

APC Resistance

APC Resistance

REF	CONTENT	SYSTEM
08013934190	APCr+ N. d'ident. 07 2001 3 APCr- N. d'ident. 07 2001 4 APCr Reag N. d'ident. 07 2001 5	cobas t 511 cobas t 711

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)
APCr+	28751
APCr-	28752
APCr Ratio	da specificare dall'utente

Finalità d'uso

APC Resistance (APCr) è un test *in vitro* per la determinazione qualitativa della resistenza del fattore Va all'inattivazione da parte della proteina C attivata (activated protein C: APC). Il test APCr è utilizzato per il trattamento del plasma citratato sugli analizzatori **cobas t** indicati. Il test serve per coadiuvare la diagnosi di mutazione del fattore V di Leiden (FV:R506Q).

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.^{1,2,3,4,5,6} 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.^{2,3,7} 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.^{5,8,9} 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.¹⁰

Principio del test

APC Resistance è un test di coagulazione funzionale basato sul plasma, che si distingue da altri test funzionali per la resistenza all'APC in quanto agisce 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 solidità e la specificità del test sono rafforzate dall'eliminazione di possibili disturbi da parte dei fattori a monte della cascata coagulativa e del calcio. Le interferenze dell'eparina non frazionata (*unfractionated heparin*: UFH), dell'eparina a basso peso molecolare (*low molecular weight heparin*: LMWH) e dei pentasaccaridi nel campione di sangue sono impediti da un inibitore dell'eparina aggiunto ai reagenti R1 e R2. In presenza (APCr+) o assenza (APCr-) 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 ottenuto dal veleno di un serpente (RVV-V da *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, dal reagente starter (SR/R3) e dal veleno di serpente *Notechis scutatus*, in assenza di calcio. Vengono registrati i tempi di coagulazione e vengono calcolati i rapporti.

APCr Ratio è un test calcolato, pertanto non viene configurato automaticamente sul sistema dopo l'installazione dei codici a barre elettronici delle applicazioni APCr+ e APCr-. Per la configurazione del test calcolato, procedere secondo le istruzioni "Creazione di un test calcolato" riportate nell'Assistenza Utente dell'analizzatore. L'utente deve configurare un test calcolato con la seguente formula:

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

Reattivi – soluzioni pronte all'uso

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

APCr+	R1	Reagente (+ APC): APC/RVV-V	APC, RVV-V, Polybrene, Hepes, BSA
APCr-	R2	Reagente (- APC)-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.

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



Avvertimento

H302 + H332 Nocivo se ingerito o inalato.

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

Prevenzione

P260 Non respirare le polveri.

P264 Lavare accuratamente la pelle dopo l'uso.

P270 Non mangiare, né bere, né fumare durante l'uso.

Reazione:

P304 + P340 IN CASO DI INALAZIONE: trasportare l'infortunato all'aria aperta e mantenerlo a riposo in posizione che favorisca la respirazione. In caso di malessere, contattare un CENTRO ANTIVELENI o un medico.

P314 In caso di malessere, consultare un medico.

Smaltimento rifiuti

P501 Smaltire il prodotto/recipiente in un impianto di smaltimento rifiuti approvato.

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

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

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

APC Resistance

APC Resistance



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.^{11,12}

Evitare la formazione di schiuma in tutti i reagenti e i tipi di campioni (campioni dei pazienti e controlli).

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 cobas t pack aperto:	
sull'analizzatore cobas t	14 giorni dopo la foratura

Non congelare.

Prelievo e preparazione dei campioni

Solo i tipi di campioni 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 siliconato. Il rapporto tra sangue (9 parti) e soluzione di citrato di sodio (0.11 M; 1 parte) deve essere esattamente rispettato.^{13,14}

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/ μ L.

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

Le aliquote del plasma congelato dovrebbero 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. Successivamente si consiglia di eseguire un controllo di qualità almeno ogni 8 ore (corrispondente alla stabilità del reagente dopo la ricostituzione). I valori ottenuti devono rientrare nei limiti definiti. Ogni laboratorio dovrebbe 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

Criterio di valutazione: recupero entro \pm 10% del valore iniziale.

Le interferenze da lipemia, emoglobina e bilirubina sono state testate secondo Glick.¹⁵

Farmaci: non si è osservata alcuna interferenza a concentrazioni terapeutiche impiegando le più comuni famiglie di farmaci.^{16,17}

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 dimostrato che gli inibitori diretti della trombina (ad es. Argatroban o Dabigatran) influenzano la capacità discriminatoria del test, mentre gli antagonisti della vitamina K (Fenprocumone, Warfarina), le UFH o le LMWH (fino a 2 IU/mL), i pentasaccaridi (fino a 2 μ g/mL) e gli inibitori diretti del fattore Xa (ad es. Rivaroxaban, Apixaban, Edoxaban) non la influenzano. A seconda del genotipo dei pazienti, l'aprotinina e la protamina hanno causato interferenze di diverso tipo sulla performance diagnostica del test.

Dopo la somministrazione di aprotinina, protamina o inibitori diretti della trombina, si consiglia pertanto di ritardare il prelievo del campione di almeno 24 ore prima di eseguire il test APC Resistance, o in alternativa di determinare la mutazione FVL con un metodo alternativo come la PCR.

