

# APC Resistance

## APC Resistance

REF	CONTENT	SYSTEM
08013934190	▽ 40	APC <sup>+</sup> , N. d'ident. 07 2001 3 APC <sup>-</sup> , N. d'ident. 07 2001 4 APCr Reag, N. d'ident. 07 2001 5

### Italiano

**Roche non è titolare della registrazione del prodotto per le metodiche partner. Il produttore legale indicato sulla confezione è il solo responsabile per tutti gli aspetti legati alla creazione del prodotto e gli aspetti legali e regolatori.**

### Informazioni relative al sistema

Nome abbreviato	ACN ( <i>application code number</i> – codice di applicazione)
APC <sup>+</sup>	28751
APC <sup>-</sup>	28752
APCr Ratio	da specificare dall'utente

### Finalità d'uso

APC Resistance è un test funzionale per la determinazione della resistenza del fattore Va all'inattivazione da parte della proteina C attivata (*activated protein C: APC*), causata dalla mutazione del fattore V di Leiden (FV:R506Q), nel plasma citratato sugli analizzatori **cobas t** indicati.

### Sommario

La resistenza alla proteina C attivata (APC) rappresenta il difetto ereditario più frequente associato alla trombosi venosa profonda. Più del 95 % del fenotipo di resistenza all'APC può essere spiegato con la mutazione del fattore V di Leiden.<sup>1,2,3,4,5,6</sup> Questo difetto è causato da mutazioni puntiformi nel gene del fattore V, che risultano nella sostituzione dell'aminoacido Arg 506 con un residuo di Gln.<sup>2,3,7</sup> Il difetto eterozigote (*heterozygous: het*) è associato ad un rischio di trombosi aumentato di 5-10 volte, il difetto omozigote (*homozygous: hom*) ad un rischio di trombosi aumentato di 50-100 volte.<sup>5,8,9</sup> Vi sono due possibilità di rilevamento del fattore V di Leiden (FVL): i test funzionali in base al plasma che possono identificare l'espressione fenotipica del difetto, o la determinazione del genotipo effettuabile mediante la tecnologia PCR.<sup>10</sup>

### Principio del test

APC Resistance è un test di coagulazione funzionale in base al plasma, che si distingue da altri test funzionali per la resistenza all'APC agendo specificamente sul livello del complesso della protrombinasi. È basato su un attivatore della protrombina dipendente dal fattore V attivato (FVa), isolato dal veleno di un serpente. La robustezza e la specificità del test vengono aumentate mediante l'eliminazione di possibili influenze disturbanti dai fattori a monte della cascata coagulativa e dal calcio. Le interferenze dall'eparina non frazionata (*unfractionated heparin: UFH*), dall'eparina a basso peso molecolare (*low molecular weight heparin: LMWH*) e dai pentasaccaridi nel campione di sangue vengono impediti da un inibitore dell'eparina aggiunto ai reattivi R1 e R2. In presenza (APC<sup>+</sup>) o assenza (APC<sup>-</sup>) di APC, il campione di plasma viene prediluito con il reagente R4 (plasma di diluizione) ed incubato a 37 °C con l'attivatore del FV proveniente dal veleno di un serpente (RVV-V dal *Daboia russelli*) per convertire il FV in FVa. La coagulazione viene stimolata dall'aggiunta di un attivatore della protrombina (*prothrombin activator: PTA*) dipendente dal FVa, reagente starter (SR/R3), proveniente dal veleno del serpente *Notechis scutatus*, in assenza di calcio. I tempi di coagulazione vengono registrati ed i rapporti vengono calcolati.

L'APCr Ratio (rapporto dell'APCr) è un test calcolato, che non sarà automaticamente configurato sul sistema dopo l'installazione dei codici a barre elettronici delle applicazioni APC<sup>+</sup> e APC<sup>-</sup>. Per la configurazione del test calcolato, procedere secondo le istruzioni "Creazione di un test calcolato" riportate nell'Assistenza Clienti dell'analizzatore. L'utente deve configurare un test calcolato con la seguente formula:

$$\text{APCr Ratio} = \text{APC}^+ * 1 / \text{APC}^- * 1$$

### Reattivi – soluzioni pronte all'uso

cobas t pack	Reagente	Descrizione	Contenuto
--------------	----------	-------------	-----------

APC <sup>+</sup>	R1	Reagente (+ APC): APC/RVV-V	APC, RVV-V, Polybrene, HEPES, BSA
APC <sup>-</sup>	R2	Reagente (- APC): RVV-V	RVV-V, Polybrene, HEPES, BSA
APCr Reag	SR (R3)	Reagente di PTA	Attivatore della protrombina, EDTA, HEPES, BSA
	R4	Plasma di diluizione	Plasma umano, trattato

### Precauzioni e avvertenze

Per uso diagnostico *in vitro*.

