

ACTICLOT® Protein C Resistance

REF 840



EC REP american diagnostica GmbH
 Kaplaneigasse 35, D-64319 Pfungstadt, Germany
 Tel. + 49 61 57 / 99 08 99 • Fax + 49 61 57 / 99 08 08

INTENDED USE

The ACTICLOT® Protein C Resistance assay is a plasma based functional assay for the determination of resistance to activated protein C caused by the factor V Leiden mutation (FV:Q506). For *in-vitro* diagnostic use.

INTRODUCTION

Activated protein C (APC) resistance is the most frequent hereditary defect associated with deep vein thrombosis. Over 95% of the APC resistance phenotype can be explained by the Factor V Leiden mutation [1,2,3,4,5,6]. This defect is caused by point mutation in the factor V gene resulting in a replacement of the amino acid Arg 506 by a Gln residue [2,3,7]. The heterozygous (het) defect is associated with a 5 to 10 fold, the homozygous (hom) defect with a 50 to 100 fold increased thrombosis risk [5,8,9].

There are two possibilities of detecting factor V (FV) Leiden. Plasma based functional assays identifying the phenotype expression of the defect [1] or genotype determination which can be done by PCR technology [10].

PRINCIPLE OF THE METHOD

The ACTICLOT® Protein C Resistance assay is a plasma-based functional clotting assay and differs from other functional APC resistance tests by acting specifically on the prothrombinase complex level. It is based on a FV-dependent prothrombin activator isolated from snake venom. Robustness and specificity of the assay is enhanced by elimination of possible disturbing influences by factors upstream the coagulation cascade and independency from calcium. Interference from UFH, LMWH and Pentasaccharide in the blood sample is precluded by a heparin inhibitor added to reagents 1 and 2.

Sample plasma is pre-diluted with reagent 4 (dilution plasma) and incubated at 37 °C with FV activator from snake venom (RVV-V from *Daboia russelli*). Coagulation is triggered by the addition of a FV dependent prothrombin activator from snake venom from *Notechis scutatus* in the absence of calcium. The clotting times are recorded and the ratios (clotting time in the presence of APC/clotting time in the absence of APC) are calculated.

REAGENTS

Reagent	Reagent content
R1	APC / RVV-V (+APC) Reagent (APC, RVV-V, Polybren, Hepes, BSA) 3 vials (lyophilisate, to be reconstituted in 2.0 ml of deionized water per vial)
R2	RVV-V (-APC) Reagent (RVV-V, Polybren, Hepes, BSA) 3 vials (lyophilisate, to be reconstituted in 2.0 ml of deionized water per vial)
R3	PTA Reagent (Prothrombin Activator, EDTA, Hepes, BSA) 3 vials (lyophilisate, to be reconstituted in 4.0 ml of deionized water per vial)
R4	Dilution Plasma (processed Human Plasma) 3 vials (lyophilisate, to be reconstituted in 2.0 ml of deionized water per vial)

Incubate reconstituted solutions R1-R4 in closed vials for 30' at room temperature and swirl gently before use.

Attention: Extended incubation of reagent R4 may – due to its high protein content – cause a phase separation characterized by a clear solution with a fine, whitish layer on its surface. This may be erroneously interpreted as coagulation. Therefore, the reagent must absolutely be brought in its initial homogeneous and slightly cloudy form just before use.

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- Deionized water
- Calibrated pipettes (1000–5000 µl)
- Automated or semi-automated coagulation instruments using mechanical or optical detection methods

Note: When using automated or semi-automated coagulation analyzers refer always to manufacturer's operator manual or ask for a detailed adaptation protocol.

STORAGE AND STABILITY

The test kit may be used up to the expiry date given on the label when stored unopened at 2–8 °C.

Stability of the reagents after reconstitution:

Reagent	Stability	
R1	-20°C	6 months
	2 - 8°C	14 days
	15 - 25°C	24 hours (on-board)
R2	-20°C	6 months
	2 - 8°C	14 days
	15 - 25°C	24 hours (on-board)
R3	-20°C	6 months
	2 - 8°C	14 days
	15 - 25°C	24 hours (on-board)
R4	-20°C	6 months
	2 - 8°C	14 days
	15 - 25°C	24 hours (on-board)

Frozen reagents should be thawed at 37 °C and gently mixed before use. Freeze only once.

