



HEMOCLLOT™ Quanti. VL

REF CK065K

R1 3 x 2 mL

R2 3 x 1 mL

Souprava pro stanovení activity Faktoru V Leiden.

Poslední revize: 01-2021

POUŽITÍ:

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

SHRNUTÍ A VYSVĚTLENÍ:

Technické^{1,2}:

Aktivovaný protein C hraje regulační roli v koagulačním procesu specifickou inaktivací aktivovaného Faktoru V (Va) a VIII (VIIIa), v přítomnosti kofaktorů. Fenomen rezistence na aktivovaný Protein C (APC) je v 90% případů způsoben mutací R506Q Faktoru V, "Faktor V Leiden". Tato mutace v exonu 10 (1691 G → A) Faktoru V nahrazuje arginine v pozici 506 za glutamin a zabraňuje tak štěpení této části faktoru APC.

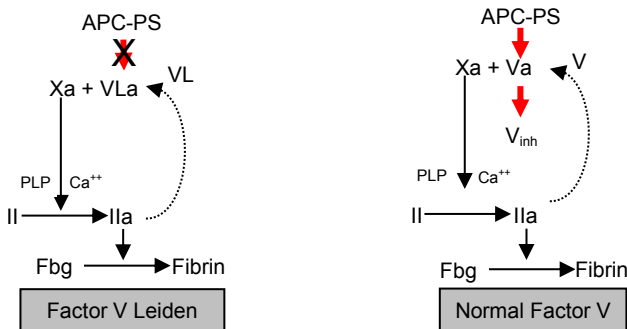
Klinické^{2,3,4}:

FV-L mutace je nejčastější dědičný rizikový faktor trombofilie. Její rozšíření je v bělošské populaci kolem 5%. Pacienti s touto mutací mají zvýšené riziko venózní trombózy, 3 až 7 krát u heterozygotů a až 80 krát u homozygotů.

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

PRINCIP:

HEMOCLLOT™ Quanti. VL je kvantitativní koagulační test pro FV-L měřením jeho senzitivity na inaktivaci APC v přítomnosti PS. Koagulační test se provádí s nadbytkem APC a koagulačních faktorů (Protrombin, Fibrinogen a PS). Koagulace je započata purifikovaným faktorem Xa (v konstantní koncentraci) v přítomnosti fosfolipidů a vápníku. Naměřený čas koagulace (CT) je nepřímo úměrný koncentraci FV-L v testovaném vzorku. Normální faktor V není měřen.



REAGENCIE:

R1 **Koagulační směs**, lyofilizováno. Obsahuje lidský Fibrinogen, lidský Protrombin, PS v určité hladině nastavené pro měření, lidský APC, heparin-neutralizující látku, BSA a stabilizátory.

3 x 2 ml lahvičky.

R2 **Čištěný lidský Faktor Xa**, koncentrace optimalizována pro měření, lyofilizováno. Obsahuje králičí mozkový cephalin (zdroj fosfolipidů) BSA a stabilizátory.

3 x 1 ml lahvičky.

UPOZORNĚNÍ A BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ:

- Některé reagensie obsažené v těchto soupravách obsahují materiály lidského a zvířecího původu. Kdykoliv je pro přípravu těchto reagensií nutná lidská plazma, je potřebné testovat plazmu na protilátky proti HIV 1, HIV 2 a HCV a pro povrchový antigen hepatitidy B schválenými metody a výsledky musí být negativní. Žádné testy nemohou zcela vyloučit přítomnost infekčních agens. Z tohoto důvodu je třeba při manipulaci s tímto biologickým materiálem učinit veškerá opatření nezbytná při používání potenciálně infekčních produktů.
- Odpad musí být likvidován v souladu s příslušnými místními předpisy.
- Používejte pouze reagensie ze stejné série soupravy.
- Studie stability ukazují, že reagensie mohou být přepravovány při pokojové teplotě bez degradace.

- Toto zařízení pro diagnostické použití in vitro je určeno pro odborné použití v laboratoři.

PŘÍPRAVA REAGENCIÍ:

Zátku po vymrazování opatrně vyjměte, aby se zabránilo ztrátám produktu při otevírání lahvičky.

R1 Rekonstituuje obsah každé lahvičky přesně s **2 ml destilované vody**. Intenzivně protřepte až do úplného rozpuštění. Vyhněte se tvorbě pěny. Vložte ji přímo do analyzátoru podle návodu k použití.
Pro manuální metodu nechte stabilizovat 30 minut při pokojové teplotě (18-25°C), před použitím homogenizujte.

