

LupoTek DetecTin VL LupoTek CorrecTin VL

Lupus Anticoagulant Testing Kits rothrombin Time Reagent



recommandée préalablement au test (7). Cela est particulièrement important si le plasma doit être congelé avant d’être testé.

Conservation et stabilité

Conserver le plasma conformément à la recommandation H21-A5 du CLSI précisée ci-dessus. Il est vivement recommandé que le plasma soit soumis à une double centrifugation ou filtration préalablement à sa congélation, comme indiqué ci-dessus. Les plaquettes résiduelles éclateront lors de la congélation-décongélation et peuvent neutraliser un anticoagulant lupique par exposition des phospholipides provenant des membranes endommagées. Décongeler rapidement à 37 °C avant l'utilisation.
Matériel requis mais non fourni
Pool de plasmas normaux
Chlorure de calcium à 0,025 M

PROCÉDURE DE TEST

Veuillez contacter r2 Diagnostics pour les applications validées de LupoTek DetecTin VL et LupoTek CorrecTin VL sur les modèles individuels d’analyseurs de coagulation.

Contrôle de la qualité

Le contrôle de la qualité des tests de coagulation implique plusieurs éléments. Chaque laboratoire doit établir un programme de contrôle qualité qui comprend des plasmas de contrôle normaux et anormaux. Le plasma de contrôle normal de r2 Diagnostics PlasmaCon N et son plasma de contrôle positif AL PlasmaCon LA sont des contrôles convenables. Les tests aux fins de contrôle de la qualité avec les réactifs **LupoTek DetecTin VL** et **CorrecTin VL** doivent être exécutés en même temps.

RÉSULTATS

Pour obtenir des résultats optimaux, les tests utilisant **LupoTek DetecTin VL** et **CorrecTin VL** doivent être réalisés en même temps. Si le temps de **LupoTek DetecTin VL** se situe dans la plage normale aucun test supplémentaire n’est nécessaire. Si le temps de coagulation avec le réactif **DetecTin VL** est au-dessus de la limite supérieure de la plage de référence normale, un autre test avec le réactif **CorrecTin VL** est justifié.

Les temps de coagulation obtenus avec les réactifs **DetecTin VL** et **CorrecTin VL** sont utilisés pour exprimer les résultats sous forme de ratio, comme indiqué ci-dessous. L’utilisation d’un **ratio normalisé (NR)**, dans lequel le temps de coagulation du patient est divisé par le temps de coagulation du pool de plasmas normaux, minimise l’impact des différences dans les plages normales en raison d’une variabilité des réactifs d’un lot à l’autre :

=
=

Tempus du patient **DetecTin VL**
Tempus du pool de plasmas normaux **DetecTin VL**

NR =

=
=
Tempus du patient **CorrecTin VL**
Tempus du pool de plasmas normaux **CorrecTin VL**

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Dans une étude interne portant sur 122 échantillons de patients, une analyse du taux de coagulation suggère une limite de 1,30 pour le ratio normalisé. Les échantillons au-dessus de ce niveau étaient considérés comme positifs AL.

La valeur limite de l’exécure décrit ci-dessus n’est pas absolue et chaque laboratoire est invité à établir ses propres ratios spécifiques à ses populations normales de référence et de patients.

Les plasmas de patients présentant des ratios limites doivent être répétés et corrélés avec les constatations cliniques si indiqué. Les plasmas de patients qui présentent des temps de coagulation longs avec **LupoTek DetecTin VL** et **CorrecTin VL**, indépendamment du ratio, peuvent présenter un autre défaut comme un déficit en Facteur ou suivre un traitement anticoagulant par voie orale.

Études de mélange

Des études de mélange sont recommandées pour faire la différence entre les états de déficit en facteur et les inhibiteurs circulants (6). L’absence de correction lors du mélange avec du plasma normaux (1:1) indique plutôt un inhibiteur, tandis que la correction suggère plutôt un état de déficit en facteur. Les études de mélange doivent être réalisées dans des conditions sous contrôle strict au moyen d’un pool de plasma normal bien caractérisé (8, 9).

VALEURS DE RÉFÉRENCE

Les plages de référence pour le plasma normal avec **LupoTek DetecTin VL** se situent dans la plage des **34-54** secondes lors de l’évaluation sur le STA Compact.

Les plages de référence pour le plasma normal avec **LupoTek CorrecTin VL** se situent dans la plage des **31-44** secondes lors de l’évaluation sur le STA Compact.

Ces résultats sont à des fins d’illustration uniquement. Chaque laboratoire doit établir ses propres plages de référence normales pour la technique et/ou l’instrument utilisé(e) dans le laboratoire.

LIMITES

Tous les tests de détection d’anticoagulants lupiques nécessitent des échantillons de plasma qui sont pauvres en plaquettes (<10 x 10⁹ /l) ou de préférence, exempts de plaquettes. Les échantillons qui n’ont pas été soumis à une double centrifugation ou filtration doivent être

Interférences

Interférence studies of LupoTek DetecTin VL and CorrecTin VL were determined on a Stago STA Compact analyzer. Interferant was spiked into pooled normal plasma and the maximum concentration tolerated in the assay was defined as the highest concentration of interferant wherein any consistent shift relative to the recovered value of the base PNP clotting time was less than 10%. The maximum concentrations were:

Interferant class	Maximum Concentration Tested	Maximum tolerated concentration
Hemolysis	500 mg/dL hemoglobin	500 mg/dL hemoglobin
Icterus	20 mg/dL unconjugated bilirubin	Icteric samples are not appropriate.
Lipemia	2,000 mg/dL triglycerides	200mg/dL triglycerides
Heparin	2.0 U/ml unfractionated heparin	0.6 U/ml unfractionated heparin

Method Comparison

One hundred twenty-two patient samples were analyzed on the STA Compact in an internal study to determine the cutoff for the LupoTek DetecTin VL/ CorrecTin VL normalized ratio. Thereafter a total of another one-hundred fifty-five patient samples were analyzed in three laboratories using LupoTek DetecTin VL and CorrecTin VL, and Diagnostica Stago DRVV Screen and Confirm reagents, on STA Compact analyzers. All samples were a mix of known LA patients and other miscellaneous clinical conditions.

