

**COATEST™ APC™ Resistance V S - 82 3138 63**

**Intended use**

For determination of resistance to activated protein C (APC), caused by the factor V:Q 506 (factor V Leiden) mutation, in plasma from untreated individuals and from patients on oral anticoagulant (OAC) or heparin therapy.

**Background and summary**

The APC resistance phenotype<sup>1,2</sup> is in more than 90% of the cases due to a mutation in the factor V gene, resulting in a replacement of Arg<sup>506</sup> (R) with Gln (Q) in the factor V protein<sup>3,5</sup>. The selectivity for the factor V:Q 506, or other mutations in the factor V gene rendering the protein resistant to inactivation by APC<sup>6</sup>, is increased by normalizing the concentrations of other plasma proteins involved in formation and regulation of thrombin. Hence, by performing the APTT-based APC resistance assay in the presence of an excess of factor V deficient 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 OAC therapy<sup>7-11</sup>.

**Measurement principle**

Sample plasma is prediluted in V-DEF Plasma and incubated with the APTT reagent for a standard period of time. Coagulation is triggered by the addition of CaCl<sub>2</sub> in the absence and presence of APC and the time for clot formation is recorded.

**REAGENTS**

- V-DEF Plasma** 2 vials  
Stabilized, lyophilized human plasma, with a low level of factor V activity, containing the heparin antagonist Polybrene®. Reconstitute with 4.0 mL of NCCLS type II water<sup>12</sup>. Allow to stand for 30 minutes at 20-25°C. Swirl gently before use.
- CaCl<sub>2</sub>** 2 vials  
2 mL of calcium chloride, 0,025 mol/L, in Tris buffer containing 0.5% bovine serum albumin.
- APTT reagent** 2 vials  
4 mL of purified phospholipids with colloidal silica as contact activator. Contains a preservative. Mix thoroughly on a Vortex mixer before use.
- APC/CaCl<sub>2</sub>** 2 vials  
Human activated protein C copolyophilized with CaCl<sub>2</sub>. Reconstitute with 2.0 mL of NCCLS type II water<sup>12</sup>. Allow to stand for 30 minutes at 20-25°C. Swirl gently before use.
- Control Plasma Level 1** 1 vial  
Lyophilized human plasma. Reconstitute with 1.0 mL of NCCLS type II water<sup>12</sup>. Allow to stand for 30 minutes at 20-25°C. Swirl gently before use.
- Control Plasma Level 2** 1 vial  
Lyophilized human plasma. Reconstitute with 1.0 mL of NCCLS type II water<sup>12</sup>. Allow to stand for 30 minutes at 20-25°C. Swirl gently before use.

**Reagents 3 and 4 are not interchangeable between lots.**

**V-DEF Plasma** (Art. No 82 3146 63), **Control Plasma Level 1** (Art. No 82 2650 63) and **Control Plasma Level 2** (Art. No 82 2668 63) are also available separately from Chromogenix.

**CAUTION:** Each donor unit used in the preparation of human source reagent has been tested by FDA approved methods for the presence of Hepatitis B surface antigen and antibodies to HIV 1 and 2 and Hepatitis C and found to be negative. However, since no test can completely rule out the presence of these blood borne diseases, the handling and disposal of human source reagents from this product should be with care.

Hazard class: **none**

Risk phrases: **none**

Safety phrases: **none**

This product is for *in vitro* diagnostic use.

**Materials required but not provided:**

- Deionized water, filtered through 0.22 µm or NCCLS type II water<sup>12</sup>
  - Calibrated pipettes.
  - Automated or semi-automated coagulation instruments which, employ mechanical or optical detection, methods should be used.
- NOTE: When using automated or semi-automated instruments, always refer to the operator manual from the instrument manufacturer for exact procedures.

**Storage conditions and stability**

The sealed reagents are stable at 2-8°C until the expiry date printed on the label. Avoid contamination of the reagents by microorganisms.

- V-DEF Plasma**  
Stability after reconstitution is 8 hours at 15-25°C, 24 hours at 2-8°C or 3 months at -20°C or below when stored in the original vial. \*See NOTE.

- CaCl<sub>2</sub>**  
Opened reagent in the original vial is stable for 1 week at 15-25°C or 1 month at 2-8°C.
- APTT reagent**  
Opened reagent in the original vial is stable for 1 week at 15-25°C or 1 month at 2-8°C. Do not freeze!
- APC/CaCl<sub>2</sub>**  
Stability after reconstitution is 2 hours at 37°C, 8 hours at 15-25°C, 5 days at 2-8°C or 3 months at -20°C or below when stored in the original vial. \*See NOTE.
- Control Plasma Level 1**  
Stability after reconstitution is 6 hours at 2-25°C or 3 months at -20°C or below when stored in the original vial. \*See NOTE.
- Control Plasma Level 2**  
Stability after reconstitution is 6 hours at 2-25°C or 3 months at -20°C or below when stored in the original vial. \*See NOTE.

\*NOTE: Frozen reagent should be rapidly thawed at 37°C and gently mixed before use. Do not refreeze.

**Quality controls**

Control Plasma Level 1 and Level 2 should be used for validation of the assay series. Level 1 shows a normal response to APC whereas Level 2 shows a response consistent with presence of the factor V:Q 506 mutation. Ranges of expected APC-V ratios are provided with each batch. If values outside the specified range are obtained, a complete check of reagents and instrument performance should be made and the analysis should be repeated. (See Calibration section for QC use of Control Plasma Level 1 and 2).

**Traceability of calibrators and control materials**

The reported values were determined over multiple runs on ACL Futura using a specific lot of reagent and against an internal House Standard. As an International Standard is not still available for the APC:RV assay, the values have been assigned against a House Standard which is traceable to frozen plasma samples which have been determined to be homozygous or heterozygous respectively for factor V dependent APC Resistance.

**Specimen collection**

The patient should be at rest for 10 min, before sampling. Collect blood (9 volumes) in 0.1 mol/L sodium citrate (1 volume) and centrifuge within 24 hours at 2000 x g for 20 min, at room temperature. Take care to avoid contamination from the platelet layer into the plasma when the plasma is separated from the cells. Analyse the plasma within 25 hours from blood sampling<sup>13</sup>. Alternatively, freeze rapidly at -70°C in aliquots of 1 mL or less and store for not more than 3 years at -70°C. Specimens should not be stored in a self defrosting freezer and not be thawed and refrozen before assay. Treat specimens as potentially infectious. For more information see NCCLS document H21-A3<sup>14</sup>.

**Procedure**

- All reagents must be brought to room temperature before use. Frozen plasma samples should be rapidly thawed at 37°C in a standardized way ensuring negligible loss of activity of labile coagulation factors and absence of cryoprecipitate.
- Pre-warm a sufficient volume of CaCl<sub>2</sub> and APC/CaCl<sub>2</sub> at 37±0.5°C.
- Pre-dilute one volume of sample plasma or Control Plasma with four volumes of V-DEF Plasma. Pre-diluted plasma test should be analyzed within 45 minutes.
- Add one volume of plasma to a test tube or cuvette, then add an equal volume of the APTT reagent. Incubate at 37°C for 5 minutes. An instrument with a different, preset, incubation time may be used provided it is at least 3 minutes.
- Add one volume of CaCl<sub>2</sub> and simultaneously begin timing of clot formation. Record the time for clot formation.
- Perform a second analysis on the plasma exchanging CaCl<sub>2</sub> with APC/CaCl<sub>2</sub> and record the time for clot formation.