Osservare le precauzioni normalmente adottate durante la manipolazione dei reagenti di laboratorio.

Lo smaltimento di tutti i rifiuti deve avvenire secondo le direttive locali. Scheda dati di sicurezza disponibile su richiesta per gli utilizzatori professionali.

Tutto il materiale di origine umana deve essere considerato come potenzialmente infettivo. Per la preparazione di tutti i prodotti derivati da sangue umano viene utilizzato solo sangue di donatori che sono stati testati individualmente e sono risultati negativi per la ricerca di HBsAg e di anticorpi anti-HCV e anti-HIV. Per i metodi di dosaggio sono stati impiegati test approvati dall'FDA o rilasciati in conformità con la Direttiva Europea 98/79/CE, Allegato II, Lista A.

Poiché non è comunque possibile escludere con sicurezza il pericolo di infezione con nessun metodo di dosaggio, è necessario manipolare il materiale con le stesse precauzioni adottate per i campioni prelevati dai pazienti. Nel caso di una esposizione, si deve procedere secondo le specifiche indicazioni sanitarie.<sup>11,12</sup>

Evitare la formazione di schiuma in tutti i reattivi e tipi di campione (campioni e controlli).

Questa confezione contiene componenti classificati, secondo il Regolamento (CE) N. 1272/2008, come segue:



### Avvertenza

H302 Nocivo se ingerito.

H332 Nocivo se inalato.

H373 Può provocare danni agli organi in caso di esposizione prolungata o ripetuta.

### Prevenzione

P260 Non respirare la polvere/i fumi/i gas/la nebbia/i vapori/gli aerosol.

P264 Lavare accuratamente le mani dopo l'uso.

P310 Contattare immediatamente un CENTRO ANTIVELENI o un medico.

L'etichettatura relativa alla sicurezza del prodotto è conforme al regolamento GHS UE.

Contatto telefonico: per tutti i paesi: +49-621-7590

# APC Resistance

## APC Resistance



### Utilizzo dei reattivi

I reattivi contenuti nella cassetta sono stati assemblati in un'unità pronta all'uso (**cobas t** pack).

Tutte le informazioni necessarie per l'utilizzo corretto sono disponibili tramite **cobas link**.

### Conservazione e stabilità

Conservare a 2-8 °C.

Conservare il **cobas t** pack in **posizione verticale**.

Stabilità del **cobas t** pack integro: fino alla data di scadenza indicata.

Stabilità del <b>cobas t</b> pack aperto:	
sull'analizzatore <b>cobas t</b>	14 giorni dopo la foratura

Non congelare.

### Prelievo e preparazione dei campioni

Solo i tipi di campione elencati di seguito sono stati testati e risultano accettabili.

Plasma umano citratato al 3.2 %.

Impiegare provette standard per prelievi di campioni in materiale plastico o in vetro silconato. Il rapporto tra sangue (9 parti) e soluzione di citrato di sodio (0.11 M; 1 parte) deve essere esattamente rispettato.<sup>13,14</sup>

I tipi di campione elencati sono stati testati impiegando una selezione di provette per il prelievo di campioni disponibili in commercio al momento dell'analisi; non sono, quindi, state testate tutte le provette disponibili di tutte le case produttrici. Alcuni sistemi per il prelievo di campioni di vari produttori possono contenere diversi materiali e in alcuni casi possono interferire sui risultati del test. Quando si trattano i campioni in provette primarie (sistemi per il prelievo di campioni), seguire le istruzioni del produttore delle provette.

Centrifugare 15 minuti a 2500 g oppure in modo tale che il conteggio delle piastrine sia < 10000 piastrine/ $\mu$ L.

Stabilità dei campioni:	
a 15-25 °C	4 ore
a -20 °C ( $\pm$ 5 °C)	2 mesi

Le aliquote del plasma congelato devono essere scongelate entro 5 minuti a 37 °C a bagnomaria ed omogeneizzate agitandole con cautela ed evitando la formazione di schiuma. Analizzare i campioni scongelati entro 2 ore. Non ricongelare i campioni.

### Materiali a disposizione

Vedere la sezione "Reattivi – soluzioni pronte all'uso".

### Materiali necessari (ma non forniti)

- [REF] 08045232190, APCr Controls, 2 x 3 x 1 mL
- Normale attrezzatura da laboratorio
- Acqua distillata o deionizzata
- Analizzatore **cobas t**. Per ulteriori materiali necessari consultare l'Assistenza Clienti del relativo analizzatore.