QUALITY CONTROLS

Use the ACTICLOT® Protein C Resistance Control Plasmas (REF 840C) as a control reference for the validation of the assay. Negative control or wild-type (neg) shows normal response to APC whereas heterozygous control (het) shows response to the presence of the heterozygous type of FV: Q506 mutation. A control run should be made with each test series.

For preparation, use and interpretation of the controls, refer to the instructions and certified ranges mentioned in the package insert of the corresponding control kit.

Different clotting times will be obtained with different types of instruments depending on the clot detection principle. If values outside the certified range (ratio) are obtained, a complete check of reagents should be made and the analysis should be repeated. If the problem persists, a complete instrument check should be made and the analysis should be repeated.

BLOOD COLLECTION AND SAMPLE PREPARATION

The patient should be at rest for 10 min prior sampling. Collect venous blood carefully in either 104 mM or 129 mM sodium citrate (volume ratio 9+1). Mix gently blood and anticoagulant directly after sampling, avoid foam formation. Centrifuge immediately at no less than 2000x g for at least 20 min at room temperature. Take care to avoid contaminations from the platelet layer into plasma when the plasma is separated from the cells. As a general rule hemolytic plasma samples should not be used.

For storage freeze undiluted plasma rapidly at –70 °C in aliquots. Freeze only once. Avoid repeated freezing and thawing cycles. To ensure negligible loss of activity of labile coagulation factors and absence of cryoprecipitate, thawing should be done rapidly (within 5 min) in a water bath at 37 °C. For more information see NCCLS document H21-A2 [11].

Stability of undiluted samples (plasma):

–80 °C	at least 1 year
–20 °C	2 months
2–8 °C	24 hours
15–25 °C	4 hours

PROCEDURE

Prepare reagents and samples as described above. Mix gently thawed sample for homogenization, avoid foam formation. Determine +APC clotting time (clotting time in the presence of Activated Protein C), –APC clotting time (clotting time in the absence of Activated Protein C) and calculate the ratio according to the following scheme:

	+ APC	- APC
Sample or control plasma	30 µL	30 µL
R4 Dilution Plasma	20 µL	20 µL
	mix prior to use	mix prior to use
R1 APC/RVV-V (+APC) Reagent	50 µL	-
R2 RVV-V (-APC) Reagent	-	50 µL
Incubation	3 min, 37°C	3 min, 37°C
R3 PTA Reagent	50 µL	50 µL
	Determine clotting time	Determine clotting time
Ratio calculation =	$\frac{\text{Clotting time} + \text{APC}}{\text{Clotting time} - \text{APC}}$	

INTERPRETATION OF THE TEST RESULTS

Differentiation of homozygous, heterozygous and negative samples is based on the typical ratio ranges measured with genotyped patient plasma samples (see tables below). These ratios may vary depending on laboratory, instrument and lot. Therefore, it is recommended to establish individual ranges and cut-offs for each laboratory and each instrument (if necessary also for each lot) by testing series of known genotyped patient plasmas.

EXPECTED VALUES

Typical ratio ranges for PCR-genotyped patient plasmas on different devices are shown in the table below.

KC-4/-10 A™ micro		
Genotype FV:Q506	n	Ratio range (min/max)
negative	99	≥ 3.0
heterozygous	166	1.3–1.9
homozygous	25	0.9–1.1

BCS® (Siemens Coagulation System)		
Genotype FV:Q506	n	Ratio range (min/max)
negative	143	≥ 3.0
heterozygous	170	1.4–2.2
homozygous	27	0.9–1.1

CA-1500 / CA-7000		
Genotype FV:Q506	n	Ratio range (min/max)
negative	235	≥ 3.0
heterozygous	56	1.5–1.8
homozygous	2	1.0–1.1

ACL 9000™		
Genotype FV:Q506	n	Ratio range (min/max)
negative	127	≥ 3.0
heterozygous	119	1.4–2.1
homozygous	24	0.9–1.2

STA® C		
Genotype FV:Q506	n	Ratio range (min/max)
negative	134	2.9
heterozygous	83	1.3–1.8
homozygous	27	0.9–1.1

AMAX CS-190		
Genotype FV:Q506	n	Ratio range (min/max)
negative	74	≥ 3.0
heterozygous	62	1.2–2.3
homozygous	10	0.9–1.1

When using these tables, following restrictions should be considered:

- These are examples and **no** reference ranges or cut-offs guaranteed by the manufacturer.
- Certain interference factors (refer to "Limitations and Interferences") may cause ratio values which cannot clearly be attributed to a particular genotype, or may lead to clotting times that exceed the maximum admitted detection time of the instrument. In these cases, further investigation by PCR and the determination of individual factors are absolutely essential.