**Results**

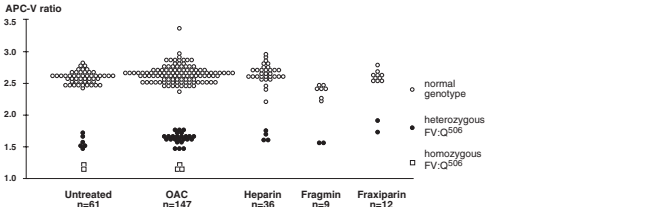
Calculate the factor V related APC ratio for the samples and controls:

$$\text{APC ratio} = \frac{\text{Clot time APC/CaCl}_2}{\text{Clot time CaCl}_2}$$

APC resistance due to a factor V mutation is indicated when the APC-V ratio is below or equal to the cut-off value (see Calibration). The following results illustrate the applicability of the Coatest APC Resistance V assay on the analysis of plasma from untreated individuals (Untreated), patients on OAC therapy, INR 1.3 - 6.0 (OAC), and patients receiving unfractionated heparin (Heparin) or low molecular weight heparins (shown here are Fragmin® and Fraxiparin®).

APC ratio =

**ENGLISH - Insert revision 03/2013**



Sample APC-V ratios are distributed according to the factor V genotype. For a given genotype, similar APC-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). Basal APT times for untreated individuals may differ moderately as compared to the original Coatest APC Resistance assay.

**Performance Characteristics**

**PRECISION**

APC-V ratios were calculated from 22 single replicate analyses of Control Plasma Level 1 on an ACL instrument using 11 different reagent combinations on 11 different occasions.

	CV% (Within series)	CV% (Between series)
Control Plasma Level 1	APC-V ratio 2.4	4 %

Duplicate analyses of plasma from altogether 630 individuals on three different types of instruments (ST-4, Thrombolyzer and MLA/Electra 900) resulted in within series CV 3% and 5% for the clotting times obtained in the absence and presence of APC respectively. NCCLS document EP5-T2<sup>15</sup>.

**Calibration**

APC-V ratios obtained with the Coatest APC Resistance 5 method are lower than the APC ratios obtained with the original Coatest APC Resistance method, independent of instrumentation used. It is recommended that each user establishes the performance of his own instrument and determines the factor V related APC resistance cut-off value through the following procedure:

- Perform five independent determinations of the APC-V ratio, using at least triplicates in each series, of a plasma sample with normal APC response. Confirm that the inter and intra assay variation of the APC-V ratio is below 7%. In case a satisfactory performance already has been established with the original Coatest APC Resistance method, this step may be omitted.
- Determine the APC-V ratios for at least 30 plasma samples from healthy individuals in the age range 20 - 65 years. Include Control Plasma Level 1 and Level 2 for assay validation.
- Verify that the APC-V ratios for the Control Plasmas are within their specified ranges.
- Calculate the median APC-V ratio.
- Calculate the factor V related APC resistance cut-off value as 0.8 times the median APC-V ratio when below 2.8 and as 0.75 times the median APC-V ratio when 2.8 or higher.
- The APC-V ratio for Control Plasma Level 1 should be within the normal range. The APC-V ratio for Control Plasma Level 2 should be below the cut-off value.

**Sensitivity**

Coatest APC Resistance V provides 100% sensitivity for FV:Q 506 as determined on Thrombolyzer (n = 447), ACL (n = 295), ST-4 (n = 249) and MLA/Electra (n = 50).

**Limitation/interfering factors**

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 OAC patients is not affected by the INR value. The prescribed assay procedure allows for the analysis of plasma from heparinized patients at heparin levels < 1 IU/mL plasma (unfractionated and low molecular weight heparins). Although the 1+4 predilution strongly decreases interferences, it can not be excluded that analysis of plasma from patients with high inhibitor activity (e.g. phospholipid antibodies) may give an abnormal APT time and thus possibly misleading results. In such cases, increasing the dilution factor (e.g. 1+9 or 1+19) may correct the test result. As for any APT-based assay, care should be taken to avoid contact activation of samples since this may lead to activation of FVIII and FV.

**Reference values**

The APC-V Ratios obtained from analysis of plasmas from 61 healthy individuals on ACL and ST-4 and from 390 healthy individuals on Thrombolyzer were in the range 2 - 3.5. No difference is found between sexes.

**COATEST™ APC™ Resistance V S - 82 3138 63**

**Verwendungszweck**

Zur Bestimmung der, durch die Faktor V:Q<sup>506</sup> (Faktor V Leiden) Punktmutation verursachten, Resistenz gegen aktiviertes Protein C (APC) bei nicht therapierten Personen und Patienten unter oraler Antikoagulation (OAK) bzw. Heparintherapie.

**Hintergrund und Zusammenfassung**

Mehr als 90% aller Fälle von APC-Resistenz<sup>1,2</sup> sind durch eine Mutation im Faktor V Gen erklärbar. Diese Mutation führt, genau an einer Spaltstelle durch aktiviertes Protein C, zu einer Aminosäuresubstitution (Arg<sup>506</sup>→Gln) im Faktor V Protein<sup>3,5</sup>. Durch diese Änderung in der Aminosäuresequenz wird die Spaltung und Inaktivierung des Faktor Va durch APC gehemmt. Die Selektivität für diese oder andere Mutationen des Faktor V<sup>6</sup> wird durch Normalisierung der Konzentration anderer, bei der Bildung und Regulierung von Thrombin beteiligten, Plasmaproteinen erhöht. Durch die Verwönnung der Patientenplasmen mit V-DEF Plasma wird die Sensitivität und Spezifität des, auf dem Grundprinzip der APT-Messung aufbauenden, APC Resistenz Tests für die Faktor V:Q<sup>506</sup> Mutation signifikant erhöht. Außerdem ermöglicht die Verwönnung auch die Testung von Patienten unter oraler Antikoagulationstherapie<sup>7-11</sup>.

**Messprinzip**

Probenplasma wird mit V-DEF Plasma vorverdünnt und für einen festgesetzten Zeitraum mit dem APTT Reagenz inkubiert. Die Zeitdauer bis zur Fibrinbildung wird nach Zugabe von CaCl<sub>2</sub> mit und ohne APC gemessen.

**REAGENZIEN**

- V-DEF Plasma** 2 Flaschen  
Stabilisiertes, lyophilisiertes humanes Plasma mit einer niedrigen Faktor-V Restaktivität und Polybrene® als Heparinantagonist. Auflösen mit 4,0 mL Wasser NCCLS Typ II.<sup>12</sup> 30 Minuten bei Raumtemperatur stehen lassen. Vor Verwendung vorsichtig durchmischen.
- CaCl<sub>2</sub>** 2 Flaschen  
2 mL Calciumchlorid, 0,025 mol/L, in Trispufler mit 0,5% Rinderserumalbumin.
- APTT Reagenz** 2 Flaschen  
4 mL gereinigete Phospholipide mit kolloidalem Silika als Kontaktaktivator. Enthält ein Konservierungsmittel. Vor Verwendung vorsichtig auf einem Vortex Mixer durchmischen.
- APC/CaCl<sub>2</sub>** 2 Flaschen  
Humanes aktiviertes Protein C, lyophilisiert in Kombination mit CaCl<sub>2</sub>. Auflösen mit 2,0 mL Wasser NCCLS Typ II.<sup>12</sup> 30 Minuten bei Raumtemperatur stehen lassen und vor Verwendung vorsichtig durchmischen.
- Kontrollplasma Level 1** 1 Flasche  
Lyophilisiertes humanes Plasma. Auflösen mit 1,0 mL Wasser NCCLS Typ II.<sup>12</sup> 30 Minuten bei Raumtemperatur stehen lassen und vor Verwendung vorsichtig mischen.
- Kontrollplasma Level 2** 1 Flasche  
Lyophilisiertes humanes Plasma. Auflösen mit 1,0 mL Wasser NCCLS Typ II.<sup>12</sup> 30 Minuten bei Raumtemperatur stehen lassen und vor Verwendung vorsichtig mischen.

