



HEMOCLOT Quanti. V-L

Art.Nr. CK065K



Vertrieb und Support:
CoaChrom Diagnostica GmbH
 www.coachrom.com | info@coachrom.com
 Tel. +43-1-236 222 1 | Fax +43-1-236 222 11
 Kostenfreie Nummern für Deutschland:
 Tel. 0800-24 66 33-0 | Fax 0800-24 66 33-3

Quantitative Bestimmung der Faktor V-Leiden Aktivität über dessen Resistenz gegen die Wirkung von Aktiviertem Protein C

VERWENDUNGSZWECK:

HEMOCLOT Quanti. V-L Test ist ein Clotting-Test zur Bestimmung der Faktor V-L (Faktor V-Leiden) Aktivität in humanem Citratplasma über dessen Resistenz gegen aktiviertes Protein C - PC(a). Der Test wird in Anwesenheit von aktiviertem Protein C und Protein S durchgeführt (ein Test pro Patient, keine Ratio!). In Anwesenheit von PC(a) steht die Verlängerung der Gerinnungszeit im umgekehrten Verhältnis zur Faktor V-Leiden Konzentration (Mutation R506Q). Normaler Faktor V wird nicht detektiert.

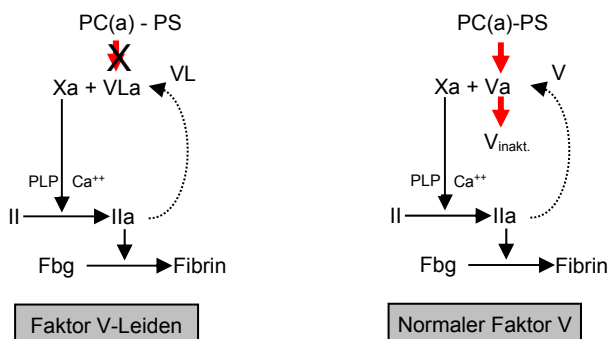
KLINISCHER HINTERGRUND UND ZUSAMMENFASSUNG:

Faktor V-Leiden ist resistent gegenüber aktiviertem Protein C. Aktiviertes Protein C inaktiviert zwar Faktor Va, nicht aber Faktor V-L und kann somit dessen gerinnungsfördernde Aktivität nicht inaktivieren. Patienten mit FV-Leiden (Mutation R506Q) sind somit einem erhöhten thrombotischen Risiko ausgesetzt. Das Thromboserisiko ist bereits in heterozygoten Patienten, die sowohl normalen Faktor V als auch Faktor V-Leiden aufweisen, erhöht. Patienten mit homozygoten Faktor V-Leiden haben ein stark erhöhtes Thromboserisiko.

TESTPRINZIP:

Im HEMOCLOT Quanti. V-L Test wird dem verdünnten Testplasma aktiviertes Protein C im Überschuss und Gerinnungsfaktoren in konstanter Menge zugesetzt. Die Gerinnungsbildung wird durch Zugabe von gereinigtem Faktor Xa in Anwesenheit von Phospholipiden und Calcium gestartet.

Im ersten Schritt wird das verdünnte Testplasma mit gereinigten Gerinnungsfaktoren (Prothrombin, Fibrinogen, Protein S und aktiviertem Protein C (R1) in konstanter, optimierter Konzentration versetzt. Anschließend wird gereinigter Faktor Xa, in Anwesenheit von Phospholipiden (PLP), wiederum in konstanter und optimierter Konzentration, zugegeben (R2). Die Gerinnungsbildung wird durch Zugabe von Calcium (Ca²⁺) gestartet. Die Zeit bis zur Gerinnungsbildung wird gemessen, diese ist dann umgekehrt proportional zur Faktor V-Leiden Konzentration im Testplasma.



- Kalibrationsplasma, lyophilisiert, unverdünnt: BIOPHEN Faktor V-L Kalibrator unverdünnt (Art.Nr. 222401).
- Kontrollplasmen: Normal (BIOPHEN Normal-Kontrollplasma Art.Nr. 223201) und Abnormal (BIOPHEN Akt. PC-R Kontrollplasma Art.Nr. 223405).

Geräte:

- Halb- oder vollautomatischer Gerinnungsautomat.
- Stoppuhr.
- Kalibrierte Pipetten.