SENSITIVITY AND SPECIFICITY

With the samples tested so far ACTICLOT® Protein C Resistance assay provided 100% sensitivity and 100% specificity for carriers of heterozygous and homozygous FV:Q506 mutation as determined by BCS® (n=340), KC-4/-10 A™ micro (n=290), CA-1500/CA-7000 (n=293), ACL 9000™ (n=270), STA® C (n=244) and AMAX CS-190 (n=146). Due to the functional detection technique the assay is supposed to detect other FV mutations leading to APC-R phenotype as well. However their prevalence is very low compared to the FV Leiden mutation.

ACCURACY AND REPRODUCIBILITY

With 2 genotyped plasma samples (neg/het) a series of 25 measurements were taken on the same day on 2 different fully automated analytical systems (BCS®, CA-500). Correlation of variance (CV) was determined based on the ratio. For both instruments and plasma genotypes the CV was below 5%.

In a further study on the STA® C analyzer, a series of 10 tests on each of 5 consecutive days were done using a heterozygous and a negative (wild-type) control. The CV of the clotting times and the ratios within each day and over all 5 days was ≤5.0 for the negative control and <3.0 for the heterozygous control.

The values obtained during these 5 days were within the following ranges:

	Negative Control			Heterozygous Control		
	+ APC	- APC	Ratio	+ APC	- APC	Ratio
min	132.9	24.2	5.3	39.2	25.4	1.5
max	166.3	25.7	6.7	42.6	27.7	1.6

LIMITATIONS AND INTERFERENCES

No significant differences are observed when fresh or frozen plasma samples are used. It does neither matter whether buffered or unbuffered citrate plasma is used. There is no significant influence on ratio or test sensitivity in case of Fibrinogen, Prothrombin, FVIII, FX, ATIII, Protein C, or Protein S deficiency (up to 100%) or excess of Fibrinogen, FVIII, ATIII, or TFPI (up to 5 times normal value). Mechanical measurements are neither influenced by the hemolytic blood samples nor by samples containing platelet residues. In contrast, optical methods can be influenced by the use of hemolytic or lipemic plasmas. Lupus anticoagulant antibodies did not influence the test. But a high Factor V deficiency (<50%) may lead to strongly elevated clotting times and thus may lead to loss of discrimination performance. The presence of Aprotinin (which inhibits the APC used in this test) and Protamine in the patient's blood can considerably shorten the clotting times, which may also lead to loss of discrimination power. Due to the addition of Polybrene the prescribed assay procedure allows for the analysis of plasma from anticoagulated patients at heparin levels ≤2 IU/ml (UFH and LMWH) or pentasaccharide levels ≤2 µg/ml. The effect of direct thrombin inhibitors such as Hirudin or Argatroban is not inhibited by Polybrene. Hirudin in the patient plasma has a strong effect on clotting times and thus precludes proper discrimination of the different genotypes.

PRECAUTIONS

Each donor unit used in the preparation of Dilution Plasma (R4) has been tested for antibodies against HIV Type 1 and 2, Hepatitis C-Virus antibodies, Treponema pallidum antibodies as well as Hepatitis B surface-antigen and Hepatitis C genome by PCR. The tests used are all CE certified tests according to list A of the European Directive for IVDs (98/79/EC) and are under supervision by the responsible European governmental authority. The plasmas were found to be negative on the tested parameters. However, since no test can completely rule out the presence of blood borne diseases these control plasmas have to be handled as potentially infectious material.