**Die Reagenzien 3 und 4 sind bei verschiedenen Kit-Chargen nicht untereinander austauschbar.**

**V-DEF Plasma** (Art.Nr. 82 3146 63), **Kontrollplasma Level 1** (Art.Nr. 82 2650 63) und **Kontrollplasma Level 2** (Art.Nr. 82 2668 63) sind auch separat von Chromogenix erhältlich.

**ACHTUNG:** Jede individuelle Blutspende, die zur Herstellung der Reagenzien verwendet wurde, ist mit FDA zugelassenen Methoden auf die Abwesenheit von Hepatitis B Oberflächenantigen und auf Antikörper gegen HIV 1 bzw. 2 und Hepatitis C überprüft. Unabhängig davon sollten alle, aus menschlichen Blut gewonnenen, Proben und Produkte, wegen nie völlig ausschließender Gefährdung durch Krankheitserreger, als potentiell infektiös angesehen und mit angemessener Sorgfalt gehandhabt werden.

Gefahrklasse: **keine**

Risikoeinstufung: **keine**

Sicherheitseinstufung: **keine**

Dieses Produkt ist nur für die *in vitro* Diagnostik geeignet.

**Zusätzlich benötigte Materialien**

- Entionisiertes Wasser 0,22 µm filtriert oder Wasser NCCLS Typ II.<sup>12</sup>
- Kalibrierte Pipetten.
- Gerinnungsmittelgerät zur Bestimmung der Gerinnungszeit. Automatische bzw. halbautomatische Gerinnungsmittelgeräte mit mechanischer oder optischer Messmethode können verwendet werden.

ANMERKUNG: Bei Verwendung von automatischen oder halbautomatischen Geräten sind die Angaben des Geräteherstellers zu befolgen.

**Halbbarkeit und Lagerungsbedingungen**

Die verschlossenen Reagenzien sind bei 2-8°C bis zum aufgedruckten Verfalldatum haltbar. Eine Kontamination mit Mikroorganismen ist zu vermeiden.

- V-DEF Plasma**  
Halbbarkeit nach dem Lösen: 8 Stunden bei 15-25°C, 24 Stunden bei 2-8°C oder 3 Monate bei -20°C oder kälter in der Originalflasche. \*Siehe ANMERKUNG.

**COATEST™ APC™ Resistance V S - 82 3138 63**

- CaCl<sub>2</sub>**  
Halbbarkeit der geöffneten Flasche: 1 Woche bei 15-25°C oder 1 Monat bei 2-8°C in der Originalflasche.
- APTT Reagenz**  
Halbbarkeit der geöffneten Flasche: 1 Woche bei 15-25°C oder 1 Monat bei 2-8°C in der Originalflasche. Nicht einfrieren!
- APC/CaCl<sub>2</sub>**  
Halbbarkeit nach dem Lösen: 2 Stunden bei 37°C, 8 Stunden bei 15-25°C, 5 Tage bei 2-8°C oder 3 Monate bei -20°C oder kälter in der Originalflasche. \*Siehe ANMERKUNG.
- Kontrollplasma Level 1**  
Halbbarkeit nach dem Lösen: 6 Stunden bei 2-25°C oder 3 Monate bei -20°C oder kälter in der Originalflasche. \*Siehe ANMERKUNG.
- Kontrollplasma Level 2**  
Halbbarkeit nach dem Lösen: 2 Stunden bei 2-25°C oder 3 Monate bei -20°C oder kälter in der Originalflasche. \*Siehe ANMERKUNG.

\*ANMERKUNG: Das gefrorene Reagenz muß bei 37°C aufgetaut und vor Verwendung vorsichtig durchmischt werden. Nicht wieder einfrieren!

**Qualitätskontrolle**

Die Kontrollplasmen Level 1 und Level 2 sollten zur Bestätigung der Patientenergebnisse mitgetestet werden. Level 1 ist ein Plasma mit normaler Reaktion, wogegen Level 2 eine, dem Vorhandensein der Faktor V:Q<sup>506</sup> Mutation entsprechende, Reaktion zeigt. Die zu erwartenden APC-V Ratio Kontrollbereiche sind im chargenspezifischen Beipackzettel angegeben. Liegen die erhaltenen Werte außerhalb der angegebenen Kontrollbereiche, sollten Reagenzien bzw. Gerät überprüft und der Test wiederholt werden.

**Rückführbarkeit der Werte von Kalibratoren und Kontrollen**

Die angegebenen Werte wurden in mehreren Analysenserien auf ACL Futura unter Verwendung einer bestimmten Reagenzcharge und eines internen Laborstandards ermittelt. Da für die Bestimmung der APC-Resistenz noch kein Internationaler Standard verfügbar ist, sind die Werte des internen Laborstandards auf gefrorene Plasmaproben zurückführbar, die als homozygot bzw. heterozygot für APC-Resistenz nachgewiesen wurden.

**Probengewinnung**

Die Blutabnahme vornehmen, nachdem sich der Patient 10 Minuten ausgeruht hat. Das Blut (9 Teile) in Natriumcitrat (0,1 mol/L - 1 Teil) geben und innerhalb von 24 Stunden bei 2000 x g und Raumtemperatur zentrifugieren. Das Plasma vorsichtig - ohne Durchmischung mit Thrombozyten - von den Zellen trennen. Die Plasma-Untersuchung muß innerhalb von 25 Stunden nach der Blutabnahme erfolgen.<sup>13</sup> Es besteht aber auch die Möglichkeit, die Blutproben rasch bei -70°C in 1 mL-Einheiten oder kleiner Tiefzufrieren und sie bei -70°C höchstens drei Jahre lang aufzubewahren. Die Proben dürfen nicht in einer Gefriertruhe mit einem automatischen Abtausystem getagert, noch vor dem Test aufgetaut und wieder eingefroren werden. Die Proben sind als potentiell infektiös zu behandeln. Zusätzliche Informationen sind im NCCLS-Dokument H21-A3 zu finden.<sup>14</sup>

**Testdurchführung**

- Alle Reagenzien vor Verwendung auf Raumtemperatur bringen. Gefrorene Proben werden unter standardisierten Bedingungen rasch bei 37°C aufgetaut, um Aktivitätsverluste von labilen Gerinnungsfaktoren bzw. die Bildung von Kryopräzipitaten zu vermeiden.
- Die benötigten Volumina CaCl<sub>2</sub> und APC/CaCl<sub>2</sub> auf 37±0.5°C vorwärmen.
- 1 mL Probe oder Kontrollplasma mit 4 Teilen V-DEF Plasma verdünnen (z.B. 25 µL + 100 µL). Die Vorverdünnung im Plasma ist innerhalb 45 Minuten zu analysieren.
- Einen Teil verdünntes Plasma in ein Teströhrchen oder eine Kuvette pipettieren und das gleiche Volumen APTT Reagenz hinzufügen. 5 Minuten bei 37°C inkubieren. Geräte mit davon abweichenden, vorprogrammierten Inkubationszeiten, können verwendet werden- vorausgesetzt, die Inkubationsdauer beträgt mindestens 3 Minuten.
- Einen Teil CaCl<sub>2</sub> hinzufügen und gleichzeitig mit der Zeitmessung bis zur Fibrinbildung mindestens 3 Minuten.
- Einen zweiten Ansatz mit APC/CaCl<sub>2</sub> anstelle von CaCl<sub>2</sub> durchführen und abermals die Zeit bis zur Fibrinbildung stoppen.