LAGERUNG:

Ungeöffnete Reagenzien müssen bei 2-8°C in der Originalverpackung gelagert werden und sind dann bis zum, auf dem Etikett aufgedruckten, Verfalldatum stabil.

Anmerkung: Stabilitätsstudien bei 30°C zeigen, dass die Reagenzien ohne Beeinträchtigung bei Raumtemperatur versendet werden können.

REKONSTITUTION UND STABILITÄT DER REAGENZIEN:

Reagenz 1:

Den Inhalt jeder Flasche mit exakt **2,0 mL** aqua dest. rekonstituieren. Bis zur vollständigen Auflösung des Inhalts gut schütteln. Für 30 Minuten bei Raumtemperatur (18-25°C) inkubieren und dabei gelegentlich schütteln. Den Inhalt vor jedem Gebrauch homogenisieren.

Reagenz 2:

Den Inhalt jeder Flasche mit exakt **1,0 mL** aqua dest. rekonstituieren. Bis zur vollständigen Auflösung des Inhalts gut schütteln. Für 30 Minuten bei Raumtemperatur (18-25°C) inkubieren und dabei gelegentlich schütteln. Den Inhalt vor jedem Gebrauch homogenisieren.

Die Stabilität der rekonstituierten Reagenzien in der Originalflasche:

2 – 8 °C	Raumtemperatur (18-25°C)	Tiefgefroren bei ≤ -20°C *
48 Stunden	24 Stunden	1 Monat

* Gefrorene Reagenzien müssen für 15 Minuten bei 37°C aufgetaut und leicht geschüttelt werden.

Vorsichtsmaßnahmen:

Um die Stabilität zu gewährleisten, müssen die Reagenzien nach jedem Gebrauch der Originalkappe verschlossen werden. Um jegliche Kontamination zu vermeiden, sind die Reagenzien sorgfältig zu handhaben.

Anmerkung:

- Die Flaschen werden unter Vakuum verschlossen. Die Verschlüsse sind vorsichtig zu entfernen, um einen Verlust von Lyophilisat beim Öffnen zu vermeiden.
- Entsprechend der verwendeten Automatenmethode kann es zu einer Abweichung der Rekonstitutionsvolumina kommen. In jedem Fall müssen jedoch die festgelegten reaktiven Verhältnisse (entsprechende Reagenzkonzentration im Testansatz) eingehalten werden.
- Es dürfen ausschließlich Reagenzien aus Testpackungen mit übereinstimmender Chargennummer verwendet werden. Die Kombination der Reagenzien R1 und R2 ist chargenabhängig optimiert.

TESTPLASMA:

Humanes Plasma mit Tri-Natriumcitrat als Antikoagulant.

REAGENZIEN:

HEMOCLOT Quanti. V-L Test enthält alle notwendigen Reagenzien für 3 Serien zu je 20 mit manueller Methode durchgeführten Bestimmungen.

Reagenz 1 (R1), 3 Flaschen mit je 2 mL: Lyophilisierte Gerinnungsfaktoren-Mischung, bestehend aus humanem Fibrinogen, humanem Prothrombin und Protein S in konstanter Konzentration und humanem aktiviertem Protein C. Enthält Heparin-Neutralisator. Jede Flasche ist mit 2 mL destilliertem Wasser zu rekonstituieren.

Reagenz 2 (R2) 3 Flaschen mit je 1 mL: Lyophilisierter, gereinigter, humaner Faktor Xa. Enthält Phospholipide (Cephalin). Jede Flasche ist mit 1 mL destilliertem Wasser zu rekonstituieren.

Anmerkung: Humanes Plasma, das zur Herstellung von gereinigtem Fibrinogen, Prothrombin, Protein S, PC(a) (R1) und Faktor Xa (R2) verwendet wurde wurde negativ getestet auf HIV Antikörper, Hepatitis B-Oberflächenantigen und HCV Antikörper. Bovines Serumalbumin, verwendet als Stabilisator, wird aus bovinem Plasma, das auf Abwesenheit infektiöser Substanzen getestet und aus BSE-freien Tieren gewonnen wurde, hergestellt. Kein Test kann jedoch die Anwesenheit infektiöser Stoffe vollständig ausschließen. Jedes Produkt biologischen Ursprungs muss deshalb mit allen erforderlichen Vorsichtsmaßnahmen als potentiell infektiös behandelt werden.