Positive percent agreement and negative percent agreement were calculated using the normalized ratio of the test and predicate devices according the FDA guidance document 1620, “Statistical Guidance on Reporting Results from Studies Evaluating Diagnostic Tests”. The results were:

DetecTin VL/CorrecTin VL compared to Stago DRVV Screen/Confirm	
Statistic	Result
Positive Percent Agreement	98%
Negative Percent Agreement	96%

References:

- 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.
- Ginsberg JS et al. Relationship of antiphospholipid antibodies to pregnancy loss in patients with SLE: A cross sectional study. Blood:1992; 80:4.
- Ames PRJ. et al. Antiphospholipid antibodies, hemostatic variables and thrombosis-A survey of 144 patients. Thromb. Haemost.: 1995; 73: 768-773.
- Triplett DA., et al., Laboratory identification of the lupus anticoagulant. Br. J. Haematol: 1991; 73.: 139-142.
- 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.
- Brandt JT. et al. Criteria for the diagnosis of Lupus Anticoagulants: An update. Thromb. Haemost: 1995;74(4), 1185-1190.
- Sletnes KE. et al. Preparation of plasmas for the detection of lupus anticoagulants and antiphospholipid antibodies. Thromb. Res: 1992; 65. 43-53.
- Marques AB and Fritsma GA, Quick Guide to Coagulation Testing, AAC Press2006.
- Laposata M, et al., The Clinical Hemostasis Handbook, Year Book Medical Publishers, 1989.
- EP5-A2, Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods; Approved Guideline-2nd Edition, Clinical Laboratory Standards Institute, 2004.
- 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.

TEST PROCEDURE

Please contact r2 Diagnostics for validated applications for LupoTek DetecTin VL and LupoTek CorrecTin VL on individual models of coagulation analyzers.

Quality Control

Quality control of coagulation tests involves multiple components. Each laboratory should establish a quality control program that includes both normal and abnormal control plasmas. r2 Diagnostics’ normal control plasma PlasmaCon N and LA positive control plasma PlasmaCon LA are suitable controls. Quality control testing with the **LupoTek DetecTin VL** and **CorrecTin VL** reagents should be carried out at the same time.

RESULTS

For optimum results, testing using **LupoTek DetecTin VL** and **CorrecTin VL** should be done at the same time. If the **LupoTek DetecTin VL** time is in the normal range no further testing is necessary. If the clotting time with the **DetecTin VL** reagent is above the upper limit of the normal reference range further testing with the **CorrecTin VL** reagent is justified.

The clotting times obtained with the **DetecTin VL** and **CorrecTin VL** reagents are used to express results in a ratio format, as outlined below. The use of a **normalized ratio (NR)**, in which the patient’s clotting time is divided by the clotting time of pooled normal plasma, minimizes any impact of differences in the normal ranges due to lot to lot reagent variability:

=
=
DetecTin VL Time of Patient
DetecTin VL Time of Pooled Normal Plasma

NR =

=
=
CorrecTin VL Time of Patient
CorrecTin VL Time of Pooled Normal Plasma

INTERPRETATION OF RESULTS

In an internal study of 122 patient samples a ROC analysis suggested a cutoff of 1.30 for the Normalized Ratio. Samples above this level were considered as LA positive.

The example cutoff value described above is not absolute and each laboratory is encouraged to establish its own specific ratios for its normal reference and patient populations.

Patient plasmas yielding borderline ratios should be repeated and correlated with the clinical findings if indicated. Patient plasmas that have long clotting times with both **LupoTek DetecTin VL** and **CorrecTin VL**, irrespective of the ratio, may have some other defect such as a Factor deficiency or be on oral anticoagulant therapy.

Mixing Studies

Mixing studies are recommended to differentiate between factor deficiency states and circulating inhibitors (6). A failure to correct on mixing with normal plasma (1:1) is more indicative of an inhibitor, while correction is more suggestive of a factor deficiency state. Mixing studies should be carried out under carefully controlled conditions using well characterized pooled normal plasma (8, 9).

REFERENCE VALUES

Reference ranges for normal plasmas with **LupoTek DetecTin VL** are in the **34-54** second range when assessed on the STA Compact.

Reference ranges for normal plasmas with **LupoTek CorrecTin VL** are in the **31-44** second range when assessed on the STA Compact.

These results are illustrative only. Each laboratory must

establish its own normal reference ranges for the technique and/or instrument used in the laboratory.

LIMITATIONS

All testing for lupus anticoagulants require plasma samples that are platelet poor (<10 x 10⁹ /L) or preferably platelet free. Samples not double centrifuged or filtered should be tested before freezing. Both DetecTin VL and CorrecTin VL tests should be performed on either a fresh sample or a frozen sample.