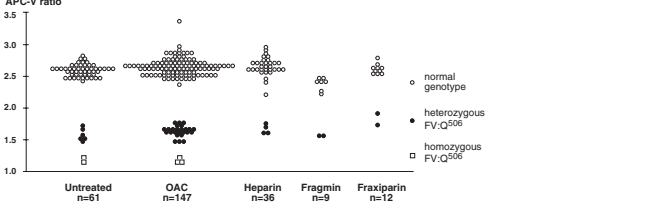
**Resultate**

Berechnung der Faktor-V bezogenen APC Ratios für Proben und Kontrollen:

$$\text{APC Ratio} = \frac{\text{Gerinnungszeit APC/CaCl}_2}{\text{Gerinnungszeit CaCl}_2}$$

Eine APC-V Ratio kleiner oder gleich dem cut-off Wert (siehe KALIBRATION) zeigt eine, durch die FV:Q<sup>506</sup> Mutation verursachte, APC Resistenz an. Die angeführten Resultate zeigen die Eignung des COATEST APC Resistance 5 Tests bei der Analyse von nicht therapierten Personen, Patienten unter OAK-Therapie (OAK, INR 1,3 - 6,0) und Patienten mit unfractionierter Heparinabgabe (Heparin) oder niedermolekularer Heparinabgabe (Fragmin®, Fraxiparin®).

**DEUTSCH - Beipackzettel Version 03/2013**



Die Verteilung der APC-V Ratios entspricht dem Faktor-V Genotyp. Innerhalb eines Faktor-V Genotyps werden, unabhängig von der Probenkategorie, ähnliche APC-V Ratios erhalten. Typische, durchschnittliche, Werte sind 2,6 (normal), 1,7 (heterozygoter FV:Q<sup>506</sup>) und 1,2 (homozygoter FV:Q<sup>506</sup>). Basal APTT-Werte für nicht therapierten Personen, kann sich im Vergleich zur COATEST APC-Resistenz Originalmethode leicht verändern.

**Testeigenschaften**

**REPRODUZIERBARKEIT UND PRÄZISION**

22 APC-V Ratios von Kontrollplasma Level 1 wurden mit 11 verschiedenen Reagenzkombinationen an verschiedenen Tagen auf einem ACL Gerinnungssystem getestet.

	APC-V Ratio	Innerhalb der Serien	Zwischen den Serien
Kontrollplasma Level 1	2,0	CV 4 %	CV 4 %

Doppelbestimmungen der Plasmen von 60 Personen auf drei verschiedenen Instrumenten (ST-4, Thrombolyzer und MLA/Electra 900) ergaben einen CV innerhalb der Serie von 3% bzw. 5% für die Gerinnungszeiten ohne bzw. mit APC. NCCLS Referenz EP5-T2.<sup>15</sup>

**Kalibrierung**

Im Vergleich zur COATEST APC Resistance Originalmethode werden mit der V-DEF Plasma Methode niedrigere Ratios erhalten. Es wird empfohlen, daß jedes Labor für das verwendete Gerät einen eigenen APC Resistenz cut-off Wert festlegt:

- Durchführung von fünf voneinander unabhängigen Dreifachbestimmungen einer Probe mit normaler APC-Response. Die inter und intra Variation der APC-R Ratios muß unter 7% liegen. Für den Fall, daß mit der Originalmethode bereits eine zufriedenstellende Testdurchführung festgestellt wurde, kann dieser Schritt entfallen.
- Bestimmung der APC-V Ratios von mindestens 30 gesunden Personen im Alter von 20-65 Jahren und der Kontrollplasmen Level 1 und 2.
- Die APC-V Ratios der Kontrollplasmen müssen innerhalb des angegebenen Kontrollbereiches liegen.
- Die mittlere APC-V Ratio berechnen.
- Der cut-off Wert bei der durchschnittlichen Ratio von unter 2,8 beträgt 80% der ermittelten Durchschnittsratio. Ist die durchschnittliche APC-V Ratio 2,8, so beträgt der cut-off Wert 75% der Durchschnittsratio.
- Die APC-V Ratio des Kontrollplasmas Level 1 muß innerhalb des Normalbereiches liegen, die Ratio des Kontrollplasmas Level 2 muß unterhalb des cut-off Wertes liegen.

**Sensitivität**

Die Sensitivität für die FV:Q<sup>506</sup> Mutation ist 100%, erstellt auf Thrombolyzer (n = 447), ACL (n = 295), ST-4 (n = 248) und MLA/Electra (n = 50).

**Grenzen des Verfahrens/Interferenzen**

Die APC-V Ratios von frischen und gefrorenen Proben zeigen keine signifikanten Unterschiede. Der INR von Patienten unter oraler Antikoagulationstherapie beeinflusst nicht die Sensitivität und Spezifität für die Faktor V:Q<sup>506</sup> Mutation. Diese APC-V Methode ermöglicht die Messung von heparinisierten Patienten mit einem Heparin Gehalt von 1,0 IE/mL Plasma (unfraktioniertes und niedermolekulares Heparin). Obwohl die 1+4 Vorverdünnung eventuelle Interferenzen stark reduziert, kann bei Patienten mit einer sehr hohen Inhibitoraktivität (z.B. Phospholipid Antikörper) eine Beeinflussung der APTT und somit des Testresultates nicht ausgeschlossen werden. In solchen Fällen kann eine höhere Probenverdünnung (1+9 oder 1+19) eine korrekte Analyse ermöglichen. Wie bei allen APTT basierenden Tests, muß eine Kontaktaktivierung der Proben vermieden werden, da dies zur Aktivierung von FVIII und FV führen kann.

**Referenzwerte**

Die APC-V Ratios von 61 gesunden Personen, gemessen auf ACL und ST-4 bzw. 390 gesunden Personen, gemessen auf Thrombolyzer, lagen im Bereich von 2,0-3,5.

**COATEST™ APC™ Resistance V S - 82 3138 63**

**PORTUGUÊS - Revisão do folheto 03/2013**

Para a revisão actual deste folheto informativo em Português, contacte o representante da Chromogenix da sua área.

**PRECAUÇÕES E ADVERTÊNCIAS:**

O material utilizado neste produto foi analisado com testes aprovados pela FDA e verificou-se a ausência de reacção ao Antígeno de Superfície da Hepatite B (HBsAg), aos anticorpos anti-HCV e anti-HIV 1/2. No entanto, deve-se manipular Classe de risco: **nenhuma**  
Frases de risco: **nenhuma**  
Frases de segurança: **nenhuma**  
Este reagente destina-se a utilização em diagnóstico *in vitro*.

**TRAÇABILIDADE DAS MATÉRIAS DOS CALIBRADORES E DOS CONTROLOS.**

Os valores apresentados foram determinados através de múltiplos ensaios no ACL Futura, utilizando um lote específico de reagente e contra um Padrão Caseiro interno. Para o ensaio de APC:RV o Padrão Internacional ainda não está disponível. Os valores foram determinados contra um Padrão Caseiro que é traçável até 15 amostras de plasma congelado que foram determinadas como sendo Homozigotas e Heterozigotas para a APCR.

**COATEST™ APC™ Resistance V S - 82 3138 63**

**SVENSK - Instick revision 03/2013**

# CHROMOGENIX

## COATEST™ APC™ Resistance V S - 82 3138 63

### Uso

Para la determinación de la resistencia a la proteína C activada (APC), causada por la mutación en el factor V:Q<sup>606</sup> (factor V Leiden), tanto en plasma de individuos sin tratamiento como en pacientes sometidos a terapias de anticoagulantes orales (TAO) o heparinas.