BIBLIOGRAPHY

- Dahlbäck 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 co factor to activated protein C. Proc Natl Acad Sci 1993; 90: 1004-8
- Bertina RM, Koelemann BPC, Koster T, Rosendaal FR, Dirven RJ, de Ronde H, van der Velden PA, Reitsma PH. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. Nature 1994; 369: 64-7.
- Zöller B, Dahlbäck B. Linkage between inherited resistance to activated protein C and factor V gene mutation in venous thrombosis. Lancet 1994; 343: 1536-8.
- Rees DC, Cox M, Clegg JB. World distribution of factor V Leiden. Lancet 1995; 346: 1133-4.
- Simioni P, Tormene D, Prandoni P, Zerbinati P, Gavasso S, Cefalo P, Girolami A. Incidence of venous thromboembolism in asymptomatic family members who are carriers of factor V Leiden: a prospective cohort study. Blood 2002; 99: 1938-42.
- Wilmer M, Stocker C, Bühler B, Conell B, Calatzis A. 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; 122:836-42
- Greengard JS, Sun X, Xu X, Fernandez JA, Griffin JH, Evatt B. Activated protein C resistance caused by Arg506Gln mutation in factor Va. Lancet 1994; 343: 1361-2.
- Cooper PC, Hampton KK, Makris M, Abuzenadah A, Paul B, Preston FE. Further evidence that activated protein C resistance can be misdiagnosed as inherited functional protein S deficiency. Br J Haematol 1994; 88: 201-3.
- 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 Gln mutation. Blood Coag Fibrinol 1995; 6: 245-8.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Collection, transport and processing of blood specimens for coagulation testing and performance of coagulation assays. NCCLS Document H21-A2; vol 11 No 23.

ANWENDUNGSGEBIET

ACTICLOT® Protein C Resistenz ist ein funktioneller Gerinnungstest zur Bestimmung einer auf der FV-Leiden Mutation (FV:Q506) basierenden Resistenz gegen aktiviertes Protein C (APC-R). Zur Verwendung als *in-vitro* Diagnostikum.

EINLEITUNG

Häufigste Ursache einer erblich bedingten tiefen Beinvenenthrombose ist eine Resistenz gegen aktiviertes Protein C (APC). In über 80% der Fälle manifestiert sich diese phänotypisch durch die FV Leiden (FVL) Mutation [1,2,3,4,5,6]. FVL basiert auf einer Punktmutation im FV-Gen, einem Austausch der Aminosäure Arginin 506 durch Glutamin [2,3,7]. Heterozygotie (het) ist mit einer 5- bis 10-fachen und Homozygotie (hom) mit einer 50- bis 100-fachen Erhöhung des Thromboserisikos verbunden [5,8,9].

Der Nachweis des FVL-Phänotyps erfolgt im Blutplasma mittels funktioneller Gerinnungstests [1]; die Genotypisierung mit Hilfe PCR-basierter Methoden [10].

PRINZIP DER METHODE

Im Unterschied zu anderen im Markt erhältlichen funktionellen Gerinnungstest, erfolgt beim ACTICLOT® Protein C Resistance die Aktivierung auf der Ebene des Prothrombinasekomplexes durch einen FVa-abhängigen Prothrombinaktivator, isoliert aus dem Gift der australischen Tigerotter (*Notechis scutatus*). Dies eliminiert potenzielle Störeinflüsse durch vorgelagerte Faktoren der Gerinnungskaskade. Die geringe Störanfälligkeit und Spezifität des Tests wird des Weiteren unterstützt durch die Unabhängigkeit von endogenem Kalzium. Einflüsse von unfraktioniertem Heparin (UFH), niedermolekularem Heparin (LMWH) oder Pentasaccharid in der Blutprobe werden durch Polybrenzusatz in Reagenz 1 und 2 neutralisiert.

Das Probenplasma wird mit Reagenz 4 (Dilution Plasma) verdünnt und in Gegenwart oder Abwesenheit von APC bei 37°C mit einem Faktor V Aktivator (RVV-V), isoliert aus dem Gift der Kettenviper (*Daboia russellii*) inkubiert. Die Gerinnung wird in Abwesenheit von

Kalzium durch Zusatz des FVa-abhängigen Prothrombinaktivators ausgelöst. Die Gerinnungszeiten werden bestimmt und die Ratio (Gerinnungszeit in Gegenwart von APC / Gerinnungszeit in Abwesenheit von APC) bestimmt.

