
Z porovnání výsledků 5 vzorků s FVIII:C menší než 13 % vyšetřených metodami OSA Cephascreeen® a Pathromtin® SL jsme navíc zjistili, že výsledky s reagensy Cephascreeen® jsou v průměru o 50 % vyšší než u Pathromtin® SL.

TUROCTOCOG ALFA PEGOL

OSA Cephascreeen®–CSA Hyphen

Vyšetřeno bylo celkem 42 vzorků, z toho 26 vzorků s FVIII:C v rozsahu přibližně 15–200 % a 16 vzorků s FVIII:C menší než 13 %. Hodnota ICC pro rozsah 15–200 % činí 0,708 ($p = 0,0395$) a pro FVIII:C menší než 13 % 0,869 ($p < 0,001$). Diference výsledků FVIII:C 15–200 % jsou znázorněny formou Bland-Altmanova grafu (graf 3).

Výsledky FVIII:C v rozsahu 15–200 % jsou metodou OSA v průměru o 36 % nižší ve srovnání s CSA (průměrná hodnota OSA 52 %, medián 47 % a CSA 81 %, medián 77 %). U výsledků FVIII:C menší



Graf 2. Bland-Altmanův graf rozdílů FVIII:C (%) a jejich průměrů stanovených OSA Cephascreen® a CSA Hyphen v rozsahu 1–13 % u koncentrátu rurioctocog alfa pegol. Přerušované čáry vymezují 95% interval spolehlivosti a plná čára reprezentuje průměrný rozdíl. Interval spolehlivosti průměrných hodnot rozdílů obsahuje linii 100% shody porovnávaných hodnot (nulová linie). Z grafu je patrné, že větší difference se objevují s vyšší hodnotou FVIII:C (OSA výsledky jsou až o polovinu vyšší ve srovnání s CSA), u nižších naopak tak výrazné rozdíly nejsou.

CSA – metoda s chromogenními substráty; ICC – koeficient vnitřní korelace; OSA – jednofázová koagulační metoda; SD – směrodatná odchylka

než 13 % nelze, dle našeho pozorování, jednoznačně určit, zda jsou hodnoty OSA metody spíše nižší či vyšší než CSA.

OSA Pathromtin® SL–CSA Hyphen

Pro porovnání výsledků těchto metod bylo vyšetřeno celkem 12 vzorků, 6 vzorků s FVIII:C v rozsahu 20–170 % a 6 vzorků s FVIII:C menší než 10 %. Pro výsledky v rozsahu 20–170 % je hodnota ICC 0,89 ($p = 0,027$) a pro FVIII:C menší než 10 % 0,839 ($p = 0,00503$).

Výsledky OSA metody jsou v rozsahu 20–170 % v průměru o 25 % nižší ve srovnání s CSA (průměrná hodnota OSA 63 %, medián 55 % a CSA 84 %, medián 76 %). Rovněž výsledky FVIII:C menší než 10 % jsou metodou OSA nižší, průměrně o 19 % (průměrná hodnota OSA 3,65 %, medián 3,78 % a CSA 4,52 %, medián 4,57 %).

DAMOCTOCOG ALFA PEGOL

OSA Cephascreen®–CSA Hyphen

Vyšetřeno bylo celkem 34 vzorků, 16 vzorků s FVIII:C v rozsahu přibližně 10–200 % a 18 s FVIII:C menší než 10 %. Hodnota ICC je pro rozsah 10–200 % 0,941 ($p = 0,000504$) a pro FVIII:C menší než 10 % pouze 0,523 ($p = 0,0943$). Difference výsledků FVIII:C menší než 10 % jsou znázorněny formou Bland-Altmanova grafu (graf 4).

V průměru jsou výsledky FVIII:C v rozsahu 10–200 % OSA metodou o 18 % vyšší než CSA (průměrná hodnota OSA 72 %, medián 57 % a CSA 61 %, medián 53 %). Výraznější diskrepance jsme pozorovali u vzorků s aktivitou FVIII menší než 10 %, výsledky OSA metody jsou vyšší než CSA, a to v průměru o 91 % (průměrná hodnota OSA metody 5,28 %, medián 3,84 % a CSA 2,77 %, medián 2,57 %).

