Precision BioLogic

CRYOcheck™ IVD Hex LA

Verwendungszweck

CRYO*check* Hex LA dient zum klinischen Laborgebrauch als qualitativer Testkit für den Nachweis von Lupus-Antikoagulantien (LA) in 3,2%igem humanen Citratplasma durch die Anwendung von Hexagonalphasen-Phospholipiden. cryo*check* Hex LA ist ein integrierter Test zum Nachweis von Lupus-Antikoagulantien. Zur in-vitro-Diagnostik. Die Testperformance wurde bei Neugeborenen und pädiatrischen Patienten nicht untersucht.

Zusammenfassung und Prinzip

Lupus-Antikoagulantien (LA) sind heterogene Autoantikörper, hauptsächlich des Typs IgG und IgM die gegen, an der Blutgerinnung beteiligte, Phospholipide (PL) oder Phospholipid-Protein-Komplexe gerichtet sind¹. LA-Antikörper werden im Patientenplasma durch PL-abhängige Gerinnungstests nachgewiesen. Es gibt einen Zusammenhang zwischen LA und erhöhtem Risiko von klinischen Komplikationen wie thrombotischen Ereignissen^{2,3} oder wiederholtem Fötalverlust⁴. Die medizinische Diagnose von LA basiert auf klinischen Symptomen und Laborergebnissen. Es gibt keinen Standardtest für LA. Angesichts der Komplexität des Mechanismus und der Heterogenität von LA-Antikörper wird die Anwendung verschiedener, auf unterschiedlichen Prinzipien basierender, Gerinnungstests.empfohlen⁵.

LA verzögert die Gerinnselbildung bei in-vitro-Tests zur PL-abhängigen Koagulation (LA-Screening), wie die LA-sensitive aktivierte partielle Thromboplastinzeit (APTT) oder dem dRVVT-Test (dilute Russell's Viper Venom Time). Um das Vorhandensein von LA in einer Plasmaprobe zu bestätigen, müssen Labors eine Korrektur der verlängerten Gerinnselbildungszeit durch zugesetztem PL (LA-Bestätigungstest) durchführen und es müssen andere Anomalien wie Faktorenmängel und das Vorhandensein von Heparin ausgeschlossen werden⁵.

cryocheck Hex LA ist ein integrierter silikatbasierter (Screening- und Bestätigungs-)APTT-Assay zum qualitativen LA-Nachweis. Das Vorhandensein von LA in einer Plasmaprobe wird durch die Korrektur der APTT-Gerinnselbildungszeit (CT) der Probe nach Zugabe einer Reaktionsmischung mit Hexagonalphasen-PL bestätigt. CRYOcheck Hex LA enthält gepooltes Normalplasma (Mischtest) und einen Heparin-Neutralisator.

Reagenzien

LA Start: Gepooltes Normalplasma mit Puffer und einem Heparin-Neutralisator.

LA Correct: Gepooltes Normalplasma mit Puffer, einem Heparin-Neutralisator und invertiertem Hexagonalphasen-Phospholipid.

LA APTT: Silikatbasiertes LA-sensitives APTT-Reagenz mit Stabilisator.

Nur verschreibungspflichtige Verwendung

IFU-HEXLA-DE-REV.01 04.2023 1/10

Lagerung, Zubereitung und Handhabung

Bei Lagerung bis zu max. -70 °C ist CRYO*check* Hex LA bis Ende des auf der Produktverpackung angegebenen Monats haltbar.

Jeweils ein Fläschchen von LA Start, LA Correct und LA APTT bei 37 °C (± 1 °C) in einem Wasserbad unter Verwendung der Wasserbadhalterung für 5 Minuten auftauen. Die Auftauzeiten sind wichtig und daher strikt einzuhalten. Die Verwendung eines Trockenbades oder Heizblocks zum Auftauen wird nicht empfohlen. Die Verwendung einer Stoppuhr wird empfohlen.

WICHTIG: Alle Reagenzien müssen vor der Verwendung durchmischt werden. Alle verschlossenen Reagenzflaschen unmittelbar nach dem Auftauen vortexen. Sicherstellen, dass jede Komponente für 5 Sekunden gevortext wird, da ein unzureichendes durchmischen der Reagenzien die LA-Sensitivität des Assays verringern kann. Sicherstellen, dass große Luftblasen, die durch das durchmischen entstanden sind, mit einer Transferpipette aufgestochen werden.

WICHTIG: LA APTT muss bei der Verwendung gerührt werden. Dem Reagenz vor der Positionierung in einer Rührposition des verwendeten Analysers einen Magnetrührstabhinzufügen.

