



HEMOCLOT™ LA-S

REF CK090K R 6 x 1 mL

REF CK094K R 12 x 2 mL

HEMOCLOT™ LA-C

REF CK091K R 6 x 1 mL



Vertrieb und Support:

CoaChrom Diagnostica GmbH

www.coachrom.com | info@coachrom.com

Tel. +43-1-236 222 1 | Fax +43-1-236 222 111

Kostenfreie Nummern für Deutschland:

Tel. 0800-24 66 33-0 | Fax 0800-24 66 33-3

Clotting-Test für die Bestimmung von Lupus Antikoagulanzen

VERWENDUNGSZWECK:

HEMOCLOT™ LA-S und HEMOCLOT™ LA-C sind Diluted Russell's Viper Venom (dRVVT) Reagenzien für die spezifische, qualitative *In-vitro*-Bestimmung von Lupus Antikoagulanzen (LA) in humanem Citratplasma mittels einer Clotting-Methode. Sie eignen sich zur manuellen oder automatisierten Durchführung.

HEMOCLOT™ LA-S: dRVVT-Reagenz für das LA-Screening

HEMOCLOT™ LA-C: dRVVT-Reagenz mit hohem Phospholipidgehalt zur Bestätigung des Vorliegens von LA

ZUSAMMENFASSUNG:

Technisch¹:

Lupus Antikoagulanzen sind gegen negativ geladene Phospholipide/Protein-Komplexe gerichtete Antikörper und führen bei Phospholipid-abhängigen Tests zu verlängerten Gerinnungszeiten. Bei LA-S (niedriger Phospholipidgehalt) ist bei Vorliegen von LA eine verlängerte Gerinnungszeit zu erwarten, bei LA-C (hoher Phospholipidgehalt) ist eine Neutralisierung von LA und eine dadurch verkürzte Gerinnungszeit zu erwarten.

Klinisch¹⁻⁵:

Lupus Antikoagulanzen sind mit verschiedenen Krankheitsbildern wie z.B. Lupus, Autoimmunerkrankungen, Thrombosen, Fehlgeburten assoziiert und müssen gewöhnlich durch mehrere Tests bestätigt werden.

TESTPRINZIP:

In Gegenwart von Calcium wird in der Probe vorhandener Faktor X durch Russell's Viper Venom (RVV) zu Faktor Xa aktiviert. In Gegenwart von Faktor V, Calcium und Phospholipiden aktiviert Faktor Xa Prothrombin zu Thrombin, welches zu einer raschen Koagulation von Fibrinogen führt. Es ist nicht zu erwarten, dass Kontaktfaktor-Anomalien, Faktor VII-, Faktor VIII- und Faktor IX-Mangel oder Inhibitoren die Ergebnisse beeinflussen.

HEMOCLOT™ LA-S wird mit einem geringen Phospholipidgehalt durchgeführt, daher ist bei Vorliegen von LA eine verlängerte Gerinnungszeit zu erwarten.

HEMOCLOT™ LA-C enthält einen höheren Phospholipidgehalt. Dadurch ist eine Neutralisierung der in der Probe enthaltenen LA und eine Verkürzung der Gerinnungszeit zu erwarten.

Die Reagenzien enthalten einen Heparin-Neutralisator (keine Heparin-Interferenz bis zu 1 IE/mL in der Probe). Daher weisen HEMOCLOT™ LA-S und HEMOCLOT™ LA-C bei der Bestimmung von LA eine höhere Spezifität auf als aPTT-Reagenzien.

REAGENZIEN:

R HEMOCLOT™ LA-S, lyophilisiert mit grünem Farbstoff. Enthält RVV, Phospholipide, Heparin-Neutralisator, Calcium und Stabilisatoren.

REF CK090K → 6 Flaschen mit je 1 mL

REF CK094K → 12 Flaschen mit je 2 mL

R HEMOCLOT™ LA-C, lyophilisiert mit rosafarbenem Farbstoff. Enthält RVV, Phospholipide, Heparin-Neutralisator, Calcium und Stabilisatoren.

REF CK091K → 6 Flaschen mit je 1 mL

VORSICHTSMASSNAHMEN UND WARNHINWEISE:

- Einige der in diesen Kits enthaltenen Reagenzien beinhalten Stoffe tierischen Ursprungs. Jedes Produkt biologischen Ursprungs muss mit größter Sorgfalt unter Beachtung der erforderlichen Vorsichtsmaßnahmen und als potentiell infektiös behandelt werden.
- Bei der Entsorgung von Restmaterial sind die geltenden lokalen Richtlinien zu befolgen.
- Benutzen Sie nur Reagenzien, die aus ein- und derselben Charge des Testkits stammen.
- Stabilitätsstudien haben gezeigt, dass die Packungen ohne Beeinträchtigung bei Raumtemperatur versendet werden können.
- Dieses *In-vitro*-Diagnostikum ist für den professionellen Gebrauch im Labor vorgesehen.