REAGENZIEN

Reagenz	Inhalt
R1	APC / RVV-V (+APC) Reagent (APC, RVV-V, Polybren, Hepes, BSA) 3 Fläschchen Lyophilisat (Rekonstitution mit 2.0 mL/Flasche entionisiertem Wasser)
R2	RVV-V (-APC) Reagent (RVV-V, Polybren, Hepes, BSA) 3 Fläschchen Lyophilisat (Rekonstitution mit 2.0 mL/Flasche entionisiertem Wasser)
R3	PTA Reagent (Prothrombinaktivator, EDTA, Hepes, BSA) 3 Fläschchen Lyophilisat (Rekonstitution mit 4.0 mL/Flasche entionisiertem Wasser)
R4	Dilution Plasma (prozessiertes Humanplasma) 3 Fläschchen Lyophilisat (Rekonstitution mit 2.0 mL/Flasche entionisiertem Wasser)

Die rekonstituierten Reagenzien R1-R4 sind in den geschlossenen Gefäßen 30 Minuten bei Raumtemperatur zu inkubieren und vor Gebrauch schonend zu durchmischen.

Achtung: Bei Reagenz R4 kann es aufgrund des hohen Proteinanteils bei längeren Inkubationszeiten zu einer Phasentrennung kommen, die durch eine feine, weisse Schicht an der Oberfläche einer klaren Lösung gekennzeichnet ist. Sie kann irrtümlich als Gerinnung interpretiert werden. Es ist deshalb unbedingt darauf zu achten, dass das Reagenz vor der Verwendung durch leichtes Durchmischen wieder in die ursprüngliche homogene und leicht trübe Form gebracht wird.

ZUSÄTZLICH BENÖTIGTE MATERIALIEN

- Entionisiertes oder destilliertes Wasser
- Kalibrierte Pipetten (1000 – 5000 µL)
- Automatisierte oder halbautomatisierte Gerinnungsgeräte, die mechanische oder optische Nachweismethoden verwenden.

Achtung: Bei Verwendung automatisierter oder halbautomatisierter Gerinnungsgeräte beachten Sie bitte die Bedienungsanleitung oder fragen Sie nach detaillierten Adaptionsprotokollen.

LAGERUNG UND STABILITÄT

Der Testkit ist ungeöffnet bei + 2°C - + 8°C bis zu dem auf dem Etikett aufgedruckten Datum verwendbar.

Stabilität der Reagenzien nach Rekonstitution:

Reagenz	Stabilität	
R1	-20°C	6 Monate
	2 - 8°C	14 Tage
	15 - 25°C	24 Stunden (im Gerät)
R2	-20°C	6 Monate
	2 - 8°C	14 Tage
	15 - 25°C	24 Stunden (im Gerät)
R3	-20°C	6 Monate
	2 - 8°C	14 Tage
	15 - 25°C	24 Stunden (im Gerät)
R4	-20°C	6 Monate
	2 - 8°C	14 Tage
	15 - 25°C	24 Stunden (im Gerät)

Tiefgefrorene Reagenzien sollten bei 37°C aufgetaut und vor Gebrauch schonend gemischt werden. Nur einmal einfrieren.

QUALITÄTSKONTROLLE

Als Referenzkontrolle für die Validierung der Methode werden die ACTICLOT® Protein C Resistance Controls (REF 840C) verwendet. Die Normalkontrolle (C1, FV-L Negative Control) repräsentiert den normalen Phänotyp, währenddessen die pathologische Kontrolle (C2, FV-L Heterozygous Control) den positiven Phänotyp für FV-Leiden repräsentiert. Die Kontrollen sollten in jeder Testserie mitgeführt werden.

Für Vorbereitung, Gebrauch und Beurteilung der Kontrollen beachten Sie bitte die Anleitungen und die Angaben zu den zertifizierten Werten im Packungsbeileger des Kontrollkits.

Je nach Detektionsprinzip können auf unterschiedlichen Geräten mit denselben Kontrollen unterschiedliche Gerinnungszeiten gemessen werden. Falls Werte ausserhalb der für die Kontrollen zertifizierten Bereiche (Ratio) liegen, ist eine komplette Überprüfung der verwendeten Reagenzien durchzuführen und die Analyse sollte wiederholt werden. Besteht das Problem weiter, ist eine Überprüfung des verwendeten Gerinnungsgerätes notwendig. Die Analyse ist zu wiederholen.

