

- 7) Sletnes KE. et al. Preparation of plasmas for the detection of lupus anticoagulants and antiphospholipid antibodies. Thromb. Res: 1992; 65. 43-53.
- 8) Marques MB and Fritsma GA, Quick Guide to Coagulation Testing, AACCPress2006.
- 9) Laposata M. et. al., The Clinical Hemostasis Handbook, Year Book Medical Publishers, 1989.
- 10) EP5-A2, Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods; Approved Guideline-2nd Edition, Clinical Laboratory Standards Institute, 2004.
- 11) H21-A5, Collection, Transport and Processing of Blood Samples for Testing Plasma-based Coagulation Assays and Molecular Hemostasis Assays; Approved Guideline-Fifth Edition, Clinical Laboratory Standards Institute, 2008.

DEUTSCHE VERSION VERWENDUNGSZWECK

LupoTek Detectin VL und **CorrecTin VL** Testkits sind qualitative Tests, die für eine Verwendung in klinischen Fachlaboren beim Nachweis von Lupus-Antikoagulanzen (LA) im zitrierten Plasma nach der verdünnten Russel Viper Venom Time-Methode vorgesehen sind.

ZUSAMMENFASSUNG

Lupus-Antikoagulanzen sind Antiphospholipid-Autoantikörper, die sich gegen Komplexe von Proteinen und negativ geladenen Phospholipiden richten. Sie sind klinisch mit Autoimmunerkrankungen (1), wiederholten Fehlgeburten (2) und ungeklärter venöser und arterieller Thrombose (3) verbunden.

Zirkulierende Antikoagulanzen werden in der Regel durch das Vorhandensein einer verlängerten Gerinnungszeit in allgemeinen Blutgerinnungstests (4), bei denen keine Korrektur hinsichtlich der Mischung von Patientenplasma (1:1) mit normalem Plasma vorgenommen wird, bestimmt. Diese Tests sind nicht spezifisch und können ohne weitere Studien nicht zwischen Factor-Hemmer, Verunreinigung durch Heparin und einem echten Antiphospholipid-Antikörper unterscheiden.

Das kennzeichnende Merkmal von Lupus-Antikoagulanzen ist ihre Phospholipid-Abhängigkeit; das heißt, die bei Reagenzien mit niedrigem Phospholipidanteil beobachtete verlängerte Gerinnungszeit wird mit Reagenzien mit hohem Phospholipidanteil korrigiert.

Die verdünnten Russel Viper Venom Time (DRVVT)-Methode ist ein einfacher Einphasen-Gerinnungstest, der mit sorgfältig abgestimmten Reagenzien mit niedrigem und mit hohem Phospholipidanteil eingesetzt werden kann, um Lupus-Antikoagulanzen bei minimaler Interferenz von anderen Arten von zirkulierenden Antikoagulanzen zu bestimmen (5).

PRINZIP

LupoTek Detectin VL und LupoTek CorrecTin VL verwenden das Gift der *Vipera lebetina* statt des Gifts der *Vipera russelli* (Russell's Viper). Das Gift der *Vipera lebetina* wird genau wie das Gift der Russell Viper den Factor X ohne Notwendigkeit von Factor VII direkt aktivieren. Der aktivierte Factor X zusammen mit Factors V, II, Kalziumionen und Phospholipid erzeugt Thrombin, das Fibrinogen zu Fibrin umwandelt und ein Gerinnsel im Testsystem erzeugt.

LupoTek Detectin VL, das Reagenz mit niedrigem Phospholipidanteil, ist als Screening-Reagenz vorgesehen, das eine Verlängerung der Gerinnungszeit erkennt. **LupoTek CorrecTin VL** ist das Reagenz mit hohem Phospholipidanteil, das die LA neutralisiert und die Gerinnungszeit auf normal korrigiert und so das Vorhandensein eines Lupus-Antikoagulans bestätigt.

REAGENZIEN

WARNHINWEIS: NUR ZUR IN-VITRO-DIAGNOSTIK.

LupoTek Detectin VL. Artikelnummer 85-202. 10 x 2 mL Fläschchen.