REAGENZIENVORBEREITUNG:

Die Gummistopfen sind vorsichtig zu öffnen, um einen Verlust an Reagenz zu vermeiden.

R Jede Flasche rekonstituieren mit:

REF CK090K / CK091K → 1 mL aqua dest.

REF CK094K → 2 mL aqua dest.

Das Reagenz gut durchmischen, bis es sich vollständig gelöst hat, dabei Schaumbildung vermeiden, und danach sofort in das Analysegerät laden.

Für die manuelle Methode 30 Minuten bei Raumtemperatur (18-25°C) stabilisieren lassen, vor Gebrauch homogenisieren.

LAGERUNG UND STABILITÄT:

Ungeöffnete Reagenzien müssen bei 2-8°C in der Originalverpackung gelagert werden. Sie können bis zu dem auf dem Set aufgedruckten Verfalldatum verwendet werden.

R Stabilität des in der Originalflasche gelagerten Reagenzes unter der Voraussetzung, dass dieses nicht kontaminiert wurden und keine Verdunstung erfolgte:

REF CK090K / CK091K / CK094K:

- 7 Tage bei 2-8°C.
- 24 Stunden bei Raumtemperatur (18-25°C).
- 2 Monate tiefgefroren bei ≤ -20°C*
- **On-board Stabilität: siehe gerätespezifische Applikation.**

*Gefrorenes Reagenz einmalig bei 37°C auftauen und sofort verwenden.

ERFORDERLICHE, NICHT MITGELIEFERTER REAGENZIEN UND MATERIALIEN:

Reagenzien:

- Aqua dest.
- Geeignete Normal- und Abnormal-Kontrollplasmen für LA, z.B.:

Produktbezeichnung	Art.Nr.
BIOPHEN™ Normal Kontrollplasma	223201
LA Kontrollplasma	SC081K / SC082K / SC083K

Siehe auch die spezifische Applikationsanleitung für das verwendete Analysegerät.

Materialien:

- Wasserbad oder halb- oder vollautomatischer Gerinnungsautomat.
- Stoppuhr, kalibrierte Pipetten, Glas- oder Kunststoffröhrchen

GEWINNUNG UND HERSTELLUNG DER PROBEN:

Das Blut (9 Volumenteile) wird vorsichtig in 0,109 M Citrat als Antikoagulant (1 Volumenteil) abgenommen. Die Blutabnahme erfolgt durch Venenpunktion. Das erste Röhrchen ist zu verwerfen.

Herstellung und Aufbewahrung der Proben müssen in Einklang mit den gültigen örtlichen Vorschriften erfolgen (für die USA: Bitte beziehen Sie sich auf die Empfehlungen den CLSI H21-A5⁹ für weitere Informationen über Probengewinnung, Handhabung und Aufbewahrung).

Bzgl. Plasma-Lagerung: siehe Referenzen^{6,7}.

VORGEHENSWEISE:

Es wird empfohlen, HEMOCLOT™ LA-S und HEMOCLOT™ LA-C gemeinsam zu verwenden.

Der Testkit eignet sich zur manuellen oder automatisierten Durchführung. Der Test wird bei einer Temperatur von 37°C±1°C durchgeführt und es wird die durch Hinzufügen des Reagenzes ausgelöste Gerinnungszeit gemessen.

Testdurchführung:

1. Die Kontrollplasmen gemäß deren jeweiligen Packungsbeilagen rekonstituieren.
2. Die Proben sind **unverdünnt** zu testen.
3. Prinzip: Gerinnungszeit mit mechanischer oder optischer Methode messen. Geeignete Menge an Reagenz (0,2 mL pro Test) auf 37°C vorewärmen. In ein kleines Teströhrchen nach folgendem Schema zugeben:

	Menge
Testplasma	200 µL
Bei 37°C für 1-2 Minuten inkubieren, dann hinzugeben (und Stoppuhr starten):	
R präinkubiert bei 37°C	200 µL
Die Gerinnungszeit in Sekunden exakt bestimmen	

Sollte das verwendete Verfahren andere Reagenzvolumina als die oben beschriebenen erfordern, müssen die Verhältnisse der Reagenzkonzentrationen genau eingehalten werden, um den Erhalt der Leistungsmerkmale des Tests zu gewährleisten. Der Benutzer ist für die Validierung von Modifizierungen und ihren Einfluss auf alle Ergebnisse verantwortlich.

Für automatisierte Methoden sind auf Anfrage Applikationsanleitungen erhältlich. Die spezifischen Applikationsanleitungen und Warnhinweise für das jeweilige Analysegerät sind zu beachten.

