

Intended use

For determination of resistance to activated protein C (APC), caused by the factor V:Q506 (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^{1,2} is in more than 90% of the cases due to a mutation in the factor V gene, resulting in a replacement of Arg⁵⁰⁶ (R) with Gln (Q) in the factor V protein.³⁻⁵ The selectivity for the factor V:Q506, or other mutations in the factor V gene rendering the protein resistant to inactivation by APC⁶, 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:Q506 mutation is significantly increased. Further, this modification allows for the analysis of plasma from patients who are on OAC therapy.⁷⁻¹¹

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 CaCl₂ in the absence and presence of APC and the time for dot formation is recorded.

Reagents

- V-DEF Plasma:** 4 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 water¹². Allow to stand for 30 minutes at 20-25°C. Swirl gently before use.
- CaCl₂:** 1 vial - 8 mL of calcium chloride, 0.025 mol/L, in Tris buffer containing 0.5% bovine serum albumin.
- APTT reagent:** 1 vial - 16 mL of purified phospholipids with colloidal silica as contact activator. Contains a preservative. Mix thoroughly on a Vortex mixer before use.
- APC/CaCl₂:** 4 vials - Human activated protein C colyophilized with CaCl₂. Reconstitute with 2.0 mL of NCCLS type II water¹². 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 water¹². 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 water¹². 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 (Cat. No. 82 3146 63), Control Plasma Level 1 (Cat. No. 82 2650 63) and Control Plasma Level 2 (Cat. No. 82 2668 63) are also available separately from Chromogenix.

Caution

APC/Calcium chloride, APC Control Plasma Levels 1 and 2, and Factor V Reagent Plasma contain human source material that tested non-reactive for HIV antibody, Hepatitis B Surface Antigen and Anti-HCV at the donor stage. This product, as with all human based specimens, should be handled with proper laboratory safety procedures to minimize the risk of transmission of infectious disease.

APC/Calcium chloride and Calcium chloride contain bovine material. All donor animals were sourced from BSE-free herds. The cattle received ante- and post-mortem health inspection by a veterinarian, and they were apparently free from infectious and contagious material. However, the material should be treated as potentially infectious.

Calcium Chloride

WARNING
Hazard class: Skin Sens. 1, H317. Aquatic Chronic 3, H412
Hazardous ingredients: Reaction mass of 5-chloro-2-methyl-2H-isothiazol-3-one and 2-methyl-2H-isothiazol-3-one (3:1) (CIT/MIT).

Hazard statements: H317: May cause an allergic skin reaction. H412: Harmful to aquatic life with long lasting effects.

Precautionary statements: P272: Contaminated work clothing should not be allowed out of the workplace. P273: Avoid release to the environment. P280: Wear protective clothing, protective gloves. P302+P352: IF ON SKIN: Wash with plenty of water. P333+P313: If skin irritation or rash occurs: Get medical advice/attention. P362+P364: Take off contaminated clothing and wash it before reuse.

APC/CaCl₂

DANGER
Hazard class: Resp. sens. 1, H334
Hazard statements: H334: May cause allergy or asthma symptoms or breathing difficulties if inhaled.

Precautionary statements: P261: Avoid breathing dust/fume. P304 + P340: IF INHALED: IF breathing is difficult, remove person to fresh air and keep comfortable for breathing. P342 + P311: If experiencing respiratory symptoms: Call a POISON CENTER/doctor. P501: Dispose of contents/container in accordance with local/regional/national/international regulation.

Supplemental hazard information: EUH 208: Contains APC (Activated Protein C). May produce an allergic reaction. EUH 210: Safety data sheet available on request. Up to 3.97% of the mixture consists of ingredients of unknown acute toxicity (dermal, inhalation) for the human health and unknown hazard to the aquatic environment.

APTT Reagent, Control Plasma level 1, Control Plasma level 2, V-DEF plasma

Hazard class: none
Hazard statements: none
Precautionary statements: none

Supplemental hazard information:

APTT Reagent: EUH 208: Contains 1,2-benzisothiazolin-3-one. EUH 210: Safety data sheet available on request. May produce an allergic reaction. Up to 20.85% of the mixture consists of component of unknown acute toxicity (oral, dermal, inhalation) for the human health and unknown hazard to the aquatic environment.
Control Plasma level 1: Up to 100% of the mixture consists of component of unknown acute toxicity (oral, dermal, inhalation) for the human health and unknown hazard to the aquatic environment.
Control Plasma level 2: Up to 98,75% of the mixture consists of component of unknown acute toxicity (oral, dermal, inhalation) for the human health and unknown hazard to the aquatic environment.
V-DEF plasma: Up to 98,26% of the mixture consists of component of unknown acute toxicity (oral, dermal, inhalation) for the human health and unknown hazard to the aquatic environment.
 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.¹³
 — 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.
- CaCl₂:** 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/CaCl₂:** 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:Q506 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-R V 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

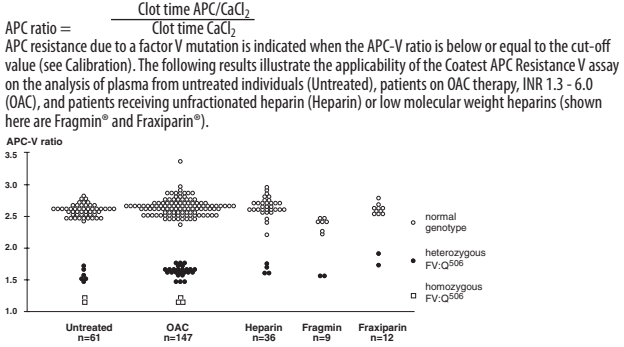
The patient should be at rest for 10 min. before sampling. Collect blood (9 volumes) in 0.1 mol/L sodium citrate (1 volume) and centrifuge within 24 hours at 2000 x g for 20 min. at room temperature. Take care to avoid contamination from the platelet layer into the plasma when the plasma is separated from the cells. Analyse the plasma within 25 hours from blood sampling.¹³ 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-A3.¹⁴

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 CaCl₂ and APC/CaCl₂ 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 should be analysed 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 CaCl₂ and simultaneously begin timing of clot formation. Record the time for clot formation.
- Perform a second analysis on the plasma, exchanging CaCl₂ with APC/CaCl₂ and record the time for clot formation.

Results

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



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:Q506) and 1.2 (homozygous FV:Q506). 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.

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

Duplicate analyses of plasma from altogether 630 individuals on three different types of instruments (ST-4, Thrombolyzer and mL/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-T2.¹⁵

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:Q506 as determined on Thrombolyzer (n = 447), ACL (n = 295), ST-4 (n = 248) and mL/Electra (n = 50).

Limitation/interfering factors

No significant differences are obtained between fresh and frozen samples. The sensitivity and specificity for the factor V:Q506 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 APTT-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.

Verwendungszweck

Zur Bestimmung der, durch die Faktor V:Q506 (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^{1,2} sind durch eine Mutation im Faktor V Gen erklärbar. Diese Mutation führt, genau an einer Spaltstelle durch aktiviertes Protein C, zu einer Aminosäuresubstitution (Arg⁵⁰⁶→Gln) im Faktor V Protein³⁻⁵. 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 V⁶ wird durch Normalisierung der Konzentration anderer, bei der Bildung und Regulierung von Thrombin beteiligten, Plasmaproteinen erhöht. Durch die Vorverdünnung der Patientenplasmen mit V-DEF Plasma wird die Sensitivität und Spezifität des, auf dem Grundprinzip der APTT-Messung aufbauenden, APC Resistenz Tests für die Faktor V:Q506 Mutation signifikant erhöht. Außerdem ermöglicht die Vorverdünnung auch die Testung von Patienten unter oraler Antikoagulationstherapie⁷⁻¹¹.