Nach dem Auftauen kann CRYO*check* Hex LA für 8 Stunden im Analysegerät oder für 4 Stunden verschlossen im Originalfläschchen bei Raumtemperatur (18-25 °C) aufbewahrt werden. Für die Lagerung bei Raumtemperatur das verschlossene APTT-Fläschchen vor dem Einsetzen in das Gerät fünfmal umschwenken. CRYO*check* Hex LA-Reagenzien NICHT im Kühlschrank (bei 2-8 °C) lagern.

Verfügbarkeit

Produkt	Katalog-Nr.	Komponenten
	HEXLA	LA Start: 2 x 1,5 ml (weiße Kappe) LA Correct: 2 x 1,5 ml (violette Kappe) LA APTT: 2 x 3,0 ml (schwarze Kappe)
cryo <i>check</i> Hex LA	HEXLA-7	LA Start: 2 x 1,5 ml (weiße Kappe) LA Correct: 2 x 1,5 ml (violette Kappe) LA APTT: 3 x 3,0 ml (schwarze Kappe)
	HEXLA-M	LA Start: 2 x 1,0 ml (weiße Kappe) LA Correct: 2 x 1,0 ml (violette Kappe) LA APTT: 2 x 2,0 ml (schwarze Kappe)

cryocheck Hex LA-Reagenzien sind chargenspezifisch und nicht mit anderen Chargennummern austauschbar.

Instrumente

Jedes Labor sollte das Analysengerät vor Ort und in Übereinstimmung mit der Gebrauchsanweisung des Herstellers vorbereiten. Protokolle für verschiedene Analysengeräte sind auf Anfrage verfügbar.

Verfahren

Bereitgestellte Materialien

CRYOcheck Hex LA (LA Start, LA Correct, LA APTT)

Erforderliche, nicht bereitgestellte Materialien

- 0,025 M CaCl₂
- Wasserbad, das eine Temperatur von 37 °C (±1 °C) aufrechterhalten kann

2/10

- Halterung zum Auftauen von Fläschchen im Wasserbad
- Stoppuhr
- Mischer
- Koagulometer
- Magnetrührstab
- Materialien zur Qualitätskontrolle (z. B. CRYOcheck Lupus Positive Control, CRYOcheck Weak Lupus Positive Control, CRYOcheck Lupus Negative Control)

Probenentnahme und -vorbereitung

Blut gemäß den CLSI-Richtlinien (Clinical and Laboratory Standards Institute)⁶ und den Richtlinien zum Nachweis von Lupus-Antikoagulantien entnehmen und aufbereiten.⁷ Patientenproben sind mit 105-109 mmol/l Tri-Natriumcitrat-Dihydrat-Antikoagulans (3,2 %) in einem Verhältnis von 9 Teilen Blut zu 1 Teil Antikoagulans zu sammeln. Patientenplasma wird durch zweifaches zentrifugieren bei 1500 x g für 15 Minuten gewonnen um thrombozytenarmes Plasma (<10.000 Thrombozyten/µl) zu erhalten und sollte bei Raumtemperatur aufbewahrt und innerhalb von vier Stunden nach der Entnahme getestet werden. Wenn Proben nicht innerhalb von vier Stunden getestet werden, sollte das Plasma aus den Zellen entfernt und bei ≤-70 °C für bis zu 2 Monate eingefroren werden. Die Proben sollten vor den Tests nicht mehr als einen Auftauzyklus durchlaufen.

Assay-Verfahren

- Die CRYOcheck Hex LA-Reagenzien gemäß den obigen Anweisungen zu Lagerung, Aufbereitung und Handhabung aufbereiten. <u>WICHTIG: Nach dem Auftauen ist sicherzustellen, dass jede</u> <u>Komponente einzeln für 5 Sekunden gevortext wird</u>. Sicherstellen, dass große Luftblasen, die durch das durchmischen entstanden sind, mit einer Transferpipette aufgestochen werden.
- Das Analysengerät ist in Übereinstimmung mit der Gebrauchsanweisung des Herstellers vorzubereiten. Protokolle für verschiedene Analysengeräte sind auf Anfrage verfügbar.
- 3. <u>WICHTIG: LA APTT muss gerührt werden</u>. LA APTT-Fläschchen öffnen, dem LA APTT-Reagens einen Magnetrührstab hinzufügen und in Rührposition in das Analysengerät einsetzen.
- 4. LA Start und LA Correct öffnen und in das Analysengerät einsetzen.
- Vor dem Test 10 Minuten warten, damit sich die geöffneten Reagenzien der Temperatur des Instruments anpassen können.
- 6. Proben in das Analysengerät laden.
- Anhand des geeigneten Geräteprotokolls die Gerinnselbildungszeit unter Verwendung von von LA Start und LA Correct messen.