PROBENTNAHME UND -AUFBEREITUNG

Der Patient sollte vor der Probenentnahme mindestens 10 Minuten ruhen. Zur Plasmagewinnung 1 Teil Natriumcitrat (104 mM) mit 9 Teilen Venenblut sorgfältig unter Vermeidung von Schaumbildung mischen. Sofort 20 Minuten bei Raumtemperatur mit mindestens 2000 g zentrifugieren. Beim Abheben des Plasmas Kontamination durch Thrombozyten vermeiden. Es sollten generell keine hämolytischen Plasmaproben verwendet werden.

Für die Lagerung das aliquotierte, unverdünnte Plasma rasch bei -70°C einfrieren. Nur einmal einfrieren. Wiederholte Auftau- und Gefrierzyklen sind zu vermeiden. Das Auftauen sollte rasch (innerhalb 5 Minuten) in einem 37°C Wasserbad erfolgen. Weitere Informationen entnehmen Sie dem NCCLS Dokument H21 A2.¹⁰

Stabilität unverdünnter Plasmaproben:

-80° C	mindestens 1 Jahr
-20° C	2 Monate
2 - 8° C	24 Stunden
15 - 25° C	4 Stunden

TESTDURCHFÜHRUNG

Bereiten Sie Reagenzien und Probenmaterial wie oben beschrieben vor. Tauen Sie zur Vermeidung von Aktivitätsverlusten labiler Gerinnungsfaktoren und Kryopräzipitaten gefrorene Proben rasch bei 37°C in standardisierter Art und Weise auf. Mischen Sie sie vorsichtig unter Vermeidung von Schaumbildung. Bestimmen Sie die Gerinnungszeiten in Anwesenheit (+APC) und Abwesenheit (-APC) von aktiviertem Protein C und berechnen Sie anschliessend deren Verhältnis (Ratio).

Verfahren Sie dabei nach folgendem Schema:

		+ APC	- APC
	Probe bzw. Kontrollplasma	30 µL	30 µL
R4	Dilution Plasma	20 µL	20 µL
		vor Gebrauch mischen	vor Gebrauch mischen
R1	APC/RVV-V (+APC) Reagent	50 µL	-
R2	RVV-V (-APC) Reagent	-	50 µL
	Inkubation	3 min, 37°C	3 min, 37°C
R3	PTA Reagent	50 µL	50 µL
		Bestimmung der Gerinnungszeit	Bestimmung der Gerinnungszeit
	Ratio =	$\frac{\text{Gerinnungszeit} + \text{APC}}{\text{Gerinnungszeit} - \text{APC}}$	

INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

Die Unterscheidung bezüglich FVL von homozygoten, heterozygoten und negativen Proben basiert auf den typischen Bereichen, wie sie für Plasmaproben genotypisierter Patienten bestimmt wurden (siehe untenstehende Tabellen). Diese können je nach Labor, Gerät und Charge variieren. Es wird deshalb empfohlen, anhand von Messreihen mit in-house hinterlegten genotypisierten Spenderplasmen, vor Ort diese Bereiche und Cut-offs für die Zuordnung für jedes Labor und Gerät (gegebenenfalls auch für jede Charge) individuell festzulegen.

ERWARTETE WERTE

Typische Ratio-Bereiche, wie sie für Plasmaproben genotypisierter Patienten gefunden wurden, bestimmt auf verschiedenen Geräten zur Bestimmung der Gerinnungszeit:

KC-4/-10 A™ micro		
Genotyp FV:Q ⁵⁰⁶	n	Ratio Bereich (min/max)
negativ	99	≥ 3.0
heterozygot	166	1.3–1.9
homozygot	25	0.9–1.1

BCS® (Siemens Coagulation System)		
Genotyp FV:Q ⁵⁰⁶	n	Ratio Bereich (min/max)
negativ	143	≥ 3.0
heterozygot	170	1.4–2.2
homozygot	27	0.9–1.1

CA-1500 / CA-7000		
Genotyp FV:Q ⁵⁰⁶	n	Ratio Bereich (min/max)
negativ	235	≥ 3.0
heterozygot	56	1.5–1.8
homozygot	2	1.0–1.1

ACL 9000™		
Genotyp FV:Q ⁵⁰⁶	n	Ratio Bereich (min/max)
negativ	127	≥ 3.0
heterozygot	119	1.4–2.1
homozygot	24	0.9–1.2

