



# HEMOCLOT Factor V-L Ref CK061K & CK061L

**HYPHEN BioMed**

ZAC Neuville Université – 155, rue d'Eragny  
95000 Neuville-sur-Oise – France  
Tél. : 01 34 40 65 10 – Fax : 01 34 48 72 36  
www.hyphen-biomed.com



## Stanovení Faktoru V-Leiden prostřednictvím rezistence na aktivovaný protein C.

Pouze pro použití "In Vitro"

Poslední revize: 08/04/2009

### POUŽITÍ:

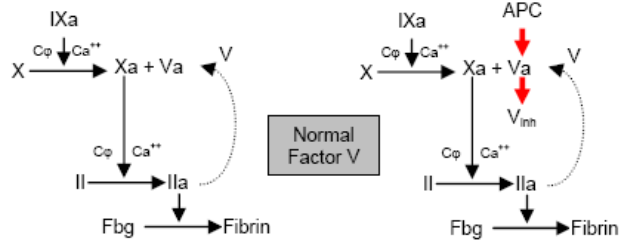
Souprava HEMOCLOT Factor V-L je navržena pro koagulační metodu testování přítomnosti Faktoru V-L (Faktor V Leiden) v citrátové plazmě pomocí jeho rezistence na působení aktivovaného proteinu C (APC). Test se provádí za nepřítomnosti a za přítomnosti aktivovaného proteinu C. V přítomnosti APC je prodloužení koagulačního času přímo úměrné koncentraci normálního Faktoru V a obráceně jeho nedostatečné prodloužení známkou přítomnosti Faktoru V-Leiden (mutace R506Q).

### KLINICKÉ PODKLADY:

Faktor V-Leiden je recitlivý na působení aktivovaného Proteinu C. Jeho přítomnost způsobí po aktivaci koagulační prodloužení prokoagulační aktivity v krvi (vzhledem k delšímu přetrvávání aktivity Faktoru Va). Nemocní s Faktorem V-L (mutace R506Q) jsou vystaveni vyššímu riziku trombozy. Toto riziko je přítomno již u heterozygotů, kteří mají přítomen normální FV i FV-L, a je silně zvýšené u homozygotů, kteří mají pouze Faktor V-Leiden.

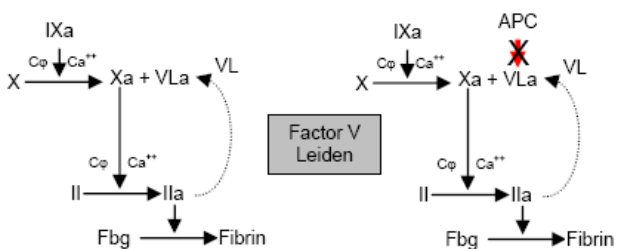
### PRINCIP:

HEMOCLOT Factor V-L souprava je koagulační metoda spouštěná čistěným Faktorem IXa s fosfolipidy a vápníkem, vyšetřovaná v ředěné testované plazmě v přítomnosti a v nepřítomnosti aktivovaného Proteinu C. V prvním kroku je ředěná plazma smíchána s čistěnými koagulačními faktory (Prothrombin a Fibrinogen) v konstantní a optimalizované koncentraci. Potom je přidán čistěný Faktor X, také v konstantní a optimalizované koncentraci bez (koagulační čas 1) nebo s (koagulační čas 2) aktivovaným Proteinem C (APC). Koagulační je zahájena přidáním Faktoru IXa v přítomnosti fosfolipidů (PLP) a vápníku (Ca<sup>2+</sup>). Koagulační časy se zaznamenají. Spočítá se poměr koagulačního času bez a s APC (koagulační čas 2 / koagulační čas 1). Pokud je plazma normální, poměr je  $\geq 2.00$ . Pokud je plazma od nemocného s mutací R506Q (Faktor V-Leiden), je tento poměr  $\leq 1.80$ .