Inhaltsstoffe: *Vipera lebetina* Gift, Phospholipide in niedriger Konzentration, Anti-Heparin-Agenzien, Kalziumionen, Pufferlösung, Stabilisatoren und ein blauer Farbstoff. Natriumazid (0,05 %) wird als Konservierungsmittel verwendet.

Vorbereitung für die Verwendung: Das Fläschchen mit **2 mL** destilliertem Wasser rekonstituieren. Gut mischen, nicht schütteln und vor Gebrauch 10 Minuten lang bei Raumtemperatur stehen lassen.

LupoTek CorrecTin VL. Artikelnummer 86-201. 10 x 1 mL Fläschchen.

Inhaltsstoffe: Gift der *Vipera lebetina*, Phospholipide in hoher Konzentration, Anti-Heparin-Agenzien, Kalziumionen, Pufferlösungen, Stabilisatoren und ein rosa Farbstoff, Natriumazid (0,05 %) als Konservierungsmittel.

Vorbereitung für die Verwendung: Das Fläschchen mit **1 mL** destilliertem Wasser rekonstituieren. Gut mischen, nicht schütteln und vor Gebrauch 10 Minuten lang bei Raumtemperatur stehen lassen.

Lagerung und Stabilität

Die lyophilisierten Reagenzien sind bis zum Verfallsdatum, das auf dem Fläschchen aufgedruckt ist, stabil. Nach Rekonstitution sind die Reagenzien 24 Stunden lang bei Lagerung bei 2-8° C bzw. 8 Stunden lang bei Raumtemperatur stabil.

WARNHINWEIS: NATRIUMAZID. Sowohl **LupoTek Detectin VL** als auch **LupoTek CorrecTin VL** enthalten Natriumazid, das bei Kontakt mit Blei- oder Kupferrohren hoch explosive Metall-Azid-Verbindungen bilden kann. Bei Entsorgung derartiger Materialien im Waschbecken muss mit viel Wasser nachgespült werden, um dieses Risiko auf ein Minimum zu begrenzen.

HANDHABUNG DER PROBEN

Probenentnahme und -vorbereitung

Plasma wird aus Vollblut, das mit 1 Teil 3,2%igem Natriumzitrat auf 9 Teile Vollblut antikoaguliert ist, erhalten. Das entnommene Vollblut verarbeiten und Plasma gemäß der CLSI-Richtlinie H21-A5 (11) hantieren.

Um eine optimale Probe sicherzustellen, sollte das Plasma weniger als 10 x 10⁹/L Thrombozyten enthalten (6). Doppelte Zentrifugation oder Filtration durch einen spritzenartigen 0,22 Mikron-

Filtrer (µ) vor dem Test wird empfohlen (7). Dies ist besonders wichtig, wenn das Plasma vor dem Test gefroren wurde.

Lagerung und Stabilität

Plasma gemäß der oben angegebenen CLSI-Richtlinie H21-A5 lagern. Es wird unbedingt empfohlen, das Plasma vor dem Einfrieren zweimal zu zentrifugieren oder zu filtern, wie oben angegeben. Möglicherweise vorhandene restliche Thrombozyten reißen beim Einfrieren und Wiederauftauen und können ein Lupus-Antikoagulans durch Kontakt mit den Phospholipiden aus den beschädigten Membranen neutralisieren. Vor Gebrauch schnell bei 37 °C auftauen.

Erforderliche, nicht im Lieferumfang enthaltene Materialien
Gepooltes normales Plasma

TESTDURCHFÜHRUNG

Validierte Anwendungen für LupoTek Detectin VL und LupoTek CorrecTin VL auf individuellen Modellen von Gerinnungsmessgeräten sind von r2 Diagnostics erhältlich.

Qualitätskontrolle

Die Qualitätskontrolle von Gerinnungstests umfasst mehrere Komponenten. Jedes Labor sollte ein Qualitätskontrollprogramm festlegen, das sowohl normale als auch abnormale Kontrollplasmen umfasst. Das normale Kontrollplasma PlasmaCon N von r2 und LA-positives Kontrollplasma PlasmaCon LA sind geeignete Kontrollen. Qualitätskontrolltests mit den **LupoTek Detectin VL** und den **CorrecTin VL**-Reagenzien sollten zur selben Zeit durchgeführt werden.