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 CaCl₂ mit und ohne APC gemessen.

Reagenzien

- V-DEF Plasma:** 4 Flaschen - Stabilisiertes, lyophilisiertes humanes Plasma mit einer niedrigen Faktor-V Restaktivität und Polybrene® als Heparinantagonist. Auflösen mit 4,0 mL Wasser NCCLS Typ II.¹² 30 Minuten bei Raumtemperatur stehen lassen. Vor Verwendung vorsichtig durchmischen.
- CaCl₂:** 1 Flasche - 8 mL Calciumchlorid, 0,025 mol/L in Trispufler mit 0,5% Rinderserumalbumin.
- APTT Reagenz:** 1 Flasche - 16 mL gereinigte Phospholipide mit kolloidalem Silika als Kontaktaktivator. Enthält ein Konservierungsmittel. Vor Verwendung vorsichtig auf einem Vortex Mixer durchmischen.
- APC/CaCl₂:** 4 Flaschen - Humanes aktiviertes Protein C, lyophilisiert in Kombination mit CaCl₂. Auflösen mit 2,0 mL Wasser NCCLS Typ II.¹² 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.¹² 30 Minuten bei Raumtemperatur stehen lassen und vor Verwendung vorsichtig durchmischen.
- Kontrollplasma Level 2:** 1 Flasche - Lyophilisiertes humanes Plasma. Auflösen mit 1,0 mL Wasser NCCLS Typ II.¹² 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 (Art. Nr. 82 2668 63) sind auch separat von Chromogenix erhältlich.

Achtung

APC/Calcium chloride, APC Control Plasma Levels 1 und 2, und Factor V Reagent Plasma enthält Material menschlichen Ursprungs, das zum Zeitpunkt der Spende untersucht wurde und sich hinsichtlich der HIV- und HCV-Antikörper sowie des HBsAg als nicht reaktiv erwiesen hat. Dieses Produkt muss, wie für alle Proben menschlichen Ursprungs entsprechend gemessener Laborverfahren behandelt werden, um das Risiko einer Übertragung infektiöser Erkrankungen, so weit wie möglich einzuschränken.

APC/Calcium chloride und Calcium chloride enthält Rindermaterial. Alle Spendertiere stammen aus Zuchtbetrieben, die frei von ESB sind; vor und nach dem Tod werden sie tierärztlich untersucht und sind frei von infektiösen bzw. ansteckenden Mitteln. Dennoch muss das Produkt als potentiell infektiös eingeschätzt werden.

Calcium Chloride

ACHTUNG
Gefahrenklasse: Sensibilisierung der Haut, Kategorie 1, H317. Chronisch gewässergefährdend, Kategorie 3, H412.
Gefährliche Inhaltsstoffe: Reaction mass aus: 5-Chlor-2-methyl-2H-isothiazol-3-on und 2-Methyl-2H-isothiazol-3-on (3:1) (CIT/MIT).

Gefahrenhinweise: H317: Kann allergische Hautreaktionen verursachen. H412: Schädlich für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung.

Sicherheitshinweise: P272: Kontaminierte Arbeitskleidung nicht außerhalb des Arbeitsplatzes tragen. P273: Freisetzung in die Umwelt vermeiden. P280: Schutzkleidung, Schutzhandschuhe tragen. P302+P352: Bei BERÜHRUNG MIT DER HAUT: Mit viel Wasser waschen. P333+P313: Bei Hautreizung oder -ausschlag: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen. P362+P364: Kontaminierte Kleidung ausziehen und vor erneutem Tragen waschen.

APC/CaCl₂

GEFAHR
Gefahrenklasse: Resp. sens. 1, H334
Gefahrenhinweise: H334: Kann bei Einatmen Allergie, asthmaartige Symptome oder Atembeschwerden verursachen.

Sicherheitssätze: P261: Einatmen von Staub/Rauch vermeiden. P304 + P340: BEI EINATMEN: Bei Atembeschwerden an die Person an die frische Luft bringen und für ungehinderte Atmung sorgen. P342 + P311: Bei Symptomen der Atemwege: GIFTINFORMATIONENZENTRUM/Arzt anrufen. P501: Inhalt/Behälter gemäß lokalen/regionalen/nationalen/internationalen Vorschriften zuführen.

Ergänzende Gefahrenmerkmale: EUH 208: Enthält APC (Activated Protein C). Kann allergische Reaktionen hervorrufen. EUH 210: Sicherheitsdatenblatt auf Anfrage erhältlich. Bis 3,97% dieses Gemisches besteht aus Inhaltsstoffen, deren akute Toxizität (dermal, inhalatorische) für den Menschen und die Gewässer nicht bekannt ist.

APTT Reagent, Control Plasma level 1, Control Plasma level 2, V-DEF plasma

Gefahrenklasse: Keine
Gefahrenhinweise: Keine
Sicherheitssätze: Keine

Ergänzende Gefahrenmerkmale:

APTT Reagent: EUH 208: Enthält 1,2-benzisothiazolin-3-one. EUH 210: Sicherheitsdatenblatt auf Anfrage erhältlich. Kann allergische Reaktionen hervorrufen. Bis 20,85% dieses Gemisches besteht aus Inhaltsstoffen, deren akute Toxizität (orale, dermal, inhalatorische) für den Menschen und die Gewässer nicht bekannt ist.
Control Plasma level 1: Bis 100% dieses Gemisches besteht aus Inhaltsstoffen, deren akute Toxizität (orale, dermal, inhalatorische) für den Menschen und die Gewässer nicht bekannt ist.
Control Plasma level 2: Bis 98,75% dieses Gemisches besteht aus Inhaltsstoffen, deren akute Toxizität (orale, dermal, inhalatorische) für den Menschen und die Gewässer nicht bekannt ist.
V-DEF plasma: Bis 98,26% dieses Gemisches besteht aus Inhaltsstoffen, deren akute Toxizität (orale, dermal, inhalatorische) für den Menschen und die Gewässer nicht bekannt ist.
 Dieses Produkt ist nur für die *in vitro* Diagnostik geeignet.

Zusätzlich benötigte Materialien

- Entionisiertes Wasser 0,22 µm filtriert oder Wasser NCCLS Typ II.¹²
- Kalibrierte Pipetten.
- Gerinnungsmeßgerät zur Bestimmung der Gerinnungszeit. Automatische bzw. halbautomatische Gerinnungsmeßgeräte mit mechanischer oder optischer Messmethodik können verwendet werden.

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

Haltbarkeit 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:** Haltbarkeit 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.
- CaCl₂:** Haltbarkeit der geöffneten Flasche: 1 Woche bei 15-25°C oder 1 Monat bei 2-8°C in der Originalflasche.
- APTT Reagenz:** Haltbarkeit der geöffneten Flasche: 1 Woche bei 15-25°C oder 1 Monat bei 2-8°C in der Originalflasche. Nicht einfrieren!
- APC/CaCl₂:** Haltbarkeit 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:** Haltbarkeit 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:** Haltbarkeit nach dem Lösen: 6 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:Q506 Mutation entsprechende, Reaktion zeigt. Die zu erwartenden APC-V Ratio Kontrollbereiche sind im chargenspezifischen Beipacktext 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 Laborstandard auf gefrorene Plasmaproben zurückführbar, die als homozygot bzw. heterozygot für APC-Resistenz nachgewiesen wurden.

