

**IVD**

# HEMOCLLOT™ Quanti. VL

**REF CK065K****R1 3 x 2 ml****R2 3 x 1 ml**

Koagulační metoda pro měření aktivity Faktoru V-Leiden.



www.hyphen-biomed.com

155, rue d'Eragny  
95000 NEUVILLE SUR OISE  
FRANCE  
Tel. : +33 (0)1 34 40 65 10  
Fax : +33 (0)1 34 48 72 36  
info@hyphen-biomed.com

Revize: 04\_2025

**POUŽITÍ:**

HEMOCLLOT™ Quanti. VL souprava je koagulační metoda pro in vitro kvantitativní stanovení Faktoru V Leiden (FV-L) měřením jeho rezistence na inaktivaci Aktivovaným Proteinem C (APC). Test se provádí v přítomnosti Proteinu S na lidské citrátové plazmě za použití manuální nebo automatické metody.

**SHRNUTÍ:****Technické<sup>1,2</sup>:**

Aktivovaný Protein C je regulátor v koagulačním procesu specifickou inaktivací aktivovaného Faktoru V (Va) a VIII (VIIIa) v přítomnosti kofaktorů. Resistenční fenomén na aktivovaný Protein C (APC) je v 90% případů mutace R506Q faktoru V zvaná „Faktor V Leiden“. Tato mutace v exonu 10 (1691 G -&gt; A) Faktoru V nahrazuje arginine v pozici 506 za glutamin a zabraňuje tak štěpení této sekce APC.

Tyto kalibrátory se používají k stanovení kalibrační křivky koagulačního měření FV-L v plazmě (HEMOCLLOT™ Quanti. VL).

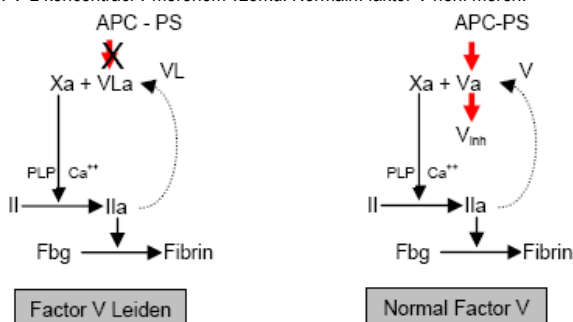
**Klinické<sup>2,3,4</sup>:**

FV-L mutace je nejčastější dědičný trombofilní rizikový faktor. Jeho četnost je kolem 5% u bělošské populace. Pacienti s FV-L mutací mají zvýšené riziko venózní trombozy, 3 až 7 krát u heterozygotů a až 80 krát u homozygotů.

Tato genetická anomálie může být pozorována koagulačním měřením v přítomnosti nebo absenci APC.

**PRINCIP:**

HEMOCLLOT Quanti. VL metoda je určena pro koagulační metodu testu FV-L měřením jeho citlivosti na inaktivaci Aktivovaným PC v přítomnosti PS. Koagulační test se provádí v nadbytku APC a koagulačních faktorů (Protrombin, Fibrinogen a PS). Koagulace je začata purifikovaným faktorem Xa (v předem nastavené, konstantní hladině) v přítomnosti fosfolipidů a vápníku. Naměřený čas koagulace (CT) je nepřímo úměrný FV-L koncentraci v měřeném vzorku. Normální faktor V není měřen.

**REAGENCIE:****R1** Koagulační směs, lyofilizováno. Obsahuje lidský fibrinogen, lidský protrombin, PS v konstantní koncentraci pro měření, lidský APC, heparin neutralizující látku, BSA a stabilizátory.**3 lahvičky po 2 ml.****R2** Purifikovaný lidský Faktor Xa, v určité hladině pro měření, lyofilizováno. Obsahuje králičí mozkový cefalin (zdroj fosfolipidů), BSA a stabilizátory.**3 lahvičky po 1 ml.****UPOZORNĚNÍ:**

- Některé reagenty v soupravě obsahují materiál lidského původu. Plazma použitá k výrobě takového materiálu byla testována registrovanými metodami a shledána negativní na přítomnost protilátek HIV 1, HIV 2 a HCV a antigenu Hepatitidy B. Přesto žádná metoda testování nemůže kompletně vyloučit přítomnost infekčních agens. Proto musí být tyto reagenty považovány za potencionálně infekční se všemi odpovídajícími bezpečnostními opatřeními.
- Odpadní materiál zlikvidujte dle lokálních směrnic o zacházení s odpadem.
- Reagenty nejsou zaměnitelné mezi šaržemi. Používejte pouze reagenty ze stejné šarže.
- Studie stability prokázaly, že reagenty může být přepravována za pokojové teploty po krátký čas bez jejího poškození.
- Pouze pro laboratorní použití In Vitro.

