

REF 502-01 Pefakit® APC-R Factor V Leiden



REF 502-01 **IVD** pouze pro diagnostické účely "In Vitro"

Účel a použití

Pefakit® APC-R Factor V Leiden je souprava, pomocí které se v lidské plazmě stanoví resistance na aktivovaný protein C způsobená mutací faktoru V Leiden (FV:Q⁵⁰⁶).

Úvod

Resistance na aktivovaný protein C (APC) je nejčastější dědičná porucha spojená s hlubokou žilní trombózou. Více jak 95% fenotypů APC resistance může být vysvětleno mutací faktoru V Leiden [1,2,3,4,5,6]. Tato porucha je způsobena bodovou mutací genu faktoru V, jejímž výsledkem je náhrada aminokyseliny Arg 506 zbytkem Gln [2,3,7]. Heterozygotní porucha je provázena (het) 5 až 10 násobným, homozygotní (hom) porucha 50 až 100 násobným zvýše-ním rizika trombóz [5,8,9].

Existují dvě možnosti detekce faktoru V (FV) Leiden. Funkční stanovení z plazmy vyjadřující poruchu fenotypu [1] nebo stanovení genotypu, které může být provedeno metodou PCR [10].

Princip metody

Pefakit® APC-R Factor V Leiden je funkční koagulační stanovení z plazmy a liší se od ostatních funkčních testů na APC resistenci tím, že specificky reaguje s hladinou protrombinového komplexu. Je založen na faktor Va závislém protrombinovém aktivátoru, který je izolován z hadího jedu. Robustnost a specifita stanovení je zesílena eliminací možných rušivých vlivů faktorů koagulační kaskády a nezávislostí na vápníku. Interference z nefrakcionovaného heparinu, nízkomolekulárního heparinu a pentasacharidů, které jsou obsaženy ve vzorku, jsou vyloučeny přidávkou inhibitoru heparinu do reagensů 1 a 2.

Vzorek plazmy je předředěn reagensy 4 (diluční plazma) a inkubován při 37°C s aktivátorem FV z hadího jedu (RVV-V z *Daboia russelli*), který převede FV na FVa. Koagulace je odstartována přidávkou protrombinového aktivátoru, závislém na FVa (vyrobeném z hadího jedu *Notechis scutatus*) za absence vápníku. Koagulační čas je zaznamenáván a vypočítávají se poměry (koagulační čas za přítomnosti APC/ koagulační čas za absence APC).

Reagencie

Reagencie	Obsah
R1	APC / RVV-V (+APC) Reagent (APC, RVV-V, Polybrene, Hepes, BSA) 3 lahvičky (lyofilizované, rozpustit v 2.0 ml deionizované vody na každou lahvičku)
R2	RVV-V (-APC) Reagent (RVV-V, Polybrene, Hepes, BSA) 3 vials (lyofilizované, rozpustit v 2.0 ml deionizované vody na každou lahvičku)
R3	PTA Reagent (Prothrombin Aktivátor, EDTA, Hepes, BSA) 3 lahvičky (lyofilizované, rozpustit v 4.0 ml deionizované vody na každou lahvičku)
R4	Ředící plazma (Lidská plazma) 3 lahvičky (lyofilizované, rozpustit v 2.0 ml deionizované vody na každou lahvičku)

Naředěné roztoky R1-R4 inkubujte v zavřených lahvičkách po dobu 30 minut při pokojové teplotě a před použitím mírně zamíchejte.

Upozornění: Prodloužená inkubace reagensie R4 může – vlivem vysokého obsahu proteinu – způsobit separaci fází charakteristickou čistým roztokem s jemnou, bělavou vrstvou na povrchu. To může být mylně interpretováno jako koagulace. Z tohoto důvodu musí být reagensie před použitím promíchána až do původní homogenní a mírně zakalené formy.

Materiál požadovaný ale v kitu neobsažený

- Deionizovaná voda.
- Kalibrované pipety (1000 - 5000 µl).
- Automatický nebo polo-automatický koagulometr využívající k detekci mechanických nebo optických metod.

Pozn: Při použití automatických nebo polo-automatických koagulačních analyzátorů postupujte vždy dle operačního manuálu daného výrobce nebo požádejte o detailní adaptační protokol.

Skladování a Stabilita

Kit může být používán až do doby expirace, uvedené na štítku, pokud je skladován neotevřený při 2-8°C.