Probengewinnung

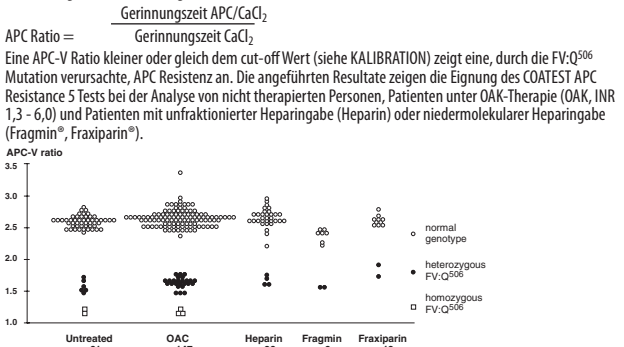
Die Blutabnahme vornehmen, nachdem sich der Patient 10 Minuten ausgeruhet hat. Das Blut (9 Teile) in Natriumcitrat (0,1 mol/L - 1 Teil) geben und innerhalb von 24 Stunden bei 2000 x g und Raumtemperatur zentrifugieren. Das Plasma vorsichtig - ohne Durchmischung mit Thrombozyten - von den Zellen trennen. Die Plasma-Untersuchung muß innerhalb von 25 Stunden nach der Blutabnahme erfolgen.¹³ 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 gelagert, 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.¹⁴

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 Kryoprecipitaten zu vermeiden.
- Die benötigten Volumina CaCl₂ und APC/CaCl₂ auf 37±0,5°C vorwärmen.
- 1 Teil 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 Küvette 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 CaCl₂ hinzufügen und gleichzeitig mit der Zeitmessung bis zur Fibrinbildung beginnen.
- Einen zweiten Ansatz mit APC/CaCl₂ anstelle von CaCl₂ durchführen und abermals die Zeit bis zur Fibrinbildung stoppen.

Resultate

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



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 (normaler Genotyp), 1,7 (heterozygoter FV:Q506) und 1,2 (homozygoter FV:Q506). Die Ausgangs- APTT bei 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 Gerinnungsautomaten getestet.

APC-V Ratio	Innerhalb der Serien	Zwischen den Serien
2,0	CV ≤ 4%	CV ≤ 4%

Doppelbestimmungen der Plasmen von 630 Personen auf drei verschiedenen Instrumenten (ST-4, Thrombolyzer und mL/Electra 900) ergaben einen CV innerhalb der Serie von ≤ 3% bzw. ≤ 5% für die Gerinnungszeiten ohne bzw. mit APC. NCCLS Referenz EP5-T2.¹⁵

Kalibrierung

Im Vergleich zur COATEST APC Resistance Originalmethode werden mit der V-DEF Plasma Methode niedrigere Ratios

Uso

Para la determinación de la resistencia a la proteína C activada (APC), causada por la mutación en el factor V:Q⁵⁰⁶ (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^{1,2} 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 Arg⁵⁰⁶ (R) por Gln (Q) en la proteína del factor V.³⁻⁵ La selectividad en el factor V:Q⁵⁰⁶ u otras mutaciones en el gen del factor V que produzcan la resistencia de la proteína a la inactivación por AP^C, 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 cabo el APTT en 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:Q⁵⁰⁶ aumenta significativamente. Además, esta modificación permite el análisis de plasma de pacientes que están con terapias de (TAO).⁷⁻¹¹

Fundamento del método

La muestra de plasma es prediluida en Plasma DEF-V e incubada con el reactivo APTT durante un periodo de tiempo estándar. La coagulación se inicia al añadir CaCl₂ en ausencia y presencia de APC y se registra el tiempo de formación del coágulo.

Reactivos

- V-DEF Plasma:** 4 viales - Plasma humano estabilizado y liofilizado, con un bajo nivel de actividad en factor V, conteniendo el antagonista de la heparina Polibrene®. Reconstituir con 4 mL de agua NCCLS tipo II.¹² Se puede mantener 30 min a 20-25°C. Agitar suavemente antes de usar.
 - CaCl₂:** 1 vial - 8 mL de cloruro cálcico, 0.025 mol/L, en tampón Tris conteniendo 0.5% de albúmina bovina.
 - APTT reactivo:** 1 vial - 16 mL de fosfolípidos purificados con sílica coloidal como activador de contacto. Contiene un conservante. Agitar vigorosamente en un vórtex antes de usar.
 - APC/CaCl₂:** 4 viales - Proteína C activada humana colifilozada con CaCl₂. Reconstituir con 2 mL de agua NCCLS tipo II.¹² 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.¹² 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.¹² Se puede mantener durante 30 minutos a 20-25°C; agitar suavemente antes de usar.
- * Los reactivos 3 y 4 no son intercambiables entre lotes.**
 Chromogenix suministra también separadamente: V DEF Plasma (N.º de ref. 82 3146 63), Plasma Control Nivel 1 (N.º de ref. 82 2650 63) y Plasma Control Nivel 2 (N.º de ref. 82 2668 63).

Δ Precaución

APC/Calcium chloride, APC Control Plasma Levels 1 y 2, y Factor V Reagent Plasma contiene material de origen humano analizado en el momento de la donación que demostró no ser reactivo a anticuerpos contra el VIH, antígenos de superficie del virus de la hepatitis B y anticuerpos contra HCV. Este producto, como sucede con todas las muestras de origen humano, debe ser tratado según procedimientos de laboratorio adecuados para minimizar el riesgo de transmisión de enfermedades infecciosas.

APC/Calcium chloride y Calcium chloride material de origen bovino. Todos los animales donantes provienen de criaderos libres de BSE, son sometidos a inspección veterinaria antes y después de su muerte y no presentan agentes infecciosos y/o contagiosos. En todo caso, el producto debe ser tratado como potencialmente infectado.

Calcium Chloride

ATENCIÓN
Clase de peligro: Sensibilización cutánea, categoría 1, H317. Peligroso para el medio ambiente acuático — Peligro crónico, categoría 3, H412. **Componentes peligrosos:** mezcla de: 5-cloro-2-metil-2H-isotiazol-3-ona; 2-metil-2H-isotiazol-3-ona (3:1) (CIT/MIT). **Indicaciones de peligro:** H317: Puede provocar una reacción alérgica en la piel. H412: Nocivo para los organismos acuáticos, con efectos nocivos duraderos. **Consejos de prudencia:** P272: Las prendas de trabajo contaminadas no podrán sacarse del lugar de trabajo. P273: Evitar su liberación al medio ambiente. P280 - Llevar prendas de protección, quantes de protección. P302+P352: EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con abundante agua. P333+P313: En caso de irritación o erupción cutánea: Consultar a un médico. P362+P364: Quitar las prendas contaminadas y lavarlas antes de volver a usarlas.