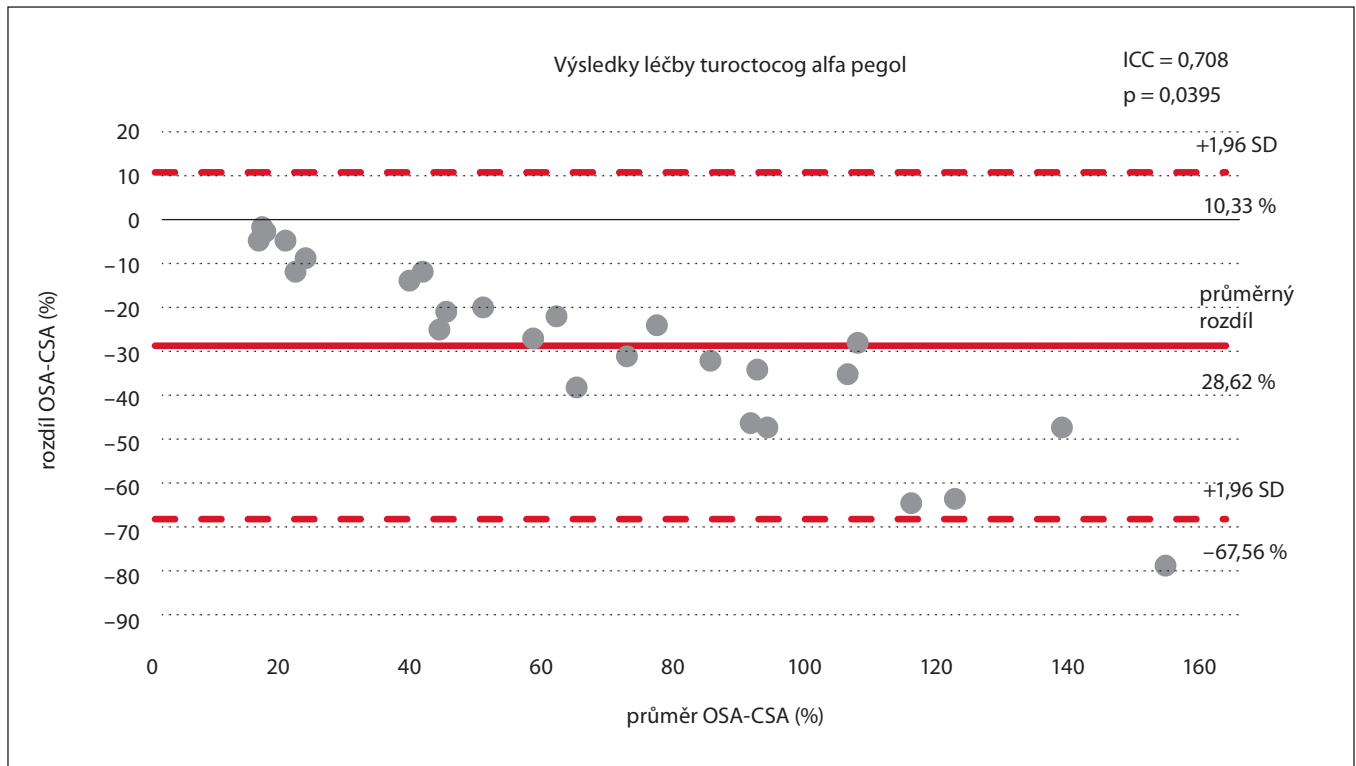
OSA Pathromtin® SL–CSA Hyphen

Těmito metodami bylo vyšetřeno pouze 7 vzorků, 3 vzorky v rozsahu FVIII:C 39–74 % a 4 vzorky s FVIII:C menší než 10 %. Výsledek ICC je pro rozsah 39–74 % 0,919 ($p = 0,0172$) a pro FVIII:C menší než 10 % pak 0,00 ($p = 0,6$), což znamená, že mezi metodami není žádná korelace.

