

Aplicação Prevista

Para a determinação da resistência à Proteína C activada, causada pela mutação no Factor V:Q⁵⁰⁶ (Factor V Leiden), em plásmas de indivíduos sem tratamento e doentes que se encontram sob terapêutica anti-coagulante oral (TAO) ou terapêutica com heparina.

Resumo e Princípio

O fenótipo de resistência à APC^{1,2} deve-se, em mais de 90% dos casos, à mutação no gene do Factor V, resultando numa substituição de Arg⁵⁰⁶ (R) por Gln (Q) na proteína Factor V. A selectividade do Factor V:Q⁵⁰⁶ ou outras mutações existentes no gene do Factor V que tornam a proteína resistente à inibição pela APC, é aumentada pela normalização das concentrações de outras proteínas que estão envolvidas na formação e regulação da trombina. Ao analisar o ensaio da resistência à APC baseado na TTPA em presença de um excesso de Plasma reagente em Factor V, a sensibilidade e especificidade à mutação do Factor V:Q⁵⁰⁶ aumenta significativamente. Além disso, esta alteração permite que seja feita a análise de plásmas provenientes de doentes com TAO.

O plasma da amostra é previamente diluído com Plasma reagente em Factor V e é incubado com o reagente TTPA, durante um período de tempo pré-determinado. A coagulação inicia-se quando se junta CaCl₂ na ausência e na presença de APC e o tempo de formação do coágulo é anotado.

Composição

O kit Factor V Leiden (APC™ Resistance V) - Factor V Leiden (Resistência à APC™ V) é composto por:

- R** **APTT reagent** (Núm. Cat. 0020008721): recipientes 2 x 4 mL de fosfolípidos purificados com sílica coloidal como activador de contacto.
- FV** **Factor V Reagent Plasma** (Núm. Cat. 0020008723): recipientes 2 x 4 mL de plasma humano liofilizado com um baixo nível de actividade do Factor V e estabilizadores (Também está disponível em separado, Núm. Cat. 0020008800).
- A** **APC/Calcium chloride** (Núm. Cat. 0020008722): recipientes 2 x 2 mL de Proteína C humana activada coliofilizada com CaCl₂.
- Ca** **Calcium chloride** (Núm. Cat. 0020008720): recipientes 2 x 2 mL de cloreto de cálcio em tampão Tris, contendo albumina de sorbo bovino.
- 1** **APC Control Plasma Level 1** (Núm. Cat. 0020008724): recipientes 2 x 1 mL de plasma humano normal liofilizado.
- 2** **APC Control Plasma Level 2** (Núm. Cat. 0020008725): recipientes 2 x 1 mL de plasma humano anormal liofilizado.

*Nota: Os reagentes TTPA e APC/CaCl₂ não podem ser trocados entre lotes.

AVISOS E PRECAUÇÕES:

O material utilizado neste produto foi analisado com testes aprovados pela FDA e verificou-se a ausência de reacção ao Antígeno de Superfície da Hepatite B (HBsAg), aos anticorpos anti-HCV e anti-HIV 1/2. No entanto, deve-se manipular com precaução, como potencialmente infeccioso.

Evitar o contacto com a pele e os olhos (S 24/25). Não deitar os resíduos no esgoto (S 29). Usar vestuário de protecção adequado (S 36).

Para uso em diagnóstico in vitro.

Preparação

APTT reagent: Misturar cuidadosamente antes de utilizar.

Factor V Reagent Plasma: Dissolver o conteúdo de cada recipiente em 4 mL de água destilada (tipo II de acordo com a NCCLS). Fechar o recipiente e homogeneizar suavemente. Verificar se o produto fica completamente dissolvido. Conservar o reagente entre 15 e 25°C durante 30 minutos. Misturar invertendo o recipiente, antes de utilizar. Não agitar.

APC/Calcium chloride: Dissolver o conteúdo de cada recipiente em 2 mL de água destilada (tipo II de acordo com a NCCLS). Fechar o recipiente e homogeneizar suavemente. Verificar se o produto fica completamente dissolvido. Conservar o reagente entre 15 e 25°C durante 30 minutos. Misturar invertendo o recipiente, antes de utilizar. Não agitar.

Calcium chloride: Pronto a ser utilizado.

APC Control Plasma Level 1 & 2: Dissolver o conteúdo de cada recipiente em 1 mL de água destilada (tipo II de acordo com a NCCLS). Fechar o recipiente e homogeneizar suavemente. Verificar se o produto fica completamente dissolvido. Conservar o controlo entre 15 e 25°C durante 30 minutos. Misturar invertendo o recipiente, antes de utilizar. Não agitar.

