

Aplicación

Para la determinación de la Resistencia a la Proteína C Activada causada por la mutación en el Factor V:Q26R (Factor V Leiden), en el plasma de individuos sin tratamiento y de pacientes que están bajo terapia anticoagulante oral (TAO) o terapia heparínica.

Principio

El fenotipo de Resistencia a la Proteína C Activada^{1,2} es debido, en más del 90% de los casos, a una mutación en el gen del Factor V que produce la sustitución de la Arg²⁶ (R) por Gln (Q) en la proteína del Factor V.^{3,4} La selectividad por la mutación Factor V:Q26R u otras en el gen del Factor V, que producen una proteína resistente a la inactivación por la Proteína C Activada (APC), se incrementa mediante la normalización de las concentraciones de otras proteínas del plasma que actúan en la formación y regulación de la Trombina. Llevando a cabo el ensayo de Resistencia a la APC basado en el test TTPA y en presencia de un exceso de Plasma Reactivo Factor V, la sensibilidad y especificidad a la mutación Factor V:Q26R se incrementa significativamente. Además, esta modificación permite el análisis del plasma de pacientes que están en TAO.^{5,7,8,9,10,11}

El plasma de la muestra es prefiltrado con Plasma Reactivo Factor V e incubado con el reactivo TTPA por un periodo estándar de tiempo.

La coagulación es desencadenada por la adición de CaCl₂ en ausencia y presencia de APC, registrándose el tiempo de formación del coágulo.

Composición

El kit Factor V Leiden (APC™ Resistance V) consta de:

R APTT reagent (Cat. No. 0020008721): 2 x 4 mL viales de fosfolípidos purificados con sílice coloidal como activador de contacto.

FV Factor V Reagent Plasma (Cat. No. 0020008723): 2 x 4 mL viales de plasma humano liofilizado con un nivel bajo de actividad de Factor V y estabilizantes (también disponible por separado: Cat. No. 0020008800).

A APC/Calcium chloride (Cat. No. 0020008722): 2 x 2 mL viales de Proteína C Activada humana co-liofilizada con CaCl₂.

Ca Calcio chloride (Cat. No. 0020008720): 2 x 2 mL viales de cloruro cálcico en tampón Tris conteniendo Albúmina de suero bovino.

1 APC Control Plasma Level 1 (Cat. No. 0020008724): 2 x 1 mL viales de plasma humano normal liofilizado.

2 APC Control Plasma Level 2 (Cat. No. 0020008725): 2 x 1 mL viales de plasma humano anormal liofilizado.

*Nota: los reactivos TTPA y APC/CaCl₂ no son intercambiables entre lotes.

PRECAUCIÓN:

El material usado en este producto ha sido verificado por los métodos aprobados por la FDA y encontrado no reactivo al Antígeno de Superficie de la Hepatitis B (HBsAg), Anti-HCV y anticuerpos HIV. Manejar con precaución como si fuese potencialmente infeccioso.¹²

Indicaciones de Peligro: Ninguna

Frases de Riesgo: Ninguna

Frases de Seguridad: Ninguna

Este reactivo es para diagnóstico *in vitro*.

Preparación

APTT reagent: Mezclar vigorosamente antes de su uso.

Factor V Reagent Plasma: Disolver el contenido de cada vial con 4 mL de agua destilada (tipo II de acuerdo a NCCLS).¹³ Cerrar el vial y homogeneizar suavemente. Asegurarse de la completa disolución del producto. Mantener el reactivo entre 15 y 25°C durante 30 minutos. Mezclar por inversión del vial antes de su uso. No agitar.

APC/Calcium chloride: Disolver el contenido de cada vial con 2 mL de agua destilada (tipo II de acuerdo a NCCLS).¹³ Cerrar el vial y homogeneizar suavemente. Asegurarse de la completa disolución del producto. Mantener el reactivo entre 15 y 25°C durante 30 minutos. Mezclar por inversión del vial antes de su uso. No agitar.

Calcio chloride: Se suministra listo para su uso.

APC Control Plasma Level 1 & 2: Disolver el contenido de cada vial con 1 mL de agua destilada (tipo II de acuerdo a NCCLS).¹³ Cerrar el vial y homogeneizar suavemente. Asegurarse de la completa disolución del producto. Mantener el reactivo entre 15 y 25°C durante 30 minutos. Mezclar por inversión del vial antes de su uso. No agitar.

Conservación y estabilidad de los reactivos

Los reactivos que no hayan sido abiertos son estables hasta la fecha de caducidad indicada en el vial si se mantienen a 2-8°C.

APTT reagent - El reactivo abierto es estable 1 semana a 15-25°C, 1 mes a 2-8°C en el vial original, 8 horas a 15°C en los sistemas ACL Classic (100-7000) ó 3 días a 15°C en los sistemas ACL Futura/ACL Advance y ACL TOP sin agitación. No congelar.