### Antecedentes y resumen

El fenotipo<sup>1,2</sup> del "APC Resistance" es, en más del 90% de los casos, debido a una mutación en el gen del factor V que produce la sustitución de Arg<sup>506</sup> (R) por Gin (Q) en la proteína del factor V.<sup>3,5</sup> La selectividad en el factor V:Q<sup>606</sup> u otras mutaciones en el gen del factor V que produzcan la resistencia de la proteína a la inactivación por APC<sup>6</sup>, es aumentada al normalizar la concentración de las otras proteínas plasmáticas implicadas en la formación y regulación de la trombina. Por tanto, al llevar a el que se basa el ensayo de APC Resistance, en presencia de un exceso de plasma deficiente en factor V, la sensibilidad y especificidad para la mutación del factor V:Q<sup>606</sup> aumenta significativamente. Además, esta modificación permite el análisis de plasma de pacientes que están con terapias de (TAO).<sup>7-11</sup>

### Fundamento del método

La muestra de plasma es precluida en Plasma DEF-V e incubada con el reactivo APTT durante un periodo de tiempo estándar. La coagulación se inicia al añadir CaCl<sub>2</sub> en ausencia y presencia de APC y se registra el tiempo de formación del coágulo.

### REACTIVOS

- V-DEF Plasma** 2 viales Plasma humano estabilizado y liofilizado, con un bajo nivel de actividad en factor V, conteniendo el antagonista de la heparina Polybren®. Reconstituir con 4 mL de agua NCCLS tipo II.<sup>12</sup> Se puede mantener 30 min a 20-25°C. Agitar suavemente antes de usar.
- CaCl<sub>2</sub>** 2 viales 2 mL de cloruro cálcico, 0,025 mol/L, en tampón Tris conteniendo 0.5% de albúmina bovina.
- APTT reactivo** 2 viales 4 mL de fosfolípidos purificados con sílica coloidal como activador de contacto. Contiene un conservante. Agitar vigorosamente en un vórtex antes de usar.
- APC/CaCl<sub>2</sub>** 2 viales Proteína C activada humana colifilizada con CaCl<sub>2</sub>. Reconstituir con 2 mL de agua NCCLS tipo II.<sup>12</sup> Se puede mantener durante 30 minutos a 20-25°C; mezclar suavemente antes de usar.
- Control Plasma Nivel 1** 1 vial Plasma humano liofilizado. Reconstituir con 1,0 mL de agua NCCLS tipo II.<sup>12</sup> Se puede mantener durante 30 minutos a 20-25°C; agitar suavemente antes de usar.
- Control Plasma Nivel 2** 1 vial Plasma humano liofilizado. Reconstituir con 1,0 mL de agua NCCLS tipo II.<sup>12</sup> Se puede mantener durante 30 minutos a 20-25°C; agitar suavemente antes de usar.

\* **Los reactivos 3 y 4 no son intercambiables entre ellos.**

Chromogenix suministra también separadamente: **V DEF Plasma** (Art 82 3146 63), **Plasma Control Nivel 1** (Art 82 2650 63) y **Plasma Control Nivel 2** (Art 82 2668 63).

**PRECAUCIÓN:** Cada muestra de donante empleada en la preparación de reactivos de procedencia humana han sido ensayada con los métodos vigentes de la FDA (Food and Drug Administration) para determinar la presencia de antígenos de superficie de la hepatitis B y anticuerpos frente a VIH 1 y 2 y hepatitis C, siendo todos los resultados negativos. Sin embargo, puesto que no existe ningún análisis que descarte completamente la presencia de tales enfermedades sanguíneas, la manipulación y desechos de los reactivos de procedencia humana de este producto, ha de realizarse con cuidado.

Indicaciones de peligro: **Ninguna**

Frase de Riesgo: **Ninguna**

Frase de Seguridad: **Ninguna**

Este producto es para diagnóstico in vitro.

**Material requerido pero no proporcionado:**

- Agua desionizada, filtrada a través de un filtro de 0,22 µm o agua NCCLS tipo II.<sup>12</sup>
- Pipetas calibradas.
- Instrumentos de coagulación automáticos o semi-automáticos que empleen métodos de detección óptico o mecánico.

NOTA: Cuando usando instrumentos automáticos o semi-automáticos, consultar el manual de intrucciones del fabricante del instrumento para seguir el proceso correcto.

### Condiciones de almacenamiento y estabilidad

Los reactivos sin abrir son estables a 2-8°C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta. Evitar la contaminación de los reactivos por microorganismos.

- V-DEF Plasma** Estabilidad después de la reconstitución: 8 horas a 15-25°C, 24 horas a 2-8°C o 3 meses a -20°C o temperatura inferior en el vial original. \*Ver NOTA.

## COATEST™ APC™ Resistance V S - 82 3138 63

### Utilización prevue

Détermination de la résistance à la protéine C activée (APC), provoquée par une mutation du facteur V:Q<sup>606</sup> (facteur V de Leyde) dans le plasma provenant de sujets non traités et de patients traités par des anticoagulants oraux (ACO) ou de l'héparine.

### Contexte et resume

Le phénotype de la résistance à l'APC<sup>1,2</sup> est dû dans plus de 90% des cas à une mutation du gène du facteur V, provoquée par le remplacement d'Arg<sup>506</sup> (R) par Gin (Q) au niveau de la protéine du facteur V.<sup>3,5</sup> La sélectivité pour le facteur V:Q<sup>606</sup> ou par d'autres mutations au niveau du gène du facteur V, rendant la protéine résistante à l'inactivation par l'APC<sup>6</sup>, est accrue par la normalisation des concentrations des autres protéines plasmatiques impliquées dans la formation et dans la régulation de la thrombine. La sensibilité et la spécificité pour la mutation du factor V:Q<sup>606</sup> est ainsi significativement accrue si l'on procède à un test de résistance à l'APC, basé sur le temps de céphaline-kaolin en présence d'un excès de plasma pauvre en facteur V. Cette modification permet en outre l'analyse de plasmas prélevés chez des patients traités par les ACO.<sup>7-11</sup>

### Principe de mesure

Le prélevement plasmatique est précléidú dans du plasma V-DEF et incubé avec le réactif pour le temps de céphaline-kaolin pendant une durée standard. La coagulation est déclenchée par l'addition de CaCl<sub>2</sub> en l'absence et en présence d'APC et le délai nécessaire à la formation du caillot est enregistré.

### REACTIFS

- V-DEF Plasma** 2 flacons Plasma lyophilisé et stabilisé d'origine humaine, comportant un taux faible d'activité du facteur V et contenant Polybren® et l'antagoniste de l'héparine. Reconstituer à l'aide de 4,0 ml eau NCCLS type II.<sup>12</sup> Laisser reposer pendant 30 minutes à une température de 15-25°C. Agiter prudemment avant l'emploi.
- CaCl<sub>2</sub>** 2 flacons 2 mL de chlorure de calcium, 0,025 mol/l, dans un tampon Tris, contenant 0,5% de sérumalbumine.
- Réactif APTT pour temps de céphaline-kaolin** 2 flacons 4 ml de phospholipides purifiés avec de la sílice colloidale comme activateur de contact. Contient un conservateur. Mélanger soigneusement à l'aide d'un vortex avant l'emploi.
- APC/CaCl<sub>2</sub>** 2 flacons Protéine C activée d'origine humaine, colophylisée avec du CaCl<sub>2</sub>. Reconstituer à l'aide de 2,0 ml eau NCCLS type II.<sup>12</sup> Laisser reposer pendant 30 minutes à une température de 20-25°C et mélanger prudemment avant l'emploi.
- Contrôle plasmatique 1** 1 flacon Plasma lyophilisé d'origine humaine. Reconstituer à l'aide de 1,0 ml eau NCCLS type II.<sup>12</sup> Laisser reposer pendant 30 minutes à une température de 20-25°C et agiter prudemment avant l'emploi.
- Contrôle plasmatique 2** 1 flacon Plasma lyophilisé d'origine humaine. Reconstituer à l'aide de 1,0 ml eau NCCLS type 2.<sup>12</sup> Laisser reposer pendant 30 minutes à une température de 20-25°C et agiter prudemment avant l'emploi.