Výsledky v rozsahu 39–74 % dosahovaly oběma metodami prakticky stejných hodnot, k dispozici byl však omezený počet vzorků, tudíž nelze učinit jednoznačný závěr stran diskrepancí. Výsledky vzorků s FVIII:C menší než 10 % jsou OSA metodou v průměru o 100 % vyšší než CSA (průměrná hodnota OSA 5,27 %, medián 5,42 % a CSA 2,63 %, medián 2,76 %).

DISKUZE

Diskrepance výsledků aktivity FVIII při monitorování substituční léčby modi-



Graf 3. Bland-Altmanův graf rozdílů FVIII:C (%) a jejich průměrů stanovených OSA Cephascreen® a CSA Hyphen v rozsahu 15–200 % u koncentrátu turoctocog alfa pegol.

Přerušované čáry vymezují 95% interval spolehlivosti a plná čára reprezentuje průměrný rozdíl (28,6 %), který se liší od 0 (linie 100% shody porovnávaných hodnot), což značí systematickou chybu měření, kdy OSA vede k nižším výsledkům. CSA – metoda s chromogenními substráty; ICC – koeficient vnitřní korelace; OSA – jednofázová koagulační metoda; SD – směrodatná odchylka

fikovanými koncentráty vedou k potřebám upravit metodiky v klinických laboratořích, aby byla zajištěna adekvátní léčba. Cílem této práce bylo porovnat výsledky FVIII:C jednofázové koagulační metody s metodou s chromogenními substráty u pacientů léčených vybranými EHL koncentráty. Metoda s chromogenními substráty je Evropským lékopisem stanovena jako referenční metoda pro stanovení účinnosti koncentrátů FVIII a je doporučována i pro vyšetřování vzorků pacientů organizacemi, jako jsou britská UKHCDO a francouzská BIMHO, vyjma produktu rurioctocog alfa pegol, u kterého nejsou výsledky zcela jasné, a je proto nutné provést další studie.

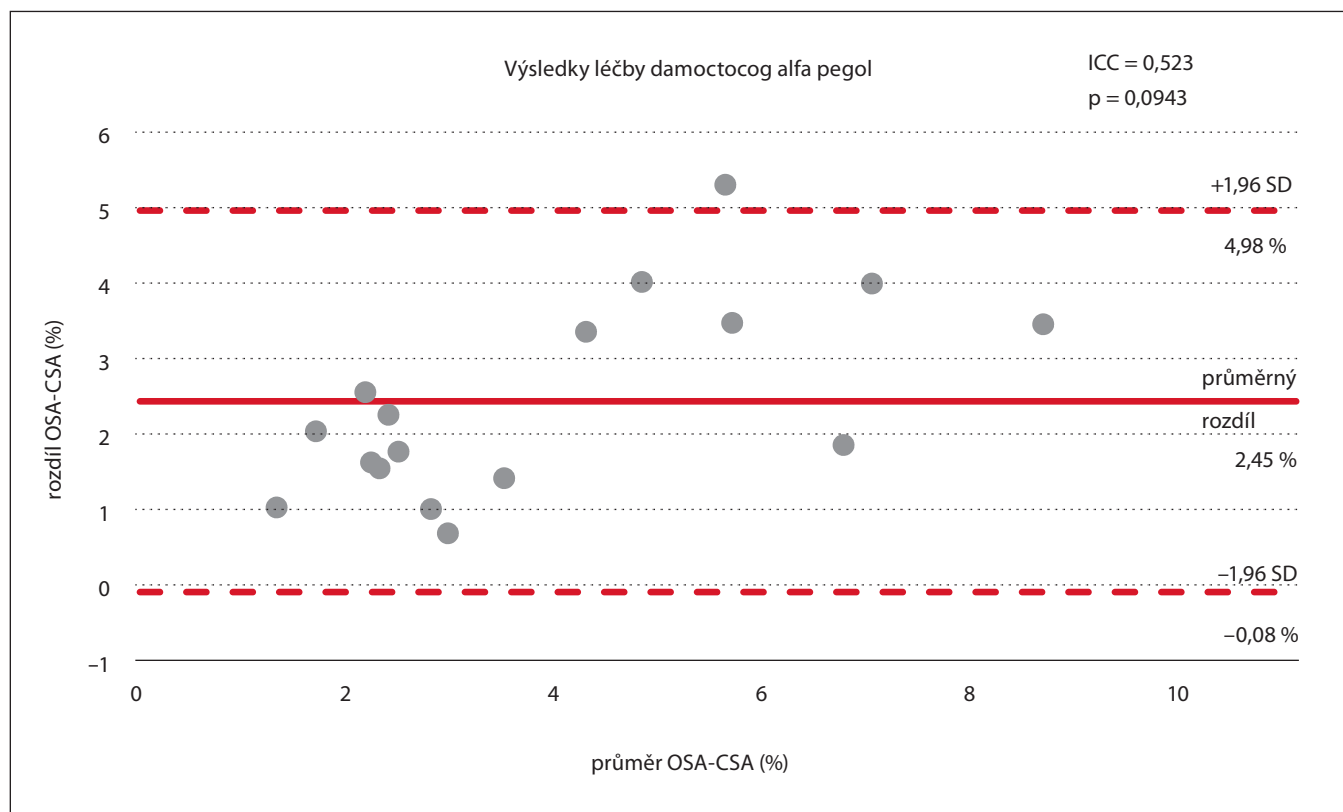
Britská skupina UKHCDO obecně doporučuje metodu, která byla ověřena na nízkých, středních a vysokých hladinách FVIII:C a poskytuje výsledky do $\pm 20\%$ od cílové hodnoty pro FVIII:C větší než 30%

