Factor V Leiden (APC™ Resistance V) - 0020008700

ENGLISH - Insert revision 10/2012

CE

Intended use

For determination of resistance to activated Protein C, caused by the Factor V:Q^{506} (Factor V Leiden) mutation, in plasma from untreated individuals and from patients on oral anti-coagulant (OAT) or heparin therapy.

Summary and principle

The APC resistance phenotype[1,2] is, in more than 90% of cases, due to a mutation in the Factor V gene, resulting in a replacement of Arg^{506} (R) with Gln (Q) in the Factor V protein.[3,4,5] The selectivity for the Factor V:Q^{506} or other mutations in the Factor V gene rendering the protein resistant to inactivation by APC is increased by normalizing the concentrations of other plasma proteins involved in formation and regulation of thrombin. By performing the APTT-based APC resistance assay in the presence of an excess of Factor V Reagent Plasma, the sensitivity and specificity for the Factor V:Q^{506} mutation is significantly increased. Further, this modification allows for the analysis of plasma from patients who are on OAT.[6,7,8,9,10,11] Sample plasma is prediluted with Factor V Reagent Plasma and incubated with the APTT reagent for a standard period of time. Coagulation is triggered by the addition of $CaCl_2$ in the absence and presence of APC and the time of clot formation is recorded.

Composition

The **Factor V Leiden (APC™ Resistance V)** kit consists of:

- R **APTT reagent** (Cat. No. 0020008721): 2 x 4 mL vials of purified phospholipids with colloidal silica as contact activator.
- FV **Factor V Reagent Plasma** (Cat. No. 0020008723): 2 x 4 mL vials of lyophilized human plasma with a low level of Factor V activity and filler (also available separately from Instrumentation Laboratory, Cat. No. 0020008800).
- A **APC/Calcium chloride** (Cat. No. 0020008722): 2 x 2 mL vials of human activated Protein C co-lyophilized with $CaCl_2$.
- Ca **Calcium chloride** (Cat. No. 0020008720): 2 x 2 mL vials of calcium chloride in Tris buffer containing bovine serum albumin.
- 1 **APC Control Plasma Level 1** (Cat. No. 0020008724): 2 x 1 mL vials of lyophilized human normal plasma.
- 2 **APC Control Plasma Level 2** (Cat. No. 0020008725): 2 x 1 mL vials of lyophilized human abnormal plasma.

***Note**: APTT reagent and APC/$CaCl_2$ are not interchangeable between lots.

PRECAUTIONS AND WARNINGS:

The material in this product was tested by FDA approved test methods and found nonreactive for Hepatitis B Surface Antigen (HBsAg), Anti-HCV and HIV antibodies. Handle as if potentially infectious.[12]

Hazard class: **None**
Risk phrases: **None**
Safety phrases: **None**
This product is For *in vitro* Diagnostic Use.

Preparation

APTT reagent: Mix thoroughly before use.
Factor V Reagent Plasma: Dissolve the contents of each vial with 4 mL of NCCLS Type II water or equivalent.[13] Replace the stopper and swirl gently. Make sure of the complete reconstitution of the product. Keep the reagent at 15-25°C for 30 minutes and invert to mix before use. Do not shake.
APC/Calcium chloride: Dissolve the contents of each vial with 2 mL of NCCLS Type II water or equivalent.[13] Replace the stopper and swirl gently. Make sure of the complete reconstitution of the product. Keep the reagent at 15-25°C for 30 minutes and invert to mix before use. Do not shake.
Calcium chloride: Supplied ready for use.
APC Control Plasma Level 1 & 2: Dissolve the contents of vial with 1 mL of NCCLS Type II water or equivalent.[13] Replace the stopper and swirl gently. Make sure of the complete reconstitution of the product. Keep the control at 15-25°C for 30 minutes and invert to mix before use. Do not shake.

Reagent storage and stability

Unopened reagents and controls are stable until the expiration date shown on the vial when stored at 2-8°C.
APTT reagent - Opened reagent is stable: 1 week at 15-25°C, 1 month at 2-8°C in the original vial, 8 hours at 15°C on the ACL® Systems or 3 days at 15°C on the ACL Futura ®/ACL Advance Systems and ACL TOP™. No stirring is required. Do not freeze.
Factor V Reagent Plasma - Stability after reconstitution: 8 hours at 15-25°C, 24 hours at 2-8°C, 3 months at -20°C or below in the original vial or 3 days at 15°C on the ACL Futura/ACL Advance Systems and ACL TOP. No stirring is required. Frozen reagent should be thawed at 37°C and gently mixed before use. Do not refreeze.
APC/Calcium chloride - Stability after reconstitution: 8 hours at 15-25°C, 5 days at 2-8°C, 3 months at -20°C or below in the original vial or 3 days at 15°C on the ACL Futura/ACL Advance Systems and ACL TOP. No stirring is required. Do not refreeze.
Calcium chloride - Opened reagent is stable: 1 week at 15-25°C, 1 month at 2-8°C in the original vial or 3 days at 15°C on the ACL Futura/ACL Advance Systems and ACL TOP. No stirring is required.
APC Control Plasma Level 1 & 2 - Stability after reconstitution: 6 hours at 2-8°C and 15-25°C or 3 months at -20°C or below in the original vial. Frozen control should be thawed at 37°C and gently mixed before use. Do not refreeze.
For optimal stability remove reagents from the system and store them at 2-8°C in the original vials.

Instrument/test procedures

Refer to the appropriate IL instrument's Operator's Manual and/or Application Manual for the complete assay procedure instructions.

Specimen collection and preparation

Nine parts of freshly drawn venous blood are collected into one part trisodium citrate. Refer to NCCLS Document H21-A4 for further instructions on specimen collection, handling and storage.[14]

Additional reagents and control plasma

The following may be purchased separately.

	Americas, Pacific Rim and Europe
Factor V Reagent Plasma	Cat. No. 0020008800
Cleaning solution	Cat. No. 0009831700

Quality control

Normal and abnormal controls are recommended for a complete quality control program.[15] APC Control Plasmas Level 1 (normal) and Level 2 (abnormal) are designed for this program. Each laboratory should establish its own mean and standard deviation and should establish a quality control program to monitor laboratory testing. Controls should be analyzed at least once every 8 hour shift in accordance with good laboratory practice. Refer to the instrument's Operator's Manual for additional information. Refer to Westgard *et al* for identification and resolution of out-of-control situations.[16]

Results

APCR-V results may be reported in seconds and ratios. Refer to the instrument's Operator's Manual for additional information.

Limitations/interfering substances

No significant differences are obtained between fresh and frozen samples. The sensitivity and specificity for the Factor V:Q^{506} mutation on analysis of plasma from OAT patients is not affected by the INR value.
No interference up to 1 U/mL (unfractionated and low molecular weight) heparin on the IL Coagulation Systems.
APCR-V results on the ACL Futura/ACL Advance Systems are not affected by hemoglobin up to 400 mg/dL, bilirubin up to 20 mg/dL and triglycerides up to 1000 mg/dL. APCR-V results on the ACL TOP are not affected by hemoglobin up to 500 mg/dL, bilirubin up to 18.8 mg/dL and triglycerides up to 1791 mg/dL.
Patients with known high inhibitor activity (e.g. phospholipid antibodies) may give an abnormal APTT and thus possibly misleading results. In such cases, increasing the dilution factor (e.g. 1 + 9 or 1 + 19) may correct the test result.

Cut-off value

APC Resistance due to FV:Q^{506} mutation is indicated when the APCR-V ratio is below or equal to the cut-off value.
When using the Factor V Leiden (APC Resistance V) kit, a cut-off value must be established for each individual instrument.
The cut-off value is that value which distinguishes the abnormal from normal samples. The abnormal samples have APCR-V ratios which are below or equal to the cut-off value. The APCR-V ratio for normals is higher than the cut-off value.
Procedure to establish the cut-off value:

1. Using a plasma sample with a normal APCR-V genotype, perform five independent determinations of the APCR-V ratio. Perform testing in triplicate. Confirm that the inter and intra assay variation is below 7%.
2. Determine the APCR-V ratio for at least 30 plasma samples from individuals in the age range of 20 - 65 years. Include APC Control Plasma Level 1 and Level 2 for assay validation.
3. Verify that APCR-V ratios for the APC Control Plasmas are within the range on the insert sheet.
4. Calculate the median APCR-V ratio of the 30 samples.
5. Calculate the Factor V related APC Resistance cut-off value as follows: if the median is < 2.8: 0.8 x median APCR-V ratio (calculated in #4); if the median is > 2.8: 0.75 x median APCR-V ratio (calculated in #4).
6. The APCR-V ratio for APC Control Plasma Level 1 should be higher than the established cut-off value. The APCR-V ratio for APC Control Plasma Level 2 should be lower than the calculated cut-off value.

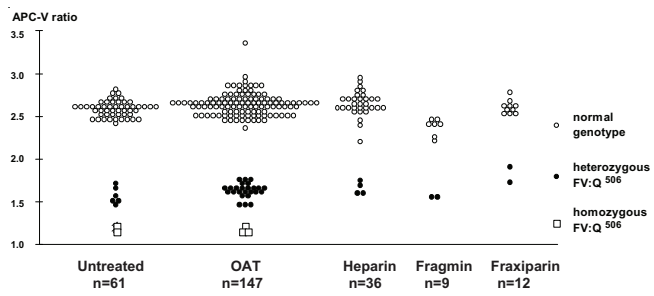
IL recommends to perform regular checks of the cut-off value by use of the APC Control Plasma Level 1 and Level 2.

Expected values

A normal range study was performed using Factor V Leiden (APC Resistance V) kit.

System	N	Range (units)
ACL Family	30	2.18 - 3.38 (APCR-V ratios)
ACL Futura/ACL Advance	30	2.42 - 3.18 (APCR-V ratios)
ACL TOP	120	2.61 - 3.32 (APCR-V ratios)

The following results illustrate the applicability of the APC Resistance V assay on the analysis of plasma from untreated individuals, patients on OAT with an INR of 1.3 - 6.0, and patients receiving unfractionated Heparin or low molecular weight heparin (shown here are Fragmin® and Fraxiparin®).
By prediluting patient plasma with Factor V Reagent Plasma, a complete discrimination between normal, heterozygous V:Q^{506} and homozygous V:Q^{506} genotypes can be obtained by performing APC resistance analysis on plasma from both untreated patients and patients on oral anticoagulant or heparin therapy.



Sample APCR-V ratios are distributed according to the Factor V genotype. For a given genotype, similar APCR-V ratios are obtained regardless of patient group. Typical median values are 2.6 (normal), 1.7 (heterozygous FV:Q^{506}) and 1.2 (homozygous FV:Q^{506}). Factor V Leiden (APC Resistance V) kit provides > 99% sensitivity for FV:Q^{506} mutation as determined on the ACL system (n = 295).
These results were obtained using a specific lot of reagent.
Due to many variables which may affect clotting times, each laboratory should establish its own normal range.

Performance characteristics

Precision:
Within run and total (run to run and day to day) precision were assessed over multiple runs using both normal and abnormal samples.

ACL Family	Mean (APCR-V ratios)	CV % (Within run)	CV % (Total)
APC Control 1	2.49	1.8	2.0
APC Control 2	1.58	1.9	2.2
ACL Futura/ ACL Advance	**Mean (APCR-V ratios)**	**CV % (Within run)**	**CV % (Total)**
APC Control 1	2.34	2.1	2.3
APC Control 2	1.54	1.2	1.1
ACL TOP	**Mean (APCR-V ratios)**	**CV % (Within run)**	**CV % (Total)**
APC Control 1	2.94	3.9	4.6
APC Control 2	1.85	1.4	2.0

Correlation:

Unit	system	slope	intercept	r	Reference method
APCR-V ratios	ACL TOP	1.041	-0.004	0.970	APCR-V on ACL Advance

These precision and correlation results were obtained using specific lots of reagents and controls.

Factor V Leiden (APC™ Resistance V) - 0020008700

DEUTSCH - Packungsbeilage Version 10/2012

CE

Verwendung

Zur Bestimmung einer Resistenz gegenüber aktiviertem Protein C, die durch eine Mutation des Faktor V:Q^{506} (Faktor V Leiden) verursacht wird, im Plasma unbehandelter Personen als auch bei Patienten unter oraler Antikoagulantien-Therapie (OAT) oder Heparintherapie.