**Les réactifs 3 et 4 ne sont pas interchangeables entre les lots.**

Le **plasma V-DEF** (Article N° 82 3146 63, AFSSAPS N° S62372) ainsi que le **Contrôle plasmatique 1** (Article N° 82 2650 63, AFSSAPS N° M16026) et le **Contrôle plasmatique 2** (Article N° 82 2668 63, AFSSAPS N° M17312) peuvent également être fournis séparément par Chromogenix et ses distributeurs.

**PRECAUTION:** Chaque unité provenant d'un donneur et utilisée pour la préparation d'un réactif d'origine humaine a été testée selon des méthodes approuvées par la FDA pour la recherche des anticorps anti VIH 1 et 2 et anti HCV et de l'antigène HBS. Cette recherche s'est révélée négative. Néanmoins, étant donné qu'aucun test ne permet d'éliminer toute certitude absolue la présence de l'antigène de surface de l'hépatite B et de l'hépatite C ou des anticorps dirigés contre le VIH, le maniement et l'élimination des réactifs d'origine humaine de ce produit devant faire l'objet de toutes les attentions.

Classification risque: **Acucne**

Phrases risque: **Acucne**

Phrases sécurité: **Acucne**

Ce produit est à usage diagnostique in vitro.

**Matériel nécessaire mais non fourni:**

- Eau désionisée, filtrée sur filtre de 0,22 µm, ou eau NCCLS type II.<sup>12</sup>
- Pipette étalonée.
- Utiliser des appareils de mesure de la coagulation automatiques ou semi-automatiques basés sur des méthodes de détection mécaniques ou optiques.

**REMARQUE:** Lors de l'utilisation d'appareils de mesure automatiques ou semi-automatiques, se reporter toujours au manuel de l'opérateur, fourni par le fabricant de l'appareil, pour des procédures exactes.

### Condicions de conservation et stabilité

Les réactifs soéils sont stables à des températures de 2 à 8°C jusqu'à la date de préemption imprimée sur l'étiquette. Eviter la contamination des réactifs par des microorganismes.

- Plasma V-DEF** Stable après la reconstitution pendant 8 heures à 15-25°C, pendant 24 heures à 2-8°C ou pendant 3 mois à -20°C ou à des températures inférieures dans le flacon d'origine. \*Voir REMARQUE.

## COATEST™ APC™ Resistance V S - 82 3138 63

### Uso

Determinazione della resistenza alla proteina C attivata (APC), causata dalla mutazione del fattore V:Q<sup>606</sup> (fattore V Leiden), nel plasma di soggetti non trattati e di pazienti in terapia anticoagulante orale (TAO) o in terapia eparinica.

### Introduzione

Il fenotipo APC resistente<sup>1,2</sup> è dovuto, in oltre il 90% dei casi a una mutazione nel gene del fattore V che comporta una sostituzione dell' Arginina<sup>506</sup> (R) con una Glicina (Q) nella proteina fattore V.<sup>3,5</sup> La selettività per il fattore V Leiden, o altre mutazioni nel gene del fattore V che rendono la proteina resistente all'inattivazione da parte della APC<sup>6</sup>, è aumentata dalla normalizzazione delle concentrazioni di altre proteine plasmatiche coinvolte nella formazione e nella regolazione della trombina. Perciò, eseguendo test di resistenza alla APC basati su APTT in presenza di un eccesso di plasma carente di fattore V, la sensibilità e la specificità per la mutazione Leiden sono significativamente aumentate. Inoltre, questa modificazione permette di analizzare i plasmi di pazienti in terapia anticoagulante orale.<sup>7-11</sup>

### Principio del metodo

Il plasma campione è precluido nel plasma carente di fattore V e incubato con il reagente APTT per un tempo standard. La coagulazione si inizia all'aggiunta di CaCl<sub>2</sub> in assenza e in presenza della APC, quindi si registra il tempo necessario alla formazione del coagulo.

### REAGENTI

- V-DEF Plasma** 2 filea Plasma umano liofilizzato e stabilizzato con bassi livelli di attività di fattore V, contenente Polybren® come antagonista eparinico. Reconstituire con 4,0 mL di aqua NCCLS tipo II.<sup>12</sup> Lasciare a temperatura ambiente (20-25°C) per 30 minuti. Miscelare delicatamente prima dell'uso.
- CaCl<sub>2</sub>** 2 filea 2 mL di calcio cloruro, 0,025 mol/L, in tampone Tris contenente albumina serica bovina 0,5%.
- Reagente APTT** 2 filea 4 mL di fosfolipidi purificati, con sílice colloidale come attivatore di contatto. Contiene conservanti. Miscelare accuratamente su un vortex prima dell'uso.
- APC/CaCl<sub>2</sub>** 2 filea Proteina C attivata umana co-fofilizzata con CaCl<sub>2</sub>. Ricostituire con 2,0 mL di acqua NCCLS tipo II.<sup>12</sup> Lasciare a temperatura ambiente (20-25°C) per 30 minuti e miscelare delicatamente prima dell'uso.
- Plasma di controllo Livello 1** 1 filea Plasma umano liofilizzato. Ricostituire con 1,0 mL di acqua NCCLS tipo II.<sup>12</sup> Lasciare a temperatura ambiente (20-25°C) per 30 minuti e miscelare delicatamente prima dell'uso.
- Plasma di controllo Livello 2** 1 filea Plasma umano liofilizzato. Ricostituire con 1,0 mL di acqua NCCLS tipo II.<sup>12</sup> Lasciare a temperatura ambiente (20-25°C) per 30 minuti e miscelare delicatamente prima dell'uso.

**I reagenti 3 e 4 non sono intercambiabili fra lotti diversi.**

**V-DEF Plasma** (art. N° 82 3146 63), **Plasma di controllo Livello 1** (art. N° 82 2650 63) e **Plasma di controllo Livello 2** (art. N° 82 2668 63) sono disponibili anche separatamente dalla CHROMOGENIX.

**ATTENZIONE:** Ciascuna unità di donatore utilizzata nella preparazione di un reagente di origine umana è stata testata con metodi approvati dalla FDA per la presenza di anticorpi anti HIV 1 e 2, per l'antigene di superficie dell'epatite B ed epatite C, ed è stata trovata negativa. Comunque, poiché nessun test è in grado di escludere completamente la presenza di questi agenti infettivi trasmessi per via ematica, l'impiego e l'eliminazione di reagenti di origine umana utilizzati in questo prodotto, richiedono attenzione.

Simbolo di pericolo: **nessuno**

Frasi di rischio: **nessuno**

Consigli di prudenza: **nessuno**

Per l'impiego diagnostico in vitro.

**Materiali necessari ma non forniti:**

- Acqua desionizzata, filtrata attraverso membrane da 0,22 µm o NCCLS tipo II.<sup>12</sup>
- Pipette di precisione.
- Coagulometri automatici o semiautomatici a determinazione ottica o meccanica.