Ergebnisse und Interpretation

Die Differenz der mit den LA Start- und LA Correct-Reagenzien erhaltenen Gerinnselbildungszeit (CT) in Sekunden ermitteln ("Deltakorrektur"):

Deltakorrektur = CT LA Start - CT LA Correct

Der Wert der Deltakorrektur wird dann mit einem festgelegten Assay cut-off verglichen.^{7,8} Ein Wert, der mit dem festgelegten cut-off übereinstimmt oder höher als dieser ist, wird als LA-positiv gedeutet, während ein Wert unter dem festgelegten cut-off als LA-negativ gedeutet wird.

Bei normalen Proben kann die CT von LA Correct länger sein als die CT von LA Start, was zu einem negativen Deltakorrekturwert führt. Dies hat keine Folgen und die entsprechende Probe ist als LAnegativ zu betrachten.

IFU-HEXLA-DE-REV.01 04.2023 3 / 10

Siehe auch: Pengo et al, 2009 und CLSI H60 für Richtlinien zum Nachweis von Lupus-Antikoagulantien.^{5,7}

Qualitätskontrolle

Bei sämtlichen Koagulationstests muss das Labor alle acht Betriebsstunden und bei jeder Änderung der Reagenzien mindestens zwei Kontrollstufen vorsehen.⁸

Assaykontrollen sind separat zu erwerben. Dazu zählen CRYOcheck Lupus Negative Control, CRYOcheck Weak Lupus Positive Control und CRYOcheck Lupus Positive Control. Beachten Sie das Assayzertifikat für chargenspezifische Ergebnisse mit CRYOcheck Hex LA.

Erwartete Werte

Anhand von normalen Proben wurde auf zwei Analysengeräten eine interne Normalbereichsstudie gemäß CLSI EP28:A3c⁹ durchgeführt (Analyzsengerät A, n=137; Analysengerät B, n=126). Jede Probe wurde unter Verwendung von drei CRYO*check* Hex LA-Chargen getestet. Ein gepoolter ±2 SD-Durchschnittsbereich wurde für Deltakorrekturergebnisse, wie in nachstehender Tabelle dargestellt, ermittelt.

Normal	bereich
Unterer Bereich (s)	Oberer Bereich (s)
-5,9	2,0

Cut-Off

Der cut-off für die Assay-Deltakorrektur wurde anhand der gesammelten Werte der Normalbereichsstudie errechnet, indem der +4 SD-Durchschnittswert berechnet wurde und ergab folgende Werte:

Deltakorrektur	Interpretation
< 6.0 Sekunden	LA-negativ
≥ 6.0 Sekunden	LA-positiv

Die Ergebnisse wurden unter Verwendung bestimmter Reagenzchargen erzielt. Der cut-off wird, entsprechend anerkannter Methoden für Hexagonalphasen-Neutralisationstests als Durchschnittswert der Deltakorrektur +4 SD berechnet. Diese Methode der Berechnung des cut-offs, unterscheidet sich von der Beschreibung des Bestätigungstests in Pengo et al., 2009⁵.

Jedes Labor sollte seinen eigenen cut-off berechnen, indem es das Plasma von mindestens 20 gesunden Personen testet.

Leistungsmerkmale

Alle Studien wurden unter Verwendung von CRYOcheck Hex LA auf Stago STA-R Evolution® Analysegerät(en) durchgeführt.

Methodenvergleich

Eine Methodenvergleichsstudie wurde durchgeführt, um die Wirksamkeit von CRYO*check* Hex LA beim qualitativen Nachweis von LA gegenüber dem Vergleichstest Staclot[®] LA zu bewerten. Die Studie umfasste insgesamt 446 Proben: 124 bekannte (zuvor charakterisierte) LA-positive Proben, 75 normale (vermeintlich LA-negative) Proben, 27 Proben von Personen mit anderen Krankheiten einschließlich Autoimmunerkrankungen und 220 LA Screening Patientenproben. Die Studie wurde an einem internen und drei externen Standorten durchgeführt. An jedem Standort wurde der Assay anhand der Untersuchungsvorgabeg unter Verwendung einer einzelnen CRYO*check* Hex LA-Charge durchgeführt. An einem externen Standort der als Zentrallabor fungierte, wurden die Vergleichstests bei allen 446 Proben anhand des Staclot LA-Assays auf einem STA-R Evolution-Analysegerät durchgeführt. Die Daten zeigten eine positive prozentuale Übereinstimmung von 95.6% (95% CI, 91-98%), eine negative prozentuale Übereinstimmung von 95.2% (95% CI, 92%-97%) und eine Gesamtübereinstimmung von 95.3% (95% CI, 93%-97%), wie unten dargestellt.