APC/CaCl₂

PELIGRO
Clase de peligro: Resp. sens. 1, H334
Indicaciones de peligro: H334: Puede provocar síntomas de alergia o asma o dificultades respiratorias en caso de inhalación. **Consejos de prudencia:** P261: Evitar respirar el polvo/el humo. P304 + P340: EN CASO DE INHALACIÓN: Si respira con dificultad, transportar a la persona al aire libre y mantenerla en una posición que le facilite la respiración. P342 + P311: En caso de síntomas respiratorios: Llamar a un CENTRO DE TOXICOLOGÍA/médico. P501: Eliminar el contenido/ el recipiente de conformidad con la normativa local, regional, nacional o internacional. **Información suplementaria sobre los peligros:** EUH 208: Contiene APC (Activated Protein C). Puede provocar una reacción alérgica. EUH 210: Puede solicitarse la ficha de datos de seguridad. Hasta el 3,97% de la mezcla está constituido por componentes con una toxicidad aguda (dérmica, por inhalación) para los seres humanos y un peligro para el medio ambiente no conocidos.

APTT Reagent, Control Plasma level 1, Control Plasma level 2, V-DEF plasma
Clase de peligro: Ninguna
Indicaciones de peligro: Ninguna
Consejos de prudencia: Ninguna

Utilization prevue

Détermination de la résistance à la protéine C activée (APC), provoquée par une mutation du facteur V:Q⁵⁰⁶ (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^{1,2} est dû dans plus de 90 % des cas à une mutation du gène du facteur V, provoquée par le remplacement d’Arg⁵⁰⁶ (R) par Gln (Q) au niveau de la protéine du facteur V³⁻⁵. La selectivité pour le facteur V:Q⁵⁰⁶ ou par d’autres mutations au niveau du gène du facteur V, rendant la protéine résistante à l’inactivation par l’APC^C, 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 facteur V:Q⁵⁰⁶ 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.⁷⁻¹¹

Principe de mesure

Le prélevement plasmatique est prédilué dans le 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 CaCl₂ en l’absence et en présence d’APC et le délai nécessaire à la formation du caillot est enregistré.

Reactifs

- Plasma V-DEF :** 4 flacons - Plasma lyophilisé et stabilisé d’origine humaine, comportant un taux faible d’activité du facteur V et contenant Polybrene®, un antagoniste de l’héparine. Reconstituer à l’aide de 4,0 mL eau NCCLS type II.¹² Laisser reposer pendant 30 minutes à une température de 15-25°C. Agiter prudemment avant l’emploi.
- CaCl₂ :** 1 flacon - 8 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 :** 1 flacon - 16 mL de phospholipides purifiés avec de la sílice colloïdale comme activateur de contact. Contient un conservateur. Mélanger soigneusement à l’aide d’un vortex avant l’emploi.
- APC/CaCl₂ :** 4 flacons - Protéine C activée d’origine humaine, colyophilisée avec du CaCl₂. Reconstituer à l’aide de 2,0 mL eau NCCLS type II.¹² 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.¹² 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 II.¹² 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 (Réf. 82 3146 63, AFSSAPS N° S62372) ainsi que le Contrôle plasmatique 1 (Réf. 82 2650 63, AFSSAPS N° M16062) et le Contrôle plasmatique 2 (Réf. 82 2668 63, AFSSAPS N° M17312) peuvent également être fournis séparément par Chromogenix et ses distributeurs.

Δ Precaution

APC/Calcium chloride, APC Control Plasma Levels 1 et 2, et Factor V Reagent Plasma contient du matériel d’origine humaine testé au moment de la donation et qui s’est avéré non réactif vis-à-vis des anticorps anti-VIH, des antigènes de surface du virus de l’hépatite B et des anticorps anti-VHC. Comme pour tous les échantillons d’origine humaine, ce produit doit être traité suivant des procédures de laboratoire appropriées pour réduire au minimum le risque de transmission de maladies infectieuses.

APC/Calcium chloride et Calcium chloride du matériel d’origine bovine. Tous les animaux proviennent d’élevages indemnes d’ESB; ils sont soumis à une inspection sanitaire ante et post mortem et se sont révélés apparemment exempts de matériel infectieux et/ou contagieux. Toutefois, le produit doit être traité comme du matériel potentiellement infectieux.

Calcium Chloride

ATTENZIONE
Clase de danger: Sensibilisation cutanée, catégorie 1, H317. Dangereux pour le milieu aquatique — Danger chronique, catégorie 3, H412. **Composants dangereux :** mélange de : 5-chloro-2-méthyl-2H-isotiazol-3-ona; 2-méthyl-2H-isotiazol-3-ona (3 : 1) (CIT/MIT). **Mentions de danger :** H317 : Peut provoquer une allergie cutanée. H412 : Nocif pour les organismes aquatiques, entraîne des effets néfastes à long terme. **Conseils de prudence :** P272 : Les vêtements de travail contaminés ne devraient pas sortir du lieu de travail. P273 : Éviter le rejet dans l’environnement. P280 : Porter des vêtements de protection, des gants de protection. P302 + P352 : EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU : Laver abondamment à l’eau. P333+P313 : En cas d’irritation ou d’éruption cutanée : consulter un médecin. P362+P364 : Enlever les vêtements contaminés et les laver avant réutilisation.

APC/CaCl₂

DANGER
Clase de danger : Resp. sens. 1, H334
Indicaciones de danger: H334: Peut provoquer des symptômes allergiques ou d’asthme ou des difficultés respiratoires par inhalation. **Conseils de prudence :** P261 : Éviter de respirer les poussières / fumées. P304 + P340 : EN CAS D’INHALATION: s’il y a difficulté à respirer, transporter la personne à l’extérieur et la maintenir dans une position où elle peut confortablement respirer. P342 + P311 : En cas de symptômes respiratoires: Appeler un CENTRE ANTIPOISON / un médecin. P501 : Éliminer le contenu / récipient conformément à la réglementation locale / régionale / nationale / internationale. **Informations additionnelles sur les dangers:** EUH 208: Contient APC (Activated Protein C). Peut produire une réaction allergique. EUH 210: Fiche de données de sécurité disponible sur demande. Jusqu’à 3,97 % de ce mélange est constitué de composants dont la toxicité aiguë (cutanée, par inhalation) pour la santé humaine et l’écotoxicité pour le milieu aquatique sont inconnues.

APTT Reagent, Control Plasma level 1, Control Plasma level 2, V-DEF plasma
Clase de danger : Aucun
Indicaciones de danger : Aucun
Conseils de prudence : Aucun

Información suplementaria sobre los peligros:

APTT Reagent: EUH 208: Contiene 1,2-benzisotiazolín-3-ona. EUH 210: Puede solicitarse la ficha de datos de seguridad Puede provocar una reacción alérgica. Hasta el 20,85% de la mezcla está constituido por componentes con una toxicidad aguda (orale, dérmica, por inhalación) para los seres humanos y un peligro para el medio ambiente no conocidos.

Control Plasma level 1: Hasta el 100% de la mezcla está constituido por componentes con una toxicidad aguda (orale, dérmica, por inhalación) para los seres humanos y un peligro para el medio ambiente no conocidos.

Control Plasma level 2: Hasta el 98,75 de la mezcla está constituido por componentes con una toxicidad aguda (orale, dérmica, por inhalación) para los seres humanos y un peligro para el medio ambiente no conocidos.

V-DEF plasma: Hasta el 98,26 de la mezcla está constituido por componentes con una toxicidad aguda (orale, dérmica, por inhalación) para los seres humanos y un peligro para el medio ambiente no conocidos. 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.¹²
- Pipetas calibradas.
- Instrumentos de coagulación automáticos o semi-automáticos que empleen métodos de detección óptico o mecánico.