Stabilita reagensů po naředění:

Reagencie	Stabilita
R1	-20°C 6 měsíců
	2 – 8°C 14 dní
	15 – 25°C 24 hodin (v analyzátoru)
R2	-20°C 6 měsíců
	2 – 8°C 14 dní
	15 – 25°C 24 hodin (v analyzátoru)
R3	-20°C 6 měsíců
	2 – 8°C 14 dní
	15 – 25°C 24 hodin (v analyzátoru)
R4	-20°C 6 měsíců
	2 – 8°C 14 dní
	15 – 25°C 24 hodin (v analyzátoru)

Zamražené reagensie by měly být rozpuštěny při 37°C a mírně promíchány před použitím. **Zamrazujte pouze jednou.**

Kontrola kvality

Používejte Pefakit® APC-R Factor V Leiden Kontroly (REF 502- 21) jako referenci při validaci stanovení. Negativní kontrola nebo "wild-type" (neg) vykazují normální odezvu na APC, zatímco heterozygotní kontrola (het) vykazuje odezvu na přítomnost heterozygotního typu FV:Q⁵⁰⁶ mutace. Měření kontrol by se mělo provádět při každé testované sérii vzorků.

Pro přípravu, použití a interpretaci kontrol použijte příbalového letáku, který je u každého kitu kontrol, kde naleznete instrukce a certifikovaná rozmezí.

Distributor: Diagnostica s.r.o, Za Tratí 686, Praha 9, Česká republika, tel.+420 266 315 909, Fax.+420 266 316 000, e-mail: info@diagnostica.cz, www.diagnostica



Veze 16.0 – IVD – pouze pro diagnostické účely in-vitro 11.2022

Různé koagulační časy získané na různých koagulačních přístrojích jsou závislé na různých principech detekce koagula. Pokud jsou získané hodnoty mimo certifikované rozmezí (poměr), měla by být provedena kontrola všech reagensů a stanovení by mělo být zopakováno. Pokud problém dále přetrvává, měla by být provedena kompletní kontrola analyzátoru a stanovení opět zopakováno.

Odběr krve a příprava vzorku

Před odběrem krve by měl být pacient alespoň 10 minut v klidu. Pečlivě odeberte žilní krev do buď 0.104 M nebo 0.129 M citrátu sodného (objemový poměr 9+1). Směs antikoagulantu a krve po odběru mírně míchejte, abyste se vyhnuli formaci koagula. Potom ihned odstředějte při alespoň 2000 g po dobu nejméně 20 min při pokojové teplotě. Dbejte, aby nedošlo ke kontaminaci vrstvy destiček do plazmy, když se plazma odděluje od buněk. Jako běžné pravidlo platí, že vzorky z hemolytické plazmy by neměly být používány.

Pro uchování zamrazte neředěnou plazmu na -70°C v alikvotních množstvích. Zamrazujte pouze jednou. Zabraňte opětovnému zamrazování a rozmrazování. Rozmrazování by mělo být provedeno rychle (během 5 min.) ve vodní lázni při 37°C, aby se zabránilo ztrátě aktivity koagulačních faktorů nebo vytvoření precipitátu. Pro více informací viz NCCLS dokument H21-A2 [11].

Stabilita nenaředěných vzorků (plazma):

-80°C	alespoň 1 rok
-20°C	2 měsíce
2-8°C	24 hodin
15-25°C	4 hodin

Postup

Připravte reagenzie jak popsáno výše. Rozmrazený vzorek promíchejte, vyvarujte se vytvoření pěny ve vzorku během míchání. Stanovte +APC koagulační čas (koagulační čas za přítomnosti aktivovaného proteinu C), -APC koagulační čas (koagulační čas za absence aktivovaného proteinu C) a vypočítejte poměr podle následujícího schématu:

	APC+	APC-
R4 Vzorek nebo kontrolní plazma	30 µl	30 µl
R4 Ředěná plazma	20 µl	20 µl
	Zamíchat před použitím	Zamíchat před použitím
R1 APC/RVV-V (+APC) Reagent	50 µl	-
R2 RVV-V (-APC) Reagent	-	50 µl
R3 Inkubace	3 min, 37°C	3 min, 37°C
R3 PTA Reagent	50 µl	50 µl
	Změřit koagulační čas	Změřit koagulační čas
Poměr	+ APC koagulační čas - APC koagulační čas	

Interpretace výsledků

Diferenciace homozygotních, heterozygotních a negativních vzorků je založena na určených rozmezích poměrů měřených na geneticky známých vzorcích plazem pacientů (viz tabulka dále). Tyto poměry se mohou měnit v závislosti na typu laboratoře, přístroje a šarže. Z tohoto důvodu se doporučuje pro každou laboratoř a určitý přístroj si stanovit svoje vlastní rozmezí a (cut-off) hraniční hodnoty (pokud bude nezbytné rovněž i pro

každou šarži) testováním sérií o známých genotypech plazem pacientů.

