

ProC® Ac R

I Revideringssøyle indikerer oppdatering til tidligere versjon.

Produktets hensikt

The ProC® Ac R-testen er en Russel Viper giftbasert funksjonell koaguleringsstest for screening av resistens mot Aktivert protein C (APC) i plasma fra individer med Faktor V (Leiden) gen-defekten. Det kan også utføres på plasma fra pasienter på stabilisert oral antikoagulant eller heparinbehandling.

Sammendrag og forklaring

Aktivert Protein C-resistens (APC-resistens) er forbundet med punktmutasjon i faktor V-genet [f.eks. Faktor V (Leiden)]. Mutasjonsresultatene i erstatningen av aminosyrearginin 506 (R) med glutamin (Q) i Faktor V-proteinet¹. Denne mutasjonen senker hastigheten til inaktivering av faktor Va av APC, og fører til en hyperkoagulerbar tilstand. Forekomsten av Faktor V (Leiden) er den vanligste årsaken til arvelig trombofili, og utgjør 20 til 50 % av alle tilfeller².

Metodeprinsipp

ProC® Ac R-testen er basert på aktiveringen av endogent protein C ved inkubasjonen av plasma med *Agkistrodon contortrix contortrix* (Southern Copperhead) gift. En fortynnet "Russells Viper gifttid" (DRVVT, slangegiftaktivator for Faktor X) blir deretter utført på plasmaet. DRVVT er sensitiv for endringer i konsentrasjon av Aktivert protein C. I normale individer, forlenger aktivering av deres protein C resultatet til det dobbelt eller tredobbelte, sammenlignet med plasma uten aktivator. I individer med Faktor V (Leiden), fremkaller giftaktiveringen av Protein C bare marginal forlengelse av resultatet (vanligvis mindre enn 1,5 ganger plasmaet uten aktivator). For å minimere effekten av andre koagulerende variabler, bør et forhold av koaguleringsstider oppnådd med og uten Protein C, bestemmes.

Aktivert Protein C-resistens kan også skyldes andre mutasjoner i faktor V-genet [f.eks. FV (Cambridge) og FV (Hong Kong)].

Reagenser

Merk: ProC® Ac R kan brukes manuelt eller på automatiske koagulasjonsinstrumenter. Siemens Healthcare Diagnostics utarbeider referansemanualer (applikasjonsbeskrivelse) for mange koagulasjonsinstrumenter. Referansemanualene (applikasjonsbeskrivelsene) inneholder instrument/metode- spesifikk håndterings og ytelses informasjon, som kan være forskjellig, fra det som er oppgitt i denne brukerinstruksjonen. Hvis dette er tilfelle, vil informasjonen i referansemanualen (applikasjonsbeskrivelsen) gjelde fremfor informasjonen i denne brukerinstruksjonen. I tillegg, sjekk med brukermanualen til instrumentet.

Materialer som medfølger

ProC® Ac R, **REF** OPBC med

5 x → 4,0 ml **REAGENT**, PR3V-reagens

5 x → 2,0 ml **ACTIVATOR**, Aktivator-reagens

Nok til å utføre 100 manuelle koaguleringsanalyser (100 tester med aktivator og 100 tester uten aktivator).

Merk: Antallet tester som er oppnådd med spesifikke koagulasjonsinstrumenter, kan variere.

Sammensetning:

Aktivatorreagens:

Lyofilisat, inneholder *Agkistrodom contortrix contortrix*-gift (< 0,1 g/l) i stabiliserende bufferløsning.

Konserveringsmiddel: natriumazid (< 1 g/l)

PR3V-reagens:

Lyofilisat, inneholder fortynnet *Vipera Russellii*-gift med høyt innhold av fosfolipid (< 1 mg/l), plantederiverte fosfolipider (< 10 g/l), kalsium og en heparinhemmer (< 0,5 g/l).

Konserveringsmiddel: natriumazid (< 1 g/l)

Advarsler og forholdsregler

Kun for *in vitro*-diagnostisk bruk.