ERGEBNISSE

Für optimale Ergebnisse sollten Tests mittels **LupoTek Detectin VL** und **CorrecTin VL** zur selben Zeit durchgeführt werden. Falls die **LupoTek Detectin VL** -Zeit im Normbereich liegt, sind keine weiteren Tests erforderlich. Falls die Gerinnungszeit mit dem **Detectin VL**-Reagenz über der Obergrenze des Normreferenzbereichs liegt, sind weitere Tests mit dem **CorrecTin VL**-Reagenz angemessen.

Die mit den **Detectin VL** und **CorrecTin VL**-Reagenzien erhaltenen Gerinnungszeiten werden zum Ausdruck der Ergebnisse in einem Verhältnis, wie unten beschrieben, verwendet. Die Verwendung eines **normalisierten Verhältnisses (NR)**, wobei die Gerinnungszeit des Patienten durch die Gerinnungszeit des gepoolten normalen Plasmas dividiert wird, minimiert jeglichen Einfluss von Unterschieden in Normbereichen aufgrund der Reagenzvariabilität zwischen den unterschiedlichen Losen:

$$NR = \frac{\text{Detectin VL-Zeit des Patienten}}{\text{Detectin VL-Zeit des gepoolten normalen Plasmas}}$$

$$NR = \frac{\text{CorrecTin VL-Zeit des Patienten}}{\text{CorrecTin VL-Zeit des gepoolten normalen Plasmas}}$$

INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

Bei einer internen Studie von 122 Patientenproben wies eine ROC-Analyse auf eine Höchstgrenze von 1,30 für das normalisierte Verhältnis hin. Proben über diesem Wert wurden als LA-positiv angesehen.

Der oben angegebene beispielhafte Höchstgrenzwert ist nicht absolut und es wird empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen Verhältnisse für seine normalen Referenz- und Patientenpopulationen festlegen sollte.

Patientenplasmen, die Verhältnisse im Grenzbereich ergeben, sollten wiederholt und, falls indiziert, mit den klinischen Befunden in Beziehung gesetzt werden. Patientenplasmen, die unabhängig vom Verhältnis sowohl mit **LupoTek Detectin VL** als auch **CorrecTin VL**, lange Gerinnungszeiten aufweisen, können möglicherweise einen anderen Defekt haben, wie beispielsweise eine Factor-Defizienz, oder können durch orale Antikoagulantientherapie verursacht sein.

Mischstudien

Mischstudien werden empfohlen, um zwischen Factor-Defizienz-Zuständen und zirkulierenden Hemmstoffen zu unterscheiden (6). Nichtkorrigieren bei Mischen mit normalem Plasma (1:1) weist eher auf einen Hemmstoff hin, wohingegen eine Korrektur eher auf einen Factor-Defizienz-Zustand hinweist. Mischstudien sollten unter sorgfältig kontrollierten Bedingungen unter Verwendung von gut ausgeprägtem gepooltem normalem Plasma durchgeführt werden (8, 9).

REFERENZWERTE

Referenzbereiche für normale Plasmen mit **LupoTek Detectin VL** liegen bei Bewertung auf dem STA Compact im **34-54** zweiten Bereich.

Referenzbereiche für normale Plasmen mit **LupoTek CorrecTin VL** liegen bei Bewertung auf dem STA Compact im **31-44** zweiten Bereich.

Diese Ergebnisse sind nur zur Veranschaulichung vorgesehen. Jedes Labor sollte für die im Labor verwendeten Techniken und/oder Instrumente seinen eigenen Normreferenzbereich bestimmen.

BEGRENZUNGEN

Für alle Tests auf Lupus-Antikoagulanzen sind Plasmaproben, die wenige Thrombozyten (<10 x 10⁹/L) bzw. vorzugsweise keine

Thrombozyten aufweisen, erforderlich. Proben, die nicht zweimal zentrifugiert oder gefiltert wurden, sollten vor dem Einfrieren getestet werden. Sowohl Detectin VL als auch CorrecTin VL-Tests sollten entweder an einer frischen Probe oder an einer gefrorenen Probe durchgeführt werden.