		CRYOcheck Hex LA Ergebnisse				
		Negativ	Positiv	Gesamt		
	Negativ	295	15	310		
Ergebnisse des Vergleichsgeräts	Positiv	6	130	136		
	Gesamt	301	145	446		

Übereinstimmung	Punktschätzung (95 % Konfidenzintervall)
Positive prozentuale Übereinstimmung	95.6% (91% - 98%)
Negative prozentuale Übereinstimmung	95.2% (92% - 97%)
Übereinstimmung insgesamt	95.3% (93% - 97%)

Präzision

Eine interne Präzisionsstudie wurde unter Verwendung von drei verschiedenen CRYO*check* Hex LA-Chargen auf einem STA-R Evolution-Analysegerät gemäß CLSI EP05-A3¹⁰ durchgeführt. Drei CRYO*check* Hex LA-Chargennummern wurden verwendet, um drei Kontrollplasmen und fünf Plasmen mit unterschiedlicher LA-Positivität zu testen. Jede Probe wurde zweifach, zweimal täglich für 20 Tage getestet. Die Ergebnisse zeigten eine gepoolte Präzision von < 5 % CV für LA Start und < 8 % CV für LA Correct.

IFU-HEXLA-DE-REV.01 04.2023 5 / 10

	Innerhalb Lal		ision	Innerhalb Laborpräzision LA Correct			
Probe	Mittelwert Gerinnselbil- dungszeit (s)	SD	%CV	Mittelwert Gerinnselbil- dungszeit (s)	SD	%CV	
CRYOcheck Lupus Negative Control	53,0	1,6	3,0	52,8	2,8	5,3	
CRYOcheck Weak Lupus Positive Control	87,3	3,2	3,7	65,4	2,8	4,2	
CRYO <i>check</i> Lupus Positive Control	125,4	5,2	4,2	79,8	4,5	5,7	
LA-negative Plasmaprobe	55,9	1,7	3,1	55,1	2,5	4,5	
Plasmaprobe mit LA nahe cut-off	67,6	2,5	3,8	58,4	2,6	4,5	
Schwach LA-positive Plasmaprobe	89,8	3,3	3,7	66,4	3,0	4,6	
Mäßig LA-positive Plasmaprobe	146,5	6,0	4,1	85,9	5,8	6,7	
Stark LA-positive Plasmaprobe	270,7	9,6	3,6	118,0	9,0	7,6	

Wiederholbarkeit

Die Studien zur Wiederholbarkeit wurden an drei Zentren durchgeführt (einem internen und zwei externen) mit drei Chargen CRYOcheck Hex LA in Übereinstimmung mit CLSI EP05-A3 10 . Bei der Studie wurden drei Kontrollplasmen und fünf Plasmen mit unterschiedlicher LA-Positivität getestet. Jede Probe wurde in dreifacher Ausführung zweimal am Tag über 5 Tage für jede der 3 Chargen cryocheck Hex LA getestet. Die Daten der drei Zentren ergaben eine gepoolte Wiederholbarkeit von < 5 % CV für LA Start und \leq 8 % CV für LA Correct, wie in den Tabellen zur Wiederholbarkeit unten zusammenfassend dargestellt wird.

	Wiederholbarkeit: LA Start								and the same		
Mittelwert Probe Gerinnselbil-	innerhalb des Durchlaufs (Wiederholbarkeit)		Innerhalb des Durchlaufs		Innerhalb des Tages		Innerhalb des Zentrums		Wiederholbarkeit		
	dungszeit (s)	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV
CRYO <i>check</i> Lupus Negative Control	52,8	1,4	2,7	0,3	0,6	0	0	0,4	0,7	1,6	3,0
CRYO <i>check</i> Weak Lupus Positive Control	85,6	3,3	3,9	0,5	0,6	0,5	0,6	1,9	2,2	3,9	4,6
CRYO <i>check</i> Lupus Positive Control	123,6	5,0	4,0	0,0	0	1,5	1,3	2,1	1,7	5,7	4,6
LA-negative Plasmaprobe	55,8	1,5	2,6	0,1	0,2	0,3	0,5	0,7	1,3	1,8	3,2
Plasmaprobe mit LA nahe cut-off	66,9	2,3	3,5	0,4	0,6	0,8	1,2	0,8	1,2	2,7	4,0
Schwach LA-positive Plasmaprobe	88,3	3,7	4,1	0	0	1,1	1,3	1,8	2,0	4,3	4,8
Stark LA-positive Plasmaprobe	264,9	6,9	2,6	0,3	0,1	2,3	0,9	4,5	1,7	10,3	3,9