Factor deficiencies, oral anticoagulants, and other antibody-type inhibitors can lengthen the clotting times of both LupoTek DetecTin VL and CorrecTin VL. Mixing studies are recommended to differentiate between the clinical conditions (6, 8, 9).

DetecTin VL and **CorrecTin VL** incorporate a heparin neutralization agent that is effective to 0.6 U/mL of unfractionated heparin. Testing of samples with higher heparin levels is not recommended. The effects of low molecular weight heparins and direct thrombin inhibitors have not been determined.

The performance characteristics of **DetecTin VL** and **CorrecTin VL** have not been evaluated in pediatric populations.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Precision

CLSI EP5-A2 (10) precision estimates of LupoTek DetecTin VL and CorrecTin VL on the STA Compact, as %CV of the clotting times, were:

Reagent	Plasma	Repeatability Imprecision	Total (Within Instrument) Imprecision
DetecTin VL	Normal	1.3%	3.6%
	Abnormal	1.4%	3.7%
CorrecTin VL	Normal	1.1%	3.7%
	Abnormal	1.3%	2.6%

ENGLISH VERSION

INTENDED USE

LupoTek DetecTin VL and **CorrecTin VL** test kits are qualitative tests intended to aid in the detection of lupus anticoagulants (LA) in citrated plasma by the dilute Russell’s viper venom method in professional clinical laboratories.

SUMMARY

Lupus anticoagulants are antiphospholipid autoantibodies targeted against complexes of proteins and negatively charged phospholipids. Clinically they are associated with auto-immune disease (1), recurrent fetal loss (2) and unexplained thrombosis, both venous and arterial (3).

Circulating anticoagulants are usually detected by the presence of a prolonged clotting time in global coagulation tests (4) which does not correct on mixing patient plasma (1:1) with normal plasma. These tests are not specific, and cannot distinguish between a factor inhibitor, heparin contamination and a true antiphospholipid antibody without further studies.

The hallmark characteristic of lupus anticoagulants is their phospholipid dependence; that is, the prolonged clotting time seen with low phospholipid reagents is corrected with high phospholipid reagents.

The Dilute Russell Viper Venom time (DRVVT) is a simple one stage clotting test which can be used with carefully matched low and high phospholipid reagents to detect Lupus Anticoagulants with minimal interference from other types of circulating anticoagulants (5).

PRINCIPLE

LupoTek DetecTin VL and LupoTek CorrecTin VL use *Vipera lebetina* venom rather than *Vipera russelli* (Russell’s Viper) venom. *Vipera lebetina* venom, like Russell’s viper venom, will directly activate Factor X without requiring Factor VII. The activated Factor X in conjunction with Factors V, II, calcium ions and phospholipid will generate thrombin which converts fibrinogen to fibrin, producing a clot in the test system.

LupoTek Detec Tin VL, the low phospholipid reagent, is designed as the screening reagent to detect a prolongation of the clotting time. **LupoTek CorrecTin VL** is the high phospholipid reagent that neutralizes the LA and corrects the clotting time to normal, confirming the presence of a Lupus Anticoagulant.

REAGENTS

WARNING: FOR IN-VITRO DIAGNOSTIC USE ONLY.

LupoTek DetecTin VL. Catalog number 85-202. 10 x 2 mL vials.

Ingredients: *Vipera lebetina* venom, low concentration of phospholipids, anti-heparin agents, calcium ions, buffers, stabilizers and a blue dye. Sodium azide (0.05%) is used as a preservative.

Preparation for Use: Reconstitute the vial with **2 mL** distilled water. Mix well, do not shake and leave at room temperature for 10 minutes before use.

LupoTek CorrecTin VL. Catalog number 86-201. 10 x 1 mL vials.

Ingredients: *Vipera lebetina* venom, high concentration of phospholipids, anti-heparin agents, calcium ions, buffers, stabilizers and a pink dye. Sodium azide (0.05%) as a preservative.

Preparation for Use: Reconstitute the vial with **1 mL** distilled water. Mix well, do not shake and leave at room temperature for 10 minutes before use.

Storage and Stability

The lyophilized reagents are stable until the expiration date printed on the vials. After reconstitution, the reagents are stable for 24 hours at 2-8° C or 8 hours at room temperature.

WARNING: SODIUM AZIDE. Both **LupoTek DetecTin VL** and **LupoTek CorrecTin VL** contain sodium azide, which can form highly explosive metal azides if exposed to lead or copper in plumbing. Any such materials should be discarded into a sink with large volumes of water to minimize such a risk.

SPECIMEN HANDLING

Specimen Collection and Preparation

Plasma is obtained from whole blood anti-coagulated with 1 part 3.2% sodium citrate to 9 parts whole blood. Process the collected whole blood and handle the plasma according to the CLSI guideline H21-A5 (11).

To insure an optimum sample, the plasma should contain less than 10 x 10⁹ /L platelets (6). Double centrifugation or filtration through a 0.22 micron (µ) syringe type filter before testing is recommended (7). This is particularly important if plasma is to be frozen before testing.

Storage and Stability

Store plasma according to the CLSI guideline H21-A5 noted above. It is strongly recommended that plasma should be double centrifuged or filtered before freezing as outlined above. Any residual platelets will rupture on freezing and thawing and can neutralize a lupus anticoagulant by exposure of phospholipids from the damaged membranes. Thaw rapidly at 37°C before use.

Materials Required but not Provided

Pooled Normal Plasma
0.025M Calcium Chloride

testés préalablement à leur congélation. Les tests DetecTin VL et CorrecTin VL doivent être réalisés sur un échantillon frais ou congelé.

