



HEMOCLOT™ Quanti. V-L

REF CK065K

R1 3 x 2 mL

R2 3 x 1 mL



Vertrieb und Support:
CooChrom Diagnostica GmbH
www.coachrom.com | info@coachrom.com
Tel. +43-1-236 222 1 | Fax +43-1-236 222 111
Kostenfreie Nummern für Deutschland:
Tel. 0800-24 66 33-0 | Fax 0800-24 66 33-3

Clotting-Test zur Bestimmung der Faktor V-Leiden-Aktivität

VERWENDUNGSZWECK:

HEMOCLOT™ Quanti. VL ist ein Clotting-Test zur quantitativen *In-vitro*-Bestimmung der Faktor V-Leiden (FV-L) Aktivität in humanem Citratplasma über dessen Resistenz gegen die Inaktivierung durch aktiviertes Protein C - PC(a). Der Test wird in Anwesenheit von aktiviertem Protein C und Protein S durchgeführt. Ein zweiter Testansatz, zur Berechnung einer Ratio, ist nicht erforderlich, da das Ergebnis auf eine Kalibrationskurve bezogen wird. Er eignet sich zur manuellen oder automatisierten Durchführung.

ZUSAMMENFASSUNG:

Technisch^{1,2}:

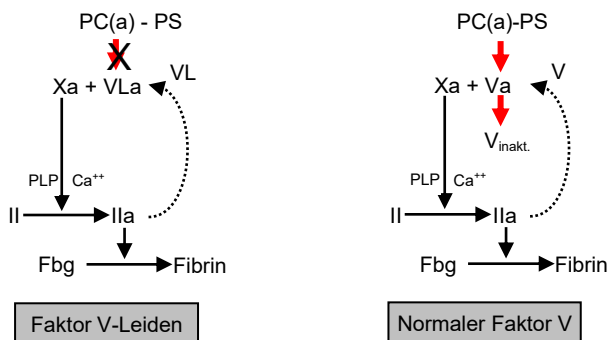
Aktiviertes Protein C inaktiviert in Gegenwart von Kofaktoren die aktivierten Faktoren Va und VIIIa und ist somit ein Regulator im Gerinnungsprozess. Die Mutation F506Q von Faktor V („Faktor V-Leiden“) ist gegenüber aktiviertem Protein C jedoch in mehr als 90% der Fälle resistent, aktiviertes Protein C kann dessen gerinnungsfördernde Aktivität also nicht inaktivieren. Die Mutation im Faktor V Exon 10 (1691 G → A) ersetzt an Position 506 des Proteins Arginin durch Glutamin und verhindert die Spaltstelle durch aktiviertes Protein C.

Klinisch^{2,3,4}:

Die Mutation Faktor V-Leiden ist der bekannteste erbliche Thrombophilie-Risikofaktor und tritt bei ca. 5% der weißen Bevölkerung auf. Patienten mit FV-Leiden sind einem erhöhten thrombotischen Risiko ausgesetzt – um das 3- bis 7-fache bei heterozygoten Patienten und um das bis zu 80-fache bei Patienten mit homozygotem Faktor V-Leiden. Diese genetische Anomalie kann mit einem Clotting-Test in Gegenwart oder Abwesenheit von aktiviertem Protein C nachgewiesen werden.

TESTPRINZIP:

HEMOCLOT™ Quanti. VL ist ein Gerinnungstest zur Quantifizierung von FV-L durch die Messung seiner Sensitivität auf Inaktivierung durch aktiviertes Protein C in Gegenwart von Protein S. Dem verdünnten Testplasma werden aktiviertes Protein C im Überschuss und Gerinnungsfaktoren (Prothrombin, Fibrinogen und Protein S) in konstanter Menge zugesetzt. Die Gerinnung wird durch Zugabe von gereinigtem Faktor Xa (in konstanter, optimierter Konzentration) in Anwesenheit von Phospholipiden und Calcium gestartet. Die gemessene Gerinnungszeit ist umgekehrt proportional zur FV-L-Konzentration im Testplasma. Normaler Faktor V wird nicht gemessen.