NOTA: Cuando usamos 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.
- CaCl₂:** Estabilidad 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/CaCl₂:** Estabilidad después de reconstituido: 2 horas a 37°C, 8 horas a 15-25°C, 5 días a 2-8°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.

Contrales 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:Q⁵⁰⁶. 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 uso del ensayo de APC-RV, 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.

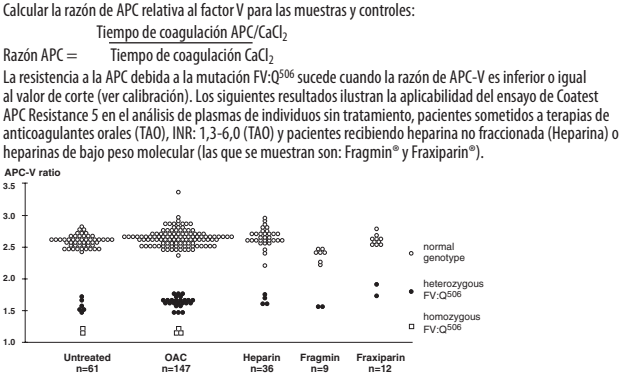
Toma de muestras

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.¹³ 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 información ver el documento H21-A3 NCCLS.¹⁴

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 lábiles de coagulación sea negligible y haya ausencia de crioprecipitado.
- Precalentar un volumen suficiente de CaCl₂ y APC/CaCl₂ 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 CaCl₂ 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 CaCl₂ por APC/CaCl₂ y registrar el tiempo de formación del coágulo.

Resultados



Las razones de APC-V de las muestras están 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 típicos son: 2,6 (normal), 1,7 (heterocigotos FV:Q⁵⁰⁶) y 1,2 (homocigotos FV:Q⁵⁰⁶). 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
Control Plasma Level 1	2,4	≤4 %	≤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 reference EP5-T2.¹⁵

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:Q⁵⁰⁶ determinado en Thrombolyzer (n = 447), ACL (n = 295), ST-4 (n = 248) y MLA/Electra (n = 50).

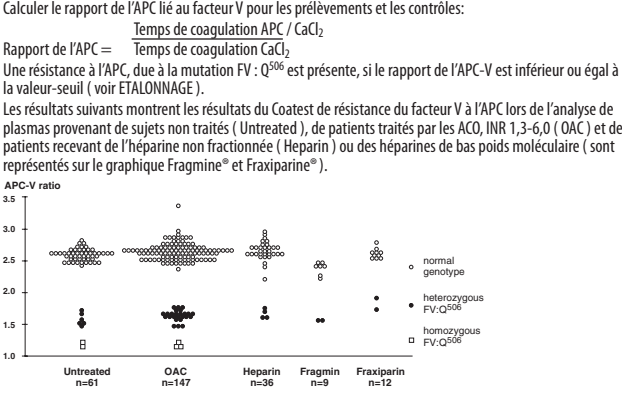
Limitaciones/ factores de interferencia

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:Q⁵⁰⁶ 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 UI/ml 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 inhibitoria (anticuerpos contra fosfolípidos) tengan un tiempo de APT normal 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.

Résultats



Les rapports de l’APC-V des prélèvements sont distribués selon le génotype du facteur V. Pour un génotype donné, des rapports de l’APC-V analogues sont obtenus, indépendamment du groupe de patients. Les médianes typiques sont les suivantes: 2,6 (génotype normal), 1,7 (FV:Q⁵⁰⁶ hétérozyote) et 1,2 (FV : Q⁵⁰⁶ homozyote). 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

Repetabilite 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 différentes combinaisons de réactifs à 11 occasions différentes.

	Rapport APC-V	Intrasérie	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.¹⁵

Etalonnage

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-dosage 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 Réistance V présente une sensibilité de 100 % pour FV:Q⁵⁰⁶ effectué à l’aide de Thrombolyzer (n = 447), ACL (n = 295), ST-4 (n = 248) et MLA/ Electra (n = 50).

Limitations/ facteurs interferences

Aucune différence significative n’a été obtenue entre les prélèvements de plasmas fraîchement prélevés et les plasmas congelés. La sensibilité et la spécificité pour la mutation du facteur V : Q⁵⁰⁶ lors de l’analyse de plasmas prélevés chez des patients traités par les ACO ne sont pas modifiées par la valeur INR. La procédure du test décrit permet l’analyse de plasma provenant de patients héparinés présentant une héparinémie inférieure ou égale à 1 UI/ml de plasma (héparines non fractionnées et à bas poids moléculaire). Bien que la prédilution de 1 + 4 réduise fortement les interferences, on ne peut pas exclure l’éventualité selon laquelle l’analyse de plasmas, prélevés chez des patients présentant une activité inhibitrice élevée (par exemple anticorps phospholipidiques) pourrait donner lieu à un temps de céphaline anormal et donc éventuellement à des résultats erronés. Dans ces cas, l’accroissement du facteur de dilution (par exemple 1 + 9 ou 1 + 19) peut corriger le résultat du test. Comme pour tout test basé sur le temps de céphaline-kaolin, il convient de veiller à éviter une activation des prélèvements par contact, étant donné qu’une telle interférence peut provoquer une activation du facteur VIII et du facteur V.

Valeurs de reference

Les rapports de l’APC-V obtenus par l’analyse de plasmas prélevés chez 61 sujets sains sur des appareils de mesure ACL et ST-4 et chez 390 sujets

Uso

Determinazione della resistenza alla proteina C attivata (APC), causata dalla mutazione del fattore V:Q506 (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^{1,2} è dovuto, in oltre il 90% dei casi a una mutazione nel gene del fattore V che comporta una sostituzione dell' Arg⁵⁰⁶ (R) con una Gln (Q) nella proteina fattore V.³⁻⁵ 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 APC⁶, 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.⁷⁻¹¹

Principio del metodo

Il plasma campione è prediluito nel plasma carente di fattore V e incubato con il reagente APTT per un tempo standard. La coagulazione è innescata dall'aggiunta di CaCl₂ in assenza e in presenza della APC, quindi si registra il tempo necessario alla formazione del coagulo.

Reagenti

- V-DEF Plasma:** 4 fiale - Plasma umano liofilizzato e stabilizzato con bassi livelli di attività di fattore V, contenente Polybrene® come antagonista eparinico. Ricostituire con 4,0 mL di acqua NCCLS tipo II.¹² Lasciare a temperatura ambiente (20-25°C) per 30 minuti. Miscelare delicatamente prima dell'uso.
- CaCl₂:** 1 fiala - 8 mL di calcio cloruro, 0,025 mol/L in tampone Tris contenente albumina serica bovina 0,5%.
- Reagente APTT:** 1 fiala - 16 mL di fosfolipidi purificati, con silice colloidale come attivatore di contatto. Contiene conservanti. Miscelare accuratamente su un vortex prima dell'uso.
- APC/CaCl₂:** 4 fiale - Proteina C attivata umana co-liofilizzata con CaCl₂. Ricostituire con 2,0 mL di acqua NCCLS tipo II.12 Lasciare a temperatura ambiente (20-25°C) per 30 minuti e miscelare delicatamente prima dell'uso.
- Plasma di controllo Livello 1:** 1 fiala - Plasma umano liofilizzato. Ricostituire con 1,0 mL di acqua NCCLS tipo II.12 Lasciare a temperatura ambiente (20-25°C) per 30 minuti e miscelare delicatamente prima dell'uso.
- Plasma di controllo Livello 2:** 1 fiala - Plasma umano liofilizzato. Ricostituire con 1,0 mL di acqua NCCLS tipo II.12 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 (Nr. Cat. 82 3146 63), Plasma di controllo Livello 1 (Nr. Cat. 82 2663 60) and Plasma di controllo Livello 2 (Nr. Cat. 82 2668 63) sono disponibili anche separatamente dalla CHROMOGENIX.

