

HEMOCLOT™ Quanti. VL



REF CK065K

R1 3 x 2 mL

R2 3 x 1 mL

Méthode coagulante pour la détermination du taux de Facteur V Leiden.

Français, dernière révision : 01-2021

UTILISATION:

Le coffret HEMOCLOT™ Quanti. VL est une méthode coagulante pour la détermination quantitative *in vitro* du Facteur V Leiden (FV-L), par la mesure de sa résistance à l'inactivation par la Protéine C Activée (PCA), en présence de Protéine S (PS), sur plasma humain citraté, en utilisant une méthode manuelle ou automatisée.

RÉSUMÉ ET EXPLICATION:

Technique^{1,2}:

La Protéine C activée joue un rôle de régulateur dans les processus de coagulation en inactivant spécifiquement les facteurs V activé (Va) et VIII activé (VIIIa), en présence de co-facteurs. Le phénomène de résistance à la Protéine C Activée (PCA) est dû dans plus de 90% des cas à la mutation R506Q du Facteur V appelé « Facteur V Leiden ». Cette mutation dans l'exon 10 du Facteur V (1691 G → A), substitue l'arginine en position 506 par une glutamine, empêche le clivage de ce site par la PCA.

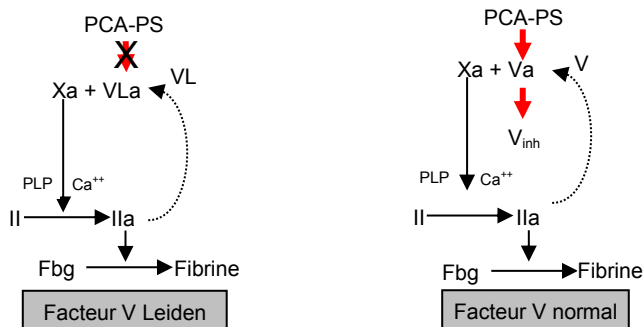
Clinique^{2,3,4}:

La mutation du FV-L est le facteur de risque de thrombophilie héréditaire le plus fréquent. Sa prévalence est d'environ 5 % dans les populations caucasiennes. Les patients porteurs de la mutation du FV-L ont un risque accru de thrombose veineuse, 3 à 7 fois chez les hétérozygotes et jusqu'à 80 fois chez les homozygotes.

Cette anomalie génétique peut être mise en évidence par dosage en méthode coagulante en présence ou en absence de PCA.

PRINCIPE:

La méthode HEMOCLOT™ Quanti. VL est un dosage coagulant pour la quantification du FV-L par la mesure de sa sensibilité à l'inactivation par la PCA, en présence de PS. Le test de coagulation est réalisé en présence d'un excès de PCA et de facteurs de coagulation (Prothrombine, Fibrinogène et PS). La coagulation est déclenchée par le facteur Xa purifié (en concentration constante et optimisée) en présence de phospholipides et de calcium. Le temps de coagulation (TC) mesuré est inversement proportionnel à la concentration de FV-L présente dans l'échantillon testé. Le facteur V normal n'est pas mesuré.



REACTIFS:

R1 Mélange coagulant, lyophilisé. Contient du fibrinogène humain, de la prothrombine humaine, de la PS, en concentrations constantes et optimisées pour le test, de la PCA humaine, un agent anti-héparine, de la BSA et des stabilisants.

3 flacons de 2 mL.

R2 Facteur Xa humain purifié, en concentration constante et optimisée pour le test, lyophilisé. Contient de la céphaline de lapin (source de phospholipides), de la BSA et des stabilisants.

3 flacons de 1 mL.

MISE EN GARDE ET AVERTISSEMENTS:

- Certains réactifs de ce coffret contiennent des produits d'origine humaine et animale. Lorsque du plasma humain a été utilisé dans la préparation de ces réactifs, la recherche de l'antigène HBs, des anticorps anti-HCV, anti-HIV 1 et anti-HIV 2 a été effectuée et trouvée négative. Cependant aucun test ne peut garantir de façon absolue l'absence de tout agent infectieux. Aussi, ces réactifs d'origine biologique doivent être manipulés avec les précautions d'usage s'agissant de produits potentiellement infectieux.