Testprinzip und Zusammenfassung

Der APC Phänotyp[1,2] ist in 90 % aller Fälle auf eine Mutation des Faktor V Gens zurückzuführen, die auf einem Austausch der Aminosäure Arg^{506} (R) gegen Gln (Q) im Faktor V Protein beruht.[3,4,5] Die Selektivität für den Faktor V:Q^{506} oder anderer Mutationen des Faktor V Gens, die das Protein gegenüber einer Inaktivierung durch aktiviertes Protein C (APC) resistent machen, wird durch eine Normalisierung der Konzentrationen anderer Plasmaproteine, die bei der Bildung und Regulierung des Thrombins beteiligt sind, erhöht. Bei der Durchführung des auf einer APTT basierenden APC Resistance Tests in Gegenwart eines Überschusses an Faktor V Reagenz Plasma, wird die Sensitivität und Spezifität für die Faktor V:Q^{506} Mutation signifikant erhöht. Außerdem ist es dadurch möglich auch Plasmen von Patienten unter OAT zu untersuchen.[6,7,8,9,10,11]
Das Patientenplasma wird mit Faktor V Reagenz Plasma vorverdünnt und mit dem APTT Reagenz inkubiert. Die Gerinnung wird durch Zugabe von $CaCl_2$ in Anwesenheit und Abwesenheit von APC gestartet und die Gerinnungszeit gemessen.

Inhalt

Die **Factor V Leiden (APC™ Resistance V)** Packung enthält:

- R **APTT reagent** (Art. Nr. 0020008721): 2 Flaschen x 4 mL gereinigte Phospholipide mit kolloidalem Kieselgur als Kontaktaktivator.
- FV **Factor V Reagent Plasma** (Art. Nr. 0020008723): 2 Flaschen x 4 mL lyophilisiertes Humanplasma mit verminderter Faktor V Aktivität und Stabilisatoren. (Das Faktor V Reagenz Plasma ist auch einzeln unter der Art. Nr. 0020008800 erhältlich.).
- A **APC/Calcium chloride** (Art. Nr. 0020008722): 2 Flaschen x 2 mL humanes aktiviertes Protein C mit $CaCl_2$ lyophilisiert.
- Ca **Calcium chloride** (Art. Nr. 0020008720): 2 Flaschen x 2 mL Kalziumchlorid in Tris-Puffer mit bovinem Serumalbumin.
- 1 **APC Control Plasma Level 1** (Art. Nr. 0020008724): 2 Flaschen x 1 mL lyophilisiertes Human-Normalplasma.
- 2 **APC Control Plasma Level 2** (Art. Nr. 0020008725): 2 Flaschen x 1 mL lyophilisiertes Human-Abnormalplasma.

***Hinweis**: APTT Reagenz und APC/Kalziumchlorid verschiedener Chargen sind nicht austauschbar.

WARNUNG:

Das verwendete Material wurde mit FDA anerkannten Testmethoden auf HIV 1/2-Antikörper, Hepatitis-B-Antigen und HCV-Antigen geprüft. Bitte beachten Sie die Bestimmungen zum Umgang mit potentiell infektiösen Materialien.[12]

Gefahrenklasse: **keine**
Risikoeinstufung: **keine**
Sicherheitseinstufung: **keine**
Dieses Produkt ist nur für die *in vitro* Diagnostik geeignet.

Herstellung

APTT reagent: Vor Verwendung kräftig schütteln.
Factor V Reagent Plasma: Zum Inhalt einer Flasche wird 4 mL Aqua dest. pipettiert und durch leichtes Schwenken gelöst.[13] Nach vollständiger Rekonstitution wird das Reagenz 30 Minuten bei 15-25°C inkubiert und dann unter vorsichtigem Schwenken erneut gemischt. Nicht schütteln.
APC/Calcium chloride: Zum Inhalt einer Flasche wird 2 mL Aqua dest. pipettiert und durch leichtes Schwenken gelöst.[13] Nach vollständiger Rekonstitution wird das Reagenz 30 Minuten bei 15-25°C inkubiert und dann unter vorsichtigem Schwenken erneut gemischt. Nicht schütteln.
Calcium chloride: Gebrauchsfertig.
APC Control Plasma Level 1 & 2: Zum Inhalt einer Flasche wird 1 mL Aqua dest. pipettiert und durch leichtes Schwenken gelöst.[13] Nach vollständiger Rekonstitution wird das Reagenz 30 Minuten bei 15-25°C inkubiert und dann unter vorsichtigem Schwenken erneut gemischt. Nicht schütteln.

Lagerung und Haltbarkeit

Die ungeöffneten Reagenzien sind bei Lagerung zwischen 2-8°C bis zu dem auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum haltbar.
APTT reagent - Geöffnetes Reagenz:

- bei 15-25°C in der Originalflasche: 1 Woche
- bei 2-8°C in der Originalflasche: 1 Monat
- bei 15°C in ACL-Analysensystemen: 8 Stunden (kein Rühren erforderlich)
- bei 15°C in ACL Futura/ACL Advance und ACL TOP-Analysensystemen: 3 Tage (kein Rühren erforderlich)

Nicht einfrieren.
Factor V Reagent Plasma - Haltbarkeit nach Rekonstitution:

- bei 15-25°C in der Originalflasche: 8 Stunden
- bei 2-8°C in der Originalflasche: 24 Stunden
- bei -20°C oder kälter in der Originalflasche: 3 Monate
- bei 15°C in ACL Futura/ACL Advance und ACL TOP-Analysensystemen: 3 Tage (kein Rühren erforderlich)

Tiefgefrorenes Reagenz sollte bei 37°C aufgetaut und vor dem Gebrauch vorsichtig geschwenkt werden. Nur einmal einfrieren.
APC/Calcium chloride - Haltbarkeit nach Rekonstitution:

- bei 15-25°C in der Originalflasche: 8 Stunden
- bei 2-8°C in der Originalflasche: 5 Tage
- bei -20°C oder kälter in der Originalflasche: 3 Monate
- bei 15°C in ACL Futura/ACL Advance und ACL TOP-Analysensystemen: 3 Tage (kein Rühren erforderlich)

Nur einmal einfrieren.
Calcium chloride - Geöffnetes Reagenz:

- bei 15-25°C in der Originalflasche: 1 Woche
- bei 2-8°C in der Originalflasche: 1 Monat
- bei 15°C in ACL Futura/ACL Advance und ACL TOP-Analysensystemen: 3 Tage (kein Rühren erforderlich)

APC Control Plasma Level 1 & 2 - Haltbarkeit nach Rekonstitution:

- bei 15-25°C in der Originalflasche: 6 Stunden
- bei 2-8°C in der Originalflasche: 6 Stunden
- bei -20°C oder kälter in der Originalflasche: 3 Monate

Tiefgefrorenes Kontrollplasma sollte bei 37°C aufgetaut und vor dem Gebrauch vorsichtig geschwenkt werden. Nur einmal einfrieren.
Für eine optimale Haltbarkeit sollten die Reagenzien nach dem Gebrauch aus dem Gerät entnommen und im Kühlschrank bei 2-8°C in der Originalflasche aufbewahrt werden.

Bestimmungsansatz

Die ausführliche Beschreibung des Bestimmungsansatzes ist dem Geräte-Bedienerhandbuch und/oder dem Applikationshandbuch zu entnehmen.

Probenmaterial und -gewinnung

9 Teile frisches venöses Blut und 1 Teil Trinatriumcitratlösung werden sorgfältig in einem silikonisierten Glasröhrchen gemischt. Hinweise zur Aufbereitung des Blutes sind den Empfehlungen des Deutschen Instituts für Normung - DIN 58 905 - oder dem NCCLS Document H21-A4 zu entnehmen.[14]

Zusätzliche Reagenzien und Kontrollplasmen

Die folgenden Reagenzien können auch einzeln bestellt werden.

	Amerikan. und Pazifischer Raum und Europa
Faktor V Reagenz Plasma	Art. Nr. 0020008800
Reinigungslösung	Art. Nr. 0009831700

Qualitätskontrolle

Es ist gängige Laborpraxis, die Qualität der Analyse mit Kontrollmaterialien im normalen sowie im pathologischen Bereich zu überprüfen.[15] Es wird empfohlen, als Kontrollmaterial die oben angegebenen Kontrollen zu verwenden. Die Bereiche sind der jeweiligen Packungsbeilage zu entnehmen. Jedes Labor sollte seinen eigenen Kontrollbereich ermitteln. Spätestens nach jeweils 8 Stunden sollte eine Qualitätskontrolle durchgeführt werden. Algorithmen zur Beurteilung der Qualitätskontrollergebnisse siehe z.B Westgard *et al.*1[6] Siehe auch "Richtlinien der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung quantitativer laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen" vom 24.8.2001.

Ergebnisse

APCR-V Ergebnisse werden in Sekunden und Ratio dargestellt. Weitere Informationen sind dem Bedienerhandbuch zu entnehmen.

Einschränkungen

Zwischen frischen und gefrorenen Plasmen werden keine signifikanten Unterschiede gefunden. Die Sensitivität und Spezifität auf die Faktor V:Q^{506} Mutation bei Untersuchung von Plasmen von Patienten unter OAT wird nicht durch das Ausmass der Antikoagulantientherapie beeinflusst. Die Ergebnisse werden durch Konzentrationen an Heparin (unfraktionierte oder niedermolekulare) bis zu 1 U/mL auf IL Gerinnungssystemen nicht beeinflusst.
APCR-V Ergebnisse auf ACL Futura/ACL Advance-Analysensystemen bleiben durch Konzentrationen von Hämoglobin bis 400 mg/dL, Bilirubin bis 20 mg/dL und Triglyceriden bis 1000 mg/dL unbeeinflusst. APCR-V Ergebnisse auf ACL TOP-Analysensystemen werden durch Konzentrationen an Hämoglobin bis 500 mg/dL, Bilirubin bis 18,8 mg/dL und Triglyceriden bis 1791 mg/dL nicht beeinflusst. Bei Patienten mit bekannt hoher Inhibitor-Aktivität (z.B. Phospholipid-Antikörpern) kann es zu pathologischen APTT Werten und damit zu möglicherweise irreleitenden Ergebnissen kommen. In solchen Fällen kann durch eine Erhöhung des Verdünnungsfaktors (z.B. 1+ 9 oder 1 + 19) das Testergebnis korrigiert werden.

Cut-Off Wert

Eine auf die FV Leiden Mutation zurückzuführende APC-Resistenz ist indiziert, wenn die APCR-V Ratio gleich oder kleiner des Cut-Off-Wertes ist. Bei Einsatz des Faktor V Leiden (APC™ Resistance V) Testkits muss für jedes Analysensystem ein eigener Cut-Off-Wert ermittelt werden. Der Cut-Off-Wert ist der Wert, der die pathologischen Proben von den normalen abgrenzt. Pathologische Proben weisen APCR-V Ratios kleiner oder gleich dem Cut-Off-Wert auf. Die APCR-V Ratio gesunder Patienten liegt höher als der Cut-Off-Wert.
Vorgehensweise zur Ermittlung des Cut-Off-Wertes:

1. Mit einem Plasma, das einen normalen APCR-V Genotyp besitzt, werden fünf voneinander unabhängige APCR-V Ratio Bestimmungen durchgeführt (jeweils als Dreifach-Bestimmung). Sowohl der Variationskoeffizient der Dreifach-Bestimmung als auch der verschiedenen Läufe sollte kleiner als 7 % sein.
2. Bestimmung der APCR-V Ratio von mindestens 30 Plasmaproben von Personen der Altersgruppe 20 - 65 Jahre. Zur Testvalidierung sollte auch das APC Kontrollplasma Level 1 und 2 gemessen werden.
3. Die APCR-V Ratios der Kontrollplasmen sollten innerhalb der im Beipackzettel angegebenen Bereiche liegen.
4. Berechnung des Medians der 30 ermittelten APCR-V Ratios.
5. Der Faktor V bezogene APC Reistance Cut-Off-Wert berechnet sich wie folgt:
   - ist der Median < 2,8 dann multipliziert man den unter Punkt 4 berechneten Median der APCR-V Ratios mit 0,8 - ist der Median > 2,8 dann multipliziert man den unter Punkt 4 berechneten Median der APCR-V Ratios mit 0,75
6. Die APCR-V Ratio des Kontrollplasmas Level 1 sollte höher und die des Kontrollplasmas Level 2 niedriger als der ermittelte Cut-Off-Wert sein.

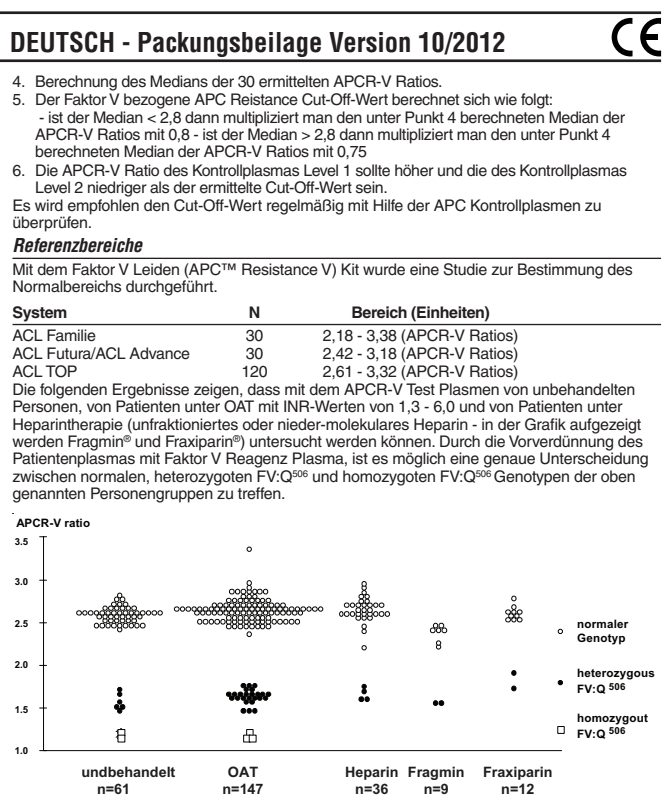
Es wird empfohlen den Cut-Off-Wert regelmäßig mit Hilfe der APC Kontrollplasmen zu überprüfen.