⚠ Attenzione

APC/Calcium chloride, APC Control Plasma Levels 1 e 2, e Factor V Reagent Plasma contiene materiale di origine umana testato al momento della donazione e risultato non reattivo per anticorpi anti-HIV, antigeni di superficie del virus dell'epatite B ed anticorpi anti-HCV. Questo prodotto, come avviene per tutti i campioni di origine umana, deve essere trattato secondo adeguate procedure di laboratorio per minimizzare il rischio di trasmissione di malattie infettive.

APC/Calcium chloride e Calcium chloride materiale di origine bovina. Tutti gli animali donatori provengono da allevamenti esenti da BSE; vengono sottoposti a ispezione veterinaria prima e dopo la morte e risultano esenti da agenti infettivi e/o contagiosi. Il prodotto deve essere comunque trattato come potenzialmente infetto.

Calcium Chloride

⚠ ATTENZIONE

Classe di pericolo: Sensibilizzazione cutanea, categoria 1, H317. Pericoloso per l'ambiente acquatico — Pericolo cronico, categoria 3, H412. **Componenti pericolosi:** Miscela di: 5-cloro-2-metil-2H-isotiazol-3-one; 2-metil-2H-isotiazol-3-one (3:1) (CIT/MIT). **Indicazioni di pericolo:** H317: Può provocare una reazione allergica cutanea. H412: Nocivo per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata. **Consigli di prudenza:** P272: Gli indumenti da lavoro contaminati non devono essere portati fuori dal luogo di lavoro. P273: Non disperdere nell'ambiente. P280: Indossare indumenti protettivi, indossare guanti protettivi. P302+P352: IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE: lavare abbondantemente con acqua. P333+P313: In caso di irritazione o eruzione della pelle: Consultare un medico. P362+P364: Togliere tutti gli indumenti contaminati e lavarli prima di indossarli nuovamente.

APC/CaCl₂

⚠ PERICOLO

Classe di pericolo: Resp. sens. 1, H334 **Indicazioni di pericolo:** H334: Può provocare sintomi allergici o asmatici o difficoltà respiratorie se inalato.

Consigli di prudenza: P261: Evitare di respirare la polvere/fumi. P304 + P340: IN CASO DI INALAZIONE: Se la respirazione è difficile, trasportare l'fortunato all'aria aperta e mantenerlo a riposo in posizione che favorisca la respirazione. P342 + P311: In caso di sintomi respiratori: contattare un CENTRO ANTIVELENI/ un medico. P501: Smaltire il prodotto/recipiente in conformità alla regolamentazione locale/regionale/ nazionale/internazionale.

Informazioni supplementari sui pericoli: EUH 208: Contiene APC (Activated Protein C). Può provocare una reazione allergica. EUH 210: Scheda dati di sicurezza disponibile su richiesta. Fino al 3,97% di questa miscela è costituita da ingredienti la cui tossicità acuta (dermale, inalatoria) per la salute umana e la tossicità per l'ambiente acquatico non è nota.

APTT Reagent, Control Plasma level 1, Control Plasma level 2, V-DEF plasma

Classe di pericolo: Nessuno

Indicazioni di pericolo: Nessuno

Consigli di prudenza: Nessuno

Informazioni supplementari sui pericoli:

APTT Reagent: EUH 208: Contiene 1,2-benzisotiazolin-3-one. EUH 210: Scheda dati di sicurezza disponibile su richiesta. Può provocare una reazione allergica. Fino al 20,85% di questa miscela è costituita da ingredienti la cui tossicità acuta (per via orale, dermale, inalatoria) per la salute umana e la tossicità per l'ambiente acquatico non è nota.

Control Plasma level 1: Fino al 100% di questa miscela è costituita da ingredienti la cui tossicità acuta (per via orale, dermale, inalatoria) per la salute umana e la tossicità per l'ambiente acquatico non è nota.

Control Plasma level 2: Fino al 98,75% di questa miscela è costituita da ingredienti la cui tossicità acuta (per via orale, dermale, inalatoria) per la salute umana e la tossicità per l'ambiente acquatico non è nota.

V-DEF plasma: Fino al 98,26% di questa miscela è costituita da ingredienti la cui tossicità acuta (per via orale, dermale, inalatoria) per la salute umana e la tossicità per l'ambiente acquatico non è nota.

Per l'impiego diagnostico *in vitro*.

Materiali necessari ma non forniti:

- Acqua deionizzata, filtrata attraverso membrane da 0,22 µm o NCCLS tipo II.¹²
- 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.
- CaCl₂:** 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.
- APC/CaCl₂:** Stabilità dopo ricostituzione: 2 ore a 37°C, 8 ore a 15-25°C, 5 giorni a 2-8°C o 3 mesi a -20°C o a temperatura inferiore conservato nel flacone originale. *Vedi NOTA.
- Plasma di controllo Livello 1:** Stabilità dopo ricostituzione: 6 ore a 2-25°C, 3 mesi a -20°C o a temperature inferiori conservato nel flacone originale. *Vedi NOTA.
- Plasma di controllo Livello 2:** Stabilità dopo ricostituzione: 6 ore a 2-25°C, 3 mesi a -20°C o a temperature inferiori conservato nel flacone originale. *Vedi NOTA.

***NOTA:** Il reagente congelato dovrebbe essere scongelato a 37°C e miscelato delicatamente prima dell'uso. Non ricongelare.

Controllo di qualità

I plasmi di controllo Livello 1 e Livello 2 dovrebbero essere utilizzati per la validazione dei risultati. Il Livello 1 fornisce una risposta normale alla APC, mentre il Livello 2 mostra una risposta relativa alla presenza della mutazione del fattore V:Q506. Per ogni lotto vengono forniti gli intervalli attesi espressi in APC-V ratio. Se si ottengono valori al di fuori dagli intervalli indicati, è opportuno controllare le performances dei reagenti e degli strumenti e successivamente ripetere il test.

Tracciabilità di Calibranti e materiale di Controllo

Tutti i valori riportati sono stati determinati con analisi multiple su ACL Futura utilizzando uno soeficco lotto di reagente e contro un Standard Interno di Riferimento. Poichè per il test APCR-V uno standard Internazionale non è disponibile, i valori sono stati assegnati contro uno Standard di Riferimento Interno, proveniente da campioni di plasma congelati identificati come omozigoti e eterozigoti per APCR.