Studi sperimentali hanno dimostrato che il rapporto o la sensibilità del test non sono influenzati né dalla carenza di proteina C e ATIII fino al 100%, né dall'eccesso di FVIII, FX, proteina C e proteina S fino a 5 volte il valore normale. Gli anticorpi diretti contro gli anticoagulanti del lupus non sembrano interferire con il test. Tuttavia, altre carenze o eccessi possono ridurre la performance diagnostica del test:

- Basse concentrazioni di FI (< 50%), FII (< 75%), FV (< 60%), FVIII (< 75%), FX (< 25%), proteina S (< 50%) e TFPI (< 100%) possono interferire con i risultati del test.
- Alte concentrazioni di FI (> 200%), FII (> 100%), FV (> 140%), TFPI (> 100%) e ATIII (> 200%) possono interferire con i 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 Utente. Se richiesta, la procedura di lavaggi extra deve essere eseguita prima di riportare i risultati di questo test.

Limiti e 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**:

APC Resistance



APC Resistance

Genotipo R506Q	n	Intervallo dei rapporti (min./mass.)
negativo	221	>2.6
eterozigote	42	1.3-1.7
omozigote	7	1.0

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

- Si tratta di esempi e non di intervalli di riferimento o valori di cutoff garantiti dal produttore.
- 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

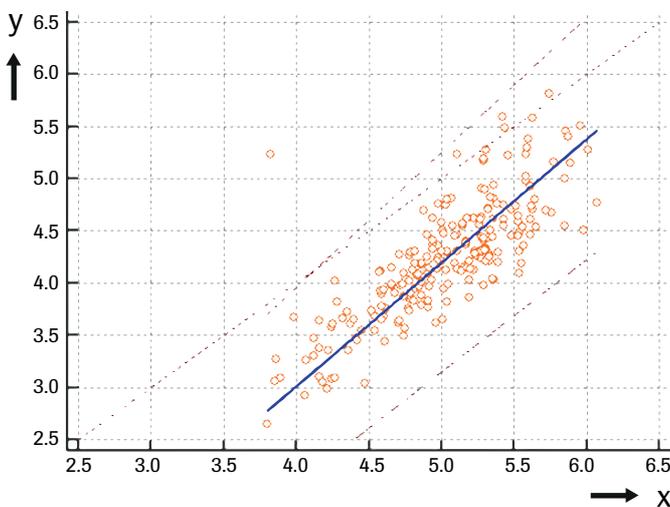
I valori ottenuti con il test APC Resistance per i campioni di plasma umano su un analizzatore **cobas t 711 (y)** sono stati confrontati con quelli determinati con il reagente Pefakit® APC-R Factor V Leiden (DSM Pentapharm) su un analizzatore Siemens BCS® XP (x).

Numero di campioni (di riferimento) negativi misurati: 221

Passing e Bablok¹⁸

$$y = -1.725 + 1.185 x$$

$$r = 0.813$$

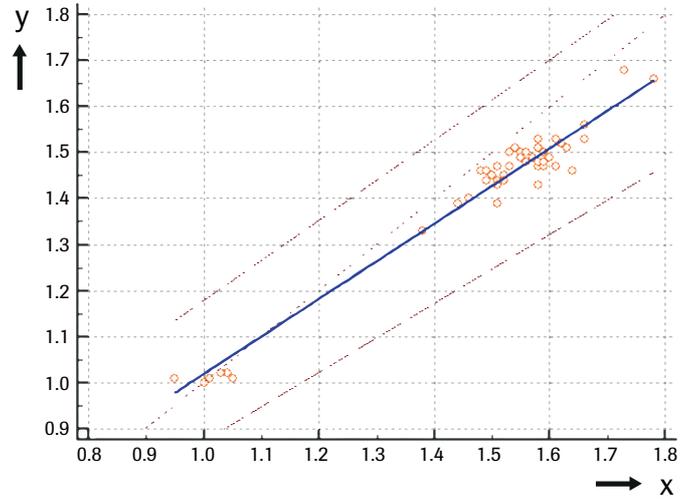


Numero di campioni (eterozigoti e omozigoti) positivi per FV-L misurati: 49

Passing e Bablok¹⁸

$$y = 0.202 + 0.818 x$$

$$r = 0.838$$



Letteratura

- 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.
- Bertina RM, Koelema BPC, Koster T et al. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature* 1994; 369: 64-67.
- 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.
- Rees DC, Cox M, Clegg JB. World distribution of factor V Leiden. *Lancet* 1995; 346: 1133-1134.
- 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.
- 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.
- Greengard JS, Sun X, Xu X et al. Activated protein C resistance caused by Arg506Gln mutation in factor Va. *Lancet* 1994; 343: 1361-1362.
- 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.
- Price DT, Ridker PM. Factor V Leiden mutation and the risks for thromboembolic disease: a clinical perspective. *Ann Intern Med* 1997; 127: 895-903.
- 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.
- Occupational Safety and Health Standards: Bloodborne pathogens. (29 CFR Part 1910.1030). *Fed. Register*.
- 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.
- 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.

APC Resistance

APC Resistance

- 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.
- 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:

	Contenuto della confezione
	Analizzatori/strumenti sui quali i reagenti possono essere utilizzati
	Reagente
	Calibratore
	Volume per la ricostituzione
	Global Trade Item Number
	Rappresentante autorizzato europeo
	Pentapharm AG (CH): +41 61 706 48 48
	Tox Info Suisse (CH): +41 44 251 51 51 (24 ore; 7 giorni su 7)
	Produttore
	Non utilizzare se la confezione è danneggiata e consultare le istruzioni per l'uso
	Importatore
	Distributore

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

© 2023, Roche Diagnostics



Pentapharm AG
Dornacherstrasse 112
CH-4147 Aesch BL
Svizzera



Distribuito da:
Roche Diagnostics GmbH, Sandhofer Strasse 116,
D-68305 Mannheim, Germania
www.roche.com



EMERGO EUROPE, Westervoortsedijk 60, 6827 AT
Arnhem, Paesi Bassi