a do $\pm 30\%$ od cílové hodnoty pro FVIII:C v rozsahu $10\text{--}30\%$ [5]. Množství laboratorních studií pak považuje za akceptovatelnou diskrepanci mezi cílovou a naměřenou hodnotou do $25\text{--}30\%$ [5,20]. V našem případě jsme cílovou hodnotu neznali, neboť jsme porovnávali výsledky od reálných pacientů, proto jsme vycházeli z doporučení, že CSA je vhodnější k monitorování EHL a výsledky OSA jsme porovnávali vůči CSA.

Výsledky FVIII:C při léčbě efmorocog alfa dosahují podobných hodnot všemi testovanými metodami (ICC se blíží 1,0 a p hodnoty dosahují statisticky významné korelace). I přes výbornou shodu lze pozorovat, že výsledky nad 10% dosahují oběma OSA lehce nižších hodnot (průměrně o 10% , resp. 15%), zatímco výsledky pod cca 10% naopak hodnot vyšších (průměrně o 21% , resp. 18%). Podobné výsledky publikovali i Lowe et al. (2020), kdy v rámci

kontrol UK NEQAS BC byly do 81 center zaslány 2 vzorky pacientů léčených koncentrátem efmorocog alfa a 2 vzorky FVIII-deficitní plazmy obohacené o definované množství tohoto koncentráty. Z testování vyplynulo, že vzorky s FVIII:C $\leq 11\%$ dosahovaly OSA metodou o 15% vyšších hodnot, přičemž vzorky s FVIII:C $55\text{--}70\%$ byly naopak CSA metodou vyšší o 20% . Autoři zároveň uvádějí, že není rozdíl mezi vzorky od pacientů a uměle připravenými vzorky [24].