- L'élimination des déchets doit être effectuée conformément aux réglementations locales en vigueur.
- Utiliser uniquement les réactifs d'un même lot de coffret.
- Les études de vieillissement montrent que les réactifs peuvent être expédiés à température ambiante sans aucun dommage.
- Ce dispositif de diagnostic *in vitro* est destiné à une utilisation professionnelle en laboratoire.

PRÉPARATION DES REACTIFS:

Retirer délicatement le bouchon de lyophilisation, pour s'affranchir de toute perte de produit à l'ouverture du flacon.

R1 Reconstituer chaque flacon avec exactement **2 mL d'eau distillée**.

Agiter vigoureusement jusqu'à dissolution complète, en évitant la formation de mousse et charger directement sur l'automate en suivant les instructions du guide d'application.

Pour la méthode manuelle, laisser stabiliser pendant 30 min à température ambiante (18-25°C), homogénéiser avant utilisation.

R2 Reconstituer chaque flacon avec exactement **1 mL d'eau distillée**.

Agiter vigoureusement jusqu'à dissolution complète, en évitant la formation de mousse et charger directement sur l'automate en suivant les instructions du guide d'application.

Pour la méthode manuelle, laisser stabiliser pendant 30 min à température ambiante (18-25°C), homogénéiser avant utilisation.

STOCKAGE ET STABILITE:

Les réactifs non ouverts doivent être conservés à 2-8°C dans leur emballage d'origine. Ils sont alors utilisables jusqu'à la date de péremption imprimée sur le coffret.

R1 R2 La stabilité du réactif après reconstitution, sous réserve de toute contamination ou d'évaporation, conservé fermé est de :

- 24 heures** à 2-8°C.
- 12 heures** à température ambiante (18-25°C).
- 1 mois** congelé à -20°C ou moins*
- Stabilité à bord de l'automate : se référer à l'application spécifique.**

*Décongeler une seule fois le plus rapidement possible à 37°C et utiliser immédiatement.

REACTIFS ET MATERIELS REQUIS MAIS NON FOURNIS:

Réactifs:

- Eau distillée.
- Imidazole Buffer (AR021B/AR021K/AR021L/AR021M/AR021N).
- CaCl₂ à 0,025 M (AR001B/AR001K/AR001L).
- Étalons et contrôles spécifiques, tels que :

Nom du produit	Référence
BIOPHEN™ V-L Plasma Calibrator	222401
BIOPHEN™ Normal Control Plasma	223201
BIOPHEN™ V-L Control Plasma	223405

Se référer également au guide d'application spécifique de l'automate utilisé.

Matériels:

- Bain marie électromagnétique, automate de coagulation semi-automatique ou automatique.
- Chronomètre, Pipettes calibrées, tubes pour tests en plastique ou en verre siliciné.

PRÉLEVEMENTS ET PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS:

Le sang (9 volumes) doit être collecté sur l'anticoagulant citrate trisodique (1 volume) (0,109M, 3,2%) avec précautions, par ponction veineuse franche. Le premier tube doit être éliminé.

La préparation et la conservation des échantillons doivent être réalisées selon les recommandations locales en vigueur (pour les États-Unis, se référer aux recommandations du CLSI H21-A5⁵ pour plus d'informations concernant le prélèvement, la manipulation et la conservation).

Pour la conservation des plasmas, se référer aux références⁵.

PROCEDURE:

Le coffret peut être utilisé en méthode manuelle ou automatisée. Le test est réalisé à 37°C et le temps de coagulation, déclenché par l'ajout de calcium est mesuré.

Pour une méthode automatisée, les guides d'applications sont disponibles sur demande. Se référer aux guides d'application et aux précautions spécifiques pour chaque automate.