Referenzbereiche

Mit dem Faktor V Leiden (APC™ Resistance V) Kit wurde eine Studie zur Bestimmung des Normalbereichs durchgeführt.

System	N	Bereich (Einheiten)
ACL Familie	30	2,18 - 3,38 (APCR-V Ratios)
ACL Futura/ACL Advance	30	2,42 - 3,18 (APCR-V Ratios)
ACL TOP	120	2,61 - 3,32 (APCR-V Ratios)

Die folgenden Ergebnisse zeigen, dass mit dem APCR-V Test Plasmen von unbehandelten Personen, von Patienten unter OAT mit INR-Werten von 1,3 - 6,0 und von Patienten unter Heparintherapie (unfraktioniertes oder nieder-molekulares Heparin - in der Grafik aufgezeigt werden Fragmin® und Fraxiparin®) untersucht werden können. Durch die Vorverdünnung des Patientenplasmas mit Faktor V Reagenz Plasma, ist es möglich eine genaue Unterscheidung zwischen normalen, heterozygoten FV:Q^{506} und homozygoten FV:Q^{506} Genotypen der oben genannten Personengruppen zu treffen.



Die APCR-V Ratios werden gemäss den Faktor V Genotypen angegeben. Für einen bestimmten Genotyp erhält man unbeachtet der Patientengruppe ähnliche APCR-V Ratios. Typische Mediane sind: 2,6 (normaler Genotyp), 1,7 (heterozygot FV:Q^{506}), und 1,2 (homozygot FV:Q^{506}). Der Faktor V Leiden (APC™ Resistance V) Kit ist > 99% sensitiv auf die Faktor V Mutation (untersucht wurde am ACL n=295).
Die Werte wurden mit einer spezifischen Reagenziencharge ermittelt. Aufgrund verschiedener Variablen, die die Gerinnungszeit beeinflussen können, wird empfohlen, dass jedes Labor seinen eigenen Normalbereich ermittelt.

Testcharakteristik

Präzision:
Die Präzision im Lauf und von Tag zu Tag wurde bei mehreren Läufen mit Normal- und Abnormal-Kontrollen bestimmt.

ACL Familie	Mittelwert (APCR-V Ratios)	VK % (im Lauf)	VK % (Tag zu Tag)
APC Kontrollplasma Level 1	2,49	1,8	2,0
APC Kontrollplasma Level 2	1,58	1,9	2,2
ACL Futura/ ACL Advance	**Mittelwert (APCR-V Ratios)**	**VK % (im Lauf)**	**VK % (Tag zu Tag)**
APC Kontrollplasma Level 1	2,34	2,1	2,3
APC Kontrollplasma Level 2	1,54	1,2	1,1
ACL TOP	**Mittelwert (APCR-V Ratios)**	**VK % (im Lauf)**	**VK % (Tag zu Tag)**
APC Kontrollplasma Level 1	2,94	3,9	4,6
APC Kontrollplasma Level 2	1,85	1,4	2,0

Korrelation:

Einheit	System	Steigung	Ordinatenabschnitt	r	Referenzmethode
APCR-V Ratios	ACL TOP	1,041	-0,004	0,970	APCR-V am ACL Advance

Die Ergebnisse der Präzision und Korrelation sind mit spezifischen Reagenzien- und Kontrollchargen ermittelt worden.

Instrumentation Laboratory

Instrumentation Laboratory Company - Bedford, MA 01730-2443 (USA)
Instrumentation Laboratory SpA - V.le Monza 338 - 20128 Milano (Italy) EC REP

301557A R9 10/2012

Factor V Leiden (APC™ Resistance V) - 0020008700

ESPAÑOL - Revisión Folleto 10/2012

CE

Aplicación

Para la determinación de la Resistencia a la Proteína C Activada causada por la mutación en el Factor V:Q^{506} (Factor V Leiden), en el plasma de individuos sin tratamiento y de pacientes que están bajo terapia anticoagulante oral (TAO) o terapia heparínica.

Principio

El fenotipo de Resistencia a la Proteína C Activada[1,2] es debido, en más del 90% de los casos, a una mutación en el gen del Factor V que produce la sustitución de la Arg^{506} (R) por Gln (Q) en la proteína del Factor V.[3,4,5] La selectividad por la mutación Factor V:Q^{506} u otras en el gen del Factor V, que producen una proteína resistente a la inactivación por la Proteína C Activada (APC), se incrementa mediante la normalización de las concentraciones de otras proteínas del plasma que actúan en la formación y regulación de la Trombina. Llevando a cabo el ensayo de Resistencia a la APC basado en el test TTPA y en presencia de un exceso de Plasma Reactivo Factor V, la sensibilidad y especificidad a la mutación Factor V:Q^{506} se incrementa significativamente. Además, esta modificación permite el análisis del plasma de pacientes que están en TAO.[6,7,8,9,10,11]

El plasma de la muestra es prediluido con Plasma Reactivo Factor V e incubado con el reactivo TTPA por un periodo estándar de tiempo.

La coagulación es desencadenada por la adición de $CaCl_2$ en ausencia y presencia de APC, registrándose el tiempo de formación del coágulo.

Composición

El kit **Factor V Leiden (APC™ Resistance V)** consta de:

- R **APTT reagent** (Cat. No. 0020008721): 2 x 4 mL viales de fosfolípidos purificados con sílice coloidal como activador de contacto.
- FV **Factor V Reagent Plasma** (Cat. No. 0020008723): 2 x 4 mL viales de plasma humano liofilizado con un nivel bajo de actividad de Factor V y estabilizantes (también disponible por separado: Cat. No. 0020008800).
- A **APC/Calcium chloride** (Cat. No. 0020008722): 2 x 2 mL viales de Proteína C Activada humana co-liofilizada con $CaCl_2$.
- Ca **Calcium chloride** (Cat. No. 0020008720): 2 x 2 mL viales de cloruro cálcico en tampón Tris conteniendo Albúmina de suero bovino.
- 1 **APC Control Plasma Level 1** (Cat. No. 0020008724): 2 x 1 mL viales de plasma humano normal liofilizado.
- 2 **APC Control Plasma Level 2** (Cat. No. 0020008725): 2 x 1 mL viales de plasma humano anormal liofilizado.

***Nota**: los reactivos TTPA y APC/$CaCl_2$ no son intercambiables entre lotes.

PRECAUCIÓN:

El material usado en este producto ha sido verificado por los métodos aprobados por la FDA y encontrado no reactivo al Antígeno de Superficie de la Hepatitis B (HBsAg), Anti-HCV y anticuerpos HIV. Manejar con precaución como si fuese potencialmente infeccioso.[12]

Indicaciones de Peligro: **Ninguna**

Frases de Riesgo: **Ninguna**

Frases de Seguridad: **Ninguna**

Este reactivo es para diagnóstico *in vitro*.

Preparación

APTT reagent: Mezclar vigorosamente antes de su uso.

Factor V Reagent Plasma: Disolver el contenido de cada vial con 4 mL de agua destilada (tipo II de acuerdo a NCCLS).[13] Cerrar el vial y homogeneizar suavemente. Asegurarse de la completa disolución del producto. Mantener el reactivo entre 15 y 25°C durante 30 minutos. Mezclar por inversión del vial antes de su uso. No agitar.

APC/Calcium chloride: Disolver el contenido de cada vial con 2 mL de agua destilada (tipo II de acuerdo a NCCLS).[13] Cerrar el vial y homogeneizar suavemente. Asegurarse de la completa disolución del producto. Mantener el reactivo entre 15 y 25°C durante 30 minutos. Mezclar por inversión del vial antes de su uso. No agitar.

Calcium chloride: Se suministra listo para su uso.

APC Control Plasma Level 1 & 2: Disolver el contenido de cada vial con 1 mL de agua destilada (tipo II de acuerdo a NCCLS).[13] Cerrar el vial y homogeneizar suavemente. Asegurarse de la completa disolución del producto. Mantener el reactivo entre 15 y 25°C durante 30 minutos. Mezclar por inversión del vial antes de su uso. No agitar.

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.

APTT reagent - El reactivo abierto es estable 1 semana a 15-25°C, 1 mes a 2- 8°C en el vial original, 8 horas a 15°C en los sistemas ACL® ó 3 días a 15°C en los sistemas ACL Futura®/ ACL Advance y ACL TOP™ sin agitación. No congelar.

Factor V Reagent Plasma - Estabilidad después de la reconstitución: 8 horas a 15-25°C, 24 horas a 2-8°C, 3 meses a -20°C ó temperatura menor en el vial original ó 3 días a 15°C en los sistemas ACL Futura/ACL Advance y ACL TOP sin agitación. El reactivo se puede descongelar a 37°C. Homogeneizar suavemente antes de su uso. No recongelar.

APC/Calcium chloride - Estabilidad después de la reconstitución: 8 horas a 15-25°C, 5 días a 2-8°C, 3 meses a -20°C ó temperatura menor en el vial original ó 3 días a 15°C en los sistemas ACL Futura/ACL Advance y ACL TOP sin agitación. No recongelar.

Calcium chloride - El reactivo abierto es estable 1 semana a 15-25°C, 1 mes a 2- 8°C en el vial original ó 3 días a 15°C en los sistemas ACL Futura/ACL Advance y ACL TOP sin agitación.

APC Control Plasma Level 1 & 2 - Estabilidad después de la reconstitución: 6 horas a 2-8°C y a 15-25°C, 3 meses a -20°C ó temperatura menor en el vial original. El control se puede descongelar a 37°C. Homogeneizar suavemente antes de su uso. No recongelar.

Para obtener una estabilidad óptima de los reactivos, sugerimos que una vez acabado el trabajo retire los reactivos del analizador y los conserve a 2-8ºC en su vial original.

Método de Ensayo

Seguir las instrucciones de la técnica de acuerdo al Manual del Operador de los instrumentos IL o bien al Manual de Aplicaciones.

Recolección y Preparación de las muestras

Recoger nueve partes de sangre recién extraída por punción venosa y una parte de anticoagulante citrato trisódico. Para la recolección, manejo y conservación del plasma seguir las recomendaciones del documento H21-A4 de la NCCLS.[14]

Reactivos adicionales y plasmas de control

Los siguientes productos pueden pedirse por separado.

	Americas, Pacific y Europa
Plasma Reactivo Factor V	N° Cat. 0020008800
Agente de Limpieza	N° Cat. 0009831700

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.[15] Tanto el APC Plasma control Nivel 1 (normal) como el APC Plasma control Nivel 2 (anormal), están diseñados específicamente para este programa. Cada laboratorio debe establecer su propia media y desviación estándar, asimismo establecer un programa de Control de Calidad para monitorizar los resultados de su laboratorio. Los controles deben ser usados como mínimo una vez dentro del turno de 8 horas, de acuerdo a la normativa de Buenas Prácticas en el Laboratorio. Referirse al Manual del Operador para información adicional. Consultar la publicación de Westgard y col. para una identificación y resolución de situaciones anormales del Control de Calidad.[16]

Resultados

Los resultados del APCR-V se expresan en segundos y ratio. Referirse al Manual del Operador para información adicional.

Limitaciones/interferencias

No se han encontrado diferencias significativas entre muestras frescas y congeladas. La sensibilidad y especificidad para la mutación Factor V:Q^{506} en el análisis de plasmas de pacientes en TAO no son alteradas por el valor de INR.

No se ha encontrado interferencia con concentraciones de heparina hasta 1 U/mL (tanto no fraccionada como de bajo peso molecular) en los Sistemas de Coagulación de IL.

Resultados de APCR-V en los sistemas ACL Futura/ACL Advance no son afectados por concentraciones de Hemoglobina hasta 400 mg/dL, Bilirrubina hasta 20 mg/dL y Triglicéridos hasta 1000 mg/dL. Resultados de APCR-V en el ACL TOP no son afectados por concentraciones de Hemoglobina hasta 500 mg/dL, Bilirrubina hasta 18,8 mg/dL y Triglicéridos hasta 1791 mg/dL.