REAGENZIEN:

R1 Gerinnungsfaktorenmischung, lyophilisiert. Enthält humanes Fibrinogen, humanes Prothrombin und Protein S in konstanter, für den Test optimierter Konzentration, sowie humanes aktiviertes Protein C, einen Heparin-Neutralisator, BSA und Stabilisatoren.
3 Flaschen mit je 2 mL.

R2 Gereinigter humaner Faktor Xa, in konstanter und für den Test optimierter Konzentration, lyophilisiert. Enthält Kaninchenhirn-Cephalin (Phospholipid-Quelle), BSA und Stabilisatoren.
3 Flaschen mit je 1 mL.

VORSICHTSMASSNAHMEN UND WARNHINWEISE:

- Einige der in diesen Kits enthaltenen Reagenzien beinhalten Stoffe humanen und tierischen Ursprungs. Zur Herstellung von Reagenzien verwendetes humanes Plasma wurde mit registrierten Methoden negativ getestet auf HIV1-, HIV-2-, und HCV-Antikörper sowie Hepatitis B-Oberflächenantigen. Kein Test kann jedoch die Anwesenheit infektiöser Stoffe vollständig ausschließen. Jedes Produkt biologischen Ursprungs muss deshalb mit größter Sorgfalt unter Beachtung der erforderlichen Vorsichtsmaßnahmen und als potentiell infektiös behandelt werden.
- Bei der Entsorgung von Restmaterial sind die geltenden lokalen Richtlinien zu befolgen.

- Benutzen Sie nur Reagenzien, die aus ein- und derselben Charge des Testkits stammen.
- Stabilitätsstudien zeigen, dass die Reagenzien bei Raumtemperatur versandt werden können und für den Versand bei Raumtemperatur stabil sind.
- Dieses *In-vitro*-Diagnostikum ist für den Einsatz im Labor vorgesehen.

REAGENZIVORBEREITUNG:

Die Gummistopfen sind vorsichtig zu öffnen, um einen Verlust an Reagenz zu vermeiden.

R1 Jede Flasche mit genau **2 mL aqua dest.** rekonstituieren.

Das Reagenz gut durchmischen, bis es sich vollständig gelöst hat, dabei Schaumbildung vermeiden, und danach sofort in das Analysegerät laden.

Für die manuelle Methode, 30 Minuten bei Raumtemperatur (18-25°C) stabilisieren lassen, vor Gebrauch homogenisieren.

R2 Jede Flasche mit genau **1 mL aqua dest.** rekonstituieren.

Das Reagenz gut durchmischen bis es sich vollständig gelöst hat, dabei Schaumbildung vermeiden, und danach sofort in das Analysegerät laden.

Für die manuelle Methode, 30 Minuten bei Raumtemperatur (18-25°C) stabilisieren lassen, vor Gebrauch homogenisieren.

LAGERUNG UND STABILITÄT:

Ungeöffnete Reagenzien müssen bei 2-8°C in der Originalverpackung gelagert werden. Sie können bis zu dem auf dem Set aufgedruckten Verfalldatum verwendet werden.

R1 R2 Stabilität der in der Originalflasche gelagerten Reagenzien unter der Voraussetzung, dass diese nicht kontaminiert wurden und keine Verdunstung erfolgte:

- 24 Stunden bei 2-8°C.
- 12 Stunden bei Raumtemperatur (18-25°C).
- 1 Monate tiefgefroren bei ≤ -20°C *
- On-board Stabilität: siehe die spezifische Anwendung.

*Gefrorenes Reagenz einmal bei 37°C auftauen und sofort verwenden.

ERFORDERLICHE, ABER NICHT MITGELIEFERT REAGENZEN UND AUSRÜSTUNGEN:

Reagenzien:

- Destilliertes Wasser.
- Imidazolpuffer (AR021K/AR021L).
- CaCl₂ 0.025 M (AR001K).
- Spezifische Kalibrations- und Kontrollplasmen, z.B.:

Produktbezeichnung	Art.Nr.
BIOPHEN™ APC Resistenz (FV-Leiden) Kalibrationsplasmenset	222401
BIOPHEN™ Normal Kontrollplasma	223201
BIOPHEN™ APC Resistenz (FV-Leiden) Kontrollplasma	223405

Siehe auch die spezifischen Applikationsanleitungen für das verwendete Analysegerät.