NOTA: Nel caso di utilizzo di strumenti automatici o semiautomatici, riferirsi sempre al manuale dell'operatore, fornito dalla azienda produttrice, per l'esatta procedura.

### Conservazione e stabilità

I reagenti sigillati sono stabili a 2-8°C fino alla data di scadenza stampata sull' etichetta. Evitare la contaminazione dei reagenti da parte dei microorganismi.

- V-DEF Plasma** Stabilità dopo ricostituzione: 8 ore a 15-25°C, 24 ore a 2-8°C, 3 mesi a -20°C o a temperatura inferiore conservato nel flacone originale. \*Vedi NOTA.
- Una volta aperto rimane stabile 7 giorni a 15-25°C o un mese a 2-8°C.

### Reagente APTT

- Una volta aperto rimane stabile 7 giorni a 15-25°C o un mese a 2-8°C. Non congelare.

- CaCl<sub>2</sub>** Stabilità una vez abierto: 7 días a 15-25°C o 1 mes a 2-8°C en el vial original.
- APTT reactivo** Estabilidad después de reconstituido: 7 días a 15-25°C o 1 mes a 2-8°C en el vial original. No congelar.
- APC/CaCl<sub>2</sub>** Estabilidad después de reconstituido: 6 horas a 2-25°C o 3 meses a -20°C o temperatura inferior en el vial original. \*Ver NOTA.
- Control Plasma Nivel 1** Estabilidad después de reconstituido: 6 horas a 2-25°C o 3 meses a -20°C o temperatura inferior en el vial original. \*Ver NOTA.
- Control Plasma Nivel 2** Estabilidad después de reconstituido: 6 horas a 2-25°C o 3 meses a -20°C o temperatura inferior en el vial original. \*Ver NOTA.

\*NOTA: El reactivo congelado debería ser atemperado a 37°C. Agitar suavemente antes de usar. No volver a congelar.

### Controles de calidad

Deben usarse los Plasmas Control Nivel 1 y Nivel 2 para la validación de las series de pruebas. El Nivel 1 muestra una respuesta normal a APC mientras que el Nivel 2 muestra una respuesta consecuente a la presencia de la mutación V:Q<sup>606</sup>. Los rangos de valores esperados para las razones de APC-V están especificados para cada lote. Si se obtienen valores fuera de este rango debe realizarse una revisión completa de los reactivos y de la funcionalidad del instrumento y deben repetirse los análisis.

### Correlación de los calibradores y materiales de control.

Los valores obtenidos se determinaron mediante múltiples mediciones en ACL Futura usando un lote específico de reactivo y con un estándar interno. En el aso del ensayo de APCR-V, el estándar internacional aún no está disponible. Lo valores se han asignado frente al estándar interno, el cual es correlacionable con muestras de plasma congelado que se han determinado como homocigóticas y heterocigóticas para APCR.

### Toma de muestras

El paciente debe haber estado en reposo durante al menos diez minutos antes de tomar la muestra. Recoger la sangre (9 volúmenes) en 0,1 mol/L de citrato de sodio (1 volumen) y centrifugar dentro de las 24 horas siguientes a 2.000 x g durante 20 minutos a temperatura ambiente. Evitar la contaminación del plasma con células que forman parte de la capa de separación. Analizar el plasma dentro de las 25 horas siguientes a la toma de muestras.<sup>12</sup> Como alternativa, puede congelarse rápidamente a -70°C en alícuotas de 1 mL o menos, y almacenar durante menos de tres años a -70°C. Las muestras no deben almacenarse en un congelador de descongelación automática, y no deben ser descongeladas y congeladas nuevamente antes de la prueba.

Las muestras deben tratarse como potencialmente infecciosas. Para más informacion ver el documento H21-A3 NCCLS.<sup>14</sup>

### Procedimiento

- Todos los reactivos deben estar a temperatura ambiente antes de usar. Las muestras de plasma congelado deben ser rápidamente atemperadas a 37°C de manera estandarizada asegurando que la pérdida de actividad de los factores líbiles de coagulación sea negligible y haya ausencia de criocepitulado.
- Precalentar un volumen suficiente de CaCl<sub>2</sub> y APC/CaCl<sub>2</sub> a 37±0,5°C.
- Prediluir un volumen de la muestra de plasma o de Plasma Control con 4 volúmenes de Plasma DEF-V. Analizar la predilución de las muestras plasmáticas dentro de 45 minutos.
- Añadir un volumen de plasma en un tubo de ensayo o cubeta, entonces añadir un volumen igual de reactivo APTT. Incubar a 37°C durante 5 min. Aquellos instrumentos con diferente programación, se debería poder incubar durante al menos 3 minutos.
- Añadir un volumen de CaCl<sub>2</sub> y simultáneamente empezar a cronometrar el tiempo de formación de coágulo. Registrar el tiempo de formación del coágulo.
- Llevar a cabo un segundo análisis con el plasma, intercambiando el CaCl<sub>2</sub> por APC/CaCl<sub>2</sub> y registrar el tiempo de formación del coágulo.

### Resultados

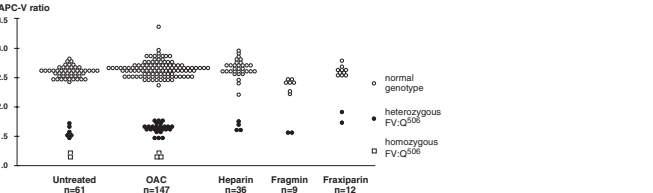
Calcular la razón de APC relativa al factor V para las muestras y controles:

<p> Tempo de coagulación APC/CaCl<sub>2</sub></p>	<p> Tempo de coagulación CaCl<sub>2</sub></p>
---	---

Razón APC =

La resistencia a la APC debida a la mutación FV:Q<sup>606</sup> sucede cuando la razón de APC-V es inferior o igual al valor de corte (ver calibración). Los siguientes resultados ilustran la aplicabilidad del ensayo de Coatest APC Resistance 5 en el análisis de plasmas de individuos sin tratamiento, pacientes sometidos a terapias de anticoagulantes orales (TAO), INR: 1.3-6,0 (TAO) y pacientes recibiendo heparina no fraccionada (Heparina) o heparinas de bajo peso molecular (las que se muestran son: Fragmin® y Fraxiparin®).

#### ESPAÑOL - Revisión Folleto 03/2013



Las razones de APC-V de las muestras estan distribuidas respecto al genotipo del factor V. Para un genotipo dado, se obtienen similares razones de APC-V para un grupo de pacientes. Los valores medios tipicos son: 2,6 (normal), 1,7 (heterocigotos FV:Q<sup>606</sup>) y 1,2 (homocigotos FV:Q<sup>606</sup>). Los tiempos de APT basal para individuos sin tratamiento podrían diferir moderadamente cuando se comparan con el ensayo original de Coatest APC Resistance.

### Características de rendimiento

#### REPETIBILIDAD Y PRECISIÓN

Las razones de APC-V son calculadas a partir de 22 análisis individuales de Plasma Control Nivel 1 en un instrumento ACL utilizando 11 combinaciones diferentes de reactivos en 11 ocasiones diferentes.