### Esecuzione

Per una performance ottimale dei test, attenersi alle indicazioni riportate in questo documento. Per le istruzioni specifiche dell'analizzatore relative all'esecuzione del test, consultare l'Assistenza Clienti dello strumento.

Roche non risponde delle performance delle applicazioni che non sono state validate dalla stessa Roche – tali performance devono quindi essere definite dall'utilizzatore.

### Controllo di qualità

Per la verifica dell'accuratezza e della riproducibilità dei risultati è necessario l'impiego di controlli.

Per il controllo di qualità, impiegare le confezioni di controlli indicate nella sezione "Materiali necessari (ma non forniti)".

Gli intervalli ed i limiti del controllo dovranno essere conformi alle esigenze individuali di ogni laboratorio. Si consiglia di eseguire un controllo di qualità sempre dopo la calibrazione di un lotto e successivamente almeno ogni 8 ore (corrispondente alla stabilità del reagente dopo la ricostituzione). I valori ottenuti devono rientrare nei limiti definiti. Ogni laboratorio deve

definire misure correttive da attuare nel caso in cui alcuni valori siano al di fuori dei limiti definiti.

Per il controllo di qualità, attenersi alle normative vigenti e alle linee guida locali.

### Limiti del metodo – interferenze

È stato testato l'effetto delle seguenti sostanze endogene e dei seguenti composti farmaceutici sulla performance del test. Non è stata osservata alcuna influenza sui risultati fino alle concentrazioni elencate:

#### Sostanze endogene

Composto	Concentrazione
Bilirubina coniugata	19.8 mg/dL
Bilirubina non coniugata	52.8 mg/dL
Emoglobina	1300 mg/dL
Intralipid	600 mg/dL

Valutazione: recupero entro  $\pm$ 10 % del valore iniziale.

Le interferenze da lipemia, emoglobina e bilirubina sono state testate secondo Glick.<sup>15</sup>

Farmaci: non si è osservata alcuna interferenza a concentrazioni terapeutiche impiegando le più comuni famiglie di farmaci.<sup>16,17</sup>

Ai fini diagnostici, i risultati devono sempre essere valutati congiuntamente con la storia clinica del paziente, con gli esami clinici e con altre evidenze cliniche.

Studi sperimentali hanno mostrato che gli inibitori diretti della trombina (es. l'argatroban o il dabigatran) influenzano sulla performance discriminatoria del test, mentre gli antagonisti della vitamina K (il fenprocumone, la warfarina), le UFH o le LMWH (fino a 2 IU/mL), i pentasaccaridi (fino a 2  $\mu$ g/mL) e gli inibitori diretti del fattore Xa (es. il rivaroxaban) non influenzano sulla performance discriminatoria del test. A seconda del genotipo dei pazienti, l'aprotinina e la protamina hanno manifestato differenti tipi di influenze sulla performance discriminatoria del test.

Si consiglia quindi che, in seguito alla somministrazione di aprotinina, protamina o inibitori diretti della trombina, il prelievo del campione per l'esecuzione del test APC Resistance sia ritardato di almeno 24 ore, o che la mutazione del FVL sia determinata impiegando la PCR come metodo alternativo.

Studi sperimentali hanno mostrato che una deficienza della proteina C e dell'ATIII fino al 100 % nonché un eccesso del FVIII, del FX, della proteina C e della proteina S fino a 5 volte il valore normale non hanno alcuna influenza sul rapporto o sulla sensibilità del test. Non è stato mostrato che gli anticorpi diretti contro gli anticoagulanti del lupus interferiscano con il test. Tuttavia, differenti deficienze ed eccessi riducono la performance discriminatoria del test:

- Basse concentrazioni di FI (<50 %), FII (<75 %), FV (<75 %), FVIII (<75 %), FX (<25 %), proteina S (<50 %) e TFPI (<100 %) possono interferire sui risultati del test.
- Alte concentrazioni di FI (>200 %), FII (>100 %), FV (>100 %), TFPI (>100 %) e ATIII (> 200 %) possono interferire sui risultati del test.

Ciclo di lavaggio extra: è assolutamente necessario effettuare specifiche fasi di lavaggio se certe combinazioni di test vengono eseguite insieme sugli analizzatori **cobas t**. Per ulteriori istruzioni, consultare la versione più recente dell'elenco dei possibili carry-over allegato alla metodica CLEAN e l'Assistenza Clienti. È necessario implementare la procedura di extralavaggio (qualora richiesta) prima di riportare i risultati di questo test.