Factor-Defizienzen, orale Antikoagulanzen und andere antikörperartige Hemmstoffe können die Gerinnungszeiten von LupoTek Detectin VL und CorrecTin VL verlängern. Mischstudien werden empfohlen, um zwischen den klinischen Bedingungen zu unterscheiden (6, 8, 9).

Detectin VL und **CorrecTin VL** beinhalten ein Agens zur Heparin-Neutralisierung, das bis 0,6 U/mL von unfraktioniertem Heparin wirksam ist. Das Testen von Proben mit höheren Heparinwerten wird nicht empfohlen. Die Auswirkungen von niedermolekularen Heparinen und direkten Thrombinhemmern wurden nicht bestimmt.

Die Leistungsdaten von **Detectin VL** und **CorrecTin VL** wurden nicht an pädiatrischen Populationen beurteilt.

LEISTUNGSDATEN

Präzision

CLSI EP5-A2 (10) Präzisionsschätzungen von LupoTek Detectin VL und CorrecTin VL auf dem STA Compact in % CV der Gerinnungszeiten fielen wie folgt aus:

Reagenz	Plasma	Ungenauigkeit der Wiederholbarkeit	Gesamt Ungenauigkeit (innerhalb des Instruments)
Detectin VL	Normal	1,3 %	3,6 %
	Abnormal	1,4 %	3,7 %
CorrecTin VL	Normal	1,1 %	3,7 %
	Abnormal	1,3 %	2,6 %

Interferenzen

Interferenzstudien von LupoTek Detectin VL und CorrecTin VL wurden auf einem Stago STA Compact Messgerät bestimmt. Gepooltes normales Plasma wurde mit einer interferierenden Substanz versetzt und die maximale im Assay tolerierte Konzentration wurde definiert als die höchste Konzentration der interferierenden Substanz, wobei eine gleichbleibende Veränderung zum wiederhergestellten Wert der PNP-Grundgerinnungszeit weniger als 10 % betrug. Die maximalen Konzentrationen betrugen:

Kategorie der interferierenden Substanz	Maximale getestete Konzentration	Maximale tolerierte Konzentration
Lipämie	2.000 mg/dL Triglyceride	200 mg/dL Triglyceride
Heparin	2,0 U/mL unfraktioniertes Heparin	0,6 U/mL unfraktioniertes Heparin
Hämolyse	500 mg/dL Hämoglobin	500 mg/dL Hämoglobin
Ikterus	20 mg/dL unkonjugiertes Bilirubin	Iktersische Proben sind nicht geeignet.

Methodenvergleich

Einhundertzweiundzwanzig Patientenproben wurden in einer internen Studie auf dem STA Compact analysiert, um die Höchstgrenze für das normalisierte Verhältnis für LupoTek Detectin VL / CorrecTin VL zu bestimmen. Daraufhin wurden weitere einhundertfünfundfünfzig Patientenproben in drei Labors unter Verwendung von LupoTek Detectin VL und CorrecTin VL sowie Diagnostica Stago DRVV Screen and Confirm Reagenzien auf STA Compact-Analysegeräten analysiert. Bei allen Proben handelte es sich um eine Mischung aus bekannten LA-Patienten und verschiedenen anderen klinischen Zuständen.

Die positive prozentuale Übereinstimmung und die negative prozentuale Übereinstimmung wurden unter Verwendung des normalisierten Verhältnisses des Tests und von Vergleichsgeräten gemäß der FDA-Leitlinie 1620, „Statistical Guidance on Reporting Results from Studies Evaluating Diagnostic Tests“ (Statistischer Leitfaden für die Angabe von Ergebnissen aus Diagnostest bewertenden Studien) berechnet. Die Ergebnisse waren:

Detectin VL/CorrecTin VL im Vergleich mit Stago DRVV Screen/Confirm	
Statistisches	Ergebnis
Positive prozentuale Übereinstimmung	98 %
Negative prozentuale Übereinstimmung	96 %

Literatur:

- 1) Love PE. et al. Antiphospholipid antibodies: Anticardiolipin antibodies and the lupus anticoagulant in SLE, and non-SLE disorders. Ann. Intern. Med: 1990; 112, 682-698.