**Without PCA  
Clotting Time 1**

**With PCA  
Clotting Time 2**



### REAGENCIE DODÁVANÉ V SOUPRAVĚ:

HEMOCLOT Factor V-L (Ref CK061K & CK061L) obsahuje tyto reagenty nezbytné pro testování

	CK061L	CK061K
<b>R1 : Reagent 1</b>	2 lahvičky po 4 ml	4 lahvičky po 4 ml
<b>R2 A: Reagent 2A</b>	2 lahvičky po 1 ml	4 lahvičky po 1 ml
<b>R2 B: Reagent 2B</b>	2 lahvičky po 1 ml	4 lahvičky po 1 ml
<b>R3: Reagent 3</b>	2 lahvičky po 4 ml	4 lahvičky po 4 ml
<b>Počet testů</b>	2 série po 20 pacientech manuální metodou nebo 2 série po 40 pacientech automatickou metodou	4 série po 20 pacientech manuální metodou nebo 4 série po 40 pacientech automatickou metodou

### R1: Reagent 1

Koagulační směs obsahuje lidský Fibrinogen, lidský Prothrombin, rekombinantní FVIII:C a Protein S v konstantní koncentraci, optimalizované pro test, lyofilizované. Obsahuje také heparin neutralizující substanci. Rozpusťte každou lahvičku s přesně 4 ml destilované vody.

### R2 A: Reagent 2A

Čistěný lidský Faktor X v konstantní koncentraci optimalizované pro test, lyofilizovaný společně s fosfolipidy z králičího mozku (cephalin). Rozpusťte každou lahvičku s přesně 1 ml destilované vody.

### R2 B: Reagent 2B

Čistěný lidský Faktor X v konstantní koncentraci optimalizované pro test (stejně jako R2A), obsahující lidský aktivovaný Protein C, lyofilizovaný společně s fosfolipidy z králičího mozku (cephalin). Rozpusťte každou lahvičku s přesně 1 ml destilované vody.

### R3: Reagent 3

Čistěný lidský Faktor IXa s obsahem fosfolipidů z králičího mozku (cephalin) a vápník, lyofilizovaný. Rozpusťte každou lahvičku s přesně 4 ml destilované vody.

### Poznámka:

- Lidská plazma užitá pro přípravu čistěného Fibrinogenu, Prothrombinu, Proteinu S (R1), Faktoru X (R2A a R2B), APC a Faktoru IXa (R3) byla testována a shledána negativní pro anti-HIV, HBsAG a anti-HCV. Přesto, žádný test nemůže zajistit naprostou nepřítomnost infekčních činitelů. S každým produktem lidského původu tedy musí být zacházeno s předepsanou opatrností jako s potenciálně infekčním materiálem.
- Bovinní sérový albumin, užitý jako stabilizující faktor, je připraven z bovinní plazmy testované na nepřítomnost infekčních agens a odebrané od zvířat bez BSE. Přesto, žádný test nemůže úplně vyloučit přítomnost infekčních agens. Jako každý produkt bovinního původu, musí být reagent 1 (R1) užíván s předepsanou opatrností jako potenciálně infekční materiál.

### REAGENCIE A MATERIÁL POTŘEBNÝ, ALE NEPŘÍTOMNÝ V SETU:

#### Reagencie:

- Destilovaná voda, Fyziologický roztok nebo Imidazolový pufr (#AR021A/RA021K/AR021L)
- Normální kontrolní plazma (# 223201), Abnormální kontrolní plazma (BIOPHEN Act. PC-r Control Plasma, # 223405) pro Faktor V Leiden.

#### Materiál:

- Elektromagnetická vodní lázeň nebo poloautomatický či automatický koagulometr
- Stopky
- Kalibrované pipety 50 a 100 µl.

### UCHOVÁVÁNÍ:

V originálním balení, před otevřením, pokud je skladována při teplotě 2-8°C je souprava HEMOCLOT Factor V-L stabilní do doby expirace uvedené na soupravě.

**Pozn.:** Studie stability ve 30°C ukazují, že všechny reagenty mohou být dopravovány za pokojové teploty bez poškození.

### PŘÍPRAVA REAGENCIÍ A STABILITA:

#### Příprava:

#### Reagent 1: R1: Čistěné koagulační faktory:

Rozpusťte každou lahvičku s přesně 4 ml destilované vody. Nechte 30 minut za pokojové teploty (18-25°C), opatrně promíchejte, dokud se obsah zcela nerozpustí (vortex). Homogenizujte před každým použitím.

#### Reagent 2 A: R2A: Čistěný lidský Faktor X:

Rozpusťte každou lahvičku s přesně 1 ml destilované vody. Nechte 30 minut za pokojové teploty (18-25°C), opatrně promíchejte, dokud se obsah zcela nerozpustí (vortex). Homogenizujte před každým použitím.