Conservação e estabilidade dos reagentes

Os reagentes fechados, que ainda não foram utilizados, são estáveis até ao final do prazo de validade, que consta no rótulo, desde que conservados entre 2-8°C.

APTT reagent - Depois de aberto, o reagente é estável durante 1 semana entre 15-25°C, 1 mês a 2-8°C dentro do recipiente original, 8 horas a 15°C nos Sistemas ACL ou 3 dias a 15°C nos Sistemas ACL Futura, ACL Advance e ACL TOP sem qualquer agitação. Não voltar a congelar.

Factor V Reagent Plasma - Estabilidade depois da reconstituição: 8 horas a 15-25°C, 24 horas a 2-8°C, 3 meses a -20°C ou abaixo dentro do recipiente original, ou 3 dias a 15°C nos Sistemas ACL Futura, ACL Advance e ACL TOP sem qualquer agitação. O reagente pode ser descongelado a 37°C. Homogeneizar suavemente antes de utilizar. Não recongelar.

APC/Calcium chloride - Estabilidade após reconstituição: 8 horas a 15-25°C, 5 dias a 2-8°C, 3 meses a -20°C ou abaixo dentro do recipiente original, ou 3 dias a 15°C nos Sistemas ACL Futura, ACL Advance e ACL TOP sem qualquer agitação. Não recongelar.

Calcium chloride - Depois de aberto, o reagente é estável durante 1 semana a 15-25°C, 1 mês a 2-8°C dentro do recipiente original, ou 3 dias a 15°C nos Sistemas ACL Futura, ACL Advance e ACL TOP sem qualquer agitação.

APC Control Plasma Level 1 & 2 - Estabilidade após reconstituição: 6 horas a 2-8°C e 15-25°C ou 3 meses a -20°C ou abaixo dentro do recipiente original. O controlo pode ser descongelado a 37°C. Homogeneizar suavemente antes de utilizar. Não recongelar.

Para obter uma estabilidade óptima retire os reagentes do aparelho e conserve-os entre 2-8°C, nos recipientes originais.

Método de ensaio

Seguir as instruções da técnica de acordo com o Manual do Operador e/ou com o Manual de Aplicações dos Aparelhos IL.

Recolha e preparação de amostras

Adicionar nove partes de sangue extraído recentemente por punção venosa a uma parte de citrato trissódico. Para efectuar a recolha, o manuseamento e a conservação da amostra devem seguir-se as recomendações referidas no documento H21-A4 da NCCLS.

Reagentes adicionais e plásmas de controlo

Os produtos abaixo mencionados, pelo que podem ser pedidos em separado:

	Américas, Pacífico e Europa
Plasma Reagente Factor V	Núm.Cat. 0020008800
Solução de limpeza	Núm.Cat. 0009831700

Controlo de Qualidade

Para realizar um programa completo de Controlo de Qualidade, recomenda-se a utilização dos controlos normais e anormais. Os controlos adequados para este programa são os APC Plásmas Controlo Nível 1 e Nível 2. Cada laboratório deve estabelecer a sua própria média e desvio padrão e deve efectuar um programa de controlo de qualidade para monitorizar os seus resultados. Os controlos devem ser analisados uma vez em cada turno de 8 horas, de acordo com a norma vigente no laboratório. Ver Manual do Operador para mais informações. Consultar a publicação de Westgard e col. para identificar e solucionar situações anormais do Controlo de Qualidade.

Resultados

Os resultados do APCR-V são expressos em segundos e rácio. Para mais informações consultar o Manual do Operador dos Aparelhos.

Limitações/Interferências

Não existem diferenças significativas entre amostras frescas e congeladas. A sensibilidade e especificidade à mutação do Factor V:Q⁵⁰⁶ nas análises de plasma de doentes com TAO não é afectada pelo valor de INR.

Não existe interferência nos valores de heparina (não fraccionada e com baixo peso molecular) acima de 1 U/mL nos Sistemas de Coagulação da IL.

Os resultados do APCR-V nos Sistemas ACL Futura/ACL Advance não são afectados por concentrações de hemoglobina até 400 mg/dL, bilirrubina até 20 mg/dL e triglicéridos até 1000 mg/dL. Os resultados do APCR-V no ACL TOP não são afectados por concentrações de hemoglobina até 500 mg/dL, bilirrubina até 18,8 mg/dL e triglicéridos até 1791 mg/dL.