Inneholder natriumazid (< 1 g/l) som konserveringsmiddel. Natriumazid kan reagere med kobber- eller blyrør i avløpsledninger og danne eksplosive stoffer. Avhendes i samsvar med lokale forskrifter.

Klargjøring av reagenser

- Rekonstituer **ACTIVATOR** i 2,0 ml destillert eller avionisert vann uten konserveringsmidler. Det rekonstituerte produktet skal være en klar, svakt gul løsning uten synlige partikler.
- Rekonstituer PR3V **REAGENT** i 4,0 ml destillert eller avionisert vann uten konserveringsmidler. Det rekonstituerte produktet skal være en gjennomsiktig, blek løsning uten synlige partikler.
- Snu forsiktig for å blande. **Må ikke ristes!**
- Inkuber i 10 minutter ved romtemperatur (15 til 25 °C) før bruk.
- Bland reagenser på nytt forsiktig før bruk.

Oppbevaring og stabilitet

Frysetørrede reagenser må lagres ved 2 til 8 °C og er stabile frem til utløpsdatoen som står på etiketten.

Stabilitet etter rekonstitusjon (lukket flaske):

Temperatur	ACTIVATOR	REAGENT
ved 2–8 °C	2 uker	2 uker
ved 20–25 °C	12 dager	12 dager
ved 37 °C	6 timer	6 timer
ved –20 °C	2 uker	2 uker

Informasjon om holdbarhet på instrumentet er spesifisert i referansemanualen (applikasjonsbeskrivelsen) for de forskjellige koagulasjonsinstrumentene.

Indikasjon på utløp:

Hvis det ikke er tegn til vakuum når **REAGENT**-flasken åpnes og/eller **REAGENT** ikke fremstår som tørt, skal det returneres til Siemens. Hvis rekonstituerte produkter viser tydelige tegn til partikler eller kontaminasjon eller hvis de ikke løses opp helt innen 15 minutter av tilsetningen av destillert eller avionisert vann, vennligst ta kontakt med Siemens eller din distributør.

Ikke frys og tin på nytt mer enn én gang etter rekonstituering!

Materiale som er nødvendig men som ikke medfølger

Natriumcitrat (0,11 M eller 3,2 %) for blodprøvetaking

Kontrollplasma N, **REF** ORKE

ProC® kontrollplasma, **REF** OQKE
 Destillert eller avionisert vann uten konserveringsmidler
 Testrør av plast
 Pipetter for nøyaktig måling av 100 µl, 2,0 ml og 4,0 ml
 Vannbad, opprettholdt ved 37 °C
 Tidtaker eller stoppeklokke
 Fysiologisk saltløsning (0,15 M natriumklorid) til bruk med BCS® koagulasjonsinstrument
 Dade® CA System-buffer til bruk med SYSMEX CA Systems, **REF** B4265 *eller*
 Dade® Owren's veronal buffer, **REF** B4234
 Koagulasjonsinstrument

Prøvetakning og klargjøring

Viktig: Behandle alle plasmaer som potensielt smittsomme!

For å få plasma, bland forsiktig 1 del natriumsitratløsning (0,11 M) med 9 deler frisktappet veneblod og unngå skumdannelse. Sentrifuger blodprøven så raskt som mulig ved 1,500 x g i minst 15 minutter i romtemperatur. Ved avpippetering av plasma, pass på at ikke Trombocytter kommer i plasmaet. Hvis prøven skal fryses; sentrifuger plasmaet igjen og frys umiddelbart. Se i CLSI dokument H21-A5³ for generelle retningslinjer for prøvepreparering og lagring.

Prøvenes stabilitet

ved 2 til 8 °C	4 timer (ferskt plasma)
ved -30 °C	6 måneder (hvis blodplatene fjernes ved dobbel sentrifugering før frysing).

Prosedyre

Manual:

Test med aktivator:

1. Forvarm nok **PR3V-reagens**, med 0,1 ml per test, til 37 ±1 °C i en reagensbeholder.
2. Dispenser 0,1 ml testplasma i et testrør.
3. Tilsett 0,1 ml **aktivatorreagens** til testplasmaet og inkuber i nøyaktig 5 minutter ved 37 ±1 °C.
4. Tilsett 0,1 ml av **PR3V-reagenset** forvarmet til 37 ±1 °C, start stoppeklokken straks og finn koaguleringstiden.
5. Gjenta målingen for dobbel måling og rapporter gjennomsnittet av begge målinger som resultat.