#### Reagent 2 B: R2B: Čistěný lidský Faktor X s APC a cephalinem:

Rozpusťte každou lahvičku s přesně 1 ml destilované vody. Nechte 30 minut při laboratorní teplotě (18-25°C), jemně míchejte, dokud se obsah kompletně nerozpustí (vortex). Homogenizujte před každým použitím.

#### Reagent 3: R3: Lidský Faktor IXa: Obsahuje Vápník.

Rozpusťte každou lahvičku s přesně 4 ml destilované vody. Nechte 30 minut při laboratorní teplotě (18-25°C), jemně míchejte, dokud se obsah nerozpustí. Před každým použitím jemně promíchejte (vortex). Homogenizujte před každým použitím.



## Stabilita

Stabilita rozpuštěných reagensů R1, R2A, R2B a R3, skladovaných v jejich originálních lahvičkách je:

- **24 hodin** při teplotě 2-8°C
- **8 hodin** při laboratorní teplotě 18-25°C
- **1 měsíc** při teplotě -20°C a nižší

## Upozornění:

Pro zlepšení stability musí být reagenty uzavřeny jejich originálními zátkami po každém použití. Reagenty musí být užívány s opatrností, aby nedošlo k jejich kontaminaci během užívání.

### Poznámka:

- R1, R2A, R2B a R3 lahvičky jsou uzavřeny pod vakuem. Opatrně odstraňujte zátku, aby nedošlo k žádné ztrátě lyofilizátu během otevírání lahviček.
- Pokud jsou reagenty zamražené, nechte je roztát při 37°C po dobu 30 minut a před každým použitím roztáté reagenty mírně zamíchejte (vortex)
- V souladu s užitou automatickou metodou, reagenty mohou být rozpouštěny objemy odlišnými od doporučených. V každém případě stanovený reaktivní poměr (respektive koncentrace reagensů v reakčním prostředí a celkový objem) musí být pro každou reagentii striktně dodržen.
- Užívejte pouze reagenty ze souprav stejné šarže. Neužívejte reagenty ze souprav rozdílných šarží v rámci jednoho testu. Reagenty R1, R2A, R2B a R3 jsou optimalizovány pro každou šarži.

## PŘÍPRAVA PLAZMY:

- Krev (9 dílů) musí být odebrána do **0,109 M** citrátového antikoagulantu (1 díl) s opatrností, aby nebyla způsobena aktivace koagulace. Vzorek musí být odebrán přímou venepunkcí, první kapka krve musí být odstraněna.
- Do dvou hodin musí být vzorek centrifugován při **3000 g** po dobu **20 minut** při teplotě 18°C nebo nižší a plazma se oddělí do plastových zkumavek pomocí plastových pipet.

## Uchovávání plazmy:

- Do **8 hodin** při 20°C
- Do **24 hodin** při 2-8°C
- Do **1 měsíce** zmražené při teplotě **-20°C** a (před použitím rozmrazit 15 minut ve vodní lázni při 37°C).

## PROVEDENÍ:

Souprava HEMOCLOT Factor V-L je určena pro koagulační metodu manuální nebo automatizovanou. Adaptace pro automaty jsou dostupné na vyžádání. Test se provádí při 37°C, měří se koagulační čas spuštěný reagentii R3.

## Testovaná plazma:

Testovaná plazma musí být ředěna 1/5 ve fyziologickém roztoku (9g/l chloridu sodného, NaCl), nebo v imidazolovém pufru.

## Manuální metoda

Test	Bez APC	S APC
Plazma ředěná 1/5 v FR	50 µl	
Reagent R1	100 µl	
<b>Promíchat a inkubovat 1 minutu v 37°C, potom přidat</b>		
Reagent R2A	50 µl	
Reagent R2B		50 µl
<b>Promíchat a inkubovat 1 minutu při 37°C, potom přidat</b>		
Reagent R3, předehřátý při 37°C a promíchaný	100 µl	
Změřit koagulační časy	CT1	CT2

Spočítá se poměr CT2/CT1.

## Automatickou metoda

Adaptační protokoly pro různé analyzátoři (STA-R, BCS, atd.) jsou k dispozici na žádost. Postupujte dle příslušného adaptačního protokolu a dbejte udaných upozornění pro každý přístroj.

### Pozn:

- Aby se dosáhlo výkonnosti testu, musí být zachovány stejné poměry mezi koncentracemi reagensů a použitými objemy.
- Vyřadte jakýkoli vzorek plazmy, který má jinou barvu, než je obvyklá.