Doentes com níveis altos de actividade inibidora conhecidos (ex: anticorpos fosfolípidos) podem fornecer um resultado anormal de TTPA e por consequência resultados que podem induzir em erro.

Nesses casos, ao aumentar o factor de diluição (ex: 1 + 9 ou 1 + 19) pode corrigir-se o resultado do teste.

Valor de "Cut-off"

A existência de Resistência à APC devido à mutação FV:Q⁵⁰⁶ está indicada por um valor do rácio APCR-V inferior ou igual ao valor de "cut-off".

Quando se utiliza o kit Factor V Leiden (Resistência à APC™ V), deve estabelecer-se um valor de "cut-off" para cada equipamento. O valor de "cut-off" é estabelecido como o valor que distingue as amostras normais das anormais. As amostras anormais têm um rácio de APCR-V inferior ou igual ao valor de "cut-off". O rácio APCR-V de amostras normais é superior ao valor de "cut-off".

Procedimento para estabelecer o valor de "cut-off":

- Efectuar cinco determinações seguidas do mesmo plasma que tenha um genótipo normal de APCR-V. Voltar a analisar a série referida mais duas vezes. Comprovar que o Coeficiente de Variação (CV) do rácio APCR-V inter e intra-série é inferior a 7%.
- Determinar o rácio APCR-V em pelo menos 30 plásmas de indivíduos com idades compreendidas entre os 20 e os 65 anos. Incluir também o Plasma Controlo Nível 1 e Nível 2 para tornar válido o ensaio.
- Verificar se os rácios da APCR-V dos Plásmas Controlo se encontram dentro do limite indicado na ficha técnica (folheto).
- Calcular a média dos rácios da APCR-V das 30 amostras.
- Calcular o valor do "cut-off" da Resistência à Proteína C Activada, relacionada com o Factor V, da seguinte forma: se a média do rácio APCR-V (calculada no ponto 4) for < 2,8; multiplicar a média x 0,8; mas se a média do rácio APCR-V (calculada no ponto 4) for > 2,8; multiplicar a média x 0,75.
- O rácio APCR-V do Plasma Controlo Nível 1 deve ser mais alto que o valor de "cut-off" estabelecido. O rácio APCR-V do Plasma Controlo Nível 2 deve ser mais baixo que o valor de "cut-off" estabelecido. A IL recomenda que o valor de "cut-off" seja verificado usando os Plásmas Controlo Nível 1 e Nível 2.

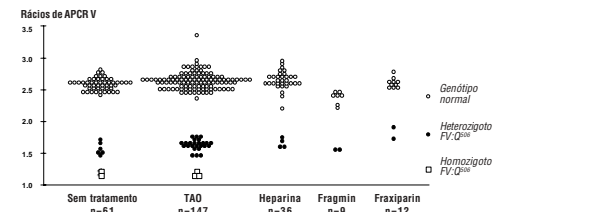
Valores Esperados

Efectuou-se um estudo de intervalo normal de valores com o kit Factor V Leiden (Resistência à APC™ V).

Sistema	N	Intervalo (unidades)
Família ACL	30	2,18 - 3,38 (rácios de APCR V)
ACL Futura/ACL Advance	30	2,42 - 3,18 (rácios de APCR V)
ACL TOP	120	2,61 - 3,32 (rácios de APCR V)

Os seguintes resultados ilustram aplicação do teste APC V Resistência em análises a plásmas de indivíduos sem tratamento, doentes com TAO com um INR de 1,3 - 6,0 e doentes que estejam a receber heparina não fraccionada ou heparina com baixo peso molecular (nomeadamente Fragin™ e Fraxiparin™).

Ao efectuar uma pré-diluição do plasma do doente com o Plasma reagente em Factor V, podem diferenciar-se os genótipos normal, heterozigoto e homozigoto para a mutação no Factor V, fazendo uma análise à resistência APC em plásmas de doentes com TAO ou heparinizados.



Os rácios de APCR V são distribuídos de acordo com o genótipo do Factor V. Para um dado genótipo, obtêm-se rácios de APC similares independentemente do grupo a que pertencem os doentes. Os valores médios são: 2,6 (normal), 1,7 (heterozigoto FV:Q⁻) e 1,2 (homozigoto FV:Q⁻). O kit Factor V Leiden (Resistência à APC[™] V) fornece > 99% de sensibilidade para a mutação FV:Q⁻, tal como determinado nos sistemas ACL (n = 295). Os resultados foram obtidos usando o mesmo lote de reagente. Devido às variáveis que podem afectar os tempos de coagulação, cada laboratório deve estabelecer os seus próprios limites de normalidade.