- 2) Ginsberg JS et al. Relationship of antiphospholipid antibodies to pregnancy loss in patients with SLE: A cross sectional study. Blood:1992; 80:4.
- 3) Ames PRJ. et al. Antiphospholipid antibodies, hemostatic variables and thrombosis-A survey of 144 patients. Thromb. Haemost: 1995; 73: 768-773.
- 4) Triplett DA., et al., Laboratory identification of the lupus anticoagulant, Br. J. Haematol: 1991; 73, 139-142.
- 5) Exner T. et al. Use of a simplified dilute Russell's viper venom time (DRVVT) confirms heterogeneity among „lupus anticoagulants“. Blood Coag. Fibrinol: 1990; 1, 259-266.
- 6) Brandt JT. et al. Criteria for the diagnosis of Lupus Anticoagulants: An update. Thromb. Haemost: 1995;74(4), 1185-1190.
- 7) Sletnes KE. et al. Preparation of plasmas for the detection of lupus anticoagulants and antiphospholipid antibodies. Thromb. Res: 1992; 65. 43-53.
- 8) Marques MB and Fritsma GA, Quick Guide to Coagulation Testing, AACCPress2006.
- 9) Laposata M. et. al., The Clinical Hemostasis Handbook, Year Book Medical Publishers, 1989.
- 10) EP5-A2, Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods; Approved Guideline-2nd Edition, Clinical Laboratory Standards Institute, 2004.
- 11) H21-A5, Collection, Transport and Processing of Blood Samples for Testing Plasma-based Coagulation Assays and Molecular Hemostasis Assays; Approved Guideline-Fifth Edition, Clinical Laboratory Standards Institute, 2008.

VERSIONE ITALIANA USO PREVISTO

I kit per test **LupoTek Detectin VL** e **CorrecTin VL** sono test qualitativi indicati per facilitare il rilevamento degli anticoagulanti lupici (LA) nel plasma citrato tramite il metodo con veleno di vipera diluito in laboratori clinici professionali.

RIEPILOGO

Gli anticoagulanti lupici sono autoanticorpi antifosfolipidici diretti contro i complessi di proteine e fosfolipidi a carica negativa. Dal punto di vista clinico sono associati a malattia auto-immune (1), poliabortività (2) e trombotosi inspiegabile, sia venosa che arteriosa (3).

Gli anticoagulanti circolanti vengono generalmente rilevati tramite la presenza di un tempo di coagulazione prolungato nei test di coagulazione globale (4) che non si corregge con la miscelazione del plasma del paziente (1:1) con il plasma normale. Questi test non sono specifici e non fanno distinzione tra inibitori del fattore, contaminazione da eparina e anticorpi antifosfolipidi veri in assenza di ulteriori studi.

La caratteristica distintiva degli anticoagulanti lupici è la dipendenza dai fosfolipidi; ciò significa che il tempo di coagulazione prolungato osservato con i reagenti a basso contenuto di fosfolipidi viene corretto con i reagenti a elevato contenuto di fosfolipidi.

Il tempo del veleno della vipera di Russell diluito (Dilute Russell Viper Venom, DRVVT) è un semplice test di coagulazione a una fase che può essere usato con reagenti a basso ed elevato contenuto di fosfolipidi attentamente combinati per rilevare gli anticoagulanti lupici con un'interferenza minima da parte di altri tipi di anticoagulanti circolanti (5).

PRINCIPIO

LupoTek Detectin VL e LupoTek CorrecTin VL utilizzano veleno di *Vipera lebetina* anziché il veleno della *Vipera russelli* (vipera di Russell). Il veleno della *Vipera lebetina*, analogamente al veleno della vipera di Russell, interviene direttamente il Factor X senza necessitare del Factor VII. Il Factor X attivato in associazione ai Factor V, II, agli ioni di calcio e al fosfolipide genera la trombina che converte il fibrinogeno in fibrina, producendo un coagulo nel sistema del test.