### Limiti ed intervalli

#### Valori di riferimento

Nella seguente tabella sono riportati i tipici intervalli dei rapporti per i plasmi dei pazienti genotipizzati con PCR, ottenuti sugli analizzatori di coagulazione **cobas t**:

Genotipo R506Q	n	Intervallo dei rapporti (min./mass.)
negativo	221	>2.6
eterozigote	42	1.3-1.7

# APC Resistance



## APC Resistance

omozigote	7	1.0
-----------	---	-----

Per l'uso di questa tabella, considerare le seguenti restrizioni:

1. Si tratta di esempi e non di intervalli di riferimento o valori di cutoff garantiti dal produttore.
2. Alcuni fattori di interferenza (consultare la sezione "Limiti del metodo – interferenze") possono causare valori di rapporto non chiaramente attribuibili ad un particolare genotipo, oppure possono portare a tempi di coagulazione superiori al massimo tempo di rilevazione consentito dello strumento. In tali casi sono assolutamente necessari ulteriori esami mediante PCR e la determinazione di singoli fattori.

### Dati specifici sulla performance del test

Qui di seguito sono riportati i dati rappresentativi delle prestazioni sugli analizzatori. I risultati dei singoli laboratori possono differire da questi.

### Precisione

La ripetibilità e la precisione intermedia sono state determinate usando controlli, eseguiti in conformità ai requisiti EP5 del CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) (2 aliquote per serie, 2 serie al giorno, 21 giorni). Sono stati ottenuti i seguenti risultati:

Campione	Media (rapporto)	Ripetibilità		Precisione intermedia	
		DS (rapporto)	CV (%)	DS (rapporto)	CV (%)
APCr Neg Con	5.74	0.2	3.8	0.0	0.4
APCr Pos Con	1.55	0.0	1.2	0.0	0.1

### Confronto tra metodi

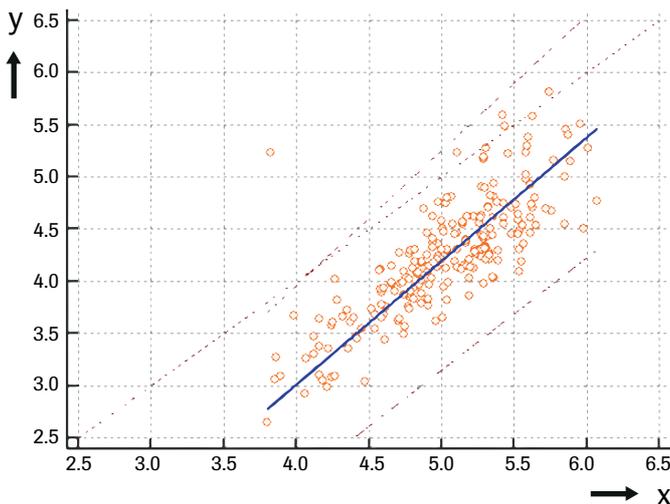
I valori ottenuti nel test APC Resistance per campioni di plasma umano su un analizzatore **cobas t 711** (y) sono stati confrontati con quelli determinati con il reagente Pefakit® APC-R Factor V Leiden (DSM Pentapharm) su un analizzatore Siemens BCS® XP (x).