IFU-HEXLA-DE-REV.01 04.2023 6 / 10

Wiederholbarkeit	Wiederholbarkeit: LA Correct										
Probe	Mittelwert Gerinnselbil-	Innerhalb des Durchlaufs (Wiederholbarkeit)		Innerhalb des Durchlaufs		Innerhalb des Tages		Innerhalb des Zentrums		Wiederholbarkeit	
	dungszeit (s)	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV
CRYO <i>check</i> Lupus Negative Control	53,7	1,7	3,1	0,8	1,6	0	0	0	0	3,1	5,8
CRYO <i>check</i> Weak Lupus Positive Control	65,7	2,4	3,6	1,0	1,5	0,7	1,0	0,7	1,1	3,1	4,8
CRYO <i>check</i> Lupus Positive Control	80,2	3,2	4,0	1,5	1,8	1,4	1,7	1,8	2,2	4,8	5,9
LA-negative Plasmaprobe	56,0	1,7	3,0	0,6	1,1	0,2	0,4	0,0	0,0	2,9	5,2
Plasmaprobe mit LA nahe cut-off	59,2	2,2	3,7	1,2	2,0	0,7	1,1	0,3	0,6	3,0	5,0
Schwach LA-positive Plasmaprobe	66,9	2,7	4,0	1,3	2,0	1,2	1,8	2,2	3,3	4,0	6,0
Stark LA-positive Plasmaprobe	117,4	4,5	3,9	3,1	2,6	2,0	1,7	2,6	2,2	9,4	8,0

Interferenzen

Interferenzstudien wurden gemäß CLSI EP07, 3. Auflage, anhand einer einzigen CRYOcheck Hex LA-Charge durchgeführt¹¹. Plasmaproben von Patienten wurden mit potenziellen Störsubstanzen versetzt und 20 Parallelproben wurden zusätzlich zu den 20 Parallelproben der entsprechenden Leerwertmatrix-Kontrolle getestet. Folgende Substanzen zeigten keine Interferenzen bis zu den angegebenen Konzentrationen:

Getestete Substanz	Testkonzentration
Hämoglobin	≤ 500 mg/dL
Bilirubin (nicht konjugiert)	≤ 20 mg/dL
Bilirubin (konjugiert)	≤ 2 mg/dL
Intralipid	≤ 500 mg/dL
Unfraktioniertes Heparin	≤ 2 IE/mL
Niedermolekulares Heparin	≤ 2 IE/mL

- Dabigatran, Rivaroxaban und Fondaparinux interferieren nicht mit der Interpretation von CRYOcheck
 Hex LA-Ergebnissen, können jedoch die Deltakorrektur LA-positiver Proben erhöhen.
- Eine erhöhte Faktor-VIII-Aktivität (bis zu 180 %) interferiert nicht mit CRYOcheck Hex LA.
- Erhöhte Fibrinogenkonzentrationen interferieren nicht mit der Interpretation von CRYOcheck Hex LA-Ergebnissen, können jedoch die Deltakorrektur LA-positiver Proben erhöhen.
- C-reaktives Protein interferiert nicht mit der Interpretation von CRYO*check* Hex LA-Ergebnissen, kann bei Konzentrationen von mehr als 15 μg/ml jedoch die Deltakorrektur LA-positiver Proben erhöhen.
- Antikörper gegen Faktor-VIII-Inhibitoren interferieren nicht mit der Interpretation von CRYOcheck Hex LA-Ergebnissen, können bei einem Titer von mehr als 15 BU/mL jedoch die Deltakorrektur LApositiver Proben erhöhen.

IFU-HEXLA-DE-REV.01 04.2023 7 / 10

- Plasmaproben mit erh\u00f6hter INR (bis zu 4,5) interferieren nicht mit der Interpretation von CRYOcheck
 Hex LA-Ergebnissen.
- Verglichen mit plättchenarmen (<10,000/ μl, einmal zentrifugiert) oder plättchenfreiem (doppelt zentrifugiert) Plasmaproben von denselben Spendern, zeigt plättchenreiches Plasma (>10,000 Plättchen/μl) Interferenzen mit CRYOcheck Hex LA.
- Abnormal erniedrigte Faktor II Werte (unter 50%) können mit CRYOcheck Hex LA bei schwach positiven LA Plasmen zu falsch negativen Ergebnissen führen.
- Faktor VII und Faktor IX Mängel interferieren nicht mit CRYOcheck Hex LA.
- Abnormal erniedrigte Faktor X Werte (unter 50%) interferieren nicht mit cryocheck Hex LA, können aber die Deltakorrektur von LA positiven Proben erhöhen.

Vorsichtsmaßnahmen/Warnungen

Verwenden Sie das Produkt nicht, wenn es nach Erhalt aufgetaut wurde oder wenn die Durchstechflaschen Risse aufweisen. Das Umfüllen von Material in einen anderen Behälter als silikonisiertes Glas oder Polypropylen kann die Leistung beeinträchtigen und wird nicht empfohlen.