Les déficits en facteur, la prise d’anticoagulants oraux, et d’autres inhibiteurs de type anticohors peuvent prolonger le temps de coagulation de LupoTek DetecTin VL et CorrecTin VL. Des études de mélange sont recommandées pour faire la différence entre les conditions cliniques (6, 8, 9).

DetecTin VL et **CorrecTin VL** incorporent un agent de neutralisation de l’héparine qui est efficace pour 0,6 U/ml d’héparine non fractionnée. Il n’est pas recommandé de tester les échantillons avec des taux d’héparine plus élevés. Les effets des héparines de faible poids moléculaire et des inhibiteurs directs de la thrombine n’ont pas été déterminés.

Les caractéristiques de performances de **DetecTin VL** et **CorrecTin VL** n’ont pas été évaluées dans les populations pédiatriques.

CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCES PRÉCISION

Les estimations de précision EP5-A2 (10) de CLSI pour LupoTek DetecTin VL et CorrecTin VL sur le STA Compact, comme le CV % des temps de coagulation, étaient :

Interférences

Réactif	Plasma	Imprecision de la répétabilité	Total (dans l’instrument) imprecision
DetecTin VL	Normal	1,3 %	3,6 %
	Anormal	1,4 %	3,7 %
CorrecTin VL	Normal	1,1 %	3,7 %
	Anormal	1,3 %	2,6 %

Les études d’interférence de LupoTek DetecTin VL et CorrecTin VL ont été déterminées sur un analyseur compact Stago STA. L’interférrant a été ajouté dans du plasma normal mélangé et la concentration maximale tolérée dans le test a été définie comme la concentration maximale d’interférrant pour laquelle tout changement cohérent par rapport à la valeur récupérée du temps de coagulation PNP de base était inférieur à 10 %. Les concentrations maximales étaient :

Comparaison des méthodes

Classe d’interférrant	Concentration maximale testée	Concentration maximale tolérée
Hémolyse	500 mg/dl d’hémoglobine	500 mg/dl d’hémoglobine
Ictère	20 mg/dl de bilirubine non conjuguée	Les échantillons icteriques ne sont pas appropriés.
Lipidémie	2 000 mg/dl de triglycérides	200 mg/dl de triglycérides
Héparine	2.0 U/ml d’héparine non fractionnée	0,6 U/ml d’héparine non fractionnée

Cent vingt-deux échantillons de patients ont été analysés sur le STA Compact dans une étude interne visant à déterminer la limite pour le ratio normalisé de LupoTek DetecTin VL / CorrecTin VL. Par la suite, cent cinquante-cinq autres échantillons de patients ont été analysés dans trois laboratoires en utilisant LupoTek DetecTin VL et CorrecTin VL, et les réactifs de dépistage et de confirmation Diagnostica Stago DRVV, sur des analyseurs STA Compact. Tous les échantillons étaient un mélange de patients AL avérés et d’autres affections cliniques diverses.

Le pourcentage de concordance positive et le pourcentage de concordance négative ont été calculés au moyen du ratio normalisé des dispositifs de test et de prédicat conformément au document de recommandation 1620 de la FDA, « Recommandation statistique sur le rapport des résultats des études évaluant les tests de diagnostic ». Les rapports étaient :

DetecTin VL/CorrecTin VL comparés à Stago DRVV dépistage/confirmation	
Statistique	Résultat
Pourcentage de concordance positive	98 %
Pourcentage de concordance négative	96 %

Références :

- 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.
- Ginsberg JS et al. Relationship of antiphospholipid antibodies to pregnancy loss in patients with SLE: A cross sectional study. Blood:1992; 80:4.
- Ames PRJ. et al. Antiphospholipid antibodies, hemostatic variables and thrombosis-A survey of 144 patients. Thromb. Haemost: 1995; 73: 768-773.
- Triplett DA., et al., Laboratory identification of the lupus anticoagulant. Br. J. Haematol: 1991; 73.: 139-142.
- 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.

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, Pufferlösungen, 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

Probentnahme 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 (1) 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** Geopooltes normales Plasma 0,025 M Kalziumchlorid Reagenz

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 Kontrollplasma 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:

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

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. Geopooltes 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 betragen:

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
Icterus	20 mg/dL unkonjugiertes Bilirubin	Icterische 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 einhundertfünfundsünfzig 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, attiva 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, è progettato come reagente di screening per rilevare un 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



R2 Diagnostics

South Bend, Indiana (574) 288-4377

EC REP MT Promedt Consulting GmbH

Ernst-Heckel-Straße 7, 66386 St. Ingbert, Germany

LL-4529 REV. F

LupoTek DetecTin VL LupoTek CorrecTin VL

Lupus Anticoagulant Testing Kits rothrombin Time Reagent

- Marques MB and Fritsma GA. Quick Guide to Coagulation Testing, AACCC Press2006.
- Laposata M, et. al., The Clinical Hemostasis Handbook, Year Book Medical Publishers, 1989.
- EP5-A2, Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods; Approved Guideline-2nd Edition, Clinical Laboratory Standards Institute, 2004.
- 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.

VERSIÓN ESPAÑOLA USO PREVISTO

Los kits de prueba **LupoTek DetecTin VL** y **CorrecTin VL** son pruebas cualitativas destinadas a ayudar a detectar anticoagulantes lúpicos (AL) en plasma citratado por el método de veneno de víbora de Russell diluido en laboratorios clínicos profesionales.