Očekávané hodnoty

Typická rozmezí poměrů pro PCR-otypované plazmy pacientů jsou pro různé přístroje uvedeny v tabulce níže:

Semi-automatický kuličkový koaguloemtr (micro)		
Genotyp FV:Q506	n	Poměr-rozmezí (min/max)
Negativní	99	> 3.0
Heterozygot	166	1.3 - 1.9
Homozygot	25	0.9 - 1.1

BCS® XP		
Genotyp FV:Q506	n	Poměr-rozmezí (min/max)
Negativní	143	> 3.0
Heterozygot	170	1.4 - 2.2
Homozygot	27	0.9 - 1.1

Sysmex CS-line		
Genotype FV:Q506	n	Poměr-rozmezí (min/max)
Negativní	62	> 3.5
Heterozygot	37	1.4 - 2.0
Homozygot	2	1.0 - 1.1

ACL Top® line		
Genotyp FV:Q506	n	Poměr-rozmezí (min/max)
Negativní	138	> 2.8
Heterozygot	94	1.3 - 1.8
Homozygot	1	1.0 - 1.1

STA® line		
Genotyp FV:Q506	n	Poměr-rozmezí (min/max)
Negativní	134	> 2.9
Heterozygot	83	1.3 - 1.8
Homozygot	27	0.9 - 1.1

Při použití těchto tabulek by se měla vzít v úvahu následující omezení

- Výše uvedené hodnoty jsou pouze **příklady** a **ne** referenční hodnoty rozmezí a hraničních hodnot (**cut-offs**), které jsou garantovány výrobcem.
- Určité interferenční faktory (viz „Omezení a Interference“) mohou způsobit, že některé hodnoty poměrů se nemohou jasně přisuzovat k určitému genotypu nebo mohou způsobit prodloužení koagulačních časů k maximálnímu přípustnému detekčnímu času přístroje. V těchto případech je třeba dalšího zkoumání metodou PCR a je nezbytné určení individuálních faktorů.

Distributor: Diagnostica s.r.o, Za Tratí 686, Praha 9, Česká republika, tel.+420 266 315 909, Fax.+420 266 316 000, e-mail: info@diagnostica.cz, www.diagnostica

IVD

Veze 16.0 – IVD – pouze pro diagnostické účely in-vitro 11.2022

Citlivost a Specificita

Se vzorky dosud testovanými kity Pefakit® APC-R Factor V Leiden výsledky vykazovaly 100% citlivost a 100% specificitu pro nositele heterozygotní a homozygotní FV:Q506 mutace stanovenou na přístrojích BCS® XP (n=340), Semiautomaticém kuličkovém koagulometru (micro) (n=290), CS-2100/CS-5100 (n=101), ACL Top® 500(n=233), STA® C (n=244).

Vzhledem k funkčním detekčním technikám stanovení se předpokládá detekce i jiných FV mutací vedoucích také k fenotypu APC-R. Nicméně jejich výskyt je velmi malý v porovnání s mutací FV Leiden.

Přesnost a opakovatelnost

Přesnost byla stanovena pomocí jedné C1 FV-L negativní kontroly a jedné C2 FV-L heterozygotní kontroly, každé v sérii o 20 měřeních provedených v jeden den na třech plně automatizovaných analytických systémech (BCS® XP, ACL Top® 500 a STA® C).

Variační koeficient (CV%) pro koagulační čas a poměr na všech třech analytických systémech byly <10% pro C1 FV-L negativní kontrolu a <5% pro C2 FV-L heterozygotní kontrolu.

Opakovatelnost byla stanovena pomocí dvou měření za den v 20 náhodných dnech na třech plně automatizovaných analytických systémech (BCS®/BCS® XP, ACL Top® 500 a STA® C), a to vždy pomocí C1 FV-L negativní kontroly a jedné C2 FV-L heterozygotní kontroly.