U léčby rurioctocog alfa pegol dobře koreluje OSA Cephascreen® a CSA v rozsahu FVIII:C $15\text{--}200\%$, u nízkých hodnot (menší než 13%) je korelace nejednoznačná, dle ICC je patrná spíše slabší shoda a výsledky OSA jsou vyšší v průměru o 54% . Co se týče korelace OSA Pathromtin® SL a CSA, tak pro rozsah $80\text{--}150\%$ dosahuje ICC pouze střední shody bez statisticky významné kore-



Graf 4. Bland-Altmanův graf rozdílů FVIII:C (%) a jejich průměrů stanovených OSA Cephascree® a CSA Hyphen u vzorků obsahujících damoctocog alfa pegol s FVIII:C nižší než 10 %. Prerušované čáry vymezují 95% interval spolehlivosti a plná čára reprezentuje průměrný rozdíl (2,45 %), který se liší od 0 (linie 100% shody porovnávaných hodnot), což značí systematickou chybu měření, kdy OSA vede k vyšším výsledkům. Linie 100% shody je až na spodní hranici intervalu spolehlivosti.

CSA – metoda s chromogenními substráty; ICC – koeficient vnitřní korelace; OSA – jednofázová koagulační metoda; SD – směrodatná odchylka

lace, což je způsobeno pravděpodobně malým počtem pozorování. Výsledky nižší než 10 % jsou těmito metodami ve střední shodě se statisticky významnou korelací, přestože jsme v několika případech pozorovali výrazně vyšší výsledky OSA metodou.

Nadhodnocení výsledků OSA metodou u vzorků s nízkou FVIII:C bylo pozorováno i v jedné mezinárodní terénní studii (Turecek PL et al., 2016). Průměrné *recovery* vzorků FVIII-deficitní plazmy obohacené o ruriotocog alfa pegol s aktivitou 5 % bylo 124,3 %. Vzorky s FVIII:C 80 % dosahovaly naopak *recovery* 101 %. Obecně vyšší výsledky byly pozorovány u APTT reagentů na bázi kyseliny ellagové/polyfenolů než u reagentů na bázi oxidu křemičitého/kaolinu. Výsledky CSA metody s různými sety napříč všemi koncentracemi byly

s *recovery* 114 % (rozsah 95–124 %) [18]. Stejně tak i výsledky našeho měření ukázaly, že hodnoty OSA jsou u FVIII:C menší než 13 % vyšší než CSA a že výsledky OSA Cephascree® jsou zároveň vyšší než OSA Pathromtin® SL.

Výsledky koncentráty turoctocog alfa pegol jsou obecně OSA metodami nižší než CSA. Vyšší diskrepanci jsme pozorovali u vzorků s FVIII:C větší než 15 %. Dle průměrných hodnot jsou výsledky OSA Cephascree® nižší o 36 % a dle ICC panuje mezi metodami pouze střední shoda. Dobré shody u vzorků s FVIII:C větší než 20 % dosahuje s CSA Hyphen OSA Pathromtin® SL, průměrné hodnoty OSA jsou však nižší o 25 %. Obě OSA statisticky významně korelují s CSA u vzorků s FVIII:C menší než 13 %. Podle výsledků studie Hillarp A. et al (2017), ve které byly analyzovány vzorky FVIII-deficitní plazmy s turoc-

tocog alfa pegol o aktivitě 3 %, 20 %, 60 % a 90 % ve dvou centrech (Sheffield, UK a Malmö, Švédsko) na analyzátoch ACL TOP (IL, Bedford, MA, USA), CS5100i (Sysmex® Kobe, Japonsko) a BCS® XP (Siemens, Marburg, Německo), dochází s chromogenním setem Hyphen k nadhodnocení výsledků (*recovery* 126–144 %), zatímco *recovery* OSA Pathromtin® SL bylo 90–105 % v prvním centru a 94–95 % v druhém centru [25]. Rovněž naše výsledky dosahovaly chromogenní metodou Hyphen vyšších hodnot, výsledky OSA Cephascree® i Pathromtin® SL byly u vzorků s FVIII:C větší než 15 % nižší v průměru o 36 % a 25 %.