Materialien:

- Elektromagnetisches Wasserbad oder halb- oder vollautomatischer Gerinnungsautomat
- Stoppuhr, kalibrierte Pipetten, Glas- oder Kunststoffröhrchen

GEWINNUNG UND HERSTELLUNG DER PROBEN:

Das Blut (9 Volumenteile) wird vorsichtig in 0,109 M Citrat als Antikoagulant (1 Volumenteil) abgenommen. Die Blutabnahme erfolgt durch Venenpunktion mit einer Nadel. Das erste Röhrchen darf nicht verwendet werden.

Herstellung und Aufbewahrung der Proben müssen in Einklang mit den gültigen örtlichen Vorschriften erfolgen (für die USA: Bitte beziehen Sie sich auf die Empfehlungen den CLSI H21-A5⁵ für weitere Informationen über Probengewinnung, Handhabung und Aufbewahrung). Zur Plasma-Lagerung siehe Referenzen⁵.

VORGEHENSWEISE:

Der Testkit eignet sich zur manuellen oder automatisierten Durchführung. Der Test wird bei einer Temperatur von 37°C durchgeführt und die Farbentwicklung bei 405 nm gemessen.

Für automatisierte Methoden sind auf Anfrage Applikationsanleitungen erhältlich. Die spezifischen Applikationsanleitungen und Warnhinweise für das jeweilige Analysegerät sind zu beachten.

Testdurchführung:

1. Die Kalibrations- und Kontrollplasmen gemäß deren jeweiligen Anleitungen rekonstituieren. Zur Erstellung der Kalibrationskurve sind zunächst, um den Kalibrationsbereich herzustellen, die Kalibrationsplasmen wie unten beschrieben in Imidazolpuffer zu verdünnen („C“ definiert die FV-L-Konzentrationen bzw. Ratio-Äquivalente und entspricht einer 1:20 Verdünnung des Kalibrators):

Kalibrator	C1	C2	C3	C3 (2C)
FV-L (%) ca.	10	25	50	100
Menge Kalibrator	50µL C1	50µL C2	50µL C3	100µL C3
Menge Imidazolpuffer	950µL	950µL	950µL	900µL

2. Die Proben wie unten beschrieben in Imidazolpuffer verdünnen:

	Art.Nr.	Verdünnung
Kontrollen	223201 / 223405	1:20
Proben	n.a.	1:20

Erstellen Sie die Kalibrationskurve und überprüfen Sie diese mit den Qualitätskontrollplasmen. Sofern sie bei Raumtemperatur (18-25°C) aufbewahrt werden, müssen die verdünnten Proben schnell getestet werden. Es müssen die genauen Konzentrationen der Kalibratoren und Kontrollen beachtet werden, die für die jeweilige Charge auf dem im Testkit enthaltenen Zertifikat vermerkt sind.

3. In ein bei 37°C vorinkubiertes Teströhrchen oder eine Mikrotiterplatte wird nach folgendem Schema zugegeben:

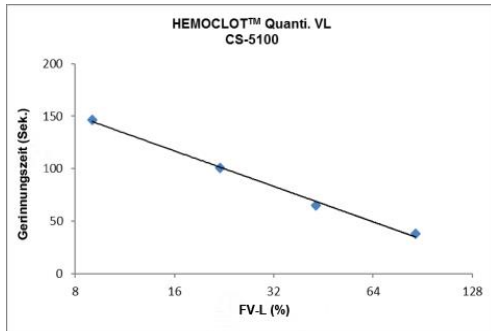
Reagenzien	Menge
R1 Gerinnungsfaktorenmischung	100 µL
Verdünnte Kalibratoren, Proben oder Kontrollen	100 µL
Mischen und für exakt 1 Minute bei 37°C inkubieren	
R2 Humaner Faktor Xa	50 µL
Mischen und für exakt 1 Minute bei 37°C inkubieren, dann zugeben (und die Stoppuhr starten):	
CaCl ₂ 0.025M, vorinkubiert bei 37°C	100µL
Messen der Gerinnungszeit (in Sek.)	

Sollte das verwendete Verfahren andere Reagenzvolumenta als die oben beschriebenen erfordern, müssen die Verhältnisse der Reagenzkonzentrationen genau eingehalten werden, um den Erhalt der Leistungsmerkmale des Tests zu gewährleisten. Der Benutzer ist für die Validierung von Modifizierungen und ihren Einfluss auf alle Ergebnisse verantwortlich.