STA® C		
Genotyp FV:Q ⁵⁰⁶	n	Ratio Bereich (min/max)
negativ	134	2.9
heterozygot	83	1.3–1.8
homozygot	27	0.9–1.1

AMAX CS-190		
Genotyp FV:Q ⁵⁰⁶	n	Ratio Bereich (min/max)
negativ	74	≥ 3.0
heterozygot	62	1.2–2.3
homozygot	10	0.9–1.1

Bei der Verwendung dieser Tabellen sind folgende Einschränkungen zu beachten:

1. Es handelt sich hier um Beispiele und **nicht** um vom Hersteller gewährleistete Referenzbereiche oder Cutoffs.
2. Bestimmte Störfaktoren (siehe «Einschränkungen und Fehlerquellen») können Ursache von Ratio-Werten sein, die nicht eindeutig einem bestimmten Genotyp zugeordnet werden können, oder zu Gerinnungszeiten führen, welche die maximal auf dem Gerät zugelassene Messdauer überschreiten. In diesen Fällen ist eine genauere Abklärung mittels PCR- und Einzelfaktorenbestimmung unumgänglich.

SENSITIVITÄT UND SPEZIFITÄT

Mit den bisher getesteten genotypisierten Patientenproben zeigt der ACTICLOT® Protein C Resistance assay eine 100%-ige Sensitivität und Spezifität für die Detektion heterozygoter und homozygoter Träger der FVL-Mutation. Die Bestimmungen wurden mit folgenden Geräten durchgeführt: BCS® (n=340), KC-4/-10 A™ micro (n=290), CA-1500/CA-7000 (n=293), ACL 9000™ (n=270), STA®C (n=244) und AMAX CS-190 (n=146).

Aufgrund des funktionalen Nachweisprinzips sollte der Test neben der FV Leiden Mutation auch andere Störungen einer FV-basierten phänotypischen APC-R nachweisen können. Die Prävalenz ist verglichen mit der FVL-Mutation jedoch sehr gering.

PRÄZISION UND REPRODUZIERBARKEIT

Zwei genotypisierte Spenderplasmen (FVL-negativ und -heterozygot) wurden in einer Serie zu 25 Messungen am selben Tag auf zwei vollautomatisierten Geräten zur Bestimmung der Gerinnungszeit (BCS®, CA-500) getestet. Der Varianzoeffizient (VK) für die Ratio lag bei beiden Proben unter 5%.

In einer weiteren Studie auf einem STA-R® Gerät wurde an 5 verschiedenen Tagen eine Serie von je 10 Testungen pro Tag mit je einer heterozygoten Kontrolle und einer negativen (wildtyp-) Kontrolle durchgeführt. Für die Gerinnungszeiten und der Ratio innerhalb des jeweiligen Tages und über alle 5 Tage hinweg wurde ein VK von ≤ 5.0 für die negative Kontrolle und von < 3.0 für die heterozygote Kontrolle bestimmt.

Über alle 5 Tage lagen die Messwerte innerhalb folgender Bereiche:

	C1 FV-L Negative Control			C2 FV-L Heterozygous Control		
	+APC(s)	-APC(s)	Ratio	+APC(s)	-APC(s)	Ratio
min	132.9	24.2	5.3	39.2	25.4	1.5
max	166.3	25.7	6.7	42.6	27.7	1.6

EINSCHRÄNKUNGEN UND FEHLERQUELLEN

Für das Ergebnis macht es keinen signifikanten Unterschied, ob mit frischen oder eingefrorenen und wieder aufgetauten Proben gearbeitet wird. Auch die Verwendung von gepuffertem vs. ungepuffertem Zitratplasma hat keinen störenden Einfluss auf die Messergebnisse.