**PŘÍPRAVA REAGENCIÍ:****Distributor:** Diagnostica s.r.o, Kostelecká 879/59, 196 00 Praha 9, Česká republika, tel.+420 266 315 909, e-mail: [info@diagnostica.cz](mailto:info@diagnostica.cz), [www.diagnostica.cz](http://www.diagnostica.cz)

Reagenty jsou lyofilizovány pod vakuem. Abyste předešli ztrátě produktu, otvírejte zátky opatrně.

**R1** Rozpusťte obsah lahvičky s přesně 2 ml destilované vody.

Míchejte, dokud se produkt úplně nerozpustí. Zabraňte tvorbě pěny a ihned po rozpuštění vložte do analyzátoru, dle příslušného protokolu.

Pro manuální metodu měření nechte reagenty stabilizovat 30 minut při pokojové teplotě (18-25°C), homogenizujte před použitím.

**R2** Rozpusťte obsah lahvičky s přesně 1 ml destilované vody.

Míchejte, dokud se produkt úplně nerozpustí. Zabraňte tvorbě pěny a ihned po rozpuštění vložte do analyzátoru, dle příslušného protokolu.

Pro manuální metodu měření nechte reagenty stabilizovat 30 minut při pokojové teplotě (18-25°C), homogenizujte před použitím.

**PODMÍNKY SKLADOVÁNÍ:**

Neotevřené reagenty musí být skladovány při 2-8°C, ve svém originálním balení. Za těchto podmínek jsou stabilní až do doby expirace, která je vytištěna na každé krabičce.

**R1** **R2** Stabilita zavřené rozpuštěné reagenty, pokud je zabráněno kontaminaci nebo odpařování, je:

- 24 hodin při teplotě 2-8°C
- 12 hodin při pokojové teplotě (18-25°C)
- 1 měsíc při teplotě -20°C a méně\*
- Stabilita v analyzátoru: viz specifický aplikační protokol.

\*Rozmrazujte pouze jednou, co nejrychleji při 37°C a ihned použijte.

**REAGENCIE A MATERIÁLY POTŘEBNÉ, ALE NEPŘÍTOMNÉ:****Reagenty:**

- Destilovaná voda.
- Imidazolový pufr (AR021B/K/L/M/N).
- CaCl<sub>2</sub> 0,025M (AR001B/K/L).
- Specifické kalibrátory a kontroly, jako jsou:

Název produktu	Referenční číslo
BIOPHEN™ V-L Plasma Calibrator	222401
BIOPHEN™ Normal Control Plasma	223201
BIOPHEN™ V-L Control Plasma	223405

Odkazujeme na specifický aplikační protokol pro použitý analyzátor.

**Materiál:**

- Elektromagnetická vodní lázeň nebo poloautomatický nebo automatický koagulometr.
- Stopy, kalibrované pipety, zkumavky ze silikonového skla nebo plastu.

**VZOREK:**

Krev (9 dílů) musí být odebrána do 0,109 M tri-sodného citrátového antikoagulantu (1 díl; 0,109M, 3,2%), přímou venepunkcí. První odebraná zkumavka by měla být znehodnocena.

Vzorky by měly být připraveny a skladovány dle relevantních řádů.

Pro skladování plazmy se odkažte na reference<sup>5</sup>.**PRŮBĚH TESTU:**

Souprava může být použita pro manuální nebo automatickou metodu. Test se provádí při 37°C a čas koagulace je měřen od přidání vápníku.

Pro automatické metody jsou na vyžádání dostupné aplikační protokoly. Odkazujeme na specifické aplikační protokoly a bezpečnostní údaje pro daný analyzátor.

## Metoda měření:

1. Pokud je zapotřebí, rozpusťte kontroly dle jejich specifických instrukcí. Pro stanovení kalibrační křivky naředte kalibrátor v imidazolovém pufru dle následující tabulky („C“ definuje koncentraci FV-L a odpovídá ředění kalibrátoru 1:20).