ERFORDERLICHE, NICHT IM KIT ENTHALTE, MATERIALIEN:

Reagenzien:

- Aqua dest.
- Imidazolpuffer (z.B. Art.Nr. AR021M/N).
- 0,025M CaCl₂ (z.B. Art.Nr. AR001B/K/L).

PROBENGEWINNUNG:

Gewinnung und Lagerung der Proben erfolgen gemäß den Vorgaben von GEHT und NCCLS/CLSI.

- **Gewinnung:** Blut (9 Volumenteile) wird in Trinatrium-Citrat als Antikoagulant (1 Volumenteil) durch Venenpunktur abgenommen. Das erste Röhrchen muss aussortiert werden. Der Zeitraum zwischen Probengewinnung und Tests sollte zwischen einer und zwei Stunden liegen und vier Stunden nicht überschreiten.
- **Zentrifugation:** Um ein plättchenarmes Plasma zu erhalten, ist eine validierte Labormethode zu nutzen wie eine Zentrifugation für mindestens 15 Minuten bei 2000 g bei Raumtemperatur (18 bis 25°C).
- **Lagerung des Plasmas:**
 - 4 Stunden bei Raumtemperatur (18-25°C)
 - 2 Monate bei -20°C
 - 18 Monate bei -70°C

DURCHFÜHRUNG:

Der HEMOCLOT Quanti. V-L Test ist ein Gerinnungstest, der sowohl manuell als auch automatisiert durchgeführt werden kann. Anleitungen für verschiedene Gerinnungsautomaten sind auf Anfrage erhältlich.

Kalibrationskurve:

Es kann das unverdünnte BIOPHEN Faktor V-L Kalibrator-Set (Art.Nr. 222401) verwendet werden. Dieses Set besteht aus 3 unverdünnten Plasma Kalibratoren mit unterschiedlicher Faktor V-Leiden Konzentration. Nach Rekonstitution müssen die Kalibratoren 1:20 mit Imidazolpuffer verdünnt werden um die in der Packung angegebenen Konzentrationen "C" zu erhalten. Die Konzentration „2C“ (etwa 100%)

erhält man durch 1:10 Verdünnung des Kalibrators 3. Beide Kalibratoren-Sets decken einen Bereich von 10% bis 100% FV-L ab. Die jeweiligen Konzentrationen „C“ (in % FV-L) werden für jede Charge exakt bestimmt und sind dem der Kalibratorpackung beigelegten Datenblatt zu entnehmen.

Testplasma:

Das Testplasma muss 1:20 mit Imidazolpuffer verdünnt werden und soll nicht länger als 2 Stunden bei Raumtemperatur (18-25°C) gelagert werden.

Testdurchführung:

Manuelle Methode:

In Teströhrchen oder Küvetten wird nach folgendem Schema zugegeben:

Test	Manuelle Methode
Reagenz R1	100 µL
1:20 verdünntes Plasma oder Kalibrator (siehe Kalibrationskurve)	100 µL
Mischen und für exakt 1 Minute bei 37°C inkubieren, dann zugeben:	
Reagenz R2	50 µL
Mischen und für exakt 1 Minute bei 37°C inkubieren, dann zugeben:	
CaCl ₂ 0.025M, vorinkubiert bei 37°C	100 µL
Messen der Gerinnungszeit	

Falls die jeweilige Methode andere Reagenzvolumenta als die oben beschriebenen erfordert, müssen die Verhältnisse der Reaktionsvolumenta eingehalten werden.

QUALITÄTSKONTROLLE:

Die Verwendung von Kontrollplasmen mit exakt ermittelten Werten für Faktor V-Leiden ermöglicht die Validierung der Kalibration bzw. der homogenen Reaktivität des HEMOCLOT Quanti. V-L Test von Analyse zu Analyse.