Méthode de dosage:

1. Reconstituer les étalons et les contrôles comme indiqué dans les notices spécifiques. Les étalons doivent être dilués dans du tampon Imidazole comme décrit dans le tableau ci-dessous afin d'effectuer la gamme de calibration ("C" définit la concentration en FV-L, correspondant à une dilution 1/20 de l'étalon) :

Etalon	C1	C2	C3	C3 (2C)
FV-L (%) environ	10	25	50	100
Volume Etalon	50µL de C1	50µL de C2	50µL de C3	100µL de C3
Volume tampon Imidazole	950µL	950µL	950µL	900µL

2. Diluer les échantillons dans du tampon Imidazole comme décrit dans le tableau ci-dessous :

Echantillons	Référence	Dilution
Contrôles	223201 / 223405	1/20
Echantillons	n.a	1/20

Réaliser la gamme de calibration et la tester avec les contrôles de qualité. Les échantillons dilués doivent être testés rapidement, s'ils sont conservés à température ambiante (18-25°C). Les concentrations exactes des étalons et des contrôles sont indiquées pour chaque lot sur le papillon fourni avec le coffret.

3. Introduire dans une cuvette, un tube pour tests en plastique ou en verre siliconé incubé à 37°C :

Réactifs	Volume
R1 Mélange coagulant	100 µL
Etalons, échantillons ou contrôles dilués	100 µL
Mélanger et incubé à 37°C pendant exactement 1 minute	
R2 Facteur Xa humain	50 µL
Mélanger et incubé à 37°C pendant exactement 1 minute, puis introduire (en déclenchant le chronomètre) :	
CaCl ₂ 0.025M pré incubé à 37°C	100µL
Enregistrer le temps de coagulation (TC, sec) exact.	

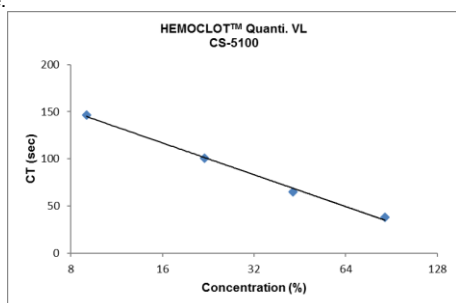
Si un volume réactionnel différent de celui indiqué ci-dessus est requis pour la méthode utilisée, le rapport des volumes doit être strictement respecté afin de garantir les performances du dosage. L'utilisateur est responsable de la validation des modifications et de leur impact sur tous les résultats.

CALIBRATION:

Le test HEMOCLOT™ Quanti. VL peut être calibré pour le dosage du FV-L. L'étalon couvrant la zone calibration est disponible chez HYPHEN BioMed (Voir paragraphe REACTIFS ET MATERIEL REQUIS MAIS NON FOURNIS) et peut être utilisé pour générer la courbe de calibration.

- La zone de calibration est environ de 10 à 100% (sur CS-series).

La courbe de calibration ci-dessous, est indiquée à titre d'exemple uniquement. La courbe de calibration générée pour la série de dosages doit être utilisée.



CONTRÔLE QUALITE:

L'utilisation de contrôles de qualité permet de valider la conformité de la méthode ainsi que l'homogénéité des dosages entre les différents essais pour un même lot de réactifs.

Inclure des contrôles qualité dans chaque série, selon les bonnes pratiques de laboratoire, afin de valider le test. Une nouvelle courbe de calibration doit être établie, de préférence, pour chaque série d'essai, et au moins pour chaque nouveau lot de réactif ou après chaque maintenance de l'automate, ou quand les valeurs des contrôles de qualité sont mesurées en dehors de la zone d'acceptation définie pour la méthode.

Chaque laboratoire doit établir les zones d'acceptation et vérifier les performances attendues dans son système analytique.