Razón APC-V	Dentro de la serie	De una a otra serie
-------------	--------------------	---------------------

Plasma de control nivel 1 2,4 CV 4% CV 4%
Análisis duplicados de plasma de un total de 630 individuos en tres diferentes tipos de instrumento (ST-4, Thrombolyzer y MLA/Electra 900) dan un resultado intra series de CV 3% y 5% para los tiempos de coagulación obtenidos en ausencia y presencia de APC respectivamente. NCCLS referencs EP5-T2.<sup>15</sup>

### Calibración

Las razones obtenidas con el método Coatest APC Resistance 5 son más bajas que las razones obtenidas con el método Coatest APC Resistance, independientemente del instrumento usado. Se recomienda que cada usuario establezca el funcionamiento de su propio instrumento y determine el valor de corte de la resistencia a la APC relativa al factor V a través del siguiente proceso:

- Realizar cinco determinaciones independientes de razones de APC-V, ensayando al menos series por triplicado, de una muestra de plasma con respuesta normal de APC. Confirmar que la variación inter e intra ensayos de la razón de APC-V es inferior al 7%.
En el caso de que ya se haya establecido un buen funcionamiento de la técnica con el método original Coatest APC Resistance, este paso podría ser omitido.
- Determinar las razones de APC-V de al menos 30 muestras de plasmas procedentes de individuos sanos con edad comprendida entre 20-65 años. Incluir Plasma Control Nivel 1 y Plasma Control Nivel 2 para validar el ensayo.
- Verificar que las razones de APC-V para los plasmas control están dentro de sus rangos específicos.
- Calcular la razón mediana de APC-V.
- Calcular el valor de corte de la resistencia a la APC relativa al factor V como 0,8 veces la media de la razón de APC-V cuando es más bajo que 2,8 y como 0,75 veces la media de la razón de APC-V cuando es 2,8 o más alto.
- La razón de APC-V para el Plasma Control Nivel 1 debería estar dentro del rango normal. La razón de APC-V para el Plasma Control Nivel 2 debería ser inferior al valor de corte.

### Sensibilidad

Coatest APC Resistance 5 proporciona un 100% de sensibilidad para FV:Q<sup>606</sup> determinado en Thrombolyzer (n = 447), ACL (n = 295), ST-4 (n = 248) y MLA/Electra (n = 50).

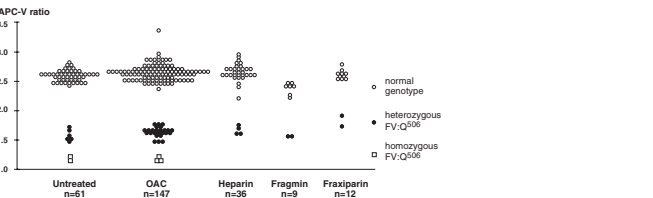
### Limitaciones/factores de interferencia

No hay interferencias significativas entre los resultados obtenidos entre muestras de plasma fresco y congelado. La sensibilidad y especificidad para la mutación del factor V:Q<sup>606</sup> en el análisis de plasma de pacientes con (TAO) no está afectada por el valor de INR. El procedimiento descrito para el ensayo permite el análisis de plasma de pacientes heparinizados con niveles de heparina de 1 U/mlr, en plasma (heparina no fraccionada y de bajo peso molecular). Aunque la predilución 1+4 disminuye drásticamente las interferencias, no puede ser excluido que el análisis de plasmas de pacientes con una alta actividad inhibidora (anticuerpos contra fosfolípidos) tengan un tiempo de APT anormal y entonces podrían obtenerse falsos resultados. En algunos casos aumentando el factor de dilución (e.g. 1+9 o 1+19) puede corregirse el resultado del test. Al hacer el ensayo de APTT es conveniente evitar la activación por contacto de las muestras ya que podría provocar la activación del FVIII y FV.

### Valores de referencia

Las razones de APC-V obtenidas en el análisis de plasma de 61 individuos sanos en ACL y ST-4 y de 390 individuos sanos en Thrombolyzer están en el rango 2-3,5. No se han encontrado diferencias entre sexos.

#### FRANÇAIS - Révision de la notice 03/2013



Les rapports de APC-V des prélèvements sont distribués selon le génotype du facteur V. Pour un génotype donné, des rapports de APC-V analogues sont obtenus, indépendamment du groupe de patients. Les médianes typiques sont les suivantes: 2,6 (génotype normal), 1,7 (FV:Q<sup>606</sup> hétérozygote) et 1,2 (FV:Q<sup>606</sup> homozygote). Les temps de céphaline-kaolin de base peuvent présenter des différences modérées chez les sujets non traités par rapport au Coatest de résistance à l'APC initial.

### Evaluation du coffret

#### REPETIBILITE ET PRECISION

Les rapports APC-V ont été calculés à partir de 22 différentes analyses en double de plasma témoin de niveau 1 sur un appareil de mesure ACL utilisant 11 différents combinaisons de réactifs à 11 occasions différentes.

Rapport APC-V	Intra-série	Interséries
---------------	-------------	-------------

Contrôle plasmatique 1 2,4 CV 4% CV 4%

Les analyses en double de plasma prélevé chez un ensemble de 630 sujets effectuées à l'aide de trois différents types d'appareils de mesure (ST-4, Thrombolyzer et MLA/Electra 900) ont donné lieu à un CV intra-série 3% et 5% pour les temps de coagulation obtenus respectivement en l'absence et en présence d'APC. Référence EP5-T2 du NCCLS.<sup>15</sup>

### Étalonnage

Les rapports de l'APC-V, obtenus par la méthode COATEST APC Resistance V sont plus faibles que les rapports de l'APC, obtenus par la méthode COATEST APC Resistance, indépendamment de l'appareil de mesure utilisé. Il est recommandé à chaque utilisateur d'établir les performances de son propre appareil de mesure et de déterminer la valeur-seuil de résistance à l'APC liée au facteur V à l'aide de la procédure suivante:

- Procéder à 5 déterminations indépendantes du rapport de l'APC-V en utilisant au moins des déterminations triples dans chaque série sur un prélèvement de plasma présentant une réponse normale à l'APC. Confirmer que la variation inter-dosages et intra-dosage du rapport de l'APC-V est inférieure à 7%. Si des performances satisfaisantes ont déjà été établies par la méthode COATEST APC Resistance, cette étape peut être supprimée.
- Déterminer les rapports de l'APC-V d'au moins 30 plasmas, prélevés chez des sujets sains d'un âge compris entre 20 et 65 ans. Inclure le contrôle plasmatique 1 et 2 pour la validation des tests.
- Vérifier que les rapports de l'APC-V des contrôles sont compris dans les limites de leurs gammes spécifiées.
- Calculer le rapport de l'APC-V médian.
- Calculer la valeur-seuil de résistance à l'APC liée au facteur V en multipliant le rapport de l'APC-V médian par 0,8, s'il est inférieur à 2,8 et en multipliant le rapport de l'APC-V médian par 0,75 s'il est égal ou supérieur à 2,8.
- Le rapport de l'APC-V pour le contrôle plasmatique 1 devra être compris dans les limites de la gamme normale. Le rapport de l'APC-V pour le contrôle plasmatique 2 devra être inférieur à la valeur-seuil.

### Sensibilité

Le test COATEST APC Resistance V présente une sensibilité de 100% pour FV:Q<sup>606</sup> effectué à l'aide de Thrombolyzer (n = 447), ACL (n = 295), ST-4 (n =

**COATEST APC Resistance VS 82 3138 63**

---

Printed Insert Sheet: 302251  
Revision: R3  
Issued: 03/2013  
C.O.: 433362

**LANGUAGES**

---

ENGLISH  
DEUTSCH  
ESPAÑOL  
FRANÇAIS  
ITALIANO  
PORTUGÊES  
DANSK  
SWENSK  
GREEK

**TECHNICAL SPECS**

---

PAPER: White paper, 50-60 g/m<sup>2</sup> weight. SIZE: 11 x 17" (280 x 432 mm.).  
PRINT: Front/Back. PRINT COLOR: Top rule Orange Pantone 137, all remaining type in black  
Back - All type in black.