Test uten aktivator:

1. Forvarm nok **PR3V-reagens**, med 0,1 ml per test, til 37 ±1 °C i en reagensbeholder.
2. Dispenser 0,1 ml testplasma i et testrør.
3. Tilsett 0,1 ml **saltløsning** til testplasmaet og inkuber i nøyaktig 5 minutter ved 37 ±1 °C.
4. Tilsett 0,1 ml av **PR3V-reagenset** forvarmet til 37 ±1 °C, start stoppeklokken straks og finn koaguleringstiden.
5. Gjenta målingen for dobbel måling og rapporter gjennomsnittet av begge målinger som resultat.

Intern kvalitetskontroll

Normalt område: Kontrollplasma N
 Patologisk område: ProC® kontrollplasma
 2 kontroller [en FV (Leiden) negativ og en FV (Leiden) positiv] må måles ved hver analysering.
 Et normalt kontrollplasma kan fastsettes med en pool med nylig tatt normale plasmaer, alle

testet og påvist negativ for Faktor V (Leiden)-mutasjonen. Plasmaene skal samles på dagen de ble tatt, og fryses i små alikvoter til senere bruk. En positiv kontroll kan klargjøres fra alikvoter av et kjent Faktor V Leiden-positivt individ.

Plasma skal fryses ved -70°C til bruk.

Kontrollene skal klargjøres og håndteres på samme måte som prøvene.

Akseptable grenser skal angis for hvert kontrollplasma ved å utføre presisjonsstudier i samsvar med CLSI-retningslinjer. Hvert laboratorium skal måle sitt eget kvalitetskontrollområde for begge kontroller, enten ved hjelp av målverdier og områder gitt av produsenten av kontrollene eller ved hjelp av kontrollverdier målt i laboratoriet, med hver lot av ProC® Ac R-testen. Dette beløper seg normalt til $\pm 2,5$ standardavvik fra middel kontrollverdi.

Hvis de målte kontrollverdiene er utenfor det forhåndsbestemte kontrollområdet, må ikke pasientresultatene rapporteres til problemet er identifisert, korrigert og dokumentert. Finn hvilken del av instrument-/reagens-/kontrollsystemet ikke fungerte på riktig måte og korriger den. Etter at korrigerende tiltak er implementert og dokumentert i samsvar med *god laboratoriepraksis (GLP)*, skal kontrollene testes på nytt. Hvis de nå er innenfor konfidensområdet, kan pasientprøver testes og resultatene rapporteres.

Resultater

Resultater bør uttrykkes som et forhold:

$$\text{ProC}^{\circ} \text{ Ac R-forhold} = \frac{\text{Koaguleringsstid PR3V med aktivator}}{\text{Koaguleringsstid PR3V med saltløsning eller Dade}^{\circ} \text{ CA System-buffer}}$$

ProC® Ac R Test-resultater på samlet, normalt plasma med Aktivatorreagens til stede, skal være 2 til 3 ganger lenger enn resultater på samlet, normalt plasma uten Aktivatorreagens (se forventede verdier).

Prosedyrens begrensninger

Tester med ProC® Ac R ble utført med prøver fra pasienter på stabilisert oral antikoagulantterapi, pasienter på heparin- og lavmolekyl-heparinterapi og pasienter med lupus antikoagulant.

Prøver fra slike pasienter kan vise betydelig lengre koaguleringstider enn prøver fra normale individer. Da koaguleringstidene med saltløsning eller Dade® CA System-buffer også er forlenget er imidlertid kvotienten fra koaguleringstiden med/uten aktivator fortsatt pålitelig og den diagnostiske signifikansen opprettholdes.

Terapeutiske doser hirudin eller andre direkte trombinhemmere fører til forlengede koaguleringstider.