Pomocí těchto dvou kontrol byly nalezeny následující variační koeficienty (CV%) pro koagulační čas a poměr:

ACL Top® 500	Střední hodnota (poměr)	CV% (během 1 dne)	CV% (ze dne na den)	CV% celkem
C1 FV-L Negativní kontrola	5.0	7.4	11.2	10.7
C2 FV-L Heterozygotní kontrola	1.7	5.1	5.1	5.4

BCS® XP	Střední hodnota (poměr)	CV% (během 1 dne)	CV% (ze dne na den)	CV% celkem
C1 FV-L Negativní kontrola	4.7	2.9	4.6	4.8
C2 FV-L Heterozygotní kontrola	1.6	2.8	4.5	4.1

STA® C	Střední hodnota (poměr)	CV% (během 1 dne)	CV% (ze dne na den)	CV% celkem
C1 FV-L Negativní kontrola	5.5	8.7	7.6	9.3
C2 FV-L Heterozygotní kontrola	1.5	1.6	3.6	3.7

Omezení a Interference

Nebyly pozorovány žádné signifikantní rozdíly při použití čerstvých nebo zamrazených vzorků plazmy. Nezáleží rovněž na tom, zdali je použita citrátová plazma s puforem nebo bez pufru.

Experimentální studie prokázaly, že není ani žádný signifikantní vliv na poměr nebo citlivost testu v případě přítomnosti antagonistů vitamínu K (phenprocoumon, warfarin), deficitu Fibrinogenu, Prothrombinu, FVIII, FX, ATIII, Proteinu C, nebo Proteinu S (do 100%) nebo zvýšený Fibrinogen, FVIII, ATIII, nebo TFPI (do

5-násobku normální hodnoty). Měření na mechanických přístrojích není ovlivněno ani vzorky z hemolytické krve ani vzorky obsahující zbytky krevních destiček. Naopak optické metody mohou být ovlivněny použitím hemolytických nebo lipemických plazem. Protilátky typu Lupus antikoagulans test neovlivňují. Ale velký deficit faktoru V (<50%) může vést k prodloužení koagulačních časů a tím i ke ztrátě rozlišovací schopnosti při hodnocení výsledků. Přítomnost Aprotininu (který inhibuje APC používaný při testu) a Protaminu v pacientově krvi mohou výrazně zkrátit koagulační časy, což může mít rovněž vliv na rozlišovací schopnost stanovení.

Vzhledem k přidávku Polybrenu neinterferuje s měřením plazem od pacientů, kteří jsou na antikoagulační léčbě heparinem při hladinách <2 IU/ml (UFH a LMWH) nebo hladinách pentasacharidů <2 µg/ml. Přímé inhibitory FXa (např.: rivaroxaban) nemají vliv na rozlišovací výkon testu, ale přímé trombinové inhibitory jako jsou Hirudin nebo Argatroban nejsou Polybrenem inhibovány.

Proto po pacientově léčbě Aprotininem, Protaminem nebo přímými trombinovými inhibitory, se doporučuje buď počkat alespoň 24 hodin před odběrem krve pro testování, nebo stanovit FVL metodou PCR.

Bezpečnostní upozornění a opatření

Reagencie R1 (55025R1)



Varování - Reagencie R1 obsahuje hovězí sérový albumin (BSA).

Údaj o nebezpečnosti:

H302: Zdraví škodlivý při požití.

Bezpečnostní upozornění:

P264: Po manipulaci si pečlivě umyjte ruce.



Reagencie R1 obsahuje materiál získaný z lidské plazmy (<0,1%) a mělo by se s ní tudíž nakládat s opatrností při zohlednění doporučených bezpečnostních opatření vztahujících se k biologickým rizikům.

Reagencie R2 (55025R2)



Varování - Reagencie R2 obsahuje hovězí sérový albumin (BSA).

Údaj o nebezpečnosti:

H302: Zdraví škodlivý při požití.

Bezpečnostní upozornění:

P264: Po manipulaci si pečlivě umyjte ruce.

Reagencie R3 (55025R3)



Varování - Reagencie R3 obsahuje dvojsodný dihydrát kyseliny ethylendiaminotetraoctové, hovězí sérový albumin (BSA).

Údaj o nebezpečnosti:

H302: Zdraví škodlivý při požití.

H332: Zdraví škodlivý při vdechnutí.

H373: Může způsobit poškození respiračních orgánů v případě delšího nebo opakovaného vystavení jeho vlivu.

Způsob expozice: vdechnutí.

Bezpečnostní upozornění:

P260: Nevdechujte prach.

P264: Po manipulaci si pečlivě umyjte ruce.