QUALITÄTSKONTROLLE:

Die Verwendung von Qualitätskontrollen ermöglicht bei Gebrauch der gleichen Reagenzchargen die Validierung der Methodenkonformität sowie die Überprüfung der Homogenität der Messungen von einer Serie zur anderen. Gemäß guter Laborpraxis ist bei jeder Testserie eine Qualitätskontrolle zu inkludieren, um die generierten Ergebnisse zu überprüfen. Eine Neuverifikation des Normalbereichs ist zumindest für jede neue Reagenzcharge durchzuführen sowie nach Wartungsarbeiten am Gerinnungsautomaten oder wenn die Kontrollen außerhalb des Vertrauensbereiches liegen. Jedes Labor sollte die Richtigkeit der Zielwerte und Akzeptanzbereiche unter den eigenen Testbedingungen überprüfen.

ERGEBNISSE:

Tests und Ergebnisse sollten unter Berücksichtigung anerkannter Empfehlungen und Richtlinien interpretiert werden (für die USA: siehe CLSI H60-A⁹).

• HEMOCLOT™ LA-S:

Die für die Probe gemessene Gerinnungszeit muss mit der des Referenz-Normalbereichs des Labors verglichen werden (passende Richtlinie berücksichtigen, Normalbereich idealerweise ermittelt mit individuellen Normalplasmen, oder alternativ Referenz-Pool von humanem Normalplasma, für welches das Ergebnis in diesem Bereich liegen und in jeder Testserie gemessen werden muss).

Die Ergebnisse können als Ratio angegeben werden:

LA-S Ratio = Probe LA-S (Gerinnungszeit in Sek.) / Mittelwert des Normalbereichs für LA-S (Gerinnungszeit in Sek.)

Ist das LA-S-Ergebnis ungewöhnlich verlängert (d.h. Gerinnungszeit > Mittelwert+2SD im Vergleich mit dem Referenz-Normalbereich des Labors), so ist das Vorliegen von LA mit LA-C zu bestätigen.

• HEMOCLOT™ LA-C:

Die Ergebnisse können als Ratio angegeben werden:

LA-C Ratio = Probe LA-C (Gerinnungszeit in Sek.) / Mittelwert des Normalbereichs für LA-C (Gerinnungszeit in Sek.)

• Normalisierte LA Ratio:

Normalisierte LA Ratio = LA-S Ratio / LA-C Ratio

• Mischversuche:

Um ein Vorliegen von LA zu bestätigen, können Mischversuche mit einer 50:50 Mischung aus Testplasma und Normalplasma durchgeführt werden.

Interpretation:

Plasmen, die LA enthalten, zeigen gewöhnlich ein verlängertes Ergebnis mit LA-S-Reagenz und ein verkürztes Ergebnis mit LA-C-Reagenz.

Als Anhaltspunkt:

- Normalisierte Ratio $\geq 1,20$ deutet auf das Vorliegen von LA hin (je höher die Ratio, desto stärkeres Vorliegen)
- Normalisierte Ratio $< 1,20$ (oder im Grenzbereich) und verlängerte LA-S und LA-C-Gerinnungszeiten: Die Ergebnisse sollten durch zusätzliche Untersuchungen und Mischversuche bestätigt werden.
- Das Mischen von Normalplasma und Testplasma im Verhältnis 50:50 ersetzt die im Testplasma möglicherweise fehlenden Faktoren. Ist der Mischversuch noch immer verlängert, so ist im Testplasma ein Antikoagulant oder ein anderer Inhibitor vorhanden.

Die Testergebnisse sind immer orientiert am klinischen und biologischen Zustand des Patienten sowie weiteren Befunden zu interpretieren.

EINSCHRÄNKUNGEN:

- Bitte befolgen Sie die von HYPHEN BioMed validierten technischen Anweisungen aufs Genaueste, um optimale Testergebnisse zu erzielen und den Spezifikationen zu entsprechen.
- Jedes Reagenz mit unüblicher Erscheinung oder Anzeichen einer Kontamination muss verworfen werden.
- Auffällige Proben oder solche, die Anzeichen einer Aktivierung aufweisen, müssen verworfen werden.
- Es ist nicht empfohlen, die LA-Bestimmung bei Proben von Patienten, die sich in Behandlung mit Heparin befinden, durchzuführen, jedoch enthalten

sowohl HEMOCLOT™ LA-S als auch HEMOCLOT™ LA-C einen Neutralisator, der Heparin bis zu 1 IE/mL neutralisiert.