Auf jeder Ebene jeder Testserie sollte zumindest eine Qualitätskontrolle inkludiert werden. Eine neue Kalibrationskurve sollte vorzugsweise bei jeder Testserie erstellt werden. Bei Wechsel der Testkitcharge, größeren Wartungsarbeiten am Messgerät und wenn die gemessenen Werte außerhalb des zu erwartenden Bereiches liegen, muss eine neue Kalibrationskurve erstellt werden.

Jedes Labor sollte sich eigene Akzeptanzkriterien abhängig von Reagenzcharge, Arbeitsbedingungen und Gerinnungsgerät definieren.

ERGEBNISSE:

Die Faktor V-L Konzentration (%) wird auf der x-Koordinate (logarithmische Skala) gegen die Gerinnungszeit auf der y-Koordinate (lineare Skala) aufgetragen. Anhand dieser Kalibrationskurve können die Ergebnisse der Proben abgelesen werden.

Die Bestimmung der Gerinnungszeit in Anwesenheit von PC(a) erlaubt die Messung der Faktor V Sensitivität im Testplasma gegenüber der Wirkung von aktiviertem Protein C.

Die zu erwartenden Werte in Proben mit normalem Faktor V liegen bei **≤10% FV-L**. Die Ergebnisse bei Patientenplasmen mit Faktor V-Leiden liegen zwischen **25 und 75% (heterozygoter Faktor V-L)** bzw. **>75% FV-L (homozygoter Faktor V-L)**.

Mögliche Abweichungen von den angegebenen Bereichen sind auf die Konzentration der normalen Faktor V Gerinnungs-Aktivität zurückzuführen. Ein Vergleich der Faktor V-Leiden Konzentration mit der Faktor V Konzentration erlaubt die Optimierung der Ergebnisse (Ratio von etwa 1,0 für homozygote, etwa 0,5 für heterozygote und <0,1 für normale Proben).

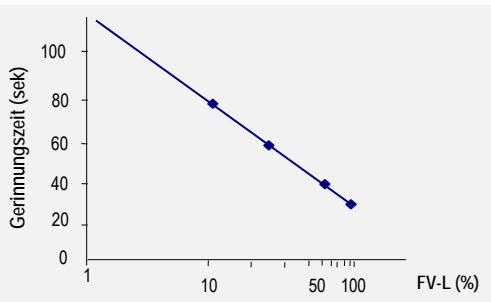
Anmerkung: Die 1:20 Verdünnung eines Plasmapools von heterozygoten Patienten mit der R506Q Mutation entspricht einer Konzentration von 50% Faktor V-L.

Die Bestätigung der Proben-Klassifizierung (heterozygot oder homozygot) ist ausschließlich mit molekularbiologische Methoden möglich.

Der Test ist sehr empfindlich auf die Ab- bzw. Anwesenheit von Faktor V-Leiden und ist für dessen Quantifizierung geeignet.

BEISPIEL FÜR EINE KALIBRATION:

Die nachfolgend gezeigte Kalibrationskurve dient lediglich als Beispiel. Zur Ergebnisberechnung von Proben dürfen ausschließlich die für die jeweilige Analysenserie gemessenen Kalibrationskurven verwendet werden.



EINSCHRÄNKUNGEN:

- Die ermittelten Gerinnungszeiten sind sensitiv gegenüber der Faktor V Konzentration; bei Patienten mit Faktor V Mangel (<25%) kann es zu falschen Ergebnissen kommen.
- Unschadegemäße Probenahme oder Plasmavorbereitung kann zu einem Verlust an Faktor V führen. Dies wiederum kann zu einer Verlängerung der Gerinnungszeit führen.

- Die Anwesenheit von aktivierten Gerinnungsfaktoren kann die Gerinnungszeit verkürzen.
- Der Test kann auch bei Patienten unter Heparintherapie (bis zu 1 IE/mL) oder unter oraler Antikoagulation (OAK) durchgeführt werden.
- Die Testung von Patienten mit Lupus Antikoagulanz wird nicht empfohlen, da der Test diesbezüglich noch nicht ausreichend evaluiert wurde.
- Die Interferenz von anderen Faktor V Mutationen wie Faktor V-Cambridge oder Faktor V-Hongkong wurde nicht evaluiert.