Siemens har validert bruken av disse reagensene på forskjellige analysatorer for å optimere produktets metodeegenskaper og overholde produktspesifikasjonene. Brukerdefinerte modifikasjoner støttes ikke av Siemens da de kan påvirke systemets egenskaper og analyseresultatene. Det er brukerens ansvar å godkjenne modifikasjoner av disse instruksjonene eller bruk av reagenser på andre analysatorer enn de som inngår i Siemens applikasjonsbeskrivelser og bruksanvisninger.

Resultater av denne testen skal alltid tolkes i sammenheng med pasienthistorikken, klinisk tilstand og andre funn.

Interferenser

Ikteriske, lipemiske og hemolytiske prøver og prøver med lavt hematokritt skal ikke brukes med denne testen, da de kan føre til feil resultater (se CLSI H21-A5 for videre klargjøring³).

Lave aktiviteter av faktor VII, VIII, IX og XII virker ikke forstyrrende på ProC® Ac R-testen.

Aktiviteter av faktor II og V på mer enn 10 % og Faktor X på mer enn 20 % har heller ingen effekt på testen. I begynnelsen av behandling med orale antikoagulanter, dvs. før stabilisering, kan ProC® Ac R-testen gi forhold som er for lave. Det samme gjelder Protein C-konsentrasjoner på mindre enn 50 %.

Anestesimiddelet propofol (Diprivan, 2,6-diisopropylfenol, CAS-nr. 2078-54-8) kan indusere falskt lave koaguleringstider i aktivatoranalysen, noe som kan føre til tall under cut-off-verdien (falskt positive resultater)⁴.

Forventede verdier

Verdier (forhold) for sunne individer varierer fra laboratorium til laboratorium, avhengig av prosedyren som brukes. Derfor skal hvert laboratorium bestemme sine egne referanseområder på grunnlag av metodene og koagulasjonsinstrumentene som brukes.

Generelt sett indikerer forhold som er mindre enn eller lik 1,5, Faktor V (Leiden)-varianten. En studie med BCS® System, SYSMEX CA-7000 og CA-1500-systemene ga en beslutningsgrense på 1,8 for disse analyseapplikasjonene.

Forhold mellom 1,5 og 2,1 kan tyde på lave konsentrasjoner av Protein C og bør undersøkes nærmere. Disse undersøkelsene kan inkludere spesifikke tester for Protein C- og DNA-tester.

Prøver med positive eller tvetydige resultater skal bekreftes ved genetisk analyse.

Spesifikke metodeegenskaper

Diagnostisk sensitivitet og diagnostisk spesifisitet

ProC® Ac R-testen ble validert med et Stago STA-instrument mot DNA-analysemetoden og en cut-off-verdi på 1,57 ble målt med ROC-analyse.

En klinisk evalueringsstudie ble deretter utført på tre uavhengige testsentre for å evaluere ProC® Ac R-testens evne til å måle Faktor V (Q506)-mutasjonen. ProC® Ac R-testen ble sammenlignet med COATEST APC Resistance V-test og DNA-analysen, med totalt 164 prøver (82 normale og 82 Faktor V (Leiden)-positive) fra pasienter fra 2 til 87 år. Populasjonen inkluderte pasienter med følgende kliniske tilstander: ubehandlet (49), DVT/PE eller andre protrombotiske tilstander (58), orale antikoagulanter (36), heparin/LMW heparin (21), lupus antikoagulant (12) eller familiestudier (39). 163 av 164 pasienter ble riktig identifisert med en cut-off-verdi på 1,57 på alle laboratorier, og ga en sensitivitet på 100 % (konfidensgrenser: 95,6 til 100 %) og en spesifisitet på 98,8 % (konfidensgrenser 93,4 til 99,8 %) i forhold til DNA-metoden. Validering ble utført med en Stago STA, en Organon Teknika MDA 180 og ved manuelt å vippe røret frem og tilbake.