Nejvyšší míru diskrepance jsme pozorovali u vzorků obsahujících koncentrát damoctocog alfa pegol s FVIII:C menší než 10 %. Výsledky nedosahují statisticky významné korelace a jsou OSA me-

todami vyšší v průměru o 91 % a 100 %. Vzorky s FVIII:C větší než 10 % nabývají podobných hodnot oběma metodami a je mezi nimi dle hodnoty ICC excellentní míra shody. Mezinárodní laboratorní studie (Church et al., 2018) prokázala, že OSA Pathromtin® SL je vhodná k monitorování damoctocog alfa pegol. V této studii byly analyzovány vzorky FVIII-deficitní plazmy obsahující tento koncentrát v aktivitě 4,3 %, 37,5 % a 86,5 %. Průměrné *recovery* vzorků obsahující střední a vysokou aktivitu FVIII bylo 115 a 111 %. Výsledky vzorků s nízkou aktivitou FVIII ale byly nadhodnoceny s průměrným *recovery* 129 %. Vzorky byly vyšetřeny i CSA s *recovery* v rozsahu 101,4–117,1 % [21].

U většiny koncentrátů jsme pozorovali, že výsledky FVIII:C menší než 10 % vychází OSA metodou bez ohledu na APTT reagentii vyšší než CSA, kromě koncentrátu turoctocog alfa pegol, kde vychází OSA Pathromtin® SL nižší v průměru o 19 %. Dle literatury by měla být metoda s chromogenními substráty vhodnější pro nízké hodnoty FVIII:C, protože jednofázová koagulační metoda výsledky FVIII:C menší než 5 % nadhodnocuje [19,26]. Nadhodnocení nízkých hodnot FVIII:C je pravděpodobně způsobené tím, že v rámci přípravy kalibrační křivky pro nízké rozmezí je nutné mnohonásobně ředit plazmatický standard pufrem, čímž dochází k naměření delších koagulačních časů pro jednotlivé body. Při vyšetřování vzorků pak vzniká nepoměr mezi koagulačními časy testovaných vzorků (tyto nejsou tolik ředěny pufrem) a standardem a z kalibrační křivky je odečtena vyšší hodnota aktivity FVIII. Řešením tohoto problému by mohlo být předředení standardu pomocí FVIII-deficitní plazmy. Diskrepance mezi ředěním pufrem a FVIII-deficitní plazmou je pravděpodobně způsobena různým obsahem fibrinogenu, FV a vitamin K-dependentních faktorů [27,28].

ZÁVĚR

Naše data ukázala, že výsledky metod OSA a CSA dobře korelují v celé škále

testovaných hladin FVIII:C u koncentrátu efmorococog alfa. U koncentrátu ruriococog alfa pegol s CSA dobře korelují pouze výsledky větší než 15 % OSA Cephascreen® (Pathromtin® SL je v rozsahu 80–150 % s CSA ve střední shodě, ale bez statisticky významné korelace), u výsledků menších než 13 % je shoda obou OSA s CSA nejednoznačná. Hodnoty FVIII:C turoctocog alfa pegol větší než 15 % jsou OSA metodami nižší se slabší korelací, ale výsledky menší než 13 % statisticky významně korelují. Výrazně vyšší výsledky OSA ve srovnání s CSA jsme pozorovali u damoctocog alfa pegol u FVIII:C menších než 10 %, výsledky větší než 10 % však korelují dobře. Kromě jednoznačně vyšší diskrepance metod OSA a CSA u FVIII:C menší než 10 % pro koncentrát damoctocog alfa pegol jsou rozdíly mezi metodami pro ostatní výše zmíněné koncentráty klinicky akceptovatelné.