En pacientes con una alta actividad conocida de inhibidores (por ejemplo, anticuerpos antifosfolípidos) se pueden obtener resultados de TTPA anormales y, por tanto, resultados engañosos. En tales casos, el incremento del factor de dilución (por ejemplo 1 + 9 ó 1 + 19) puede corregir los resultados del test.

Valor de "Cut-off"

La existencia de Resistencia a la APC debida a la mutación FV:Q^{506} está indicada por un valor del ratio APCR-V menor o igual al valor de "cut-off".

Cuando se use el kit Factor V Leiden (APC™ Resistance V), se deberá establecer el valor de "cut-off" para cada instrumento.

El valor de "cut-off" es aquel valor que distingue entre muestras normales y anormales. Las muestras anormales tienen un ratio de APCR-V menor o igual que el valor del "cut-off". El ratio APCR-V de muestras normales es más alto que el valor del "cutt-off".

Procedimiento para establecer el valor de "Cut-off":

1. Realizar cinco determinaciones seguidas de un mismo plasma que tenga un genotipo normal de APCR-V. Reanalizar dicha serie dos veces más. Comprobar que el Coeficiente de Variación (CV) del ratio APCR-V interserie e intraserie es inferior al 7 %.
2. Determinar el ratio APCR-V en al menos 30 plasmas de individuos de edades comprendidas entre 20 y 65 años. Incluir además el Plasma Control Nivel 1 y Nivel 2 para la validación del ensayo.
3. Verificar que los ratios de la APCR-V de los Plasmas Controles estén dentro del rango indicado en la ficha técnica.
4. Calcular la media de los ratios de la APCR-V de las 30 muestras.
5. Calcular el valor del "cut-off" de la Resistencia a la Proteína C Activada relacionada con el Factor V de la manera siguiente: si la media del ratio APCR-V (calculada en el apartado 4) es < 2,8: multiplicar la media x 0,8; pero si la media del ratio APCR-V (calculada en el apartado 4) es > 2,8: multiplicar la media x 0,75.
6. El ratio APCR-V del Plasma Control Nivel 1 debe ser más alto que el valor de "cut-off" establecido. El ratio APCR-V del Plasma Control Nivel 2 debe ser más bajo que el valor de "cut-off" establecido.

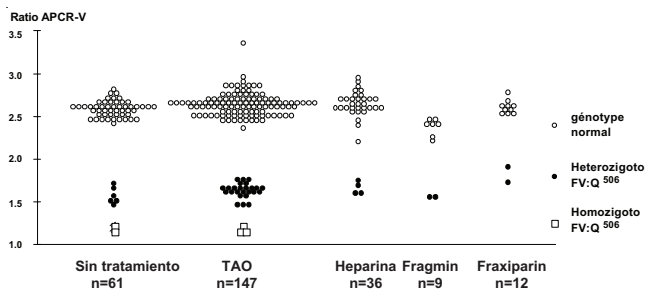
IL recomienda chequear regularmente el valor del cut-off usando los Plasmas Control Nivel 1 y Nivel 2.

Valores esperados

Se ha realizado un estudio del rango de normalidad utilizando el kit Factor V Leiden (APC™ Resistance V).

Sistema	N	Rango (unidades)
Familia ACL	30	2,18 - 3,38 (APCR-V ratios)
ACL Futura/ACL Advance	30	2,42 - 3,18 (APCR-V ratios)
ACL TOP	120	2,61 - 3,32 (APCR-V ratios)

La siguiente figura muestra los resultados del test APC Resistance V realizados en plasmas de individuos sin tratamiento, de pacientes con TAO con un INR de 1,3 - 6,0 y de pacientes tratados con Heparina no fraccionada o Heparina de bajo peso molecular (Fragmin® and Fraxiparin®). La predilución del plasma del paciente con el Plasma Reactivo Factor V, logra una completa discriminación entre los genotipos normal, heterozigoto V:Q^{506} y homozigoto V:Q^{506} y permite realizar el análisis de la Resistencia a la Proteína C Activada a pacientes sin tratamiento, pacientes que están con Terapia Anticoagulante Oral y pacientes con Terapia Heparínica.



Los ratios APCR-V se distribuyen según el genotipo del Factor V. Para cada genotipo se han obtenido valores de los ratios APCR-V muy similares para todos los grupos de pacientes.

Los valores medios obtenidos son: 2,6 (normal), 1,7 (heterozigoto FV:Q^{506}) y 1,2 (homozygoto FV:Q^{506}). El kit Factor V Leiden (APC™ Resistance V) alcanza más del 99% de sensibilidad para la mutación FV:Q^{506} en los sistemas ACL (n = 295).

Los resultados fueron obtenidos usando un mismo lote de reactivo.

Debido a las variables que pueden afectar los tiempos de coagulación, cada laboratorio debe establecer su propio rango de normalidad.

Características técnicas

Precisión:

La precisión intraserie y total (serie a serie y día a día) fue realizada en diferentes series y utilizando muestras normales y anormales.

ACL	Media (APCR-V ratios)	CV % (Intraserie)	CV % (Total)
APC Control Nivel 1	2,49	1,8	2,0
APC Control Nivel 2	1,58	1,9	2,2
ACL Futura/ ACL Advance	**Media (APCR-V ratios)**	**CV % (Intraserie)**	**CV % (Total)**
APC Control Nivel 1	2,34	2,1	2,3
APC Control Nivel 2	1,54	1,2	1,1
ACL TOP	**Media (APCR-V ratios)**	**CV % (Intraserie)**	**CV % (Total)**
APC Control Nivel 1	2,94	3,9	4,6
APC Control Nivel 2	1,85	1,4	2,0

Correlación:

Unidad	sistema	pendiente	intersección	r	Método de Referencia
APCR-V ratios	ACL TOP	1,041	-0,004	0,970	APCR-V en ACL Advance

La precisión y los datos de correlación se han obtenido usando lotes específicos de reactivos y de controles.

Factor V Leiden (APC™ Resistance V) - 0020008700

FRANÇAIS - Révision de la notice 10/2012

CE

Utilisation

Pour la détermination de la résistance à la protéine C activée, provoquée par une mutation du facteur V:Q^{506} (facteur V LEIDEN) dans le plasma provenant de sujets non traités et de patients traités par des anticoagulants oraux (TAO) ou de l'héparine.

Principe

Le phénotype "APC résistance"[1,2] est, dans plus de 90% des cas, dû à une mutation sur le gène responsable de la synthèse du facteur V, où l'Arginine^{506} (R) est remplacée par la Glutamine (Q) dans la structure de la protéine facteur V.[3,4,5] La spécificité pour le facteur V:Q^{506} ou toute autre mutation sur le gène responsable de la synthèse du facteur V, rendant la protéine résistante à toute inactivation par la protéine C activée (APC), est augmentée en normalisant la concentration des autres protéines plasmatiques impliquées dans la formation et la régulation de la thrombine. En réalisant un test TCA basé sur la résistance à l'APC en présence d'un excès de plasma déficient en facteur V, la sensibilité et la spécificité pour la mutation facteur V:Q^{506} est significativement augmentée. De plus, cette modification permet l'analyse de plasmas de patients qui sont sous TAO.[6,7,8,9,10,11] L'échantillon de plasma est prédilué avec le Réactif Plasma Facteur V et incubé avec le réactif TCA pendant une période donnée standard. La coagulation est déclenchée par l'addition de $CaCl_2$ en l'absence et en présence d'APC et le temps de formation du caillot est mesuré.

Composition

Le coffret **Factor V Leiden (APC™ Resistance V) - Facteur V Leiden (APC™ Resistance V)** contient:

- R **APTT reagent** (Réf. 0020008721): 2 flacons de 4 ml de phospholipides purifiés avec de la silice colloïdale comme activateur.
- FV **Factor V Reagent Plasma** (Réf. 0020008723): 2 flacons de 4 ml de plasma humain lyophilisé ayant une faible activité en facteur V et des stabilisants (aussi disponible séparément sous la référence IL 0020008800).
- A **APC/Calcium chloride** (Réf. 0020008722): 2 flacons de 2 ml de protéine C activée d'origine humaine co-lyophilisée avec du $CaCl_2$.
- Ca **Calcium chloride** (Réf. 0020008720): 2 flacons de 2 ml de chlorure de calcium dans un tampon tris contenant de l'albumine bovine sérique.
- 1 **APC Control Plasma Level 1** (Réf. 0020008724): 2 flacons de 1 ml de plasma humain normal lyophilisé.
- 2 **APC Control Plasma Level 2** (Réf. 0020008725): 2 flacons de 1 ml de plasma humain anormal lyophilisé.

***Note**: Le réactif APTT et APC/$CaCl_2$ ne sont pas interchangeables d'un lot à l'autre.

PRECAUTIONS:

Ces réactifs contiennent des produits d'origine humaine. Ils ont été trouvés négatifs pour les anticorps anti VIH 1/2, anti VHC et l'antigène de surface de l'hépatite B (AgHBs), en utilisant des trousses de dépistage de 3ème génération. Cependant, aucune technique ne permettant d'assurer l'absence totale du virus HIV ou de l'hépatite B ou de tout autre agent infectieux, ces réactifs sont à manipuler avec les précautions d'usage.[12]

Classification risque: **Aucune**

Phrases risque: **Aucune**

Phrases sécurité: **Aucune**

Ce produit est à usage diagnostique *in vitro*.

Préparation

APTT reagent: Homogénéiser vigoureusement avant utilisation.

Factor V Reagent Plasma: Dissoudre le contenu de chaque flacon avec 4 ml d'eau déminéralisée de type II selon les normes NCCLS ou équivalent.[13] Replacer le capuchon et agiter doucement. Assurez-vous de la complète reconstitution du produit. Conserver le réactif à 15-25°C pendant 30 minutes et retourner le flacon pour mélanger le contenu avant utilisation. Ne pas agiter violemment.

APC/Calcium chloride: Dissoudre le contenu de chaque flacon avec 2 ml d'eau déminéralisée de type II selon les normes NCCLS ou équivalent.[13] Replacer le capuchon et agiter doucement. Assurez-vous de la complète reconstitution du produit. Conserver le réactif à 15-25°C pendant 30 minutes et retourner le flacon pour mélanger le contenu avant utilisation. Ne pas agiter violemment.

Calcium chloride: Réactif prêt à l'emploi.

APC Control Plasma Level 1 & 2: Dissoudre le contenu de chaque flacon avec 1 ml d'eau déminéralisée de type II selon les normes NCCLS ou équivalent.[13] Replacer le capuchon et agiter doucement. Assurez-vous de la complète reconstitution du produit. Conserver le contrôle à 15-25°C pendant 30 minutes et retourner le flacon pour mélanger le contenu avant utilisation. Ne pas agiter violemment.

Conservation et stabilité du réactif

Conservés à 2-8°C, les réactifs sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur les flacons.

APTT reagent - Après ouverture, le réactif est stable 1 semaine à 15-25°C, 1 mois à 2-8°C dans le flacon d'origine, 8 heures à 15°C sur les analyseurs ACL ou 3 jours à 15°C sur les analyseurs ACL Futura, ACL Advance et ACL TOP sans agitation. Ne pas congeler.

Factor V Reagent Plasma - Après reconstitution, le réactif est stable 8 heures à 15-25°C, 24 heures à 2-8°C, 3 mois à -20°C ou à des températures inférieures dans le flacon d'origine ou 3 jours à 15°C sur les analyseurs ACL Futura, ACL Advance et ACL TOP sans agitation. Le réactif doit être décongelé à 37°C et mélangé doucement avant utilisation. Ne pas recongeler.

APC/Calcium chloride - Après reconstitution, le réactif est stable 8 heures à 15-25°C, 5 jours à 2-8°C, 3 mois à -20°C ou à des températures inférieures dans le flacon d'origine ou 3 jours à 15°C sur les analyseurs ACL Futura, ACL Advance et ACL TOP sans agitation. Ne pas recongeler.

Calcium chloride - Après ouverture, le réactif est stable 1 semaine à 15-25°C, 1 mois à 2-8°C dans le flacon d'origine ou 3 jours à 15°C sur les analyseurs ACL Futura, ACL Advance et ACL TOP sans agitation.

APC Control Plasma Level 1 & 2 - Après reconstitution, les contrôles sont stables 6 heures à 2-8°C et 15-25°C ou 3 mois à -20°C ou à des températures inférieures dans le flacon d'origine. Le contrôle doit être décongelé à 37°C et mélangé doucement avant utilisation. Ne pas recongeler.

Pour une stabilité optimale, conserver les réactifs à 2-8°C dans le flacon d'origine entre chaque utilisation.

Procédures de test/Instrument

Se référer au mode d'emploi de l'instrument IL approprié et/ou au manuel d'application pour des informations complémentaires sur les procédures de dosage.