RESUMEN

Los anticoagulantes lúpicos son anticuerpos antifosfolípidos dirigidos contra complejos de proteínas y fosfolípidos con carga negativa. Están clínicamente asociados con la enfermedad autoinmune (1), la pérdida fetal recurrente (2) y la trombosis sin causa justificada, tanto venosa como arterial (3).

Los anticoagulantes circulares se suelen detectar en presencia de un tiempo de coagulación prolongado en las pruebas de coagulación global (4), que no se corrige al mezclar plasma de pacientes (1:1) con plasma normal. Estas pruebas no son específicas y no pueden diferenciar entre un inhibidor de factor, contaminación de la heparina y un anticuerpo antifosfolípido verdadero.

La característica diferenciadora de los anticoagulantes lúpicos es su dependencia de fosfolípidos; es decir, el tiempo de coagulación prolongado observado con reactivos con un nivel bajo de fosfolípidos se corrige con reactivos con un nivel alto de fosfolípidos.

La prueba de tiempo de veneno de víbora de Russell diluido (TVVVR) es una prueba de coagulación de una sola fase que se puede utilizar con reactivos con nivel bajo y alto de fosfolípidos cuidadosamente emparejados para detectar anticoagulantes lúpicos con una interferencia mínima de otros tipos de anticoagulantes circulares (5).

PRINCIPIO

LupoTek DetecTin VL y LupoTek CorrecTin VL utilizan veneno de *Vipera lebetina* en lugar del veneno de *Vipera russelli* (víbora de Russell). El veneno de *Vipera lebetina*, al igual que el de la víbora de Russell, activará directamente el Factor X sin requerir Factor VII. El Factor X activado junto con los Factors V, II, los iones de calcio y los fosfolípidos generará trombina, que convierte el fibrinógeno en fibrina, y produce un coágulo en el sistema de prueba.

LupoTek DetecTin VL, el reactivo con nivel bajo de fosfolípidos, está diseñado como reactivo de detección para localizar una prolongación en el tiempo de coagulación. **LupoTek CorrecTin VL** es el reactivo con nivel alto de fosfolípidos que neutraliza el AL y corrige el tiempo de coagulación al normal, confirmando así la presencia de un anticoagulante lúpico.

REACTIVOS

ADVERTENCIA: PARA USO EXCLUSIVO EN DIAGNÓSTICO IN VITRO.

LupoTek DetecTin VL. Número de catálogo 85-202: 10 viales de 2 ml.

Ingredientes: Veneno de *Vipera lebetina*, baja concentración de fosfolípidos, agentes antiheparina, iones de calcio, tampones, estabilizantes y un tinte azul. La azida de sodio (0,05 %) se utiliza como conservante.

Preparación para el uso: Reconstituya el vial con *2 ml* de agua destilada. Mézclelo bien, no agite y déjelo a temperatura ambiente durante 10 minutos antes del uso.

LupoTek DetecTin VL. Número de catálogo 86-201: 10 viales de 1 ml.

Ingredientes: Veneno de *Vipera lebetina*, alta concentración de fosfolípidos, agentes antiheparina, iones de calcio, tampones, estabilizantes y un tinte rosa. Azida de sodio (0,05 %) como conservante.

Preparación para el uso: Reconstituya el vial con *1 ml* de agua destilada. Mézclelo bien, no agite y déjelo a temperatura ambiente durante 10 minutos antes del uso.

Almacenamiento y estabilidad

Los reactivos liofilizados son estables hasta la fecha de caducida impresa en los viales. Después de reconstituirlos, los reactivos permanecen estables durante 24 horas a 2-8 °C, o bien durante 8 horas a temperatura ambiente.

ADVERTENCIA: AZIDA SÓDICA. Tanto **LupoTek DetecTin VL** como **LupoTek CorrecTin VL** contienen azida sódica, que puede formar azidas metálicas altamente explosivas si se expone al plomo o al cobre de las tuberías. Tales materiales se deben desearchar por el desagüe dejando correr un gran volumen de agua para minimizar dicho riesgo.

MANIPULACIÓN DE LAS MUESTRAS

Extracción y preparación de la muestra

El plasma se obtiene a partir de sangre completa anticoagulada con 1 parte de citrato de sodio al 3,2 % por 9 partes de sangre completa. Procese la sangre completa recogida y manipule el plasma según la pauta H21-A5 del CLSI (11).

Para garantizar una muestra óptima, el plasma debe contener menos de 10 x 10⁹/l plaquetas (6). Se recomienda realizar un doble centrifugado o el filtrado a través de un filtro de jeringa de 0,22 micras (µ) antes de realizar la prueba (7). Es particularmente importante si se

descrito qui sopra. Eventuali residui di piastrine si rompono durante el proceso de congelamento e scongelamento e possono neutralizzare un anticoagulante lupico tramite esposizione dei fosfolipidi dalle membrane danneggiate. Scongelare rapidamente a 37 °C prima dell’uso.

Materiali richiesti ma non forniti

Pool di plasma normale
0,025M di cloruro di calcio

PROCEDURA DEL TEST

Contattare r2 Diagnostics per le applicazioni convaldate di LupoTek DetecTin VL e LupoTek CorrecTin VL su singoli modelli di analizzatori di coagulazione.