- Andere neue Gerinnungshemmer können unerwartete Effekte auf Test und Ratio haben.
- In einer externen Studie waren die Ergebnisse durch Warfarin und Rivaroxaban weniger beeinflusst als in anderen kommerziell erhältlichen dRVVT-Tests.
- Kommerziell erhältliche Normal-Kontrollplasmen mit un spezifiziertem Citrat- und Plättchen-Gehalt sind nicht zur Anwendung in Mischversuchen empfohlen.
- Zur Abklärung jedes unerwarteten oder abnormalen Ergebnisses sollte eine zusätzliche Untersuchung durchgeführt werden. Mindestens zwei Screening-Tests mit verschiedenen Eigenschaften und unterschiedlicher Sensitivität sollten durchgeführt werden, bevor das Vorliegen von LA ausgeschlossen wird. Grenzwertige Ergebnisse sollten in Übereinstimmung mit anderen Markern für das Antiphospholipid-Syndrom (APS) wie beispielsweise Antikardiolipin und Anti-beta-2-Glykoprotein ELISA betrachtet werden.
- Für Vergleichsstudien wird empfohlen, mit HEMOCLOT™ LA-S und HEMOCLOT™ LA-C simultan zu testen.
- Ikterische, lipämische oder hämolytierte Proben oder solche mit unüblicher Erscheinung (Teilgerinnung) können falsche Ergebnisse erzeugen und sollten daher mit Vorsicht interpretiert werden.

ERWARTETE WERTE:

LA sind in normalem humanen Plasma nicht vorhanden.

Als Anhaltspunkt wird bei Normalplasma gewöhnlich eine Gerinnungszeit **< 45 Sekunden** und eine **normalisierte Ratio < 1,20** erwartet. Jedes Labor muss jedoch seinen eigenen Normalbereich für jede Kombination aus verwendeter Charge, Gerät und Protokoll festlegen.

LEISTUNGSMERKMALE:

- In einer externen Studie zeigte sich bei 59 positiven dRVVT-Proben und 62 normalen Proben eine ähnliche Verteilung wie bei kommerziell erhältlichen dRVV-Screening und Bestätigungstests.
- Leistungsstudien wurden intern auf Sysmex CS-5100 durchgeführt. Sie wurden mittels Qualitätskontrollen des Labors über 6 Tage mit 2 Testserien pro Tag und 2 Wiederholungen innerhalb jeder Serie für jedes Kontrollniveau ausgewertet. Die folgenden Daten wurden erhalten:

Probe	Intra Assay			Inter Assay		
	Normal	Pathologisch		Normal	Pathologisch	
Test	LA-S	LA-S	LA-C	LA-S	LA-S	LA-C
n	30	30	30	24	24	24
Mittelwert (Sek.)	32,1	84,2	37,0	31,6	84,4	37,0
SD (Sek.)	0,19	1,05	0,26	0,66	1,16	0,33
VK%	0,59	1,24	0,71	2,10	1,38	0,89

- Korrelation mit der Referenzmethode (Siemens LA1/LA2 vs. HEMOCLOT™ LA-S/LA-C auf Sysmex CS-5100):

$$n = 50 \quad y = 1,08x - 0,08 \quad r = 0,930$$

• Interferenzen:

Es wurde mit den folgenden Substanzen und bis zu den folgenden Konzentrationen keine Interferenz beobachtet:

Hämoglobin	Bilirubin (konjugiert)	Intralipide	Heparine
500 mg/dL	25 mg/dL	250 mg/dL	1 IE/mL

REFERENZEN:

1. Thiagarajan P. et al. The use of the dilute Russels viper venom time for the diagnosis of lupus anticoagulants. Blood. 1986.
2. Moore GW. et al. Newly developed dilute Russell's viper venom reagents for lupus anticoagulant detection with improved specificity. Lupus. 2017.
3. Favaloro EJ. The Russell viper venom time (RVVT) test for investigation of lupus anticoagulant (LA). Wiley Periodicals, Inc. 2019.
4. Rauch J. et al. Distinguishing lupus anticoagulants from antifactor antibodies using hexagonal phase II phospholipids Thromb Haemost. 1989.
5. Pengo V. et al. Update of the guidelines for lupus anticoagulant detection. J. Thromb Haemost 2009.
6. CLSI Document H21-A5: "Collection, transport, and processing of blood specimens for testing plasma -based coagulation assays and molecular hemostasis assays; approved guideline". 2008.
7. Woodhams B. et al. Stability of coagulation proteins in frozen plasma. Blood coagulation and Fibrinolysis. 2001.
8. CLSI Document H60-A: "Laboratory Testing for the Lupus Anticoagulant; Approved Guideline". 2014

SYMBOL:

Die verwendeten Symbole und Zeichen sind in der ISO-Norm 15223-1 aufgeführt. Das der Packung beiliegende Symbolerklärungs-Blatt ist zu beachten.