POUŽITÉ POJMY A ZKRATKY

APTT – aktivovaný parciální tromboplastinový test
 BIMHO – Francouzská studijní skupina pro biologii hemoragických onemocnění (*French Study Group on the Biology of Hemorrhagic Disease*)
 CSA – metoda s chromogenními substráty (*chromogenic substrate assay*)
 DOACs – přímá orální antikoagulantia (*direct oral anticoagulants*)
 EHL – prodloužený poločas (*extended half-life*)
 FVIII – koagulační faktor VIII
 FVIII:C – koagulační aktivita FVIII
 FIXa – aktivovaný koagulační faktor IX
 FX – koagulační faktor X
 FXa – aktivovaný FX
 OSA – jednofázová koagulační metoda (*one-stage clotting assay*)
 IgG – imunoglobulin G
 kDa – kilodalton
 pdFVIII – plazmatický FVIII (*plasma derived*)
 PEG – polyethylenglykol
 rFVIII – rekombinantní FVIII
 SD – směrodatná odchylka (*standard deviation*)
 SPC – souhrn údajů o přípravku (*summary of product characteristics*)
 SSC ISTH – *Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis*
 WHO – Světová zdravotnická organizace (*World Health Organization*)
 UKHCDO – *United Kingdom Haemophilia Centres Doctor's Organisation*
 UK NEQAS BC – *United Kingdom External Quality Assessment for Blood Coagulation*

WFH – Světová federace hemofilie (*World Federation of Hemophilia*)
 WHO IS – WHO Mezinárodní standard (*WHO International Standard*)

Literatura

- Young GA, Perry DJ; for The International Prothrombin Study Group (IPSG). Laboratory assay measurement of modified clotting factor concentrates: a review of the literature and recommendations for practice. *J Thromb Haemost.* 2019;17:567–573.
- Marlar RA, Strandberg K, Shima M, Adcock DA. Clinical utility and impact of the use of the chromogenic vs one-stage factor activity assays in haemophilia A and B. *Eur J Haematol.* 2020;104:3–14.
- Pruthi RK. Laboratory monitoring of new hemostatic agents for hemophilia. *Semin Hematol.* 2016;53:28–34.
- Smejkal P, Blatný J, Hajšmanová Z, et al. Konsenzuální doporučení Českého národního hemofilického programu (ČNHP) pro diagnostiku a léčbu pacientů s hemofilií, vydání 3., rok 2021. *Transfuzie Hematol Dnes.* 2021;27(1):73–90.
- Gray E, Kitchen S, Bowyer A, et al. Laboratory measurement of factor replacement therapies in the treatment of congenital haemophilia: A United Kingdom Haemophilia Centre Doctors' Organisation guideline. *Haemophilia.* 2020;26:6–16.
- Jeanpierre E, Pouplard C, Lasne D, et al. Factor VIII and IX assays for post-infusion monitoring in hemophilia patients: Guidelines from the French BIMHO group (GFHT). *Eur J Haematol.* 2020;105:103–115.
- Peyvandi F, Kenet G, Pekrul I, Pruthi RK, Ramge P, Spannagl M. Laboratory testing in hemophilia: Impact of factor and non-factor replacement therapy on coagulation assays. *J Thromb Haemost.* 2020;18:1242–1255.
- Augustsson C, Norström E, Andersson NG, Zetterberg E, Astermark J, Strandberg K. Monitoring standard and extended half-life products in hemophilia: Assay discrepancies for factor VIII and IX in pre- and postinfusion samples. *Res Pract Thromb Haemost.* 2020;4:1114–1120.
- Collins P, Chalmers E, Chowdary P, et al. The use of enhanced half-life coagulation factor concentrates in routine clinical practice: guidance from UKHCDO. *Haemophilia.* 2016;22:487–498.
- Hubbard AR, Dodt J, Lee T, et al. Recommendations on the potency labelling of factor VIII and factor IX concentrates. *J Thromb Haemost.* 2013;11:988–989.
- Peyvandi F, Oldenburg J, Friedman KD. A critical appraisal of one-stage and chromogenic assays of factor VIII activity. *J Thromb Haemost.* 2016;14:248–261.
- Škorňová I, Slavík L, et al. Faktory vnitřní koagulační cesty (FVIII, FIX, FXI a FXII). In: Hemostáza: laboratorní metody, jejich využití a interpretace ve vybraných klinických situacích. 2. vyd. Olomouc, Univerzita Palackého v Olomouci, 2021; 66–73.