Controllo di qualità

Il controllo di qualità per i test di coagulazione comprende diversi componenti. Ogni laboratorio deve stabilire un programma di controllo qualità composto da plasma di controllo sia normali che anormali. Il plasma di controllo normale PlasmaCon N e il plasma di controllo proprio LA PlasmaCon LA di r2 Diagnostics sono entrambi controlli appropriati. Il test di controllo qualità con i reagenti **LupoTek DetecTin VL** e **CorrecTin VL** devono essere condotti contemporaneamente.

RISULTATI

Per ottenere risultati ottimali, i test con **LupoTek DetecTin VL** e **CorrecTin VL** devono essere eseguiti contemporaneamente. Se il tempo di **LupoTek DetecTin VL** rientra nell’intervallo normale, non sarà richiesto nessun altro test. Se il tempo di coagulazione con il reagente **DetecTin VL** è oltre il limite superiore dell’intervallo di riferimento normale, può essere necessario eseguire un ulteriore test con il reagente **CorrecTin VL**.

I tempi di coagulazione ottenuti con i reagenti **DetecTin VL** e **CorrecTin VL** vengono usati per esprimere i risultati con un rapporto, come mostrato di seguito. L’uso di un **rapporto normalizzato (NR)**, in cui il tempo di coagulazione del paziente viene diviso per il tempo di coagulazione del pool di plasma normale, riduce al minimo qualunque impatto delle differenze negli intervalli normali a causa della variabilità del reagente da un lotto all’altro:

DetecTin VL Tempo del paziente

DetecTin VL Tempo del pool di plasma normale

NR =

CorrecTin VL Tempo del paziente

CorrecTin VL Tempo del pool di plasma normale

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

In uno studio interno condotto su 122 campioni di pazienti, un’analisi ROC suggerisce un cutoff di 1,30 per il rapporto normalizzato. I campioni oltre questo livello sono considerati LA positivi.

Il valore di cutoff fornito come esempio qui sopra non è assoluto e ogni laboratorio dovrebbe stabilire dei rapporti specifici in base al proprio riferimento normale e alla propria popolazione di pazienti.

L’analisi del plasma dei pazienti che produce rapporti borderline deve essere ripetuta e correlata ai risultati clinici, se necessario. Il plasma di pazienti con tempi di coagulazione lunghi sia con **LupoTek DetecTin VL** che con **CorrecTin VL**, indipendentemente dal rapporto, può presentare altri difetti come una carenza di Factor o indicare una terapia anticoagulante orale.

Studi di miscelazione

Gli studi di miscelazione sono raccomandati per distinguere tra gli stati di carenza del factor e gli inibitori circolanti (6, 6). Un errore da correggere durante la miscelazione con plasma normale (1:1) è maggiormente indicativo della presenza di un inibitore, mentre la correzione indica maggiormente la presenza di uno stato di carenza del factor. Gli studi di miscelazione devono essere eseguiti in condizioni attentamente controllate usando poll di plasma normale ben caratterizzato (8, 9).

VALORI DI RIFERIMENTO

Gli intervalli di riferimento per il plasma normale con **LupoTek DetecTin VL** si trovano nel secondo intervallo **34-54** quando valutati con STA Compact.

Gli intervalli di riferimento per il plasma normale con **LupoTek CorrecTin VL** si trovano nel secondo intervallo **31-44** quando valutati con STA Compact.

Questi risultati sono puramente indicativi. Ogni laboratorio deve stabilire i propri intervalli di riferimento normale per la tecnica e/o lo strumento utilizzato in laboratorio.

LIMITAZIONI

Tutti i test per gli anticoagulanti lupici richiedonoo campioni plasmatici con scarso contenuto di piastrine (<10 x 10⁹/L) o preferibilmente privi di piastrine. I campioni non sottoposti a doppia centrifugazione o filtrazione devono essere analizzati prima del congelamento. Entrambi i test DetecTin VL e CorrecTin VL devono essere eseguiti su un campione fresco o un campione congelato.

Le carenze di factor, gli anticoagulanti orali e altri inibitori anticorpali possono allungare i tempi di coagulazione sia di LupoTek

DetecTin VL che di CorrecTin VL. Gli studi di miscelazione sono raccomandati per distinguere tra le condizioni cliniche (6, 8, 9).

DetecTin VL e CorrecTin VL contengono un agente che neutralizza l’eparina, efficace a 0,6 U/ml di eparina non frazionata. Il test di campioni con maggiori livelli di eparina non è consigliato. Gli effetti dell’eparina a basso peso molecolare e degli inibitori diretti della trombina non sono stati determinati.

Le caratteristiche prestazionali di **DetecTin VL** e **CorrecTin VL** non sono state valutate nelle popolazioni pediatriche.

CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI

Precisione

Le stime di precisione CLSI EP5-A2 (10) di LupoTek DetecTin VL e CorrecTin VL su STA Compact, come %CV dei tempi di coagulazione, sono state:

Reagente	Plasma	Imprecisione della ripetibilità	Totale imprecisione (nello strumento)
DetecTin VL	Normale	1,3%	3,6%
	Anormale	1,4%	3,7%
CorrecTin VL	Normale	1,1%	3,7%
	Anormale	1,3%	2,6%

Interferenze

Gli studi sulle interferenze di LupoTek DetecTin VL e CorrecTin VL sono stati determinati su un analizzatore Stago STA Compact. Nel pool di plasma normale è stato inserito un interferente e la concentrazione massima tollerata nel dosaggio è stata definita come la massima concentrazione di interferente in cui qualunque scostamento uniforme relativo al valore recuperato del tempo di coagulazione PNP base era inferiore al 10%. Le concentrazioni massime sono state:

Classe interferen te	Massima concentrazione testata	Massima concentrazione tollerata
Emolisi	500 mg/dL emoglobina	500 mg/dL emoglobina
Ittero	20 mg/dL bilirubina non coniugata	1 campioni itterici non sono appropriati.
Lipemia	2.000 mg/dL trigliceridi	200 mg/dL trigliceridi
Eparina	2,0 U/ml eparina non frazionata	0,6 U/ml eparina non frazinata

Confronto tra i metodi

I campioni di centoventidue pazienti sono stati analizzati su STA Compact in uno studio interno per determinare il cutoff del rapporto normalizzato LupoTek DetecTin VL/CorrecTin VL. In seguito, i campioni di altri centocinquatacinque pazienti sono stati analizzati in tre laboratori usando reagenti LupoTek DetecTin VL e CorrecTin VL, Diagnostica Stago DRVV Screen e Confirm, su analizzatori STA Compact. Tutti i campioni provenivano da un insieme di pazienti affetti da LA nota e altre condizioni cliniche varie.

La percentuale di accordo positiva e negativa è stata calcolata usando il rapporto normalizzato del test e dispositivi equivalenti in base alle linee guida FDA contenute nel documento 1620 “Statistical Guidance on Reporting Results from Studies Evaluating Diagnostic Tests” (Guida statistica alla segnalazione dei risultati provenienti da studi per la valutazione dei test diagnostici). I risultati erano i seguenti:

DetecTin VL/CorrecTin VL rispetto a Stago DRVV Screen/Confirm	
Statistica	Risultato
Percentuale di accordo positiva	98%
Percentuale di accordo negativa	96%

Bibliografia

- 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.
- Ginsberg JS et al. Relationship of antiphospholipid antibodies to pregnancy loss in patients with SLE: A cross sectional study. Blood:1992; 80:4.
- Ames PRJ, et al. Antiphospholipid antibodies, hemostatic variables and thrombosis-A survey of 144 patients. Thromb. Haemost: 1995; 73: 768-773.
- Triplett DA., et al., Laboratory identification of the lupus anticoagulant, Br. J. Haematol: 1991; 73:, 139-142.
- 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.
- Brandt JT, et al. Criteria for the diagnosis of Lupus Anticoagulants: An update. Thromb. Haemost: 1995;74(4), 1185-1190.
- Sletnes KE, et al. Preparation of plasmas for the detection of lupus anticoagulants and antiphospholipid antibodies. Thromb. Res: 1992; 65, 43-53.

debe congelar el plasma antes de la prueba.

Almacenamiento y estabilidad

Almacene el plasma según la pauta H21-A5 del CLSI mencionada. Como ya se ha indicado, se recomienda realizar un doble centrifugado o el filtrado del plasma antes de congelarlo. Los restos de plaquetas se fragmentarán al congelar y descongelar la muestra, y pueden neutralizar un anticoagulante lúpico al exponerlo a los fosfolípidos de las membranas dañadas. Descongelar rápidamente a 37 °C antes del uso.

Materiales necesarios pero no proporcionados

Plasma normal agrupado
0,025 de cloruro de calcio

PROCEDIMIENTO DE PRUEBA

Póngase en contacto con r2 Diagnostics para consultar las aplicaciones validadas para LupoTek DetecTin VL y LupoTek CorrecTin VL en modelos individuales de analizadores de coagulación.

Control de calidad

Las pruebas de control de calidad de la coagulación implican distintos componentes. Cada laboratorio debe establecer un programa de control de calidad que incluya plasmas de control tanto normales como anormales. El plasma de control normal PlasmaCon N y el plasma de control positivo en AL PlasmaCon LA de r2 Diagnostics son controles adecuados. La prueba de control de calidad con los reactivos **LupoTek DetecTin VL** y **CorrecTin VL** se debe llevar a cabo al mismo tiempo.

RESULTADOS

Para obtener unos resultados óptimos, la prueba con **LupoTek DetecTin VL** y **CorrecTin VL** se debe realizar al mismo tiempo. Si el tiempo **LupoTek DetecTin VL** se encuentra en el intervalo normal, no es necesario realizar ninguna otra prueba. Si el tiempo de coagulación con el reactivo **DetecTin VL** está por encima del límite superior del intervalo de referencia normal, la realización de pruebas adicionales con el reactivo **CorrecTin VL** está justificada.

Los tiempos de coagulación obtenidos con los reactivos **DetecTin VL** y **CorrecTin VL** se utilizan para expresar resultados con forma de relación, como se indica a continuación. El uso de una **relación normalizada (NR)**, en la que el tiempo de coagulación del paciente se divide entre el tiempo de coagulación del plasma normal agrupado, minimiza cualquier impacto de las diferencias en los intervalos normales debido a la variabilidad de los reactivos entre lotes:

Tempo del paciente con DetecTin VL

Tempo de plasma normal agrupado con DetecTin VL

NR =

Tempo del paciente con CorrecTin VL

Tempo de plasma normal agrupado con CorrecTin VL

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

En un estudio interno de 122 muestras de pacientes, un análisis ROC sugirió un corte de 1,30 para la relación normalizada. Las muestras situadas por encima de este nivel se consideraron positivas en AL.

El valor de corte de ejemplo descrito no es absoluto y cada laboratorio debe establecer sus propios valores de relación específicos por su referencia normal y sus poblaciones de pacientes.