Características Técnicas

Precisão

A precisão foi avaliada, intra e na totalidade (de análise para análise e de dia para dia), ao longo de vários ensaios, com amostras normais e anormais.

Família ACL	Média (rácios de APCR V)	CV% (Intra-série)	CV% (Total)
APC Controlo Nível 1	2,49	1,8	2,0
APC Controlo Nível 2	1,58	1,9	2,2

ACL Futura/ ACL Advance	Média (rácios de APCR V)	CV% (Intra-série)	CV% (Total)
APC Controlo Nível 1	2,34	2,1	2,3
APC Controlo Nível 2	1,54	1,2	1,1

ACL TOP	Média (rácios de APCR V)	CV% (Intra-série)	CV% (Total)
APC Controlo Nível 1	2,94	3,9	4,6
APC Controlo Nível 2	1,85	1,4	2,0

Correlação:

Unidade	sistema	declive	intersecção	r	Método de Referência
Rácios de APCR V	ACL TOP	1,041	-0,004	0,970	APCR-V em ACL Advance

A precisão e os dados de correlação foram obtidos através da utilização de lotes específicos de reagentes e de controlos.

LOT



ACCEPTANCE RANGES

	ACL Family, ACL Futura/ACL Advance and ACL TOP	
APC Control Plasma	1	2
LOT		
APCV-1	sec	sec
APCV-2	sec	sec
APCR-V	ratio	ratio

Note:

These ranges cover the expected APTT clotting times and APCR-V ratios when performing analysis of APC Control Plasma Level 1 and 2 on the IL Coagulation Systems with the above Lot. No. using the Factor V Leiden (APC[™] Resistance V) kit.

Hinweis:

Diese Bereiche beziehen sich auf zu erwartende Gerinnungszeiten und APCR-V Ratios bei Messung der APC Kontrollplasmen Level 1 und 2 an IL Gerinnungssystemen mit der oben genannten Charge und Verwendung des Faktor V Leiden (APC[™] Resistance V) Kits.

Nota:

Estos son los rangos esperados para los Plasmas Control APC Nivel 1 y Nivel 2 en los tiempos de coagulación y ratios APC-V, en los Sistemas de Coagulación IL con el N° Lote indicado usando el kit Factor V Leiden (APC[™] Resistance V).

Note:

Ces valeurs limites concernent les temps de formation du caillot et les rapports APCR-V attendus lors de l'analyse des contrôles APC niveau 1 et 2, réalisé sur les analyseurs de coagulation IL en utilisant les numéros de lots de contrôles ci-dessus et le coffret Factor V Leiden (APC[™] Resistance V).

Nota:

Gli intervalli dei tempi di coagulazione e delle Ratio sono stati assegnati usando strumenti ACL, i lotti sopraindicati dei Plasmi di controllo e del kit Fattore V Leiden (APC[™] Resistance V).

Nota:

Estes intervalos incluem os tempos de APTT esperados e os rácios de APC-V quando são executadas análises do APC Plasma controlo Nível 1 e Nível 2 nos sistemas de Coagulação IL, com o lote acima mencionado, utilizando o kit Factor V Leiden (APC[™] Resistance V).