R2 Rekonstituuje obsah každé lahvičky přesně s **1 ml destilované vody**. Intenzivně protřepte až do úplného rozpuštění. Vyhněte se tvorbě pěny. Vložte ji přímo do analyzátoru podle návodu k použití.
Pro manuální metodu nechte stabilizovat 30 minut při pokojové teplotě (18-25°C), před použitím homogenizujte.

SKLADOVÁNÍ A STABILITA:

Neotevřené reagensie musí být skladovány při teplotě 2-8°C ve svém originálním balení. Za těchto podmínek mohou být používány až do doby expirace vytištěné na soupravě.

R1 **R2** Stabilita reagensie po rekonstituci bez jakýchkoli kontaminací nebo vypařování a skladované uzavřené je:

- 24 hodin** při teplotě 2-8°C.
- 12 hodin** při pokojové teplotě (18-25°C).
- 1 měsíc** zmrazená při teplotě -20°C nebo nižší*
- Stabilita na palubě analyzátoru: viz specifické aplikace.**

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

POŽADOVANE REAGENCIE A MATERIAL (NEJSOU SOUČÁSTI SOUPRAVY):

Reagensie:

- Destilovaná voda.
- Imidazole Buffer (AR021B/AR021K/AR021L/AR021M/AR021N).
- CaCl₂ 0.025 M (AR001B/AR001K/AR001L).
- Specifické kalibrátory a kontroly, jako jsou:

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

Také viz specifický návod k použití analyzátoru.

Materiály:

- Elektromagnetická vodní lázeň, semi-automatický nebo automatický přístroj pro koagulační měření.
- Stopy, kalibrované pipety, zkumavky z plastu nebo ze silikonového skla.

ODBĚR A PŘÍPRAVA VZORKU:

Krev (9 dílů) musí být opatrně odebrána do antikoagulantu citrátů trisodného (1 díl) (0,109 M, 3,2%) přímou venepunkcí. První zkumavku zlikvidujte.

Vzorky by měly být připravovány a skladovány v souladu s místními pokyny (pro USA viz pokyny CLSI H21-A5⁵ s dalšími informacemi o odběru, manipulaci a skladování).

Informace o skladování plazmy naleznete v referencích⁵.

POSTUP:

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

Pro automatizované metody jsou aplikační návody k dispozici na vyžádání. Viz specifické aplikace a specifická opatření pro každý analyzátor.

Metoda stanovení:

1. Resuspendujte kalibrátory a kontroly jak je uvedeno ve specifických instrukcích. Pro stanovení kalibrační křivky a rozmezí naředte kalibrátory v imidazolovém pufru podle pokynů níže („C“ definuje koncentraci FV-L, odpovídající 1:20 ředění kalibrátoru):

Kalibrátor	C1	C2	C3	C3 (2C)
FV-L (%) přibližně	10	25	50	100
Obejm kalibrátoru	50µL of C1	50µL of C2	50µL of C3	100µL of C3
Obejm imidazolového pufru	950µL	950µL	950µL	900µL

2. Rozpusťte vzorky v imidazolovém pufru, viz níže:

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

Vytvořte kalibrační křivku a testujte s kontrolami kvality. Pokud jsou ředění vzorky skladovány při pokojové teplotě (18-25°C), musí být testovány ihned. Pro každou sérii jsou koncentrace kalibrátorů a kontrol uvedené na letáku dodávaném se soupravou.

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

Reagencie	Obejm
R1 Koagulační směs	100 µL
Kalibrátory, testované plazmy nebo kontroly	100 µL
Promíchejte a inkubujte při 37°C přesně 1 minutu	
R2 Čištěný lidský Faktor Xa	50 µL
Promíchejte a inkubujte při 37°C přesně 1 minutu, a pak přidejte (zapněte stopky):	
CaCl ₂ 0.025M předem inkubovaná při 37°C	100µL
Zaznamenejte přesný čas koagulace (CT, sekundy)	

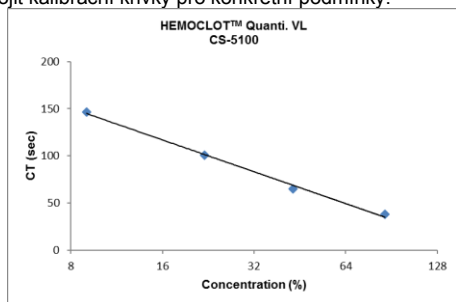
Pokud je pro používanou metodu požadován jiný reakční objem, než výše uvedený, musí být poměr objemu přísně dodržen, aby byla zaručena účinnost testu. Uživatel je zodpovědný za ověření všech změn a jejich vlivu na všechny výsledky.