Los plasmas de pacientes que contienen las relaciones límite se deben repetir y correlacionar con los descubrimientos clínicos si se indica. Los plasmas de pacientes con tiempos de coagulación prolongados tanto con **LupoTek DetecTin VL** como con **CorrecTin VL** independientemente de la relación, pueden tener algún otro defecto, como una deficiencia de factor o el uso de terapia anticoagulante oral.

Estudios de mezcla

Se recomienda llevar a cabo estudios de mezcla para diferenciar entre estados de deficiencia de factor e inhibidores circulates (6). Un fallo al corregir la mezcla con plasma normal (1:1) tiende a indicar un inhibidor, mientras que la corrección sugiere un estado de deficiencia de factor. Se deben llevar a cabo estudios de mezcla en condiciones controladas cuidadosamente utilizando plasma normal agrupado bien caracterizado (8, 9).

VALORES DE REFERENCIA

Los intervalos de referencia para plasmas normales con **LupoTek DetecTin VL** se encuentran en el segundo intervalo **34-54** al evaluarlos con el STA Compact.

Los intervalos de referencia para plasmas normales con **LupoTek CorrecTin VL** se encuentran en el segundo intervalo **31-44** al evaluarlos con el STA Compact.

Estos resultados son únicamente orientativos. Cada laboratorio debe establecer sus propios intervalos de referencia normales para la técnica o el instrumento utilizados en el laboratorio.

LIMITACIONES

Todas las pruebas para anticoagulantes lúpicos requieren muestras de plasma pobres en plaquetas (<10 x 10⁹/l) o

preferiblemente sin plaquetas. Las muestras a las que no se realice un doble centrifugado o se filtren, se deben analizar antes de congelarlas. Tanto las pruebas DetecTin VL como CorrecTin VL se deben realizar con una muestra fresca o con una muestra congelada.

Las deficiencias de factor, los anticoagulantes orales y otros inhibidores de anticuerpos pueden prolongar los tiempos de coagulación de LupoTek DetecTin VL y CorrecTin VL. Se recomienda llevar a cabo estudios de mezcla para diferenciar entre estos estados clínicos (6, 8, 9).

DetecTin VL y **CorrecTin VL** incorporan un agente neutralizador de heparina eficaz a 0,6 U/ml de heparina no fraccionada. No se recomienda la prueba de muestras con niveles de heparina superiores. No se han determinado los efectos de las heparinas de bajo peso molecular y los inhibidores directos de la trombina.

No se han evaluado las características de rendimiento de **DetecTin VL** y **CorrecTin VL** en poblaciones pediátricas.

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

Precision

Las estimaciones de precisión según EP5-A2 del CLSI (10) para LupoTek DetecTin VL y CorrecTin VL en STA Compact, como porcentaje de CV de los tiempos de coagulación fueron:

Reactivo	Plasma	Imprecisión de repetibilidad	Imprecisión total (intrastrumento)
DetecTin VL	Normal	1,3 %	3,6 %
	Anormal	1,4 %	3,7 %
CorrecTin VL	Normal	1,1 %	3,7 %
	Anormal	1,3 %	2,6 %

Interferencias

Los estudios de interferencias de LupoTek DetecTin VL y CorrecTin VL se determinaron en un analizador Stago STA Compact. El interferente se añadió al plasma normal agrupado y la concentración máxima tolerada en el ensayo se definió como la concentración más alta de interferente en la que cualquier desplazamiento constante relativo al valor recuperado del tiempo de coagulación de PNP base era inferior al 10 %. Las concentraciones máximas fueron:

Comparación de métodos

Clase de interferente	Concentración máxima analizada	Concentración máxima tolerada
Hemólisis	500 mg/dl hemoglobina	500 mg/dl hemoglobina
Ictericia	20 mg/dl bilirubina no coniugada	Las muestras ictericas no son apropiadas.
Lipemia	2000 mg/dl triglicéridos	200 mg/dl triglicéridos
Heparina	2,0 U/ml heparina no fraccionada	0,6 U/ml heparina no fraccionada

Se analizaron ciento veintidós muestras de pacientes con el STA Compact en un estudio interno para determinar el corte para la relación normalizada de LupoTek DetecTin VL / CorrecTin VL. A continuación, se analizaron un total de ciento cincuenta y cinco muestras de pacientes distintas en tres laboratorios empleando LupoTek DetecTin VL y CorrecTin VL, y reactivos de detección y confirmación Diagnostica Stago DRVV en analizadores STA Compact. Todas las muestras eran una mezcla de pacientes con constancia de AL y otros estados clínicos variados.

Los acuerdos porcentuales positivo y negativo se calcularon utilizando la relación normalizada de la prueba y los dispositivos establecidos según el documento de pautas de la Administración de Drogas y Alimentos de EE. UU. (FDA) 1620, “Statistical Guidance on Reporting Results from Studies Evaluating Diagnostic Tests” (Orientaciones estadísticas sobre la notificación de resultados procedentes de estudios de evaluación de pruebas diagnósticas). Los resultados fueron:

DetecTin VL/CorrecTin VL en comparación con los sistemas de detección y confirmación Stago DRVV	
Estadística	Resultado
Acuerdo porcentual positivo	98%
Acuerdo porcentual negativo	96%

Referencias:

- 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.
- Ginsberg JS et al. Relationship of antiphospholipid antibodies to pregnancy loss in patients with SLE: A cross sectional study. Blood:1992; 80:4.
- Ames PRJ, et al. Antiphospholipid antibodies, hemostatic variables and thrombosis-A survey of 144 patients. Thromb. Haemost: 1995; 73: 768-773.
- 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, AACC Press 2006.
- 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.