Raccolta dei campioni

Il paziente deve restare a riposo per 10 minuti prima del prelievo. Nove parti di sangue raccolto vanno mescolate con una parte di citrato trisodico 0,1 mol/L. Centrifugare entro 24 ore a 2000 x g per 20 minuti a temperatura ambiente. Avere cura di evitare la contaminazione piastriatica del plasma quando viene separato dalle cellule. Analizzare il plasma entro 25 ore dal prelievo di sangue.¹³ Alternativamente, congelare rapidamente a -70°C in aliquote di 1 mL o meno e conservare per non oltre 3 anni a -70°C. I campioni non vanno conservati in un congelatore autodisgelante e non vanno disgelati e ricongelati prima del test. I campioni vanno trattati come materiale potenzialmente infetto. Per ulteriori informazioni vedere il documento NCCLS H21-A3.¹⁴

Procedimento

- Tutti i reagenti devono essere portati a temperatura ambiente prima dell'uso. I campioni di plasma congelato devono essere scongelati rapidamente a 37°C in un modo standardizzato per evitare perdita di allività dei fattori labili della coagulazione e per assicurare l'assenza di crioprecipitato.
- Preriscaldare un volume sufficiente di CaCl₂ e APC/CaCl₂ a 37±0,5°C.
- Prediluire 1 volume di plasma campione o di plasma controllo con 4 volumi di plasma carente di fattore V. Il plasma prediluito dovrebbe essere analizzato entro 45 minuti.
- Mettere 1 volume di plasma normale in una provetta ed aggiungere un uguale volume di reagente APTT. Incubare a 37°C per 5 minuti. Uno strumento configurato con un tempo di incubazione diverso può essere usato a condizione che il tempo di incubazione sia almeno 3 minuti.
- Aggiungere 1 volume di CaCl₂ e contemporaneamente iniziare la misurazione del tempo di coagulazione. Registrare il tempo di formazione del coagulo.
- Eseguire un secondo test sostituendo CaCl₂ con APC/CaCl₂ e registrare il tempo di formazione del coagulo.

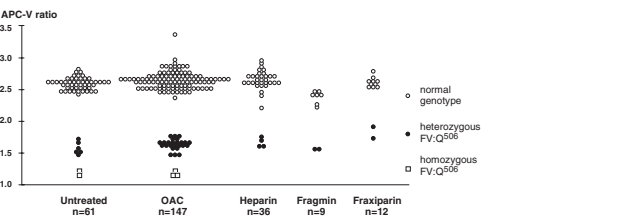
Results

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

$$\text{Tempo di coagulazione APC/CaCl}_2$$

$$\text{Rapporto APC} = \frac{\text{Tempo di coagulazione CaCl}_2}{\text{Tempo di coagulazione APC/CaCl}_2}$$

La resistenza alla proteina C attivata dovuta alla mutazione Leiden viene rilevata quando l'APC-V ratio è inferiore o uguale al valore di cut-off (vedi Calibrazione). I risultati seguenti mostrano l'impiego del Coatest APC Resistance V sui campioni di plasma di soggetti non trattati, di pazienti in terapia anticoagulante orale con INR 1,3-6,0 e pazienti in trattamento con eparina non frazionata o a basso peso molecolare (Fragmin® e Fraxiparin®).



Gli APC-V ratio dei campioni sono distribuiti secondo il genotipo del fattore V. Per un dato genotipo si ottengono APC-V ratio analoghi nei diversi gruppi analizzati. I valori di mediana sono 2,6 (normali); 1,7 (eterozigoti) e 1,2 (omozigoti). Gli APTT basali dei soggetti non trattati possono differire moderatamente quando siano comparati al Coatest APC Resistance originale.

Caratteristiche del metodo

Accuratezza e precisione

aPC-V Ratio sono stati calcolati su 22 replicati impiegando il Plasma di controllo APC Resistance Control Plasma Livello 1 su uno strumento ACL ed utilizzando 11 differenti combinazioni di reagenti in 11 differenti sedute de lavoro.

APC Resistance	APC-V Ratio	Intra-serie	Inter-serie
Plasma di controllo Livello 1	2,4	CV ≤ 4%	CV ≤ 4%

Test in doppio eseguiti su plasmi provenienti da 630 pazienti testati con tre differenti tipi di strumenti (ST-4, Thrombolyzer ed MLA Electra 900) hanno fornito CV intraserie di ≤3% e ≤5% per tempi de coagulazione ottenuti in assenza ed in presenza di APC, rispettivamente. NCCLS documento EP5-T2.¹⁵

Calibrazione

APC-V Ratio ottenuti con il metodo Coatest APC Resistance 5, sono risultati più bassi degli APC Ratio ottenuti con il metodo originale Coatest APC Resistance, indipendentemente dallo strumento utilizzato. Si raccomanda, comunque, che ciascun laboratorio stabilisca le proprie performances di reazione sul proprio strumento e stabilisca il valore di cut-off per il metodo APC Resistance V seguendo le indicazioni di seguito riportate:

- Eseguire cinque determinazioni indipendenti di APC-V Ratio, utilizzando almeno tre replicati per ciascuna serie di un plasma che presenti una risposta normale all'APC. Confermare che i CV inter ed intra serie dell'APC-V Ratio siano al di sotto del 7%. Nel caso di performances ugualmente soddisfacenti con il metodo originale Coatest APC Resistance, questo passaggio può essere omesso.
- Determinare l'APC-V Ratio di almeno 30 campioni provenienti da individui sani di età compresa tra i 20 e 65 anni. Si consiglia di includere i plasmi di controllo APC Resistance Control Plasma Livello 1 e 2 per la validazione del dosaggio.
- Verificare che l'APC-V Ratio per i plasmi di controllo sia all'interno dei ranges specificati.
- Calcolare la media degli APC-V Ratio.
- Calcolare il valore di cut-off dell'APC Resistance-V moltiplicando per 0,8 il valore medio dell'APC Ratio quando questo è al di sotto di 2,8; e moltiplicare per 0,75 il valore medio dell'APC Ratio nel caso questo sia pari a 2,8 o maggiore.
- L'APC-V Ratio del plasma di controllo APC Resistance Control Plasma Livello 1 dovrebbe cadere all'interno dell'intervallo di normalità. L'APC-V Ratio del plasma di controllo APC Resistance Control Plasma Livello 2 dovrebbe cadere all'interno del valore di cut-off.

Sensibilità

Coatest APC Resistance V ha dimostrato una sensibilità per il FV:Q506 pari al 100% come da prove effettuate su Thrombolyzer (n = 447), ACL (n = 295), ST-4 (n = 248) ed MLA/Electra (n = 50).

Limitazioni/fattori interferenti

Non sono state ottenute differenze significative tra campioni freschi e congelati. Sensibilità e specificità alla mutazione del fattore FV:Q506 per campioni di plasma provenienti da pazienti in trattamento con anticoagulanti orali non sono modificate dal valore di INR. La procedura di dosaggio descritta sopra, consente l'analisi di un plasma di un paziente in trattamento con eparina fino a livelli ≤1 UI/mL (di eparina non frazionata o a basso peso molecolare). Sebbene la prediluzione 1+4 diminuisca fortemente le interferenze, non si può escludere che l'analisi di campioni provenienti da pazienti che presentino un inibitore (es. anticorpi antifosfolipidi) possa dare tempi di coagulazione anormali e pertanto con 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. Come per qualsiasi test basato sull'APTT, occorre assicurarsi che i campioni non subiscano attivazione da contatto poiché questa potrebbe condurre all'attivazione dei fattori VIII e V.

Valori di riferimento

APC-V Ratio ottenuti da campioni di plasma provenienti da 61 donatori sani su ACL e ST-4 e da 390 individui sani su Thrombolyzer, rientravano nell'intervallo 2-3.5. Nessuna differenza è stata trovata in relazione al sesso.