Jeder schwerwiegende Vorfall, der im Zusammenhang mit der Verwendung dieses Produkts aufgetreten ist, muss dem Hersteller und der zuständigen Behörde des Mitgliedstaats gemeldet werden, in dem der Benutzer und/oder Patient niedergelassen ist.



Alle Blutprodukte sollten als potenziell infektiös behandelt werden. Das in diesem Produkt verwendete Ausgangsplasma hatte in Übereinstimmung mit den aktuell erforderlichen FDA-Tests ein negatives Testergebnis. Keine bekannten Testmethoden können die Garantie bieten, dass aus menschlichem Blut abgeleitete Produkte keine Infektionserreger übertragen. Demgemäß sollten sämtliche auf menschlichem Blut basierenden Komponenten als potenziell infektiöse Humanproben behandelt und gemäß den Empfehlungen entsorgt werden¹².

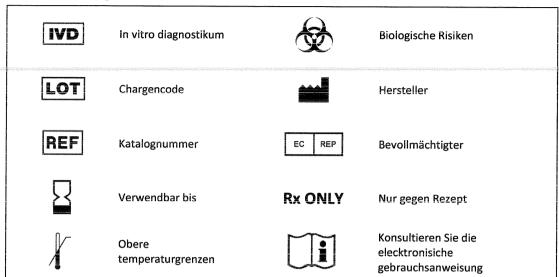
IFU-HEXLA-DE-REV.01 04.2023 8 / 10

Literatur

- Bertolaccini ML, Roch B, Amengual O, Atsumi T, Khamashta MA, Hughes GRV. Multiple antiphospholipid tests do not increase the diagnostic yield in antiphospholipid syndrome. Br. J. Rheumatol. 1998;37(11):1229-1232.
- 2. Male C, Foulon D, Hoogendoorn H, Vegh P, Silverman E, David M, Mitchell L. Predictive value of persistent versus transient antiphospholipid antibody subtypes for the risk of thrombotic events in pediatric patients with systemic lupus erythematosus. Blood. 2005;106(13):4152-4158.
- 3. Galli M, Luciani D, Bertolini G, Barbui T. Lupus anticoagulants are stronger risk factors for thrombosis than anticardiolipin antibodies in the antiphospholipid syndrome: a systematic review of the literature. Blood. 2003;101(5):1827-1832.
- Lockshin MD, Kim M, Laskin CA, Guerra M, Branch DW, Merrill J, Petri M, Porter TF, Sammaritano L, Stephenson MD, Buyon J, Salmon JE. Prediction of adverse pregnancy outcome by the presence of lupus anticoagulant, but not anticardiolipin antibody, in patients with antiphospholipid antibodies. Arthritis Rheum. 2012;64(7):2311-2318.
- 5. Pengo V, Tripodi A, Reber G, Rand JH, Ortel TL, Galli M, deGroot PG. Update of the guidelines for lupus anticoagulant detection. J. Thromb. Haemost. 2009;7(10):1737-1740.
- CLSI. Collection, Transport, and Processing of Blood Specimens for Testing Plasma-Based Coagulation Assays and Molecular Hemostasis Assays; Approved Guideline-Fifth Edition. H21-A5. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA (USA); 2008.
- 7. CLSI. Laboratory Testing for the Lupus Anticoagulant; Approved Guideline. CLSI H60-A. Wayne, PA (USA); 2014.
- 8. CLIA 2004 Code of Federal Regulations, 42CFR493.1269, 2004.
- 9. CLSI. Defining, Establishing, and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory; Approved Guideline Third Edition. CLSI C28-A3. Wayne, PA (USA); 2015.
- 10. CLSI. Evaluation of Precision of Quantitative Measurement Procedures; Approved Guideline Third Edition. EP05-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA (USA); 2014.
- CLSI. Interference Testing in Clinical Chemistry; Approved Guideline-Third Edition. EP07. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA (USA); 2018.
- 12. U.S. Department of Health and Human Services; Public Health Service. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories-Sixth Edition. Centers for Disease Control and Prevention, National Institutes of Health. Atlanta, GA (USA); 2020

IFU-HEXLA-DE-REV.01 04.2023 9 / 10

Verwendete Symbole





Europäischer autorisierter Vertreter (nur regulatorische Angelegenheiten) Emergo Europe — Westervoortsedijk 60, 6827 AT Arnhem, The Netherlands





Precision BioLogic Inc.