Recueil des spécimens et préparation

9 parts de sang fraîchement prélevé sont collectées avec 1 part de citrate trisodique. Se référer au document NCCLS H21-A4 ou au document GEHT (STV, numéro spécial, 1-40, 1998) pour plus d'informations sur le prélèvement des échantillons, leur manipulation et leur stockage.[14]

Réactifs auxiliaires et plasma de contrôle

Ces réactifs doivent faire l'objet d'une commande séparée:

	Amérique, Pacifique et Europe
Plasma Facteur V	Réf. 0020008800
Solution de nettoyage	Réf. 0009831700

Contrôle de qualité

Les contrôles normaux et anormaux sont recommandés pour un programme de contrôle de qualité complet.[15] Les contrôles plasmatiques APC Taux 1 (normal) et Taux 2 (anormal) sont spécifiques à ce programme. Chaque laboratoire doit établir sa propre moyenne et déviation standard et son programme de contrôle de qualité afin de vérifier l'état de fonctionnement de son système analytique. Les contrôles doivent être analysés au minimum toutes les 8 heures en concordance avec une bonne pratique de laboratoire. Se référer au mode d'emploi de l'instrument pour des informations complémentaires. Se reporter à Westgard *et al* pour l'identification et la résolution des contrôles hors limites.[16]

Résultats

Les résultats de l'APCR-V sont reportés en secondes et ratio. Se référer au mode d'emploi de l'instrument pour des informations complémentaires.

Limites de la méthode et substances interférant avec celle-ci

Aucune différence significative n'est obtenue entre les échantillons congelés et les échantillons frais. La sensibilité et la spécificité pour la mutation facteur V:Q^{506} lors de l'analyse de plasma provenant de patients sous TAO, ne sont pas affectées quel que soit la valeur de l'INR.

Aucune interférence avec l'héparine (non fractionnée et de bas poids moléculaire) jusqu'à des concentrations de 1 UI/ml, n'a été observée sur les systèmes de coagulation IL. Les résultats de ratio APCR-V sur les analyseurs ACL Futura et ACL Advance ne sont pas affectés par l'hémoglobine jusqu'à 400 mg/dl, par la bilirubine jusqu'à 20 mg/dl (200 mg/l) et les triglycérides jusqu'à 1000 mg/dl (10 g/l). Les résultats de ratio APCR-V sur l'ACL TOP ne sont pas affectés par l'hémoglobine jusqu'à 500 mg/dl, par la bilirubine jusqu'à 18,8 mg/dl (188 mg/l) et les triglycérides jusqu'à 1791 mg/dl (17,91 g/l).

Les échantillons de patients ayant une activité inhibitrice élevée connue (par ex. due à des anticorps anti-phospholipides) peuvent donner lieu à l'obtention de temps de coagulation anormaux pour le TCA et des résultats de ratio erronés. Dans un tel cas, augmenter le facteur de dilution (par ex.: 1 + 9 ou 1 + 19) afin de corriger le résultat du test. Dans les 2 derniers cas, le nombre d'échantillons testés étant peu important, les résultats doivent être interprétés avec prudence.

Valeur du «Cut-off»

Une résistance à la PCA due à la mutation FV:Q^{506} est présente lorsque le ratio APCR-V est inférieur ou égal à la valeur seuil. Lorsqu'on utilise le coffret Factor V Leiden (APC™ Resistance V), la valeur seuil doit être déterminée pour chaque type d'instrument. La valeur seuil (cut off) est la valeur permettant de distinguer les spécimens normaux et anormaux. Les spécimens anormaux ont des ratios APCR-V qui sont inférieurs ou égaux à la valeur seuil. Les spécimens normaux ont des ratios supérieurs à la valeur seuil.

Procédure permettant d'établir la valeur seuil:

1. En utilisant un plasma avec un génotype APCR-V normal, procéder à 5 déterminations indépendantes du ratio de l'APCR-V. Réaliser les tests en triples. Confirmer que la variation inter-dosage et intra-dosage du ratio de l'APCR-V est inférieure à 7%.
2. Déterminer les ratios de l'APCR-V d'au moins 30 plasmas, prélevés chez des sujets sains d'un âge compris entre 20 et 65 ans. Inclure les contrôles plasmatiques 1 et 2 pour la validation des tests.
3. Vérifier que les ratios APCR-V des contrôles se trouvent dans les limites spécifiées dans la fiche technique.
4. Calculer le ratio moyen de l'APCR-V des 30 échantillons.
5. Calculer la valeur seuil de résistance à l'APC liée au facteur V de la façon suivante:
   - Si le ratio APCR-V moyen est < 2,8, multiplier le par 0,8
   - Si le ratio APCR-V moyen est ≥ 2,8, multiplier le par 0,75.
6. Le ratio APCR-V du contrôle plasmatique 1 devra se trouver dans les limites de la gamme normale. Le ratio APCR-V du contrôle plasmatique 2 devra être inférieur à la valeur seuil.

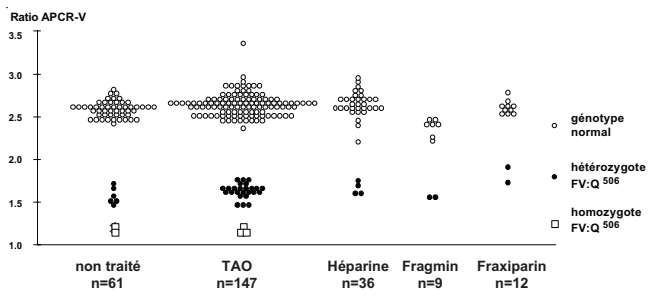
IL recommande de vérifier régulièrement la valeur du « cut off » en utilisant les plasmas de contrôle taux 1 et 2.

Valeurs attendues

Les valeurs normales de cette étude ont été obtenues en utilisant le coffret Factor V Leiden (APC™ Resistance V).

Analyseur	N	Valeurs (unités)
ACL	30	2,18 - 3,38 (ratios APCR-V)
ACL Futura/ACL Advance	30	2,42 - 3,18 (ratios APCR-V)
ACL TOP	120	2,61 - 3,32 (ratios APCR-V)

Les résultats suivants illustrent la validité du test APC résistance V sur des plasmas de sujets non traités, sous TAO ayant un INR entre 1,3 et 6,0 ou recevant de l'héparine non-fractionnée ou de l'héparine de bas poids moléculaire (comme ici la Fragmine® ou la Fraxiparine®). Grâce à la prédilution du plasma des patients avec le Réactif Facteur V, on peut obtenir une parfaite ségrégation des différents génotypes, normaux, hétérozygotes et homozygotes pour le facteur V normal et muté lors de l'analyse de la résistance à l'APC sur des plasmas de patients sous traitement anticoagulant oral ou sous héparine.



Les rapports APCR-V. des échantillons sont distribués selon leur génotype en facteur V. Pour un génotype donné, des rapports APCR-V semblables sont obtenus et ce, quel que soit le groupe de patients.

Les valeurs moyennes obtenues sont de 2,6 (plasmas normaux), 1,7 (hétérozygotes pour le facteur V) et 1,2 (homozygotes pour le facteur V:Q^{506}).

Le coffret Factor V Leiden (APC™ Resistance V) a une sensibilité >99% pour la mutation FV:Q^{506} d'après l'étude réalisée sur l'appareil ACL (n=295).

Les résultats sont obtenus en utilisant un lot spécifique de réactifs. Du fait qu'un grand nombre de variables peuvent affecter les temps de coagulation, nous recommandons à chaque laboratoire d'établir ses propres valeurs normales.

Caractéristiques et performances

Précision:

La précision intra-séries et totale (inter-séries et de jour à jour) a été évaluée au cours d'essais multiples, en utilisant des échantillons, normaux et anormaux.

ACL	Moyenne (ratios APCR-V)	CV % (Intra-séries)	CV % (Total)
APC Contrôle Taux 1	2,49	1,8	2,0
APC Contrôle Taux 2	1,58	1,9	2,2
ACL Futura/ ACL Advance	**Moyenne (ratios APCR-V)**	**CV % (Intra-séries)**	**CV % (Total)**
APC Contrôle Taux 1	2,34	2,1	2,3
APC Contrôle Taux 2	1,54	1,2	1,1
ACL TOP	**Moyenne (ratios APCR-V)**	**CV % (Intra-séries)**	**CV % (Total)**
APC Contrôle Taux 1	2,94	3,9	4,6
APC Contrôle Taux 2	1,85	1,4	2,0

Corrélation:

Unité	analyseurs	pente	ordonnée à l'origine	r	Méthode de référence
Ratios APCR-V	ACL TOP	1,041	-0,004	0,970	APCR-V sur ACL Advance

La précision et la corrélation des résultats ont été obtenus en utilisant des lots spécifiques de réactifs et de contrôles.

Factor V Leiden (APC™ Resistance V) - 0020008700

ITALIANO - Revisione dell'inserto 10/2012

Utilizzo
Per la determinazione della resistenza alla Proteina C attivata (APCR), causata dalla mutazione del Fattore V:Q^{506} (Fattore V Leiden) nel plasma di soggetti non trattati e di pazienti in terapia anticoagulante orale (TAO) o eparinica.

Principio del metodo
Il fenotipo APC resistente[1,2] è, in oltre il 90% dei casi, dovuto ad una mutazione del gene del Fattore V che comporta la sostituzione dell'Arginina (R) con la Glutamina (Q) nella posizione 506 della proteina Fattore V.[3,4,5]
La selettività per il Fattore V Leiden o per altre mutazioni nel gene del Fattore V che rendono la proteina resistente all'inattivazione da parte della proteina C attivata (APC) è aumentata dalla normalizzazione delle concentrazioni delle altre proteine plasmatiche coinvolte nella formazione e nella regolazione della trombina. Eseguendo perciò test basati su APTT in presenza di un eccesso di Plasma reagente Fattore V, la sensibilità e la specificità per la mutazione del Fattore V è significativamente aumentata. Inoltre, questa modificazione permette di analizzare i plasmi di pazienti in terapia anticoagulante orale.[6,7,8,9,10,11]
Il plasma campione è prediluito con Plasma reagente Fattore V e incubato con il reagente APTT per un periodo di tempo prefissato.
La coagulazione è innescata dall'aggiunta di Cloruro di Calcio in assenza e in presenza di APC e il tempo necessario alla formazione del coagulo è quindi registrato.

Composizione
Il kit **Factor V Leiden (APC™ Resistance V)** è composto da:
- R **APTT reagent** (Nr. Cat. 0020008721): 2 flaconi da 4 mL di fosfolipidi purificati con silice colloidale come attivatore di contatto.
- FV **Factor V Reagent Plasma** (Nr. Cat. 0020008723): 2 flaconi da 4 mL di plasma umano liofilizzato con bassi livelli di attività di Fattore V e stabilizzanti. Disponibile anche separatamente (Nr. Cat. IL 0020008800).
- A **APC/Calcium chloride** (Nr. Cat. 0020008722): 2 flaconi da 2 mL di reattivo liofilizzato con Proteina C umana attivata e Cloruro di Calcio.
- Ca **Calcium chloride** (Nr. Cat. 0020008720): 2 flaconi da 2 mL di Cloruro di Calcio in tampone TRIS con albumina bovina serica.
- 1 **APC Control Plasma Level 1** (Nr. Cat. 0020008724): 2 flaconi da 1 mL di plasma umano normale liofilizzato.
- 2 **APC Control Plasma Level 2** (Nr. Cat. 0020008725): 2 flaconi da 1 mL di plasma umano patologico liofilizzato.

***Nota**: i reagenti APTT e APC/$CaCl_2$ non sono interscambiabili fra lotti diversi.
ATTENZIONE:
Questo prodotto contiene materiale di cui è stata verificata all'origine, con metodi raccomandati dalla FDA, l'assenza dell'antigene di superficie dell'epatite B (HBsAg) e degli anticorpi anti-HCV e anti-HIV 1/2. Trattare come potenzialmente infetto.[12]
Simbolo di pericolo: **nessuno**
Frasi di rischio: **nessuno**
Consigli di prudenza: **nessuno**
Per uso diagnostico *in vitro*.

Preparazione
APTT reagent: Miscelare accuratamente prima dell'uso.
Factor V Reagent Plasma: Sciogliere il contenuto di ciascun flacone con 4 mL di acqua distillata.[13] Chiudere con il tappo e miscelare delicatamente. Assicurarsi della completa ricostituzione del prodotto. Mantenere il reagente a 15-25°C per 30 minuti e miscelare nuovamente prima dell'uso. Non agitare.
APC/Calcium chloride: Sciogliere il contenuto di ciascun flacone con 2 mL di acqua distillata.[13] Chiudere con il tappo e miscelare delicatamente. Assicurarsi della completa ricostituzione del prodotto. Mantenere il reagente a 15-25°C per 30 minuti e miscelare nuovamente prima dell'uso. Non agitare.
Calcium chloride: Pronto all'uso.
APC Control Plasma Level 1 & 2: Sciogliere il contenuto di ciascun flacone con 1 mL di acqua distillata.[13] Chiudere con il tappo e miscelare delicatamente. Assicurarsi della completa ricostituzione del prodotto. Mantenere il controllo a 15-25°C per 30 minuti e miscelare nuovamente prima dell'uso. Non agitare.