Ein bis zu 100%-iger Mangel der Faktoren Fibrinogen, Prothrombin, FVIII, FX, ATIII, Protein C und Protein S, sowie ein Überschuss bis zum 5-fachen der Normalwerte von Fibrinogen, FVIII, ATIII und TFP1 hat in experimentellen Untersuchungen keinen Einfluss auf die Ratio oder die Sensitivität des Testes gezeigt. Weder hämolytische Proben noch Kontamination durch Thrombozyten stören mechanische Messmethoden. Optische Messmethoden können hingegen durch hämolytische oder lipämische Plasmen beeinflusst werden. LA-Antikörper haben keine Störung des Tests ergeben. Ein schwerer Mangel an FV ($< 50\%$) kann hingegen zu erhöhten Gerinnungszeiten führen, und somit die Trennleistung des Testes stark beeinträchtigen. Die Präsenz von Aprotinin (hemmt das im Test eingesetzte APC) und Protamin im Patientenblut kann die Gerinnungszeiten deutlich verkürzen, was ebenfalls zu Beeinträchtigung der Trennleistung führen kann.

Durch den Zusatz von Polybren wird die Messung von Plasmen heparinierter Patienten bis zu Konzentrationen von ≤ 2 IU/mL UFH, LMWH und ≤ 2 μ L/mL Pentasaccharid nicht gestört. Die Wirkung von direkten Thrombininhibitoren (DTI) wie Hirudin oder Argatroban wird hingegen nicht durch Polybren neutralisiert, so dass Plasmen DTI-therapierter Patienten stark verlängerte Gerinnungszeiten zeigen. Die Trennleistung des Tests ist in diesen Fällen nicht mehr gegeben.

Es wird deshalb empfohlen, nach Gabe von Aprotinin, Protamin oder direkten Thrombininhibitoren mit der Abnahme des Blutes für den ACTICLOT® Protein C Resistance test bis zu 24h zu warten oder alternativ die FVL Mutation per PCR zu bestimmen.

VORSICHTSMASSNAHMEN

Jede Spendeinheit, die für die Herstellung von Dilution Plasma (R4) verwendet wurde, ist auf HIV 1 und 2 Antikörper, Hepatitis C-Virus (HCV) Antikörper, Treponema pallidum Antikörper, ebenso wie Hepatitis B Oberflächenantigen und Hepatitis C- und HIV 1-Genom (PCR) getestet und für negativ befunden worden. Die dafür verwendeten Tests sind CE-zertifizierte Tests gemäss Liste A der Europäischen IVD-Richtlinien (98/79/EG) und unterstehen der Kontrolle durch die zuständige Behörde. Trotzdem sollte davon ausgegangen werden, dass bei keinem Test die Anwesenheit von über das Blut übertragenen Erkrankungen mit letzter Sicherheit auszuschliessen ist. Daher sollte dieses Reagenz als potenziell infektiös betrachtet und entsprechend gehandhabt werden.

BIBLIOGRAPHIE

1. Dahlbäck 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 co factor to activated protein C. Proc Natl Acad Sci 1993; 90: 1004-8
2. Bertina RM, Koelemann BPC, Koster T, Rosendaal FR, Dirven RJ, de Ronde H, van der Velden PA, Reitsma PH. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. Nature 1994; 369: 64-7.
3. Zöller B, Dahlbäck B. Linkage between inherited resistance to activated protein C and factor V gene mutation in venous thrombosis. Lancet 1994; 343: 1536-8.
4. Rees DC, Cox M, Clegg JB. World distribution of factor V Leiden. Lancet 1995; 346: 1133-4.
5. Simioni P, Tormene D, Prandoni P, Zerbini P, Gavasso S, Cefalo P, Girolami A. Incidence of venous thromboembolism in asymptomatic family members who are carriers of factor V Leiden: a prospective cohort study. Blood 2002; 99: 1938-42.
6. Wilmer M, Stocker C, Bühler B, Conell B, Calatzis A. 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; 122:836-42
7. Greengard JS, Sun X, Xu X, Fernandez JA, Griffin JH, Evatt B. Activated protein C resistance caused by Arg506Gln mutation in factor Va. Lancet 1994; 343: 1361-2.
8. Cooper PC, Hampton KK, Makris M, Abuzenadah A, Paul B, Preston FE. Further evidence that activated protein C resistance can be misdiagnosed as inherited functional protein S deficiency. Br J Haematol 1994; 88: 201-3.
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. Gandhille S, Alhenc-Gelas M, Aiach M. A rapid screening method for factor V Arg506 Gln mutation. Blood Coag Fibrinol 1995; 6: 245-8.
11. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Collection, transport and processing of blood specimens for coagulation testing and performance of coagulation assays. NCCLS Document H21-A2; vol 11 No 23.