P310: **Okamžitě volejte TOXIKOLOGICKÉ CENTRUM nebo lékaře!**

Distributor: Diagnostica s.r.o, Za Tratí 686, Praha 9, Česká republika, tel.+420 266 315 909, Fax.+420 266 316 000, e-mail: info@diagnostica.cz, www.diagnostica

IVD

Veze 16.0 – IVD – pouze pro diagnostické účely in-vitro 11.2022

Reagencie R4 (55025R4)



Reagencie R4 obsahuje lidskou plazmu (50 – 100%).

Každá dárcovská jednotka použitá pro přípravu Diluční plazmy (R4) byla testována a shledána negativní na protilátky proti viru HIV 1+2, hepatitidy C, proti *Treponema pallidum*, a na povrchový antigen viru HB a genom viru hepatitidy C a HIV 1 PCR metodami. Všechny použité testy byly certifikovány CE dle seznamu A Evropských Direktiv pro IVDs (98/79/EC) a pod vedením odpovědného evropského vládního úředníka. V testovaných parametrech byly plazmy shledány negativní. Nicméně žádný z těchto testů nemůže přítomnost těchto v krvi vzniklých nemocí vyloučit s naprostou jistotou. Proto by měla být tato reagencie považována za potenciálně infekční materiál a mělo by se s ní podle toho nakládat.

Literatura

Dahlback B, Carlsson M, Svensson PJ. Familial thrombophilia due to a previously unrecognized mechanism characterized by poor anticoagulant response to activated protein C: prediction of a cofactor to activated protein C. *Proc Natl Acad Sci* 1993; 90: 1004-8

Bertina RM, Koeleman BPC, Koster T, Rosendaal FR, Dirven RJ, de Ronde H, van der Velden PA, Reitsma PH. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature* 1994; 369: 64-7.

Zoller B, Dahlback B. Linkage between inherited resistance to activated protein C and factor V gene mutation in venous thrombosis. *Lancet* 1994; 343: 1536-8.

Rees DC, Cox M, Clegg JB. World distribution of factor V Leiden. *Lancet* 1995; 346: 1133-4.

Simioni P, Tormene D, Prandoni P, Zerbinati P, Gavasso S, Cefalo P, Girolami A. Incidence of venous thromboembolism in asymptomatic family members who are carriers of factor V Leiden: a prospective cohort study. *Blood* 2002; 99: 1938-42.

Wilmer M, Stocker C, Buhler B, Conell B, Calatzis A. Improved distinction of factor V wild-type and factor V Leiden using a novel prothrombin-based activated protein C resistance assay. *Am J Clin Pathol* 2004; 122:836-42

Greengard JS, Sun X, Xu X, Fernandez JA, Griffin JH, Evatt B. Activated protein C resistance caused by Arg506Gln mutation in factor Va. *Lancet* 1994; 343: 1361-2.

Cooper PC, Hampton KK, Makris M, Abuzenadah A, Paul B, Preston FE. Further evidence that activated protein C resistance can be misdiagnosed as inherited functional protein S deficiency. *Br J Haematol* 1994; 88: 201-3.

Price DT, Ridker PM. Factor V Leiden mutation and the risks for thromboembolic disease: a clinical perspective. *Ann Intern Med* 1997; 127: 895-903.

Gandrille S, Alhenc-Gelas M, Aiach M. A rapid screening method for factor V Arg506 R Gln mutation. *Blood Coag Fibrinol* 1995; 6: 245-8.

National Committee for Clinical Laboratory Standards. Collection, transport and processing of blood specimens for coagulation testing and performance of coagulation assays. NCCLS Document H21-A2; vol 11 No 23.

Schoni R, Quehenberger P, Wu JR, Wilmer M. Clinical evaluation of a new functional test for detection of activated protein C resistance (Pefakit[®] APC-R Factor V Leiden) of two centers in Europe and USA. *Throm. Res* 2007; 119: 17-26.

Výrobce

Pentapharm AG
Dornacherstrasse 112, CH-4147 Aesch BL/Switzerland
P +41 61 706 48 48, F +41 61 706 48 00
www.pentapharm.com

Distributor: Diagnostica s.r.o, Za Tratí 686, Praha 9, Česká republika, tel.+420 266 315 909, Fax.+420 266 316 000, e-mail: info@diagnostica.cz, www.diagnostica

IVD

Veze 16.0 – IVD – pouze pro diagnostické účely in-vitro 11.2022