Conservazione e stabilità dei reagenti
I reagenti sigillati sono stabili a 2-8°C fino alla data di scadenza stampata sull'etichetta del flacone.
APTT reagent - Il reagente aperto é stabile per: 1 settimana 15-25°C, 1 mese a 2-8°C nel flacone originale, 8 ore a 15°C su strumenti ACL® o 3 giorni a 15°C su strumenti ACL Futura®, ACL Advance e ACL TOP™ senza agitatore magnetico. Non congelare.
Factor V Reagent Plasma - Stabilità dopo la ricostituzione: 8 ore a 15-25°C, 24 ore a 2-8°C, 3 mesi a -20°C (o a temperature inferiori) nel flacone originale o 3 giorni a 15°C su strumenti ACL Futura, ACL Advance e ACL TOP senza agitatore magnetico. Il reagente congelato può essere scongelato a 37°C e miscelato delicatamente prima dell'uso. Non ricongelare.
APC/Calcium chloride - Stabilità dopo la ricostituzione: 8 ore a 15-25°C, 5 giorni a 2-8°C, 3 mesi a -20°C (o a temperature inferiori) nel flacone originale o 3 giorni a 15°C su strumenti ACL Futura, ACL Advance e ACL TOP senza agitatore magnetico. Non ricongelare.
Calcium chloride - Il reagente aperto è stabile per: 1 settimana 15-25°C, 1 mese a 2-8°C nel flacone originale o 3 giorni a 15°C su strumenti ACL Futura, ACL Advance e ACL TOP senza agitatore magnetico.
APC Control Plasma Level 1 & 2 - Stabilità dopo la ricostituzione: 6 ore a 2-8°C e a 15-25°C o 3 mesi a -20°C (o a temperature inferiori) nel flacone originale. Il plasma di controllo congelato può essere scongelato a 37°C e miscelato delicatamente prima dell'uso. Non ricongelare.
Al termine dei cicli lavorativi si consiglia di conservare il reagente a 2-8°C nel flacone originale per una migliore stabilità.

Metodo
Per le metodiche e le procedure di lavoro fare riferimento al Manuale dell'Operatore e/o al Manuale Applicativo degli strumenti IL.

Preparazione dei campioni
Aggiungere a nove parti di sangue fresco venoso una parte di trisodio citrato. Per informazioni aggiuntive sulla preparazione, il trattamento e la conservazione dei campioni fare riferimento al documento NCCLS H21-A4.[14]

Reagenti ausiliari e plasmi di controllo
I seguenti reattivi possono essere ordinati separatamente.

Plasma reagente Fattore V	Nr. Cat. 0020008800
Soluzione detergente	Nr. Cat. 0009831700

Controllo di qualità
Per un completo programma di controllo di qualità, IL raccomanda l'uso di plasmi normali e patologici.[15] I Plasmi di controllo per APC Livello 1 (normale) e Livello 2 (patologico) sono specifici per questo tipo di programma. Ogni laboratorio dovrà stabilire i propri valori medi e le deviazioni standard per ogni controllo e stabilire le procedure di analisi. I controlli dovranno essere analizzati almeno una volta ogni 8 ore in accordo con le esigenze del laboratorio. Consultare il Manuale dell'Operatore dello strumento per ulteriori informazioni. Per l'identificazione e la risoluzione di situazioni particolari, fare riferimento all'articolo di Westgard *et al.*[16]

Risultati
I risultati del test APCR-V sono riportati in secondi e ratio. Riferirsi al Manuale dell'Operatore per ulteriori informazioni.

Limitazioni/sostanze interferenti
Non sono state verificate differenze significative tra campioni freschi e congelati. Sensibilità e specificità alla mutazione del Fattore V:Q^{506} per campioni di plasma provenienti da pazienti in trattamento con anticoagulanti orali non sono modificate dal valore di INR.
Campioni con concentrazioni inferiori a 1 U/mL di Eparina (Non Frazionata o a Basso Peso Molecolare) sono analizzabili sui sistemi di coagulazione ACL senza alcuna interferenza.
I risultati del test APCR-V su strumenti ACL Futura/ACL Advance non sono influenzati da concentrazioni di emoglobina fino a 400 mg/dl, di bilirubina fino a 20 mg/dl e di trigliceridi fino a 1000 mg/dL. I risultati del test APCR-V su ACL TOP non sono influenzati da concentrazioni di emoglobina fino a 500 mg/dL, di bilirubina fino a 18,8 mg/dL e di trigliceridi fino a 1791 mg/dL.
Pazienti che presentino un'alta attività inibitoria (es.: anticorpi antifosfolipidi) possono dare tempi di coagulazione anormali e pertanto esiste la possibilità di risultati errati. In tali casi, aumentando il fattore di diluizione (es.: 1 + 9 o 1 + 19) è possibile la correzione dei risultati anomali.

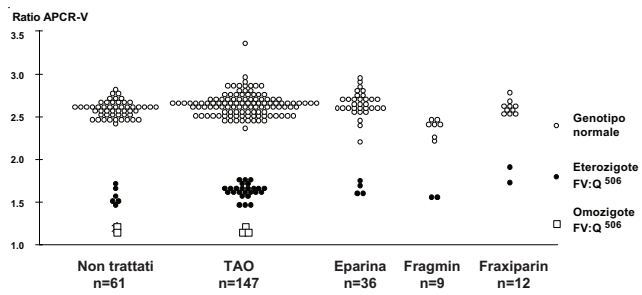
Determinazione del valore di Cut-off
Il valore di cut-off permette di discriminare i pazienti patologici dai pazienti normali. Si raccomanda che ciascun laboratorio stabilisca il proprio valore di cut-off per ogni tipo di analizzatore in uso. Campioni patologici presentano valori di Ratio per APCR-V inferiori o uguali al valore di cut-off e di conseguenza campioni normali presentano valori al di sopra del cut-off.
Procedura per stabilire il valore di cut-off
1. Utilizzando un campione di plasma normale per APCR-V, eseguire cinque determinazioni indipendenti di APCR-V e riportare il valore di Ratio. Utilizzare almeno tre replicati per serie. Confermare che i CV inter- e intra-serie siano inferiori a 7%.
2. Determinare il valore di Ratio APCR-V di almeno 30 campioni provenienti da individui sani compresi in un intervallo di età dai 20 ai 65 anni. Si consiglia di includere i plasmi di controllo (Livello 1 e 2) per la validazione dei risultati.
3. Verificare che i valori di Ratio per i plasmi di controllo siano all'interno dell'intervallo dichiarato.
4. Calcolare il valore mediano della Ratio APCR-V dei 30 campioni.
5. Calcolare il valore di cut-off dell'APCR-V moltiplicando per 0,8 il valore mediano della Ratio APCR-V, quando questo è minore di 2,8; moltiplicare per 0,75 quando è superiore.
6. La Ratio APCR-V del Plasma di Controllo Livello 1 dovrebbe essere maggiore del valore di cut-off così stabilito, viceversa la Ratio APCR-V del Plasma di Controllo Livello 2 dovrebbe essere invece minore.

Si raccomanda un controllo regolare del valore di cut-off, utilizzando i Plasmi di Controllo 1 e 2.

Valori attesi
Utilizzando il kit Fattore V Leiden (APC™ Resistance V) è stato determinato il seguente intervallo di riferimento.

Sistema	N	Intervallo (unità di misura)
ACL 100 - 10000	30	2,18 - 3,38 (Ratio APCR-V)
ACL Futura/ ACL Advance	30	2,42 - 3,18 (Ratio APCR-V)
ACL TOP	120	2,61 - 3,32 (Ratio APCR-V)

I risultati seguenti confermano la validità di utilizzo del metodo APCR-V sia per plasmi di pazienti non trattati, che per plasmi di pazienti sottoposti a terapia anticoagulante orale con valore di INR compreso tra 1,3 e 6,0 e anche per paizienti trattati con eparina non frazionata (es.: Fragmin®) o a basso peso molecolare (es.: Fraxiparin®). Prediluendo il plasma del paziente in esame con il Plasma reagente Fattore V si ottiene una completa discriminazione tra genotipi normali, eterozigoti V:Q^{506} e omozigoti V:Q^{506}, sia in caso di pazienti non trattati che in caso di pazienti sottoposti a terapia anticoagulantre (orale o eparinica).



I valori di Ratio APCR-V sono distribuiti in funzione del genotipo Fattore V. A genotipo simile corrispondono valori di ratio APCR-V simili, a prescindere dal gruppo a cui il paziente appartiene. Valori mediani tipici sono 2,6 (normale), 1,7 (eterozigote FV:Q^{506}) e 1,2 (omozigote FV:Q^{506}). Il kit Fattore V Leiden (APC™ Resistance V) garantisce una sensibilità maggiore del 99% per la mutazione del FV:Q^{506} come verificato su strumenti ACL (n = 295). Tali risultati sono stati ottenuti utilizzando un lotto specifico di reagente. In base alle numerose variabili che possono influenzare i risultati attesi, ogni laboratorio dovrebbe stabilire il proprio intervallo di riferimento.

Prestazioni
Precisione:
La precisione nella serie e totale (tra ciclo e ciclo e tra giorno e giorno) è stata verificata eseguendo numerosi test con l'impiego di plasmi di controllo normali e patologici.

ACL 100 - 10000	Media (Ratio APCR-V)	CV % (nella serie)	CV % (Totale)
APC Plasma di controllo 1	2,49	1,8	2,0
APC Plasma di controllo 2	1,58	1,9	2,2
ACL Futura/ ACL Advance	**Media (Ratio APCR-V)**	**CV % (nella serie)**	**CV % (Totale)**
APC Plasma di controllo 1	2,34	2,1	2,3
APC Plasma di controllo 2	1,54	1,2	1,1
ACL TOP	**Media (Ratio APCR-V)**	**CV % (nella serie)**	**CV % (Totale)**
APC Plasma di controllo 1	2,94	3,9	4,6
APC Plasma di controllo 2	1,85	1,4	2,0

Correlazione:

Unità di misura	Sistema	pendenza	intercetta	r	Metodo di riferimento
Ratio APCR-V	ACL TOP	1,041	-0,004	0,970	APCR-V su ACL Advance

I risultati dei test di precisione e di correlazione sono stati ottenuti usando uno specifico lotto di reagenti e controlli.

Factor V Leiden (APC™ Resistance V) - 0020008700

PORTUGUÊS - Revisão do folheto 10/2012

Aplicação Prevista
Para a determinação da resistência à Proteína C activada, causada pela mutação no Factor V: Q^{506} (Factor V Leiden), em plasmas de indivíduos sem tratamento e doentes que se encontram sob terapêutica anti-coagulante oral (TAO) ou terapêutica com heparina.

Resumo e Princípio
O fenótipo de resistência à APC[1,2] deve-se, em mais de 90% dos casos, à mutação no gene do Factor V, resultando numa substituição de Arg^{506} (R) por Gln (Q) na proteína Factor V.[3,4,5] A selectividade do Factor V:Q, ^{506} ou outras mutações existentes no gene do Factor V que tornam a proteína resistente à inibição pela APC, é aumentada pela normalização das concentrações de outras proteínas que estão envolvidas na formação e regulação da trombina. Ao analisar o ensaio da resistência à APC baseado na TTPA em presença de um excesso de Plasma reagente em Factor V, a sensibilidade e especificidade à mutação do Factor V:Q^{506} aumenta significativamente. Além disso, esta alteração permite que seja feita a análise de plasmas provenientes de doentes com TAO.[6,7,8,9,10,11]
O plasma da amostra é previamente diluído com Plasma reagente em Factor V e é incubado com o reagente TTPA, durante um período de tempo pré-determinado. A coagulação inicia-se quando se junta $CaCl_2$ na ausência e na presença de APC e o tempo de formação do coágulo é anotado.

Composição
O kit **Factor V Leiden (APC™ Resistance V) - Factor V Leiden (Resistência à APC™ V)** é composto por:
- R **APTT reagent** (Núm. Cat. 0020008721): recipientes 2 x 4 mL de fosfolípidos purificados com sílica coloidal como activador de contacto..
- FV **Factor V Reagent Plasma** (Núm. Cat. 0020008723): recipientes 2 x 4 mL de plasma humano liofilizado com um baixo nível de actividade do Factor V e estabilizadores (Também está disponível em separado, Núm. Cat. 0020008800).
- A **APC/Calcium chloride** (Núm. Cat. 0020008722): recipientes 2 x 2 mL de Proteína C humana activada coliofilizada com $CaCl_2$.
- Ca **Calcium chloride** (Núm. Cat. 0020008720): recipientes 2 x 2 mL de cloreto de cálcio em tampão Tris, contendo albumina de soro bovino.
- 1 **APC Control Plasma Level 1** (Núm. Cat. 0020008724): recipientes 2 x 1 mL de plasma humano normal liofilizado.
- 2 **APC Control Plasma Level 2** (Núm. Cat. 0020008725): recipientes 2 x 1 mL de plasma humano anormal liofilizado

***Nota:** Os reagentes TTPA e APC/$CaCl_2$ não podem ser trocados entre lotes.
AVISOS E PRECAUÇÕES:
O material utilizado neste produto foi analisado com testes aprovados pela FDA e verificou-se a ausência de reacção ao Antigénio de Superfície da Hepatite B (HBsAg), aos anticorpos anti-HCV e anti-HIV 1/2. No entanto, deve-se manipular com precaução, como potencialmente infeccioso.[12]
Classe de risco: **nenhuma**
Frases de risco: **nenhuma**
Frases de segurança: **nenhuma**
Para uso em diagnóstico *in vitro*.