ZU ERWARTENDE WERTE:

Das Vorkommen von Faktor V-L (R506Q Mutation) variiert nach geographischer Lage. In den USA und Kanada beträgt die Inzidenz 5-6%, in Skandinavien sind etwa 15%, in den mediterranen Ländern etwa 5% der Bevölkerung betroffen. In der chinesischen und japanischen Bevölkerung tritt dieser Polymorphismus praktisch nicht auf.

Eine Studie mit HEMOCLOT Quanti. V-L im Normalbereich zeigte Resultate zwischen 0 und 10% FV-L (Manuelle Methode: N=30, Durchschnittswert 1,9% FV-L, SD= 2,4 / STA-R: N=89, Durchschnittswert 2,4% FV-L, SD= 2,3). Jedes Labor sollte die zu erwartenden Bereiche unter den laborspezifischen Bedingungen validieren.

LEISTUNGSMERKMALE:

- Beispiel für die Reproduzierbarkeit anhand von 2 Plasmen mit unterschiedlichen FV-L Konzentrationen (KC-10, STAR oder Wasserbad-Gerinnungsgerät):

Probe	Intra Assay VK%			Inter Assay VK%		
	Gerinnungszeit (Sek.)	% FV-L	N	Gerinnungszeit (Sek.)	% FV-L	N
Probe 1 (100% FVL)	4,4%	5,9%	10	2,2%	3,3%	10
Probe 2 (50% FVL)	4,2%	8,2%	10	2,3%	4,7%	10

Instrument	Probe	Inter Assay VK%		
		Ger.zeit (Sek.)	% FV-L	N
KC-10	Probe 1 (25% FV-L)	7,3%	17,4%	5
	Probe 2 (10% FV-L)	6,0%	29,1%	5
STA-R	Probe 1 (25% FV-L)	5,2%	13,1%	10
	Probe 2 (10% FV-L)	5,6%	23,7%	10
Wasserbad-Gerinnungsgerät	Probe 1 (25% FV-L)	2,7%	10,0%	5
	Probe 2 (10% FV-L)	5,6%	15,2%	5

- HEMOCLOT Quanti. V-L Test zeigt eine gute Übereinstimmung mit Coatest® APC-R Test (Chromogenix):

		Coatest® APC-R	
		Normal	Abnormal
HEMOCLOT FV-L	Normal	108	7
	Abnormal	1	70
	Ausserhalb des Bereichs	2	1
Übereinstimmung	94,18%		
Co-Positiv	97,30%		
Co-Negativ	89,74%		
Probenanzahl	189		

- HEMOCLOT Quanti. V-L Test zeigt eine gute Übereinstimmung mit der Molekularbiologischen Methode:

		Molekularbiologische Methode	
		Normal	Abnormal
HEMOCLOT FV-L	Normal	15	0
	Abnormal	0	6
Übereinstimmung	100%		
Co-Positiv	100%		
Co-Negativ	100%		
Probenanzahl	21		

- Der HEMOCLOT Quanti. V-L Kit zeigt eine gute Homogenität mit dem Kit HEMOCLOT FV-L (HYPHEN BioMed) mit STAR:

Patienten (Mutation R506Q)	Ratio (HEMOCLOT FVL)	%FVL (HEMOCLOT Quanti. VL, STAR)
Normal (N=21)	>2,0 [2,05-2,44]	<5% [0-9%]
Heterozygote (N=37)	1,72 [1,57-1,80]	51% [27-69%]
Heterozygote (OAK-Behandlung) (N=20)	1,73 [1,56-1,84]	52% [34-75%]
Homozygote (N=16)	1,40 [1,24-1,44]	92% [73-118%]

Studie außerhalb der USA durchgeführt.

REFERENZEN:

- Castoldi and all. Expression of the normal Factor V allele modulates the aPC resistance phenotype in heterozygous carriers of the Factor V Leiden mutation. J Thromb Haemost, Vol 3(12)2695, 2005.
- 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).
- Bertina RM and all. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. Nature, Vol 369 (6475) 64-7 (1994).
- Brenner B. and all. Activated protein C resistance can be associated with recurrent foetal loss. British Journal of Haematology; Vol 97 551-554 (1997).
- 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).
- 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).
- Chao-Hung Ho. Prevalence of Activated Protein C Resistance in the Chinese Population. Thrombosis research Vol 88 409-412 (1997).
- 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).
- 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).