13. Srivasta A, Santagostino E, Dougall A, et al. WFH Guidelines for the management of hemophilia, 3rd edition. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/hae.14046>, přístup 25.10.2023.
14. Bowyer AE, Duncan EM, Antovic JP. Role of chromogenic assays in haemophilia A and B diagnosis. *Haemophilia*. 2018;24:578–583.
15. Souhrn údajů o přípravku Elocta®. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/elocta-epar-product-information_cs.pdf, přístup 3.11.2023
16. Lambert T, Benson G, Dolan G, et al. Practical aspects of extended half-life products for the treatment of haemophilia. *Ther Adv Hematol*. 2018;9:295–308.
17. Souhrn údajů o přípravku Adynovi®. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/adynovi-epar-product-information_cs.pdf, přístup 3.11.2023
18. Turecek PL, Romender-Finger S, Apostol C, et al. A world-wide survey and field study in clinical haemostasis laboratories to evaluate FVIII:C activity assay variability of ADYNOVATE and OBIZUR in comparison with ADVATE. *Haemophilia*. 2016;22:957–965.
19. Souhrn údajů o přípravku Esperoct®. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/esperoct-epar-product-information_cs.pdf, přístup 3.11.2023
20. Ezban M, Hansen M, Kjalke M. An overview of turoctocog alfa pegol (N8-GP; ESPE-ROCT®) assay performance: Implications for postadministration monitoring. *Haemophilia*. 2020;26:156–163.
21. Church N, Leong L, Katterle Y, et al. Factor VIII activity of BAY 94-9027 is accurately measured with most commonly used assays: Results from an international laboratory study. *Haemophilia*. 2018;24:823–832.
22. Souhrn údajů o přípravku Jivi®. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/jivi-epar-product-information_cs.pdf, přístup 3.11.2023
23. Koo TK, Li MY. A guideline of selecting and reporting intraclass correlation coefficients for reliability research. *J Chiropr Med*. 2016;15:155–163.
24. Lowe A, Jennings I, Kitchen S. One stage and chromogenic FVIII assay results at trough levels: a UK national external quality assessment scheme for blood coagulation (UK NEQAS BC) exercise. *Haemophilia*. 2020;26:27.
25. Hillarp A, Bowyer A, Ezban M, Persson P, Kitchen S. Measuring FVIII activity of glycopegylated recombinant factor VIII, N8-GP, with commercially available one-stage clotting and chromogenic assay kits: a two-centre study. *Haemophilia*. 2017;23:458–465.
26. Pickering W, Hansen M, Kjalke M, Ezban M. Factor VIII chromogenic assays can be used for potency labeling and postadministration monitoring of N8-GP. *J Thromb Haemost*. 2016;14:1579–1587.
27. Van den Bossche D, Peerlinck K, Jacquemin M. New challenges and best practices for the laboratory monitoring of factor VIII and factor IX replacement. *Int J Lab Hem*. 2018;40(Suppl. 1):21–29.
28. Cinotti S, Paladino E, Morfini M. Accuracy of FVIII:C assay by one-stage method can be improved using hemophilic plasma as diluent. *J Thromb Haemost*. 2006;4:828–833.

PODÍL AUTORŮ NA PŘÍPRAVĚ RUKOPISU

MP – laboratorní diagnostika, napsání rukopisu
 SP, RG – léčba pacientů, revize rukopisu
 CHD, ZJ – laboratorní diagnostika, revize rukopisu
 ZJ – laboratorní diagnostika, revize rukopisu
 PM, BA – revize rukopisu

ČESTNÉ PROHLÁŠENÍ

Autoři práce prohlašují, že v souvislosti s tématem, vznikem a publikací tohoto článku nejsou ve střetu zájmů a vznik ani publikace článku nebyly podpořeny žádnou farmaceutickou firmou.

PODĚKOVÁNÍ

Podpořeno MZ ČR-RVO (FNBr, 65269705) a grantem MUNI/A/1558/2023.

Do redakce doručeno dne: 31. 1. 2024.

Přijato po recenzi dne: 8. 7. 2024.

Mgr. Marie Prudková

Oddělení klinické hematologie

FN Brno

Jihlavská 340/20

625 00 Brno

e-mail: prudkova.marie@fnbrno.cz