140 Eileen Stubbs Avenue | Dartmouth, Nova Scotia | B3B 0A9 | Canada

Tel: 1.800.267.2796 / +1.902.468.6422 Fax: 1.800.267.0796 / +1.902.468.6421

www.precisionbiologic.com

Precision BioLogic

CRYO*check™* IVD

HEX LA

Intended Use

CRYOcheck Hex LA is for clinical laboratory use as a qualitative test kit intended to aid in the detection of lupus anticoagulants (LA) in 3.2% citrated human plasma by the application of hexagonal phase phospholipids. CRYOcheck Hex LA should be used as an integrated test for lupus anticoagulant detection. For in vitro diagnostic use. The performance of this device has not been established in neonate and pediatric patient populations.

Summary and Principle

Lupus anticoagulants (LA) are heterogeneous autoantibodies, mainly of the IgG and IgM type, which are directed against phospholipids (PL) or phospholipid-protein complexes involved in coagulation¹. LA antibodies are detected in patients' plasma by PL-dependent clotting assays. There is a significant association between LA and increased risk of clinical complications such as thrombotic events^{2,3} and recurrent fetal loss⁴. Medical diagnosis of LA is based on clinical symptoms and laboratory results. There is no gold standard test for LA. Considering the complexity of mechanism and the heterogeneous nature of LA antibodies, application of different clotting tests that work based on different principles has been recommended⁵.

LA prolongs clot formation of PL-dependent coagulation (LA screening) tests in vitro, such as LA-sensitive activated partial thromboplastin time (APTT) or dilute Russell's Viper Venom Time (dRVVT) screen. To confirm the presence of LA in a plasma sample, correction of a prolonged clot time by extra PL (an LA confirmatory test) needs to be performed by laboratories as well as ruling out other abnormalities, such as factor deficiency and heparin presence⁵.

CRYOcheck Hex LA is an integrated (screen and confirm) silica-based APTT assay for qualitative LA detection. The presence of LA in a plasma sample is confirmed by the correction of the APTT clot time (CT) of the sample upon the addition of a reaction mixture containing hexagonal phase PL. CRYOcheck Hex LA incorporates a pooled normal plasma (mixing test) and a heparin neutralizer.

Reagents

- LA Start: Pooled normal plasma with buffer and a heparin neutralizer.
- LA Correct: Pooled normal plasma with buffer, a heparin neutralizer, and inverted hexagonal phase phospholipid.
- LA APTT: Silica-based LA sensitive APTT reagent with stabilizer.

For prescription use only.

Storage, Preparation and Handling

When stored at -70 °C or below, CRYOcheck Hex LA is stable to the end of the month indicated on the product packaging.

Thaw one vial each of LA Start, LA Correct and LA APTT at 37 $^{\circ}$ C (\pm 1 $^{\circ}$ C) in a waterbath for 5 minutes using the waterbath "floatie" thawing device (available separately). Thawing times are important and should be strictly adhered to. **The use of a dry bath or heating block for thawing is not recommended.** The use of a timer is recommended.

IMPORTANT: All reagents must be vortexed prior to use. After thawing, immediately vortex all capped reagent vials. Ensure each component is vortexed individually for 5 seconds, as insufficient vortexing of reagents may reduce the LA sensitivity of the assay. Ensure any large air bubbles produced as a result of vortexing are broken using a transfer pipette.

<u>IMPORTANT: LA APTT must be stirred when in use.</u> Add a micro magnetic stir bar to LA APTT prior to loading in a stirring position on the instrument.

Once thawed, CRYOcheck Hex LA may be used for 8 hours on board the analyzer, or for 4 hours if capped in the original vials and maintained at room temperature (18-25 °C). If stored at room temperature, invert capped APTT vial 5 times prior to loading on board instrument. **Do NOT store** CRYOCheck Hex LA reagents in a refrigerator (at 2-8 °C).

NB: CRYOcheck Hex LA components are lot-specific and should not be interchanged with other lot numbers.

Availability

Product	Catalog #	Format
		LA Start: 2 x 1.5 mL (white cap)
	HEXLA	LA Correct: 2 x 1.5 mL (purple cap)
		LA APTT: 2 x 3.0 mL (black cap)
		LA Start: 2 x 1.5 mL (white cap)
cryo <i>check</i> Hex LA	HEXLA-7	LA Correct: 2 x 1.5 mL (purple cap)
İ		LA APTT: 3 x 3.0 mL (black cap)
		LA Start: 2 x 1.0 mL (white cap)
	HEXLA-M	LA Correct: 2 x 1.0 mL (purple cap)
		LA APTT: 2 x 2.0 mL (black cap)

Instruments

Each lab should prepare the local instrument in accordance with the manufacturer's instructions for use. Protocols for coagulation instruments are available upon request.