Kalibrátor	C1	C2	C3	C3 (2C)
FV-L (%) <b>přibližně</b>	10	25	50	100
Objem kalibrátoru	50 µl C1	50 µl C2	50 µl C3	100 µl C3
Objem imidazolového pufru	950 µl	950 µl	950 µl	900 µl

2. Naředte vzorky v imidazolovém pufru dle následující tabulky:

Vzorky	Reference	Ředění
Kontroly	223201 / 223405	1:20
Vzorky	-	1:20

Stanovte kalibrační křivku a proveďte kontrolu kvality. Pokud jsou vzorky skladovány při pokojové teplotě (18 – 25°C), měřte je co nejrychleji. Přesné hodnoty pro šarže kalibrátorů a kontrol jsou uvedeny na letáku přiloženém ke každému balení.

3. Přidejte následující do reakční kvety nebo zkumavky inkubované na 37°C:

Reagencie	Objem
<b>R1 koagulační směs</b>	100 µl
Ředěné kalibrátory, kontroly nebo vzorky	100 µl
Zamíchejte, inkubujte při 37°C po 1 minutu a pak přidejte:	
<b>R2 lidský Faktor Xa</b>	50 µl
Míchejte a inkubujte při 37°C po 1 minutu, pak přidejte (a zapněte stopky):	
<b>CaCl<sub>2</sub> 0,025M inkubované při 37°C</b>	100 µl
Zaznamenejte přesný čas koagulace (CT, sekundy)	

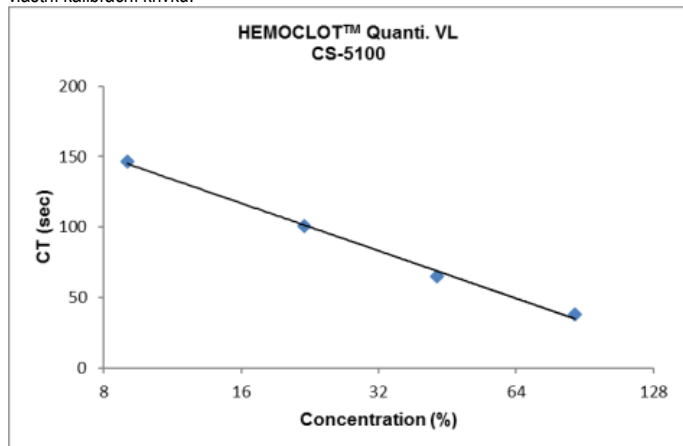
Pokud jsou pro metodu potřeba jiné reakční objemy, než jsou uvedeny výše, musí být poměr reagentů a vzorku přísně dodržen. Každý uživatel je odpovědný za validaci provedených změn postupu a za jejich vliv na výsledek.

## KALIBRACE:

HEMOCLOT™ Quanti. VL souprava se může kalibrovat při měření FV-L. Kalibrátor pokrývající kalibrační rozmezí je k dispozici od HYPHEN BioMed (viz REAGENCIE A MATERIÁL POTŘEBNÝ, ALE NEPŘÍTOMNÝ) a může být použit k stanovení kalibrační křivky.

- Kalibrační rozmezí je od přibližně 10 do 100% (na CS-sérii).

Kalibrační křivka uvedená níže je pouze příklad. Pro měření si musí laboratoř stanovit vlastní kalibrační křivku.



## KONTROLA KVALITY:

Kontrola kvality umožňuje validovat kalibrační křivku a homogenitu reaktivity mezi sériemi při použití stejné šarže reagentů.

Začněte kontrolu kvality do každé série testů, podle správných laboratorních postupů, pro validaci testu.

Nová kalibrace musí být provedena nejméně pro každou novou šarži reagentů, pro každé významné opravě či údržbě přístroje, nebo když výsledek kontrol je mimo přijatelné meze.

Každá laboratoř si musí definovat vlastní přijatelná rozmezí a verifikovat výkon testu na použitém analytickém systému.

## VÝSLEDKY:

- Pro manuální endpoint metodu vykreslete kalibrační křivku lin-log s časem koagulace (v sekundách) na ose Y a koncentrací FV-L (v %) na ose X.
- Koncentrace FV-L (%) v měřeném vzorku je přímo odečtena z kalibrační křivky, pokud jsou použity doporučená ředění.
- Výsledky musí být vyloženy dle pacientova klinického a biologického stavu.

## LIMITY:

- Pro zajištění optimálního průběhu testu a pro splnění specifikací by měly být dodrženy instrukce validované výrobcem HYPHEN BioMed.