Bibliography / Literatur / Bibliografia / Bibliographie / Bibliografía


- Dahlbäck B et al. 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 90, 1004-1008. (1993)
- Svensson P J and Dahlbäck B. Resistance to activated protein C as a basis for venous thrombosis. N Engl J Med 330, 517-522 (1994).
- Bertina R M et al. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. Nature 369, 64-67 (1994).
- Voorberg J et al. Association of idiopathic venous thromboembolism with single point mutation at Arg506 of factor V. Lancet 343, 1535-1536 (1994).
- Greengard J S et al. Activated protein C resistance caused by Arg506Gln mutation in factor Va. Lancet 343, 1361-1362 (1994).
- Williamson D et al. Factor V Cambridge: A new mutation (Arg306->Thr) associated with resistance to activated protein C. Blood 91, 1140-1144 (1998).
- Jorquera J I et al. Modified test for activated protein C resistance. Lancet 344, 1162-1163 (1994).
- Trossaert M et al. Modified APC resistance assay for patients on oral anticoagulants. Lancet 344, 1709 (1994).
- Svensson PJ et al. Evaluation of original and modified APC-resistance tests in unselected outpatients with clinically suspected thrombosis and in healthy controls. Thromb Haemost 77, 332-335 (1997).
- Freyburger G et al. Proposal for objective evaluation of the performance of various functional APC-resistance tests in genotyped patients. Thromb Haemost 78, 1360-1365 (1997).
- Hall C et al. Evaluation of a modified APTT-based method for determination of APC resistance in plasma from patients on heparin or oral anticoagulant therapy. Thromb Res 89, 203-209 (1998).
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Specifications for reagent water used in the clinical laboratory. NCCLS Approved Standard: ASC-3.
- Freyburger G et al. Response to activated protein C upon storage of whole blood and plasma. Thromb Res 93, 89-95 (1999).
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Collection, transport and processing of blood specimens for coagulation testing and performance of coagulation assays, NCCLS Document H21-A3; vol. 11 No. 23.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. EP5-T2. User evaluation of clinical chemistry devices. US Patent 5,443,960; EP 0 608 235; EP 0 690 991; Australia 666 484; 690 535; Japan 2562000; Canada 2,119,761; New Zealand 261 190. APC is a trademark of Chromogenix AB ©2022 Instrumentation Laboratory. All rights reserved.


Symbols used / Verwendete Symbole / Símbolos utilizados / Symboles utilisés / Simboli impiegati

IVD In vitro diagnostic medical device In-vitro Diagnostikum De uso diagnóstico in vitro Dispositif médical de diagnostic in vitro Per uso diagnostico in vitro	LOT Batch code Chargen-Bezeichnung Identificación número de lote Designation du lot Numero del lotto	CONTROL Control Kontrollen Control Contrôle Controllo	 Use by Verwendbar bis Caducidad Utilisable jusqu'à Da utilizzare prima del	 Temperature limitation Festgelegte Temperatur Temperatura de Almacenamiento Températures limites de conservation Limiti di temperatura	 Consult instructions for use Beilage beachten Consultar la metódica Lire le mode d'emploi Vedere istruzioni per l'uso	 Change(s) to section since previous revision Der Abschnitt hat sich seit der letzten Überarbeitung geändert La sección ha cambiado desde la revisión anterior La section a changé depuis la révision précédente La sezione è cambiata rispetto alla revisione precedente	 Biological risks Biologisches Risiko Riesgo biológico Risque biologique Rischio biologico	 Manufacturer Hergestellt von Fabricado por Fabricant Prodotto da	EC REP Authorised representative Bevollmächtigter Representante autorizado Mandatata Rappresentanza autorizzata
---	--	---	--	--	---	--	---	--	---

Control Plasma Level 1

Control Plasma Level 2

All Instruments	CaCl ₂ (s)	APC/CaCl ₂ (s)	APC-V ratio
LOT			
			

All Instruments	CaCl ₂ (s)	APC/CaCl ₂ (s)	APC-V ratio
LOT			
			

Expected values **ENGLISH - Insert revision 05/2022**

Different clotting times will be obtained with different types of instruments depending on the clot detection principle. The following ranges cover the expected clotting times when performing analysis of Control Plasma Level 1 with the above batch number using COATEST[™] APC[™] Resistance V / V-S.

Zu erwartende Werte **DEUTSCH - Beipackzettel Version 05/2022**

Mit verschiedenen Geräten werden - abhängig vom Gerinnungsnachweisprinzip - unterschiedliche Gerinnungszeiten erreicht. Die folgenden Bereiche decken die zu erwartenden Gerinnungszeiten bei Durchführung der Analyse von Control Plasma Level 1 mit der oben angeführten Charge unter Verwendung von COATEST[™] APC[™] Resistance V / V-S ab.

Magnitudes esperadas **ESPAÑOL - Revisión Prospecto 05/2022**

Se obtendrán diferentes tiempos de coagulación en los diversos instrumentos, dependiendo del principio de detección. Las gamas citadas más abajo cubren los tiempos de coagulación esperados al efectuar el análisis del Control Plasma Level 1 con el número de lote anterior, mediante el uso de los lotes COATEST[™] APC[™] Resistance V / V-S.

Valeurs normales **FRANÇAIS - Révision de la notice 05/2022**

Les temps de coagulation dépendent du principe de détection du caillot de l'instrument utilisé pour le dosage. Si l'analyse du Control Plasma Level 1 avec le batch no. mentionné au-dessus a été effectuée avec COATEST[™] APC[™] Resistance V / V-S, les valeurs attendues sont comprises entre les intervalles suivants:

Valori previsti **ITALIANO - Revisione dell'inserto 05/2022**

I tempi di coagulazione ottenuti saranno differenti a seconda del metodo e del principio di rilevamento del coagulo utilizzati. Quando l'analisi del Control Plasma Level 1 del suddetto lotto viene eseguita utilizzando COATEST[™] APC[™] Resistance V / V-S, i tempi di coagulazione previsti saranno compresi entro i range riportati.



Printed Insert Sheet: 000306784AB

Revision: R00

Issued: 05/2022

C.O.: 537760

LANGUAGES

ENGLISH
DEUTSCH
ESPAÑOL
FRANÇAIS
ITALIANO

TECHNICAL SPECS

PAPER: White paper, 50-60 g/m² weight, PCS00400180.

SIZE: 11 x 17" (280 x 432 mm.).

PRINT: Front/Back.

PRINT COLOR: Sheet 1: Front - Top Band Orange PMS 137, Red PMS 179, it is acceptable to print black in lieu of Red PMS 179, all remaining type in black.
Back - Red PMS 179, it is acceptable to print black in lieu of Red PMS 179, all remaining type in black.
Sheet 2: Front - Top Band Orange PMS 137, Red PMS 179, it is acceptable to print black in lieu of Red PMS 179, all remaining type in black.
Back - Red PMS 179, it is acceptable to print black in lieu of Red PMS 179, all remaining type in black.

SPECIAL REQUIREMENTS: Folded

CARTON SIZE: WHITE BOX PCS0003022610 manual pack must have barcodes on the back of pages 2 and 4. Sheet 1 must have "A" at the end of the document part number, i.e., 000304123A. Sheet 2 must have "B" at the end of the document part number, i.e., 000304123B