KALIBRACE:

Test HEMOCLOT™ Quanti. VL může být pro analýzu kalibrován různými FV-L. Soupravy obsahující kalibrátory specifické pro tyto analyty a zahrnující dynamický rozsah testu jsou dostupné u HYPHEN BioMed (viz POŽADOVANÉ REAGENCIE A MATERIÁL (NEJSOU SOUČÁSTÍ SOUPRAVY)) a mohou být použity k vygenerování kalibrační křivky specifické pro testovaný analyt.

- Kalibrační rozmezí je kolem 10 až 100% (na CS-sérii).

Následující kalibrační křivky jsou pouze příkladem. Pro sérii metody je nutné sestavit kalibrační křivky pro konkrétní podmínky.



KONTROLA KVALITY:

Použití kontrol kvality slouží k validaci shody metod spolu s homogenitou testu mezi sériemi pro danou sadu reagensů.

Za účelem validace testu zahrňte kontroly kvality do každé série podle správné laboratorní praxe. Nová kalibrační křivka by měla být definována nejlépe pro každou sérii testů a alespoň pro každou novou sadu reagensů nebo po údržbě analyzátoru, nebo když měřené hodnoty kontroly kvality spadají mimo akceptovatelný rozsah pro danou metodu.

Každá laboratoř si musí definovat a ověřovat vlastní akceptovatelné rozsahy v daném analytickém systému.

VÝSLEDKY:

- Pro manuální endpoint metodu stanovte kalibrační křivku lin-log, s časem koagulace (v sekundách) podél osy Y a koncentrací FV-L (v %) podél osy X.
- Koncentrace FV-L (%) v testovaném vzorku je odvozena přímo z kalibrační křivky, pokud je použita standardní diluce.
- Výsledky by měly být interpretovány podle klinického a biologického stavu pacienta.

OMEZENÍ:

- K zajištění optimálního výkonu testu a splnění specifikací je nutné se řídit technickými instrukcemi ověřenými společností HYPHEN BioMed.
- Jakékoliv reagencie vykazující neobvyklé příznaky nebo známky kontaminace nesmí být použity.
- Jakékoliv podezřelé vzorky nebo ty, které vykazují známky aktivace, nesmí být použity.
- Obdržené koagulační časy jsou citlivé na koncentraci Faktoru V. Deficit FV (<25%) u pacienta nesoucího mutaci FVL může vést k nesprávnému výsledku.
- Nesprávný odběr vzorku a příprava plazmy mohou vést ke konzumpci Faktoru V, a tím k prodloužení koagulačního času (CT).
- Přítomnost aktivovaných koagulačních faktorů může zkrátit koagulační čas (CT).
- Test může být proveden i u pacientů léčených heparinem (do 1 IU/ml) nebo inhibitory K-vitaminu (AVK).
- Testování pacientů s lupus antikoagulant není doporučeno, protože možné interference v testu nebyly zatím šířeji posouzeny.
- Interference jiných mutací - jako FV Cambridge nebo FV Hong-Kong nebyly v testu posuzovány.

OČEKÁVANÉ HODNOTY:

FV-L koncentrace v normální plazmě je < 10%. Každá laboratoř si musí stanovit své vlastní normální rozmezí.

Předpokládané hodnoty pro plazmu s R506Q mutací, jsou pro heterozygoty mezi 25 až 75% a pro homozygoty > 75%.

Porovnáním koncentrace FV-L ku koagulační aktivitě Faktoru V (poměr kolem 1,0 pro homozygoty, kolem 0,5 pro heterozygoty a <0,1 pro normální vzorky) je možné vylepšit interpretaci výsledků.

Molekulární Biologie umožňuje potvrzení klasifikace heterozygotů a homozygotů pro FV-L mutaci.

CHARAKTERISTIKA:

- Nízký limit detekce analyzátoru závisí na analytickém systému (<2% pro Sysmex CS-5100).
- Rozmezí měření závisí na použitém analytickém systému (kolem 5 až 120 % FV-L na 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				Inter assays			
	N	Průměr	CV%	SD	N	Průměr	CV%	SD
Kontrola 1	40	10.8	2.9	0.3	30	11.1	2.8	0.3
Kontrola 2	40	43.1	2.0	0.8	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 (Volný)	Bilirubin (Vázaný)
1000 mg/dL	30 mg/dL	60 mg/dL
Intralipidy	Heparin (UFH/LMWH)	Dabigatran
1000 mg/dL	2 IU/mL	50 ng/mL

Viz specifický návod k použití daného analyzátoru.

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 symboly a značky uvedené v normě ISO 15223-1 viz dokument definic symbolů.

|| Změny oproti předchozí verzi.