1. Dahlbäck B, Carlsson M, Svensson PJ. Familial Thrombophilia Due to a Previously Unrecognized Mechanism Characterized by Poor Anti-Coagulant Response to Activated Protein C: Prediction of a Cofactor to Activated Protein C. Proc. Natl. Acad. Sci. 1993; 90: 1004-1008
2. Svensson PJ, Dahlbäck B. Resistance to Activated Protein C as a Basis for Venous Thrombosis. N Engl. J Med. 1994; 330: 517-522.
3. Bertina RM, Koелеman BPC, Koster T, Rosendaal FR, Dirven RJ, de Ronde H, van der Velden PA, Reitsma P H. Mutation in Blood Coagulation Factor V Associated with Resistance to Activated Protein C. Nature. 1994; 369: 64-67.
4. Voorberg J, Roelse J, Koopman R, Büller H, Berends F, ten Cate JW, Mertens K, van Mourik JA. Association of Idiopathic Venous Thromboembolism with Single Point Mutation at Arg506 of Factor V. Lancet. 1994; 343: 1535-1536.
5. Greengard JS, Sun X, Xu X, Fernandez JA, Griffin JH, Evatt B. Activated Protein C Resistance Caused by Arg506 Gln Mutation in Factor Va. Lancet. 1994; 343: 1361-1362.
6. Jorquera JI, Montoro JM, Fernandez, MA, Aznar JA, Aznar J. Modified Test for Activated Protein C Resistance. Lancet. 1994; 344: 1162-1163.
7. Aznar J, Piedad V, and Jorquera JI. Modified Coagulative Test for Evaluation of Activated Protein C Resistance. Thromb. Haemost. 1996; 9: 165-166.
8. Trossaert M, Conard J, Horellou MH, Samama MM, Ireland H, Bayston TA, Lane DA. Modified APC Resistance Assay for Patients on Oral Anticoagulants. Lancet. 1994; 344: 1709.
9. Dahlbäck B. Modified APC-Resistance Test Offers Increased Sensitivity and Specificity for FV:Q506 Allele. Thromb. Haemost. 1995; 74: 1380-1381.
10. Trossaert M, Conard J, Horellou MH, Elalamy I, Samama MM. The Modified APC Resistance Test in the Presence of Factor V Deficient Plasma Can be used in Patients Without Oral Anticoagulant. Thromb. Haemost. 1996; 75: 520-526.
11. Cadoy Y, Siè P, Alhenc-Glas M, Aiach M. Evaluation of APC Resistance in the Plasma of Patients with Q506 Mutation of Factor V (Factor V Leiden) and Treated by Oral Anticoagulants. Letter to the Editor. Thromb. Haemost. 1995; 73: 734-735.
12. Richmond JY, McKinney RW eds. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, U.S. Dept. of Health and Human Services, Public Health Service, 4th Edition, 1999.
13. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Preparation and Testing of Reagent Water in the Clinical Laboratory, Third Edition, NCCLS Document C3-A3; Vol. 17 No. 18.
14. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Collection, Transport and Processing of Blood Specimens for Testing Plasma-Based Coagulation Assays, Fourth Edition, NCCLS Document H21-A4; Vol. 23 No. 35.
15. Zucker S, Cathey MH, West B. Preparation of Quality Control Specimen for Coagulation, Am. J. Clin. Pathol. 1970; 63: 924-927.
16. Westgard JO, and Barry PL. Cost-Effective Quality Control; Managing the Quality and Productivity of Analytical Process, AACC Press 1986.

ACL, ACL Futura and ACL TOP are trademarks of Instrumentation Laboratory.
APC is a trademark of Chromogenix AB

©1996 Instrumentation Laboratory.
Issued June 2005.

US Patent 5,443,960
EP 0608235, 0690991
Australia 666-484; 690 535
Japan; 2562000
Canada; 2, 119, 761
New Zealand; 261 190

Symbols used / Verwendete Symbole / Símbolos utilizados / Symboles utilisés / Simboli impiegati / Símbolos utilizados

ACCEPTANCE RANGE	Acceptance range / Referenzbereich / Rango esperado / Limites d'acceptabilité / Intervallo di accettabilità / Intervalo de aceitação
APCV-1	APTT without APC / APTT ohne APC / TTPA sin APC / APTT sans APC / APTT senza APC / TTPA sem APC
APCV-2	APTT with APC / APTT mit APC / TTPA con APC / APTT avec APC / APTT con APC / TTPA com APC
APCR-V	APCR-V ratio / APCR-V Ratio / Ratio APCR-V / ratio APCR-V / Ratio APCR-V / rácio de APCR-VR-V ratio

IVD
In vitro diagnostic medical device
In-vitro Diagnostikum
De uso diagnóstico in vitro
Dispositif médical de diagnostic in vitro
Per uso diagnostico in vitro
Dispositivo médico para utilização em diagnóstico

LOT
Batch code
Chargen-Bezeichnung
Identificación número de lote
Désignation du lot
Numero del lotto
Número de lote

Use by
Verwendbar bis
Caducidad
Utilisable jusqu'à
Da utilizzare prima del
Data límite de utilização

Temperature limitation
Festgelegte Temperatur
Temperatura de Almacenamiento
Températures limites de conservation
Limiti di temperatura
Limite de temperatura

Consult instructions for use
Beilage beachten
Consultar la metodología
Lire le mode d'emploi
Vedere istruzioni per l'uso
Consultar as instruções de utilização

CONTROL
Control
Kontrollen
Control
Contrôle
Controllo
Controllo

Biological risks
Biologisches Risiko
Riesgo biológico
Risque biologique
Rischio biologico
Risco biológico

Manufacturer
Hergestellt von
Fabricado por
Fabricant
Prodotto da
Fabricado por

EC REP
Authorised representative
Bevollmächtigter
Representante autorizado
Mandataire
Rappresentanza autorizzata
Representante autorizado