**Distributor:** Diagnostica s.r.o, Kostelecká 879/59, 196 00 Praha 9, Česká republika, tel.+420 266 315 909, e-mail: [info@diagnostica.cz](mailto:info@diagnostica.cz), [www.diagnostica.cz](http://www.diagnostica.cz)

- Reagencie s neobvyklým vzhledem nebo jevící známky kontaminace, by měly být znehodnoceny.
- Vzorky podezřelého vzhledu nebo vzorky vykazující známky aktivace musí být znehodnoceny.
- Získaný koagulační čas je citlivý na koncentraci Faktoru V; deficit Faktoru V (<25%) u pacientů s FV-L mutací může způsobit nesprávné výsledky.
- Nevhodný způsob odběru vzorku a příprava plazmy může způsobit spotřebu Faktoru V, což může vést k falešně prodlouženým časům koagulace.
- Přítomnost aktivovaných koagulačních faktorů může zkrátit čas koagulace.
- Měření se může provádět u pacientů s Heparinem (do 1 IU/ml) nebo s terapií vitamin K antagonistou (VKA).
- Měření pacientů s lupus antikoagulans není doporučena, protože jeho interference nebyla řádně prověřena.
- Možná interference mutací, jako jsou FV Cambridge nebo FV Hong Kong, nebyla prověřena.

## OČEKÁVANÉ HODNOTY:

FV-L koncentrace pro normální plazmu je <10%. Každá laboratoř si musí stanovit vlastní přijatelné rozmezí.

Předpokládané hodnoty pro plazmu s R506Q mutací jsou u heterozygotů běžně mezi 25 a 75% a u homozygotů >75%.

Interpretace výsledků může být upravena porovnáním FV-L koncentrace pacienta ku koagulační aktivitě Faktoru V (poměr 1,0 pro homozygoty kolem 0,5 a <0,1 pro normální jedince).

Molekulární biologie umožňuje konfirmaci klasifikace homozygotů nebo heterozygotů pro FV-L mutaci.

## CHARAKTERISTIKA:

- Nízký detekční limit metody závisí na použitém analyzátoru (<2% na Sysmex CS-5100).
- Měřitelné rozmezí závisí na použitém analyzátoru (kolem 5 do 120% FV-L pro Sysmex CS-sérii).
- Studie výkonu byly provedeny vnitřně na Sysmex CS-5100 na laboratorních kontrolách po dobu 5 dní, 2 série denně a 3 opakování každé série pro hladinu kontroly. Byly získány následující hodnoty:

Kontroly	Intra assay			
	N	Průměr	CV%	SD
Kontrola 1	40	10,8	2,9	0,3
Kontrola 2	40	43,1	2,0	0,8
	Inter assay			
	N	Průměr	CV%	SD
Kontrola 1	30	11,1	2,8	0,3
Kontrola 2	30	44,7	2,4	1,1

- Korelace s referenční metodou COATEST™ APC™ Resistance V na ACL Top vs HEMOCLOT™ Quanti. V-L na Sysmex CS-5100: 99% shoda (n = 116).

- **Interference:**  
Žádné interference byly zjištěny na přístroji Sysmex CS-5100 s molekulami do níže uvedených koncentrací:

Hemoglobin	Bilirubin (Free)	Bilirubin (Conjugated)
1000 mg/dl	30 mg/dl	60 mg/dl
Intralipidy	Heparin (UFH/LMWH)	Dabigatran
1000 mg/dl	2 IU/ml	50 ng/ml

Dále odkazujeme na specifický aplikační protokol pro použití analyzátor.

## REFERENCE:

1. Bertina R.M. *et al.* Mutation in blood coagulation factor V associated with Resistance to Activated protein C. Nature. 1994.
2. Segers K. *et al.* Coagulation factor V and thrombophilia: Background and mechanisms. Thromb Haemost. 2007.
3. Kadauke S. *et al.* Activated protein C resistance testing for factor V Leiden. American Journal of Hematology. 2014.
4. Freyburger G. and Labrousse S. Facteur V Leiden (VL) et résistance à la protéine C activée (PCA), facteur II Leiden (G20210 G>A), aspects physiopathologiques et stratégies diagnostiques. Spectra Biologie. 2007.
5. CLSI Document H21-A5: "Collection, transport, and processing of blood specimens for testing plasma -based coagulation assays and molecular hemostasis assays; approved guideline". 2008.

## SYMBOLY:

Použité znaky a symboly jsou ve shodě s ISO 15223-1. Viz dokument definice symbolů.