Factor V Reagent Plasma - Estabilidad después de la reconstitución: 8 horas a 15-25°C, 24 horas a 2-8°C, 3 meses a -20°C ó temperatura menor en el vial original ó 3 días a 15°C en los sistemas ACL Futura/ACL Advance y ACL TOP sin agitación. El reactivo se puede descongelar a 37°C. Homogeneizar suavemente antes de su uso. No congelar.

APC/Calcium chloride - Estabilidad después de la reconstitución: 8 horas a 15-25°C, 5 días a 2-8°C, 3 meses a -20°C ó temperatura menor en el vial original ó 3 días a 15°C en los sistemas ACL Futura/ACL Advance y ACL TOP sin agitación. No congelar.

Calcium chloride - El reactivo abierto es estable 1 semana a 15-25°C, 1 mes a 2-8°C en el vial original ó 3 días a 15°C en los sistemas ACL Futura/ACL Advance y ACL TOP sin agitación.

APC Control Plasma Level 1 & 2 - Estabilidad después de la reconstitución: 6 horas a 2-8°C y a 15-25°C, 3 meses a -20°C ó temperatura menor en el vial original. El control se puede descongelar a 37°C. Homogeneizar suavemente antes de su uso. No congelar.

Para obtener una estabilidad óptima de los reactivos, sugerimos que una vez acabado el trabajo retire los reactivos del analizador y los conserve a 2-8°C en su vial original.

Método de Ensayo

Seguir las instrucciones de la técnica de acuerdo al Manual del Operador de los instrumentos IL o bien al Manual de Aplicaciones.

Recolección y Preparación de las muestras

Recoger nuevas partes de sangre recién extraída por punción venosa y una parte de anticoagulante citrato trisódico. Para la recolección, manejo y conservación del plasma seguir las recomendaciones del documento H21-AA de la NCCLS.⁴

Reactivos adicionales y plasmas de control

Los siguientes productos pueden pedirse por separado.

Plasma Reactivo Factor V
Agente de Limpieza
América, Pacífico y Europa
N° Cat. 0020008800
N° Cat. 0009831700

Control de Calidad

Se recomienda el uso de los controles de plasma normales y anormales de IL para realizar un completo programa de Control de Calidad.¹⁴ Tanto el APC Plasma control Nivel 1 (normal) como el APC Plasma control Nivel 2 (anormal), están diseñados específicamente para este programa. Cada laboratorio debe establecer su propia media y desviación estándar, asimismo establecer un programa de Control de Calidad para monitorizar los resultados de su laboratorio. Los controles deben ser usados como mínimo una vez dentro del turno de 8 horas, de acuerdo a la normativa de Buenas Prácticas en el Laboratorio. Referirse al Manual del Operador para información adicional. Consultar la publicación de Westgard y col. para una identificación y resolución de situaciones anormales del Control de Calidad.¹⁵

Resultados

Los resultados del APCR-V se expresan en segundos y ratio. Referirse al Manual del Operador para información adicional.

Limitaciones/interferencia

No se han encontrado diferencias significativas entre muestras frescas y congeladas. La sensibilidad y especificidad para la mutación Factor V:Q26R en el análisis de plasmas de pacientes en TAO no son alteradas por el valor de INR.

No se ha encontrado interferencia con concentraciones de heparina hasta 1 U/mL (tanto no fraccionada como de bajo peso molecular) en los Sistemas de Coagulación de IL. Resultados de APCR-V en los sistemas ACL Futura/ACL Advance no son afectados por concentraciones de Hemoglobina hasta 400 mg/dL, Bilirrubina hasta 20 mg/dL y Triglicéridos hasta 1000 mg/dL. Resultados de APCR-V en el ACL TOP no son afectados por concentraciones de Hemoglobina hasta 500 mg/dL, Bilirrubina hasta 18,8 mg/dL y Triglicéridos hasta 1791 mg/dL.

En pacientes con una alta actividad conocida de inhibidores (por ejemplo, anticuerpos antifosfolípidos) se pueden obtener resultados de TTPA anormales y, por tanto, resultados engañosos. En tales casos, el incremento del factor de dilución (por ejemplo 1 + 9 ó 1 + 19) puede corregir los resultados del test.

Valor de "Cut-off"

La existencia de Resistencia a la APC debida a la mutación FV:Q26R está indicada por un valor del ratio APCR-V menor o igual al valor de "cut-off".

Cuando se use el kit Factor V Leiden (APC™ Resistance V), se deberá establecer el valor de "cut-off" para cada instrumento.

El valor de "cut-off" es aquel valor que distingue entre muestras normales y anormales. Las muestras anormales tienen un ratio de APCR-V menor o igual que el valor del "cut-off". El ratio APCR-V de muestras normales es más alto que el valor del "cut-off".