## KONTROLA KVALITY:

Užívejte plazmy pro kontrolu kvality - Normal nebo Abnormal for Faktor V-L - které umožní validaci testu a porovnání reaktivity HEMOCLOT Factor V-L soupravy mezi seriemi, pokud užijete stejnou šarži reagensů. Tyto kontroly jsou :

**Biophen Normal Control Plasma: (#223201).**

**Biophen Act PC-r Control Plasma: (#223405).**

## LIMITY PROVEDENÍ:

- získané koagulační časy jsou závislé na koncentraci Faktoru V. Pouze poměr CT2/CT1 může svědčit pro přítomnost Faktoru V-L. Pokud je snižena koncentrace FV, oba koagulační časy (CT1 a CT2) jsou proporcionálně zvýšené, ale poměr CT2/CT1 je obvykle validní. Test může být proveden u nemocných s LA, ACA, na terapii heparinem nebo dikumarolovými deriváty. V přítomnosti abnormálně prodlouženého CT1 (>45 sec), potvrďte diagnózu jinou metodou. Pro správný výsledek testu je potřebná koncentrace Faktoru V  $\geq 20\%$ .
- Vzorky nevhodně odebrané nebo nevhodně připravené mohou navodit konzumpci FV a FVIII:C, což může vést k prodloužení koagulačních časů CT1 a CT2. Přítomnost aktivovaných koagulačních faktorů může zkrátit časy CT1 a CT2 a CT2/CT1 poměr.
- Při použití roztátých reagensů se mírně prodlužuje měřený koagulační čas. .
- Pro stejnou šarži reagensů a stejný vzorek mohou CT1 a CT2 dávat odlišné časy dle toho, jaký přístroj je použit a dle metody detekce koagula a její citlivosti. Toto může ovlivnit CT2/CT1 poměr. Vždy validujte cut-off hodnotu pro normální a pro patologické vzorky (pacienti s mutací FVL) a pokud je nezbytné, upravte ji.

## VÝSLEDEK:

Poměr koagulačních časů obdržený s a bez APC, **CT2/CT1** dovoluje měřit citlivost Faktoru V na aktivovaný Protein C v testovaném vzorku. Normální plazma, obsahující normální Faktor V, je citlivá na toto působení a výsledný poměr CT2/CT1 je  $\geq 2.00$ . Plazmy od pacientů nesoucích mutaci R506Q Faktoru V mají výsledný poměr CT2/CT1  $\leq 1.80$ . Molekulární biologie umožňuje konfirmovat diagnózu a rozlišit nemocné s homozygotní a heterozygotní formou mutace.

## CHARAKTERISTIKA:

Příklad získaných hodnot při užití manuální metody:

Vzorek	N	průměr
Normální plazma	CT1	21
	CT2	21
	Poměr	2.22
Heterozygot	CT1	8
	CT2	8
	Poměr	1.56

## OČEKÁVANÉ VÝSLEDKY:

Incidence Faktoru V-L (R506Q mutace) je variabilní v závislosti na geografické oblasti. Je vyšší než 15% ve Skandinávských zemích a kolem 5% ve Středomoří. Tato mutace není přítomna u čínské nebo japonské populace.

## REFERENCE:

1. Dahlback B. and all. 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 USA, vol 90 (3) 1004-8 (1993).
2. Bertina RM and all. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. Nature, Vol 369 (6475) 64-7 (1994).
3. Brenner B. and all. Activated protein C resistance can be associated with recurrent foetal loss. British Journal of Haematology; Vol 97 551-554 (1997).
4. Hille E. and all. Mortality and Causes of Death in Families With the Factor V Leiden Mutation (Resistance to Activated Protein C). Blood, Vol 89 (6) 1963-1967 (1997).
5. Rosendaal F.R. and all. Factor V Leiden (Resistance to Activated Protein C) Increases the Risk of Myocardial Infarction in Young Women. Blood Vol 89 (8) 2817-2821 (1997).
6. Chao-Hung Ho. Prevalence of Activated Protein C Resistance in the Chinese Population. Thrombosis research Vol 88 409-412 (1997).
7. Labrousse S. and all. Molecular mechanism for APC resistance in the absence of Arg 506 mutation: factor V gene sequencing strategy. Thrombosis research Vol 87 (2) 263-267 (1997).
8. Crookston K.P. and all. False negative factor V Leiden assay following allogeneic stem cell transplant. British Journal of Haematology, Vol 100 600-602 (1998)