Numero dei campioni (di riferimento) negativi misurati: 221

Passing e Bablok<sup>18</sup>

$$y = -1.725 + 1.185x$$

$$r = 0.813$$

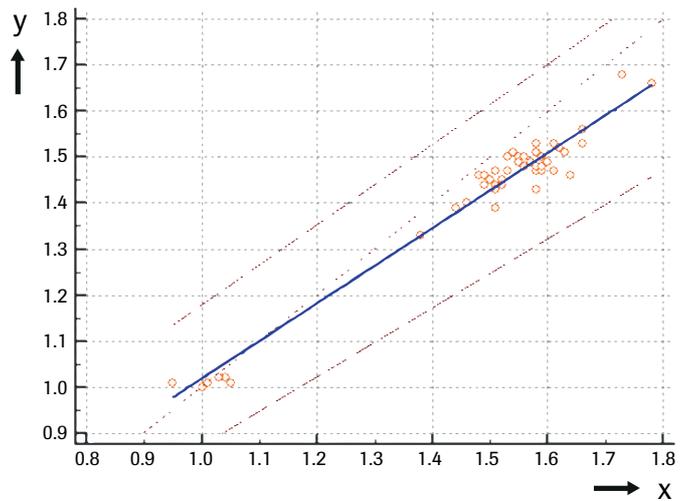


Numero dei campioni (eterozigoti e omozigoti) positivi per FV-L misurati: 49

Passing e Bablok<sup>18</sup>

$$y = 0.202 + 0.818x$$

$$r = 0.838$$



### Letteratura

- 1 Dahlback B, Carlsson M, Svensson PJ. 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* 1993; 90: 1004-1008.
- 2 Bertina RM, Koelemann BPC, Koster T et al. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature* 1994; 369: 64- 67.
- 3 Zoller B, Dahlback B. Linkage between inherited resistance to activated protein C and factor V gene mutation in venous thrombosis. *Lancet* 1994; 343: 1536-1538.
- 4 Rees DC, Cox M, Clegg JB. World distribution of factor V Leiden. *Lancet* 1995; 346: 1133-1134.
- 5 Simioni P, Tormene D, Prandoni P. Incidence of venous thromboembolism in asymptomatic family members who are carriers of factor V Leiden: a prospective cohort study. *Blood* 2002; 99: 1938-1942.
- 6 Wilmer M, Stocker C, Buhler B et al. Improved distinction of factor V wild-type and factor V Leiden using a novel prothrombin-based activated protein C resistance assay. *Am J Clin Pathol* 2004; 122: 836-842.
- 7 Greengard JS, Sun X, Xu X et al. Activated protein C resistance caused by Arg506Gln mutation in factor Va. *Lancet* 1994; 343: 1361-1362.
- 8 Cooper PC, Hampton KK, Makris M et al. Further evidence that activated protein C resistance can be misdiagnosed as inherited functional protein S deficiency. *Br J Haematol* 1994; 88: 201-203.
- 9 Price DT, Ridker PM. Factor V Leiden mutation and the risks for thromboembolic disease: a clinical perspective. *Ann Intern Med* 1997; 127: 895-903.
- 10 Gandrille S, Alhenc-Gelas M, Aiach M. A rapid screening method for factor V Arg506 R Gln mutation. *Blood Coag Fibrinol* 1995; 6: 245-248.
- 11 Occupational Safety and Health Standards: Bloodborne pathogens. (29 CFR Part 1910.1030). Fed. Register.
- 12 Directive 2000/54/EC of the European Parliament and Council of 18 September 2000 on the protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work.
- 13 CLSI Document H21-A5, Vol.28, No.5, 2008. Collection, transport, and processing of blood specimens for testing plasma-based coagulation assays and molecular hemostasis assays; approved guideline, 5th edition.
- 14 CLSI Document H3-A6. Procedures for the collection of diagnostic blood specimens by venipuncture; approved standard - Sixth Edition, vol. 27, No. 26, 2007.
- 15 Glick MR, Ryder KW, Jackson SA. Graphical Comparisons of Interferences in Clinical Chemistry Instrumentation. *Clin Chem* 1986;32:470-475.

# APC Resistance

## APC Resistance

- 16 Breuer J. Report on the Symposium "Drug effects in Clinical Chemistry Methods". Eur J Clin Chem Clin Biochem 1996;34:385-386.
- 17 Sonntag O, Scholer A. Drug interference in clinical chemistry: recommendation of drugs and their concentrations to be used in drug interference studies. Ann Clin Biochem 2001;38:376-385.
- 18 Bablok W et al. A general regression procedure for method transformation. J Clin Chem Biochem 1988;26:783-790.

In questa metodica, per separare la parte intera da quella frazionaria in un numero decimale si usa sempre il punto. Il separatore delle migliaia non è utilizzato.

Per ulteriori informazioni, consultare l'Assistenza Clienti appropriata per il relativo analizzatore e le metodiche di tutti i componenti necessari.

### Simboli

Oltre a quelli indicati nello standard ISO 15223-1, Roche Diagnostics impiega i seguenti simboli (per gli USA: per la definizione dei simboli impiegati, vedere <https://usdiagnostics.roche.com>):

	Contenuto della confezione
	Analizzatori/strumenti su cui i reagenti possono essere usati
	Reattivo
	Calibratore
	Volume dopo ricostituzione o mescolamento
	Global Trade Item Number

Le aggiunte, cancellazioni o modifiche sono indicate mediante una linea verticale posizionata al margine.

© 2018, Roche Diagnostics



DSM Nutritional Products Ltd  
Branch Pentapharm  
Domacherstrasse 112  
CH-4147 Aesch BL

Distributore:  
Roche Diagnostics GmbH, Sandhofer Strasse 116, D-68305 Mannheim  
[www.roche.com](http://www.roche.com)