En ytterligere klinisk evaluering av ProC® Ac R-testen med BCS® System, SYSMEX CA-7000 og CA-1500-systemene definerte beslutningsgrensen med ROC-analyse som 1,8. Den diagnostiske sensitiviteten og diagnostiske spesifisiteten for disse analyseapplikasjonene ble evaluert. Minst 198 ferske eller frosne prøver fra uvalgte frivillige, sunne bloddonorer bekreftet negative for Faktor V (Leiden) med PCR, og fra pasienter med forskjellige sykdomstilstander bekreftet positive for Faktor V (Leiden) med PCR ble testet. Se Tabell 1 for resultatene.

Tabell 1: Resultater av den diagnostiske sensitivitets- og diagnostiske spesifisitetsstudien for ProC® Ac R

	N	Cut-off	Spesifisitet [%]	Sensitivitet [%]	NPV [%]	PPV [%]
CA-1500	198	1,8	97,2	98,9	99	96,8
CA-7000	214	1,8	98,0	99,1	99	98,2
BCS®	231	1,8	98,1	99,2	99	98,4

ProC® Ac R-testapplikasjonene med BCS® System, SYSMEX CA-7000 og CA-1500-systemene ble sammenlignet med COATEST APC Resistance V med ACL 9000. Totalt 139 ferske eller frosne prøver fra uvalgte, frivillige sunne bloddonorer bekreftet negative for Faktor V (Leiden) med PCR, og fra pasienter med forskjellige sykdomstilstander bekreftet positive for Faktor V (Leiden) med PCR ble testet. 138 av de 139 prøvene ble riktig identifisert med ProC® Ac R-testen med BCS® System, SYSMEX CA-7000 System og COATEST APC Resistance V med ACL 9000. 137 av 139 ble riktig identifisert med ProC® Ac R-analysen med SYSMEX CA-1500 System.

Merk: Sensitiviteten og spesifisiteten til ProC® Ac R-testen for ikke-FV (Leiden) APC-resistensscreening er ikke fastsatt. På grunn av forskjellene i prøvepopulasjonene, innsamlingsteknikkene og instrumenteringene, bør hvert testlaboratorium etablere sin egen cut-off verdi.



Presisjon

Innen serie-presisjonsmaksimum (intraanalyse variasjonskoeffisient) var 1,9 %. Det totale presisjonsmaksimum variasjonskoeffisient var 8,9 % med to laboratorier, instrumenter og operatører med tre plasmaer, testet i duplikat i 20 dager dager.

Bibliografi

1. Bertina RM, Koeleman BP, Koster T, et al. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature* 1994; 369:64-7.
2. Dahlback B. Physiological anticoagulation. Resistance to activated protein C and venous thromboembolism. *J Clin Invest* 1994; 94:923-7.
3. CLSI Guideline H21-A5: Collection, Transport, and Processing of Blood Specimens for Testing Plasma-Based Coagulation Assays and Molecular Hemostasis Assays; Approved Guideline - Fifth Edition (ISBN 1-56238-657-3). CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400. Wayne, PA 19087-1898 USA, 2008.
4. Parsons L, et al. Propofol Interference in Coagulation Testing. *Am J Clin Pathol* 2011; 136: A285.

Symbolforklaring

	Ikke til gjenbruk		Holdbar til
	Lot nummer		Katalognummer
	Advarsel, konsulter tilhørende dokumenter		Produsent
	Autorisert representant i EU		Inneholder tilstrekkelig for <n> tester
	Biologiske risikoer		<i>In Vitro</i> diagnostisk medisinsk utstyr
	Temperaturbegrensninger		Konsulter instruksjoner for bruk
	Ikke-sterilt		CE merke
	Innhold		Rekonstitueringsvolum
	Nivå		Hold unna sollys og varme

BCS, Dade og ProC er varemerker for Siemens Healthcare Diagnostics.

SYMEX er et varemerke for SYMEX CORPORATION.

STA er et varemerke for Diagnostica Stago.

APC og COATEST er varemerker for Chromogenix AB.

MDA er et varemerke for Organon Teknika B.V..

© 2008 Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH.

Med enerett.



Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH
Emil-von-Behring-Str. 76
35041 Marburg/Germany

Siemens Healthcare Headquarters

Siemens Healthcare GmbH
Henkestraße 127
91052 Erlangen/Germany
Phone: +49 9131 84-0
siemens.com/healthcare