Preparação
APTT reagent: Misturar cuidadosamente antes de utilizar.
Factor V Reagent Plasma: Dissolver o conteúdo de cada recipiente em 4 mL de água destilada (tipo II de acordo com a NCCLS).[13] Fechar o recipiente e homogeneizar suavemente. Verificar se o produto fica completamente dissolvido. Conservar o reagente entre 15 e 25°C durante 30 minutos. Misturar invertendo o recipiente, antes de utilizar. Não agitar.
APC/Calcium chloride: Dissolver o conteúdo de cada recipiente em 2 mL de água destilada (tipo II de acordo com a NCCLS).[13] Fechar o recipiente e homogeneizar suavemente. Verificar se o produto fica completamente dissolvido. Conservar o reagente entre 15 e 25°C durante 30 minutos. Misturar invertendo o recipiente, antes de utilizar. Não agitar.
Calcium chloride: Pronto a ser utilizado.
APC Control Plasma Level 1 & 2: Dissolver o conteúdo de cada recipiente em 1 mL de água destilada (tipo II de acordo com a NCCLS).[13] Fechar o recipiente e homogeneizar suavemente. Verificar se o produto fica completamente dissolvido. Conservar o controlo entre 15 e 25°C durante 30 minutos. Misturar invertendo o recipiente, antes de utilizar. Não agitar.

Conservação e estabilidade dos reagentes
Os reagentes fechados, que ainda não foram utilizados, são estáveis até ao final do prazo de validade, que consta no rótulo, desde que conservados entre 2-8°C.
APTT reagent - Depois de aberto, o reagente é estável durante 1 semana entre 15-25°C, 1 mês a 2-8°C dentro do recipiente original, 8 horas a 15°C nos Sistemas ACL ou 3 dias a 15°C nos Sistemas ACL Futura, ACL Advance e ACL TOP sem qualquer agitação. Não voltar a congelar.
Factor V Reagent Plasma - Estabilidade depois da reconstituição: 8 horas a 15-25°C, 24 horas a 2-8°C, 3 meses a -20°C ou abaixo dentro do recipiente original, ou 3 dias a 15°C nos Sistemas ACL Futura, ACL Advance e ACL TOP sem qualquer agitação. O reagente pode ser descongelado a 37°C. Homogeneizar suavemente antes de utilizar. Não recongelar.
APC/Calcium chloride - Estabilidade após reconstituição: 8 horas a 15-25°C, 5 dias a 2-8°C, 3 meses a -20°C ou abaixo dentro do recipiente original, ou 3 dias a 15°C nos Sistemas ACL Futura, ACL Advance e ACL TOP sem qualquer agitação. Não recongelar.
Calcium chloride - Depois de aberto, o reagente é estável durante 1 semana a 15-25°C, 1 mês a 2-8°C dentro do recipiente original, ou 3 dias a 15°C nos Sistemas ACL Futura, ACL Advance e ACL TOP sem qualquer agitação.
APC Control Plasma Level 1 & 2 - Estabilidade após reconstituição: 6 horas a 2-8°C e 15-25°C ou 3 meses a -20°C ou abaixo dentro do recipiente original. O controlo pode ser descongelado a 37°C. Homogeneizar suavemente antes de utilizar. Não recongelar.
Para obter uma estabilidade óptima retire os reagentes do aparelho e conserve-os entre 2-8°C, nos recipientes originais.

Método de ensaio
Seguir as instruções da técnica de acordo com o Manual do Operador e/ou com o Manual de Aplicações dos Aparelhos IL.

Recolha e preparação de amostras
Adicionar nove partes de sangue extraído recentemente por punção venosa a uma parte de citrato trissódico. Para efectuar a recolha, o manuseamento e a conservação da amostra devem seguir-se as recomendações referidas no documento H21-A4 da NCCLS.[14]

Reagentes adicionais e plasmas de controlo
Os produtos abaixo mencionados, pelo que podem ser pedidos em separado:

	Américas, Pacífico e Europa
Plasma Reagente Factor V	Núm Cat. 0020008800
Solução de limpeza	Núm Cat. 0009831700

Controlo de Qualidade
Para realizar um programa completo de Controlo de Qualidade, recomenda-se a utilização dos controlos normais e anormais.[15] Os controlos adequados para este programa são os APC Plasmas Controlo Nível 1 e Nível 2. Cada laboratório deve estabelecer a sua própria média e desvio padrão e deve efectuar um programa de controlo de qualidade para monitorizar os seus resultados. Os controlos devem ser analisados uma vez em cada turno de 8 horas, de acordo com a norma vigente no Laboratório. Ver Manual do Operador para mais informações. Consultar a publicação de Westgard e col. para identificar e solucionar situações anormais do Controlo de Qualidade.[16]

Resultados
Os resultados do APCR-V são expressos em segundos e rácio. Para mais informações consultar o Manual do Operador dos Aparelhos.

Limitações/Interferências
Não existem diferenças significativas entre amostras frescas e congeladas. A sensibilidade e especificidade à mutação do Factor V:Q^{506} nas análises de plasma de doentes com TAO não é afectada pelo valor de INR.
Não existe interferência nos valores de heparina (não fraccionada e com baixo peso molecular) acima de 1 U/mL nos Sistemas de Coagulação da IL.
Os resultados do APCR-V nos Sistemas ACL Futura/ACL Advance não são afectados por concentrações de hemoglobina até 400 mg/dL, bilirrubina até 20 mg/dL e triglicéridos até 1000 mg/dL. Os resultados do APCR-V no ACL TOP não são afectados por concentrações de hemoglobina até 500 mg/dL, bilirrubina até 18,8 mg/dL e triglicéridos até 1791 mg/dL.
Doentes com níveis altos de actividade inibidora conhecidos (ex: anticorpos fosfolípidos) podem fornecer um resultado anormal de TTPA e por consequência resultados que podem induzir em erro.
Nesses casos, ao aumentar o factor de diluição (ex: 1 + 9 ou 1 + 19) pode corrigir-se o resultado do teste.

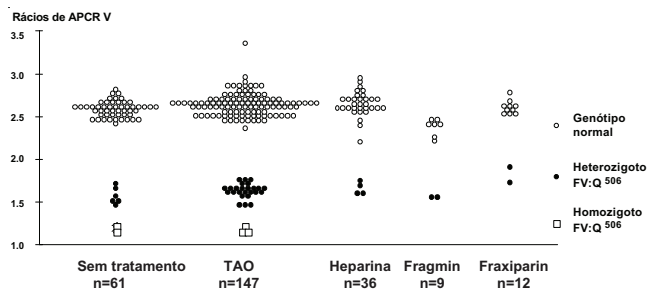
Valor de "Cut-off"
A existência de Resistência à APC devido à mutação FV:Q^{506} está indicada por um valor do rácio APCR-V inferior ou igual ao valor de "cut-off".
Quando se utiliza o kit Factor V Leiden (Resistência à APC™ V), deve estabelecer-se um valor de "cut-off" para cada equipamento. O valor de "cut-off" é estabelecido como o valor que distingue as amostras normais das anormais. As amostras anormais têm um rácio de APCR-V inferior ou igual ao valor de "cut-off". O rácio APCR-V de amostras normais é superior ao valor de "cut-off".
Procedimento para estabelecer o valor de "cut-off":
1. Efectuar cinco determinações seguidas do mesmo plasma que tenha um genótipo normal de APCR-V. Voltar a analisar a série referida mais duas vezes. Comprovar que o Coeficiente de Variação (CV) do rácio APCR-V inter e intra-série é inferior a 7%.
2. Determinar o rácio APCR-V em pelo menos 30 plasmas de indivíduos com idades compreendidas entre os 20 e os 65 anos. Incluir também o Plasma Controlo Nível 1 e Nível 2 para tornar válido o ensaio.
3. Verificar se os rácios da APCR-V dos Plasmas Controlo se encontram dentro do limite indicado na ficha técnica (folheto).
4. Calcular a média dos rácios da APCR-V das 30 amostras.
5. Calcular o valor do "cut-off" da Resistência à Proteína C Activada, relacionada com o Factor V, da seguinte forma: se a média do rácio APCR-V (calculada no ponto 4) for < 2,8: multiplicar a média x 0,8; mas se a média do rácio APCR-V (calculada no ponto 4) for > 2,8; multiplicar a média x 0,75.
6. O rácio APCR-V do Plasma Controlo Nível 1 deve ser mais alto que o valor de "cut-off" estabelecido. O rácio APCR-V do Plasma Controlo Nível 2 deve ser mais baixo que o valor de "cut-off" estabelecido.

A IL recomenda que o valor de "cut-off" seja verificado usando os Plasmas Controlo Nível 1 e Nível 2.

Valores Esperados
Efectuou-se um estudo de intervalo normal de valores com o kit Factor V Leiden (Resistência à APC™ V).

Sistema	N	Intervalo (unidades)
Familia ACL	30	2,18 - 3,38 (rácios de APCR V)
ACL Futura/ACL Advance	30	2,42 - 3,18 (rácios de APCR V)
ACL TOP	120	2,61 - 3,32 (rácios de APCR V)

Os seguintes resultados ilustram aplicação do teste APC V Resistência em análises a plasmas de indivíduos sem tratamento, doentes com TAO com um INR de 1,3 - 6,0 e doentes que estejam a receber heparina não fraccionada ou heparina com baixo peso molecular (nomeadamente Fragmin® e Fraxiparin®).
Ao efectuar uma pré-diluição do plasma do doente com o Plasma reagente em Factor V, podem diferenciar-se os genótipos normal, heterozigoto e homozigoto para a mutação no Factor V, fazendo uma análise à resistência APC em plasmas de doentes com TAO ou heparinizados.



Os rácios de APCR V são distribuídos de acordo com o genótipo do Factor V. Para um dado genotipo, obtêm-se rácios de APC similares independentemente do grupo a que pertencem os doentes. Os valores médios são: 2,6 (normal), 1,7 (heterozigoto FV:Q^{506}) e 1,2 (homozigoto FV:Q^{506}). O kit Factor V Leiden (Resistência à APC™ V) fornece > 99% de sensibilidade para a mutação FV:Q^{506} , tal como determinado nos sistemas ACL (n = 295). Os resultados foram obtidos usando o mesmo lote de reagente. Devido às variáveis que podem afectar os tempos de coagulação, cada laboratório deve estabelecer os seus próprios limites de normalidade.

Características Técnicas
Precisão
A precisão foi avaliada, intra e na totalidade (de análise para análise e de dia para dia), ao longo de vários ensaios, com amostras normais e anormais.

Familia ACL	Média (rácios de APCR V)	CV% (Intra-série)	CV% (Total)
APC Controlo Nível 1	2,49	1,8	2,0
APC Controlo Nível 2	1,58	1,9	2,2
ACL Futura/ ACL Advance	**Média (rácios de APCR V)**	**CV% (Intra-série)**	**CV% (Total)**
APC Controlo Nível 1	2,34	2,1	2,3
APC Controlo Nível 2	1,54	1,2	1,1
ACL TOP	**Média (rácios de APCR V)**	**CV% (Intra-série)**	**CV% (Total)**
APC Controlo Nível 1	2,94	3,9	4,6
APC Controlo Nível 2	1,85	1,4	2,0

Correlação:

Unidade	sistema	declive	intersecção	r	Método de Referência
Rácios de APCR V	ACL TOP	1,041	-0,004	0,970	APCR-V em ACL Advance

A precisão e os dados de correlação foram obtidos através da utilização de lotes específicos de reagentes e de controlos.

Instrumentation Laboratory
Instrumentation Laboratory Company - Bedford, MA 01730-2443 (USA)
Instrumentation Laboratory SpA - V.le Monza 338 - 20128 Milano (Italy) EC REP
301557B R9 10/2012

Factor V Leiden (APC™ Resistance V)
0020008700

DANSK - Metodeforskrift revision 10/2012

Venligst rekvirer den gældende udgave af metodeforskriften på dansk fra den lokale IL distributør.