RESULTATS:

- Pour la méthode manuelle, en point final, tracer la droite de calibration lin-log, en portant en ordonnées le temps de coagulation (sec) et en abscisses la concentration de FV-L en %.
- La concentration de FV-L (%) dans l'échantillon à doser est déduite directement de la courbe de calibration, lorsque la dilution standard est utilisée.
- Les résultats doivent être interprétés selon l'état clinique et biologique du patient.

LIMITATIONS:

- Pour obtenir les performances optimales du test et répondre aux spécifications, suivre scrupuleusement les instructions techniques validées par HYPHEN BioMed.
- Tout réactif présentant un aspect inhabituel ou des signes de contamination doit être rejeté.
- Tout échantillon suspect ou présentant des signes d'activation doit être rejeté.
- Les temps de coagulation obtenus sont sensibles au taux de Facteur V; un déficit en Facteur V (<25%) chez un patient portant la mutation FV-L est susceptible de fausser les résultats du test.
- Un prélèvement et/ou une préparation incorrecte du plasma peut entraîner une consommation du Facteur V et se traduire par un allongement des temps de coagulation.
- La présence de facteurs activés peut réduire les temps de coagulation.
- Le test peut être réalisé chez les patients traités par l'héparine (jusqu'à 1 UI/mL) ou sous AVK.
- Le dosage de patients présentant un lupus anticoagulant n'est pas recommandé, l'interférence dans le test n'étant pas largement évaluée.
- L'interférence potentielle de mutations telles que FV Cambridge ou FV Hong Kong n'a pas été évaluée pour ce test.

VALEURS ATTENDUES:

Le taux de FV-L pour un plasma normal est < 10%. Cependant, chaque laboratoire doit établir son propre intervalle normal.

La valeur attendue dans un plasma avec mutation R506Q est, pour un hétérozygote, généralement comprise entre 25 et 75% et pour un homozygote > 75%.

L'interprétation des résultats peut être optimisée en comparant le taux de FV-L à celui de l'activité coagulante du Facteur V (rapport d'environ 1,0 pour les homozygotes, d'environ 0,5 pour les hétérozygotes, et <0,1 pour les normaux).

Seule la biologie moléculaire permet de confirmer la classification du type hétérozygote ou homozygote pour la mutation FV-L.

PERFORMANCES:

- La limite basse de détection dépend du système analytique utilisé (<2% sur Sysmex CS-5100).
- La zone de mesure dépend du système analytique utilisé (environ de 5 à 120% de FV-L sur Sysmex CS-series).
- Les études de performances ont été réalisées en interne sur Sysmex CS-5100. Les performances ont été évaluées avec les contrôles du laboratoire sur 5 jours, 2 séries par jour et 3 répétitions à chaque série pour un niveau de contrôle. Les résultats suivants ont été obtenus :

Contrôle	Intra-essai				Inter-essais			
	N	Moy.	CV%	SD	n	Moy.	CV%	SD
Contrôle 1	40	10,8	2,9	0,3	30	11,1	2,8	0,3
Contrôle 2	40	43,1	2,0	0,8	30	44,7	2,4	1,1

- Corrélation avec une autre méthode (COATEST™ APC™ Resistance V sur ACL Top vs HEMOCLOT™ Quanti. V-L sur Sysmex CS-5100) : 99% d'agrément (n = 116).

Interférences :

Aucune interférence, sur l'automate Sysmex CS-5100 n'a été observée avec les molécules et jusqu'aux concentrations suivantes :

Hémoglobine	Bilirubine (Libre)	Bilirubine (Conjuguée)
1000 mg/dL	30 mg/dL	60 mg/dL
Intralipides	Héparine (HNF/HBPM)	Dabigatran
1000 mg/dL	2 UI/mL	50 ng/mL

Se référer également au guide d'application spécifique de l'automate utilisé.

REFERENCES:

- 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.

SYMBÔLES:

Symboles utilisés et signes énumérés dans la norme ISO 15223-1, se référer au document Définition des symboles.

Changements par rapport à la précédente version.