Procedimiento para establecer el valor de "Cut-off":

1. Realizar cinco determinaciones seguidas de un mismo plasma que tenga un genotipo normal de APCR-V. Reanalizar dicha serie dos veces más. Comprobar que el Coeficiente de Variación (CV) del ratio APCR-V intraserie e interserie es inferior al 7%.
2. Determinar el ratio APCR-V en al menos 30 plasmas de individuos de edades comprendidas entre 20 y 65 años. Incluir además el Plasma Control Nivel 1 y Nivel 2 para la validación del ensayo.
3. Verificar que los ratios de los APCR-V de los Plasmas Controles estén dentro del rango indicado en la ficha técnica.
4. Calcular la media de los ratios de los APCR-V de las 30 muestras.
5. Calcular el valor del "cut-off" de la Resistencia a la APC relacionada con la mutación de Factor V de la manera siguiente: si la media del ratio APCR-V (calculada en el apartado 4) es < 2,8; multiplicar la media x 0,8; pero si la media del ratio APCR-V (calculada en el apartado 4) es > 2,8; multiplicar la media x 0,75.

6. El ratio APCR-V del Plasma Control Nivel 1 debe ser más alto que el valor de "cut-off" establecido. El ratio APCR-V del Plasma Control Nivel 2 debe ser más bajo que el valor de "cut-off" establecido.

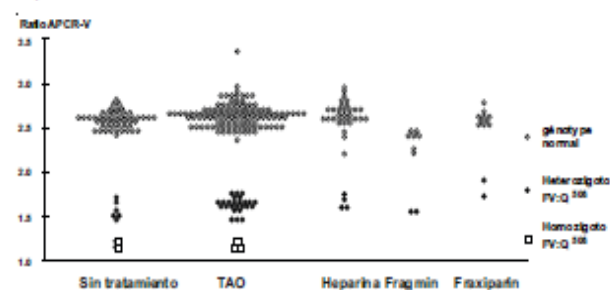
IL recomienda chequear regularmente el valor del cut-off usando los Plasmas Control Nivel 1 y Nivel 2.

Valores esperados

Se ha realizado un estudio del rango de normalidad utilizando el kit Factor V Leiden (APC™ Resistance V).

Sistema	N	Rango (unidades)
ACL Classic (100-7000)	30	2,18 - 3,38 (APCR-V ratios)
ACL Futura/ACL Advance	30	2,42 - 3,18 (APCR-V ratios)
ACL TOP	120	2,61 - 3,32 (APCR-V ratios)

La siguiente figura muestra los resultados del test APC Resistance V realizados en plasmas de individuos sin tratamiento, de pacientes con TAO con un INR de 1,3 - 6,0 y de pacientes tratados con Heparina no fraccionada o Heparina de bajo peso molecular (Fragmin® y Fraxiparin®). La predicción del plasma del paciente con el Plasma Reactivo Factor V, logra una completa discriminación entre los genotipos normal, heterocigoto FV:Q26R y homocigoto FV:Q26R y permite realizar el análisis de la Resistencia a la Proteína C Activada a pacientes sin tratamiento, pacientes que están con Terapia Anticoagulante Oral y pacientes con Terapia Heparínica.



Los ratios APCR-V se distribuyen según el genotipo del Factor V. Para cada genotipo se han obtenido valores de los ratios APCR-V muy similares para todos los grupos de pacientes. Los valores medios obtenidos son: 2,6 (normal), 1,7 (heterocigoto FV:Q26R) y 1,2 (homocigoto FV:Q26R). El kit Factor V Leiden (APC™ Resistance V) alcanza más del 99% de sensibilidad para la mutación FV:Q26R en los ACL Classic (100-7000) (n = 295). Los resultados fueron obtenidos usando un mismo lote de reactivo. Debido a las variables que pueden afectar los tiempos de coagulación, cada laboratorio debe establecer su propio rango de normalidad.

Características técnicas

Precisión: La precisión intraserie y total (serie a serie y día a día) fue realizada en diferentes series y utilizando muestras normales y anormales.

ACL 8/9/1000V ELITE/ELITE PRO	Media (APCR-V ratios)	CV % (Intraserie)	CV % (Total)
APC Control Nivel 1	2,49	1,8	2,0
APC Control Nivel 2	1,58	1,9	2,2

ACL Futura/ACL Advance	Media (APCR-V ratios)	CV % (Intraserie)	CV % (Total)
APC Control Nivel 1	2,34	2,1	2,3
APC Control Nivel 2	1,54	1,2	1,1

ACL TOP	Media (APCR-V ratios)	CV % (Intraserie)	CV % (Total)
APC Control Nivel 1	2,94	3,9	4,6
APC Control Nivel 2	1,85	1,4	2,0

Correlación:

Unidad	sistema	pendiente	intersección	r	Método de Referencia
APCR-V ratios	ACL TOP	1,041	-0,004	0,970	APCR-V en ACL Advance

La precisión y los datos de correlación se han obtenido usando lotes específicos de reactivos y de controles.