KALIBRATION:

Die Kalibration erfolgt mit dem BIOPHEN™ APC Resistenz (FV-Leiden) Kalibrationsplasmenset (Art.Nr. 222401) von Hyphen BioMed. Dies ist ein Set aus 3 Kalibrationsplasmen mit unterschiedlicher FV-L-Aktivität (ausgedrückt in %) bzw. APC-Resistenz (ausgedrückt in Ratio-Äquivalenten, d.h. Werten, die mit den Ergebnissen ratiobasierter Tests vergleichbar sind). Die Kalibrationskurve deckt einen Bereich von ca. 0 bis 100% FV-L-Aktivität bzw. ca. 0,7 bis 10 Ratio-Äquivalenten ab.

Bei der unten gezeigten Kalibrationskurve handelt es sich lediglich um ein Beispiel. Es muss die für die Testserie erstellte Kalibrationskurve verwendet werden.



QUALITÄTSKONTROLLE:

Die Verwendung von Kontrollplasmen mit exakt ermittelten Werten für FV-L-Aktivität und Ratio-Äquivalente ermöglicht bei Gebrauch der gleichen Reagenzchargen die Validierung der Methodenkonformität sowie die Überprüfung der Homogenität der Messungen von einer Serie zur anderen.

Gemäß guter Laborpraxis ist bei jeder Testserie eine Qualitätskontrolle zu inkludieren, um die generierten Ergebnisse zu überprüfen. Am besten sollte für jede neue Versuchsreihe eine neue Kalibrierkurve erstellt werden, mindestens jedoch bei Chargenwechsel sowie nach Wartungsarbeiten an dem Gerinnungsautomaten oder wenn die Kontrollen außerhalb des Vertrauensbereiches liegen. Jedes Labor sollte die Richtigkeit der Zielwerte und Akzeptanzbereiche unter den eigenen Testbedingungen überprüfen.

ERGEBNISSE:

- Bei der manuellen Endpunkt-Methode wird die Kalibrationskurve auf lin/log-Skala mit der Gerinnungszeit (in Sek.) auf der y-Achse und der FV-L-Konzentration (in %) bzw. den Ratio-Äquivalenten (ohne Einheit) auf der x-Achse aufgetragen. Anhand dieser Kalibrationskurve können die Ergebnisse der Proben abgelesen werden.
- Die zu erwartenden Werte in Proben mit normalem FV liegen bei $\leq 10\%$ FV-L bzw. ≥ 3 Ratio-Äquivalenten. Die Ergebnisse bei Patientenplasmen mit FV-Leiden liegen zwischen 25 und 75% bzw. 1 und 2 Ratio-Äquivalenten (heterozygoter FV-L) bzw. $> 75\%$ FV-L bzw. < 1 Ratio-Äquivalenten (homozygoter FV-L). Die Unterscheidung zwischen heterozygotem und homozygotem FV-L ist jedoch wie bei allen funktionellen Tests indikativ und muss durch molekularbiologische Analyse bestätigt werden.

- Anmerkung: Die 1:20-Verdünnung eines Plasmapools von heterozygoten Patienten mit der R506Q-Mutation entspricht einer FV-L-Aktivität von 50% bzw. einer Ratio-Äquivalente von ca. 1,4.
- Die Ergebnisse müssen orientiert am klinischen und biologischen Zustand des Patienten interpretiert werden.

EINSCHRÄNKUNGEN:

- Bitte befolgen Sie die von HYPHEN BioMed validierten technischen Anweisungen aufs Genaueste, um optimale Testergebnisse zu erzielen und den Spezifikationen zu entsprechen.
- Jedes Reagenz mit unüblicher Erscheinung oder Anzeichen einer Kontamination muss verworfen werden.
- Auffällige Proben oder solche, die Anzeichen einer Aktivierung aufweisen, müssen verworfen werden.
- Die gemessene Gerinnungszeit ist sensitiv gegenüber der Faktor V Konzentration. Bei Patienten mit Faktor V Mangel ($< 25\%$) oder bei unsachgemäßer Probenhandhabung (mit daraus folgendem Verlust von Faktor V) kann es zu falsch-niedrigen Ergebnissen kommen.
- Unsachgemäße Probennahme und Vorbereitung des Plasmas kann einen Verbrauch von Faktor V herbeiführen. Dies kann zu verlängerten Gerinnungszeiten führen.
- Die Anwesenheit von aktivierten Gerinnungsfaktoren kann die Gerinnungszeit verkürzen.
- Der Test kann bei Patienten unter Heparintherapie (bis mindestens 1 IE/mL) oder unter Therapie mit Vitamin-K-Antagonisten (VKAs) durchgeführt werden. Direkte orale Antikoagulantien (DOAKs) können hingegen falsch-niedrige Ergebnisse verursachen.
- Es besteht keine Interferenz durch Lupus Antikoagulans.
- Aufgrund des Testprinzips ist zu erwarten, dass auch die Aktivität anderer Faktor V Mutanten (z.B. Cambridge, Hong Kong) erfasst wird. Dies wurde jedoch noch nicht ausreichend evaluiert.

ERWARTETE WERTE:

Die FV-L-Konzentration in Normalplasma liegt bei $< 10\%$. Jedes Labor muss jedoch seinen eigenen Normalbereich festlegen.

Die Ergebnisse bei Patientenplasmen mit Faktor V-Leiden liegen zwischen 25 und 75% bzw. 1 und 2 Ratio-Äquivalenten (heterozygoter Faktor V-L) bzw. $> 75\%$ FV-L bzw. < 1 Ratio-Äquivalenten (homozygoter Faktor V-L). 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).

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

LEISTUNGSMERKMALE:

- Die untere Nachweisgrenze ist vom verwendeten Analysesystem abhängig ($< 2\%$ auf Sysmex CS-5100).
- Der Messbereich ist vom verwendeten Analysesystem abhängig (ca. 5 bis 120% FV-L auf der Sysmex CS-Serie).
- Leistungsstudien wurden intern auf Sysmex CS-5100 durchgeführt. Sie wurden mittels Qualitätskontrollen des Labors über 5 Tage mit 2 Testserien pro Tag und drei Wiederholungen innerhalb jeder Serie für jedes Kontrollniveau ausgewertet. Die folgenden Daten wurden erhalten:

Kontrolle	Intra Assay				Inter Assay			
	n	Mittelwert	CV%	SD	n	Mittelwert	CV%	SD
Kontrolle 1	40	10,8	2,9	0,3	30	11,1	2,8	0,3
Kontrolle 2	40	43,1	2,0	0,8	30	44,7	2,4	1,1

- Korrelation mit der Referenzmethode (COATEST™ APC™ Resistance V auf ACL Top gegenüber HEMOCLOT™ Quanti. V-L auf Sysmex CS-5100): 99% Übereinstimmung (n = 116).

Interferenzen:

Auf Sysmex CS-5100 wurde mit den folgenden Substanzen und bis zu den folgenden Konzentrationen keine Interferenz beobachtet:

Hämoglobin	Bilirubin (frei)	Bilirubin (konjugiert)
1000 mg/dL	30 mg/dL	60 mg/dL
Intralipide	Heparin (UFH/LMWH)	Dabigatran
1000 mg/dL	2 IE/mL	50 ng/mL

Siehe auch spezifische Anwendungsanleitung des jeweiligen Analyseautomaten.

REFERENZEN:

- Bertina R.M. et al. Mutation in blood coagulation factor V associated with Resistance to Activated protein C. Nature. 1994.
- Segers K. et al. Coagulation factor V and thrombophilia: Background and mechanisms. Thromb Haemost. 2007.
- Kadauke S. et al. Activated protein C resistance testing for factor V Leiden. American Journal of Hematology. 2014.
- 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.
- CLSI Document H21-A5: "Collection, transport, and processing of blood specimens for testing plasma-based coagulation assays and molecular hemostasis assays; approved guideline". 2008.

SYMBOLE:

Die verwendeten Symbole und Zeichen sind in der ISO-Norm 15223-1 aufgeführt. Das der Packung beiliegende Symbolerklärungs-Blatt ist zu beachten.

Änderungen im Vergleich zur Vorversion