FORHOLDSREGLER OG ADVARSLER

Indholdet i dette produkt er testet med analysemetoder godkendt af FDA og fundet negative for Hepatitis B overflade antigen (HBsAg), Anti-HCV og HIV antistoffer. På trods af dette skal indholdet behandles som potentielt smitte-farligt.
Fareklasse: **Ingen**
Risikosærninger: **Ingen**
Sikkerhedssætninger: **Ingen**
Dette produkt er til in vitro diagnostisk anvendelse.

Factor V Leiden (APC™ Resistance V)
0020008700

SVENSK - Beskrivning Revision 10/2012

Vänligen kontakta ILS Laboratories AB Tel. 08 626 38 50. för den senast uppdaterade svenska upplagan av bruksanvisningen.

VARNINGAR OCH FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER:

Materialet i denna produkt har testats med FDA godkända metoder och befunnits negativt för Hepatit B ytantigen (HBsAg), Anti-HCV och HIV antikroppar. Produkten skall hanteras som potentiellt smittsam.
Faroklass: **Ingen**
Riskfraser: **Ingen**
Skyddsfraser: **Ingen**
Denna produkt är avsedd för *in vitro* diagnostik.

Factor V Leiden (APC™ Resistance V)
0020008700

ΕΛΛΗΝΙΚΑ - Αναθεώρηση εσωκλείστου 10/2012

Για την τρέχουσα αναθεώρηση αυτού του εσωκλείστου στα Ελληνικά, παρακαλούμε επικοινωνήστε με τον τοπικό αντιπρόσωπο της IL.

ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ:

Τα υλικά κατασκευής του προϊόντος έχουν ελεγχθεί με μεθόδους εγκεκριμένες από το FDA και βρέθηκαν μη αντιδρώντα για το αντιγόνο επιφανείας της ηπατίτιδας B (HBsAg), αντισώματα κατά της ηπατίτιδας C (Anti-HCV) και αντισώματα κατά του HIV. Χειριστείτε το σαν εν δυνάμει μολυσματικό.

Σήμα κινδύνου Κατηγορία: **ουδέν**
Φράσεις κινδύνου: **ουδέν**
Φράσεις οδηγιών ασφαλούς χρήσης: **ουδέν**

Το προϊόν προορίζεται για διαγνωστική χρήση in vitro.

LOT

ACCEPTANCE RANGES

	ACL Family, ACL Futura/ACL Advance and ACL TOP	
APC Control Plasma	1	2
LOT		
APCV-1	sec	sec
APCV-2	sec	sec
APCR-V	ratio	ratio

Note:
These ranges cover the expected APTT clotting times and APCR-V ratios when performing analysis of APC Control Plasma Level 1 and 2 on the IL Coagulation Systems with the above Lot. No. using the Factor V Leiden (APC™ Resistance V) kit.

Hinweis:
Diese Bereiche beziehen sich auf zu erwartende Gerinnungszeiten und APCR-V Ratios bei Messung der APC Kontrollplasmen Level 1 und 2 an IL Gerinnungssystemen mit der oben genannten Charge und Verwendung des Faktor V Leiden (APC™ Resistance V) Kits.

Nota:
Estos son los rangos esperados para los Plasmas Control APC Nivel 1 y Nivel 2 en los tiempos de coagulación y ratios APC-V, en los Sistemas de Coagulación IL con el N° Lote indicado usando el kit Factor V Leiden (APC™ Resistance V).

Note:
Ces valeurs limites concernent les temps de formation du caillot et les rapports APCR-V attendus lors de l'analyse des contrôles APC niveau 1 et 2, réalisée sur les analyseurs de coagulation IL en utilisant les numéros de lots de contrôles ci-dessus et le coffret Factor V Leiden (APC™ Resistance V).

Nota:
Gli intervalli dei tempi di coagulazione e delle Ratio sono stati assegnati usando strumenti ACL, i lotti sopraindicati dei Plasmi di controllo e del kit Fattore V Leiden (APC™ Resistance V).

Nota:
Estes intervalos incluem os tempos de APTT esperados e os rácios de APC-V quando são executadas análises do APC Plasma controlo Nível 1 e Nível 2 nos sistemas de Coagulação IL, com o lote acima mencionado, utilizando o kit Factor V Leiden (APC™ Resistance V).

Bemærk:
Disse grænser dækker forventede APTT clottider og APCR-V ratio ved analysering af APC Control Plasma Level 1 og 2 på IL Coagulation Systemer med anvendelse af ovennævnte lot. nr. samt Factor V Leiden (APC™ Resistance V) kit.

Notering:
Dessa områden täcker förväntade APTT klottingtider och APCR-V ratios när analys utförs på APC Control Plasma Level 1 och 2 på IL Coagulation Systems med ovan Lot. No. Med användande av Factor V Leiden (APC™ Resistance V) kit.

Σημείωση:
Τα αναφερόμενα εύρη καλύπτουν τους αναμενόμενους χρόνους σχηματισμού θρόμβου του APTT και τους λόγους APCR-V όταν μετρούνται τα APC Control Plasma Level 1 και 2 σε αναλυτές IL με την ανωτέρω παρτίδα, χρησιμοποιώντας το Factor V Leiden (APC™ Resistance V) kit.

Bibliography / Literatur / Bibliografía / Bibliographie / Bibliografia /Bibliografia / Litteratur / Litteraturförteckning / Βιβλιογραφία

1. Dahlbäck B, Carlsson M, Svensson PJ. Familial Thrombophilia Due to a Previously Unrecognized Mechanism Characterized by Poor Anti-Coagulant Response to Activated Protein C: Prediction of a Cofactor to Activated Protein C. Proc. Natl. Acad. Sci. 1993; 90: 1004-1008
2. Svensson PJ, Dahlbäck B. Resistance to Activated Protein C as a Basis for Venous Thrombosis. N Engl. J Med. 1994; 330: 517-522.
3. Bertina RM, Koeleman BPC, Koster T, Rosendaal FR, Dirven RJ, de Ronde H, van der Velden PA, Reitsma P H. Mutation in Blood Coagulation Factor V Associated with Resistance to Activated Protein C. Nature. 1994; 369: 64-67.
4. Voorberg J, Roelse J, Koopman R, Büller H, Berends F, ten Cate JW, Mertens K, van Mourik JA. Association of Idiopathic Venous Thromboembolism with Single Point Mutation at Arg506 of Factor V. Lancet. 1994; 343: 1535-1536.
5. Greengard JS, Sun X, Xu X, Fernandez JA, Griffin JH, Evatt B. Activated Protein C Resistance Caused by Arg506 Gln Mutation in Factor Va. Lancet. 1994; 343: 1361-1362.
6. Jorquera JI, Montoro JM, Fernandez, MA, Aznar JA, Aznar J. Modified Test for Activated Protein C Resistance. Lancet. 1994; 344: 1162-1163.
7. Aznar J, Pledad V, and Jorquera JI. Modified Coagulative Test for Evaluation of Activated Protein C Resistance. Thromb. Haemost. 1996; 9: 165-166.
8. Trossaërt M, Conard J, Horellou MH, Samama MM, Ireland H, Bayston TA, Lane DA. Modified APC Resistance Assay for Patients on Oral Anticoagulants. Lancet. 1994; 344: 1709.
9. Dahlbäck B. Modified APC-Resistance Test Offers Increased Sensitivity and Specificity for FV:Q506 Allele. Thromb. Haemost. 1995; 74: 1380- 1381.
10. Trossaërt M, Conard J, Horellou MH, Elalamy I, Samama MM. The Modified APC Resistance Test in the Presence of Factor V Deficient Plasma Can be used in Patients Without Oral Anticoagulant. Thromb. Haemost. 1996; 75: 520-526.
11. Cadoy Y, Siè P, Alhenc-Glas M, Aiach M. Evaluation of APC Resistance in the Plasma of Patients with Q506 Mutation of Factor V (Factor V Leiden) and Treated by Oral Anticoagulants. Letter to the Editor. Thromb. Haemost. 1995; 73: 734-735.
12. Richmond JY, McKinney RW eds. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, U.S. Dept. of Health and Human Services, Public Health Service, 4th Edition, 1999.
13. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Preparation and Testing of Reagent Water in the Clinical Laboratory, Third Edition, NCCLS Document C3-A3; Vol. 17 No. 18.
14. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Collection, Transport and Processing of Blood Specimens for Testing Plasma-Based Coagulation Assays, Fourth Edition, NCCLS Document H21-A4; Vol. 23 No. 35.
15. Zucker S, Cathey MH, West B. Preparation of Quality Control Specimen for Coagulation, Am. J. Clin. Pathol. 1970; 63: 924-927.
16. Westgard JO, and Barry PL. Cost-Effective Quality Control; Managing the Quality and Productivity of Analytical Process, AACC Press 1986.

ACL, ACL Futura and ACL TOP are trademarks of Instrumentation Laboratory.

APC is a trademark of Chromogenix AB
©1996 Instrumentation Laboratory.

Issued December 2008.
US Patent 5,443,960
EP 0608235, 0 690 991
Australia 666-484; 690 535
Japan; 2562000
Canada; 2, 119, 761
New Zealand; 261 190

Symbols used / Verwendete Symbole / Símbolos utilizados / Symboles utilisés / Simboli impiegati / Símbolos utilizados / Anvendte symboler / Använda Symboler / Χρησιμοποιηθέντα σύμβολα

ACCEPTANCE RANGE	Acceptance range / Referenzbereich / Rango esperado / Valeur usuelles / Intervallo di accettabilità / Intervalo de aceitação / Accept område / Accepterat område / Αποδεκό εύρος
APCV-1	APTT without APC / APTT ohne APC / TTPA sin APC / APTT sans APC / APTT senza APC / TTPA sem APC / APTT uden APC / APTT utan APC / APTT χωρίς APC
APCV-2	APTT with APC / APTT mit APC / TTPA con APC / APTT avec APC / APTT con APC / TTPA com APC / APTT med APC / APTT med APC / APTT με APC
APCR-V	APCR-V ratio / APCR-V Ratio / Ratio APCR-V / ratio APCR-V / Ratio APCR-V / rácio de APCR-V / APCR-V ratio / APCR-V ratio / Λόγος APCR-V

IVD
In Vitro Diagnostic Medical Device
In Vitro Diagnostikum
Dispositif medical de diagnostique in vitro
Producto sanitario para diagnóstico in vitro
Dispositivo medico-diagnostico in vitro
Dispositivo médico para utilização em diagnóstico *in vitro*
Medicinsk udstyr til in vitro-diagnostik
In vitro diagnostisk medicinsk produkt
Προϊόν για διαγνωστική χρήση *in vitro*

LOT
Batch code
Chargenbezeichnung
Codigo de lote
Code du lot
Codice del lotto
Número de lote
Batchkoden
Tillverkningskod
Αρ. Παρτίδας

Use by
Verwendbar bis
Fecha de caducidad
Utiliser jusque
Utilizzare entro
Data límite de utilização
Anvendelsesdato
Användning
Χρήση έως

Temperature limitation
Zulässiger Temperaturbereich
Limite de temperatura
Limites de température
Limite di temperatura
Límite de temperatura
Temperaturbegrænsning
Temperatur gräns
Περιορισμοί θερμοκρασίας

Consult instructions for use
Gebrauchsanweisung beachten
Consulte las instrucciones de uso
Consulter les instructions d'utilisation
Consultare le istruzioni per l'uso
Consultar as instruções de utilização
Se instruktion før brug
Ta del av instruktionen före användning
Συμβουλευτήτε τις οδηγίες χρήσης

CONTROL
Control
Kontrollen
Control
Contrôle
Controllo
Controlo
Kontrol
Kontroll
Υλικό ποιοτικού ελέγχου

Biological risks
Biologisches Risiko
Riesgo biológico
Risque biologique
Rischio biologico
Risco biológico
Miljø oplysninger
Biologiska risker
Βιολογικοί κίνδυνοι

Manufacturer
Hersteller
Fabricante
Fabricant
Fabbricante
Fabricado por
Producent
Tillverkare
Κατασκευαστής

EC REP
Authorised Representative in the European Community
Bevollmächtigter in der Europäischen Union
Representante autorizado en la Comunidad Europea
Mandataire dans la Communauté européenne
Mandatario nella Comunità Europea
Representante autorizado
Repræsentant i det Europaeiske Faellesskab
Auktoriserad representant
Εξουσιοδοτημένος αντιπρόσωπος

APC™ Resistance V *0020008700*

Printed Insert Sheet: 301557A / 301557B
Revision: R9
Issued: 10/2012
C.O.: 430774

LANGUAGES

ENGLISH
GERMAN
SPANISH
FRENCH
ITALIAN
PORTUGUESE
DANSK
SVENSK
GREEK

TECHNICAL SPECS

PAPER: White paper, 50-60 g/m^2 weight.
SIZE: 2 Sheets 11 x 17" (280 x 432 mm.).
PRINT: Front/Back.
PRINT COLOR: Front - Top band Green Pantone 382, all remaining type in black.
Back - All type in black.