LupoTek Detectin VL, il reagente a basso contenuto di fosfolipidi, agiti anti-eparinici; ciò significa che il tempo di coagulazione prolungamento del tempo di coagulazione. **LupoTek CorrecTin VL** è il reagente a elevato contenuto di fosfolipidi che neutralizza il valore LA e corregge il tempo di coagulazione portandolo al valore normale, confermando la presenza di un anticoagulante lupico.

REAGENTI

AVVERTENZA: SOLO PER USO DIAGNOSTICO IN-VITRO.
LupoTek Detectin VL. Numero di catalogo 85-202. 10 file da 2 mL.

Ingredienti: Veleno di *Vipera lebetina*, bassa concentrazione di fosfolipidi, agenti anti-eparinici, ioni di calcio, tamponi, stabilizzanti e colorante blu. Sodio azide (0,05%) usata come conservante.

Preparazione per l'uso: Ricostituire la fiala con **2 mL** di acqua distillata. Miscelare bene, non agitare e lasciare a temperatura ambiente per 10 minuti prima dell'uso.

LupoTek CorrecTin VL. Numero di catalogo 86-201. 10 file da 1 mL.

Ingredienti: Veleno di *Vipera lebetina*, alta concentrazione di fosfolipidi, agenti anti-eparinici, ioni di calcio, tamponi, stabilizzanti e colorante rosa. Sodio azide (0,05%) usata come conservante.

Preparazione per l'uso: Ricostituire la fiala con **1 mL** di acqua distillata. Miscelare bene, non agitare e lasciare a temperatura ambiente per 10 minuti prima dell'uso.

Conservazione e stabilità

I reagenti liofilizzati sono stabili fino alla data di scadenza stampata sulle fiale. Dopo la ricostituzione, i reagenti sono stabili per 24 ore a 2-8 °C o per 8 ore a temperatura ambiente.

AVVERTENZA: SODIO AZIDE. Sia **LupoTek Detectin VL** che **LupoTek CorrecTin VL** contengono sodio azide che può formare azidi metalliche altamente esplosive se esposta al contatto con le tubature in piombo o rame. Per ridurre al minimo tale rischio, questi materiali devono essere smaltiti in contenitori con grandi quantità di acqua.

LAVORAZIONE DEI CAMPIONI

Raccolta e preparazione dei campioni

Il plasma si ottiene dal sangue intero anti-coagulato con 1 parte di citrato di sodio al 3,2% e 9 parti di sangue intero. Lavorare il sangue intero raccolto e trattare il plasma secondo le linee guida CLSI H21-A5 (11).

Per ottenere un campione ottimale, il plasma deve contenere meno di 10 x 10⁹/L piastrine (6). Si consiglia di eseguire una doppia centrifugazione o filtrazione usando un filtro a siringa da 0,22 micron (µ) prima del test (7). Questo è particolarmente importante se il plasma deve essere congelato prima del test.

Conservazione e stabilità:

Conservare il plasma secondo le linee guida CLSI H21-A5 summenzionate. Si consiglia vivamente di eseguire una doppia centrifugazione o filtrazione del plasma prima di congelarlo, come

“lupus anticoagulants”. Blood Coag. Fibrinol: 1990; 1, 259-266.

- 6) Brandt JT, et al. Criteria for the diagnosis of Lupus Anticoagulants: An update. Thromb. Haemost: 1995;74(4), 1185-1190.
- 7) Sletnes KE, et al. Preparation of plasmas for the detection of lupus anticoagulants and antiphospholipid antibodies. Thromb. Res: 1992; 65, 43-53.
- 8) Marques MB and Fritsma GA, Quick Guide to Coagulation Testing, AACC Press2006.
- 9) Laposata M, et. al., The Clinical Hemostasis Handbook, Year Book Medical Publishers, 1989.
- 10) EP5-A2, Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods; Approved Guideline-2nd Edition, Clinical Laboratory Standards Institute, 2004.
- 11) H21-A5, Collection, Transport and Processing of Blood Samples for Testing Plasma-based Coagulation Assays and Molecular Hemostasis Assays; Approved Guideline-Fifth Edition, Clinical Laboratory Standards Institute, 2008.