Procedure

Materials Provided

■ CRYOcheck Hex LA (LA Start, LA Correct, LA APTT)

Materials Required but not Provided

0.025 M CaCl₂

- Waterbath capable of maintaining 37 °C (± 1 °C)
- Floatie for thawing vials in waterbath
- Timer
- Vortex
- Coagulometer
- Micro magnetic stir bar
- Quality control materials (e.g. CRYOcheck Lupus Positive Control, CRYOcheck Weak Lupus Positive Control, CRYOcheck Lupus Negative Control)

Specimen Collection and Preparation

Collect and process blood in accordance with Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines and the guidelines for lupus anticoagulant detection. Patient samples should be collected into 105-109 mmol/L trisodium citrate dihydrate anticoagulant (3.2%) in a ratio of 9 parts blood to 1 part anticoagulant. Patient plasma is derived by double centrifugation at 1500 x g for 15 minutes in order to achieve platelet poor plasma (<10,000 platelets/ μ L) and should be tested within four hours of collection when maintained at room temperature. If samples are not to be tested within four hours, then plasma should be removed from the cells and frozen at \leq -70 °C for up to 2 months. Samples should not undergo more than one freeze-thaw cycle prior to testing.

Assay Procedure

- Prepare CRYO*check* Hex LA reagents according to Storage, Preparation and Handling
 instructions above. IMPORTANT: after thawing, ensure each component is vortexed
 individually for 5 seconds. Ensure any large air bubbles produced as a result of vortexing are
 broken using a transfer pipette.
- Prepare instrument according to the manufacturer's instructions for use. Protocols for coagulation instruments are available upon request.
- IMPORTANT: LA APTT must be stirred. Uncap LA APTT vial, add a micro magnetic stir bar to LA APTT reagent and load in a stirring position on the instrument.
- 4. Uncap LA Start and LA Correct vials and load on the instrument.
- 5. Allow uncapped reagents to acclimate to the instrument temperature for at least 10 minutes before testing.
- 6. Load samples on the instrument.
- 7. Measure LA Start and LA Correct clot times using the appropriate instrument protocol.

Results and Interpretation

Calculate the difference in clot time (CT) in seconds ("delta correction") obtained with the LA Start and LA Correct reagents:

Delta Correction = CT LA Start - CT LA Correct

The delta correction result is then compared to an established assay cut-off^{7,8}. A result greater than or equal to the established cut-off is considered LA positive, while a result less than the established cut-off is considered LA negative.

On normal samples, the CT of LA Correct may be longer than the CT of LA Start, resulting in a negative delta correction value. This is of no consequence, and the sample in question should be considered LA negative.

Refer to Pengo et al, 2009 and CLSI H60 for guidelines on lupus anticoagulant detection^{5,7}.

IFU-HEXLA-EN-REV.01 04.2023 3/9

Quality Control

For all coagulation tests, the laboratory must include at least two levels of control for every eight hours of operation and any time a change in reagents occurs⁹.

Assay controls are available for purchase separately. These include CRYOcheck Lupus Negative Control, CRYOcheck Weak Lupus Positive Control and CRYOcheck Lupus Positive Control. Refer to the Assay Certificate for results with CRYOcheck Hex LA specific to each lot of control.

Expected Values

A normal range study was performed in-house on two analyzers using normal samples (Analyzer A, n=137; Analyzer B, n=126) according to CLSI EP28: $A3c^8$. Each sample was tested using three lots of CRYO*check* Hex LA. A pooled mean \pm 2 SD range was determined for delta correction results and is shown in the table below.

Normal	Range
Lower Range (s)	Upper Range (s)
-5.9	2.0

Cut-Off

The cut-off for the assay delta correction was determined using pooled data from the normal range study and calculating the mean + 4 SD, with the following results:

Delta Correction	Interpretation
< 6.0 seconds	LA Negative
≥ 6.0 seconds	LA Positive

The results were obtained using specific lots of reagent. The cut-off is calculated as the mean of the delta correction + 4 SD, consistent with accepted methods for hexagonal phase neutralization tests. This method of establishing cut-off is different than that indicated for confirmatory tests in Pengo et al., 2009⁵. Each laboratory should verify its own cut-off, by testing the plasma of at least 20 normal individuals.

Performance Characteristics

All studies were performed using CRYOcheck Hex LA on Stago STA-R Evolution® analyzer(s).

Method Comparison

A method comparison study was conducted to assess the efficacy of CRYOCheck Hex LA in the qualitative detection of LA relative to a comparator assay, Staclot® LA. A total of 446 samples were included in the study: 124 known (previously characterized) LA positive samples, 75 normal (presumed LA negative) samples, 27 samples from individuals with other medical conditions including autoimmune disorders and 220 LA target screening population samples. The study was conducted at one internal and three external sites. Each site performed the investigational device assay on their assigned portion of the samples using a single lot of CRYOCheck Hex LA. One external site, acting as the central laboratory, performed the comparator device testing on all 446 samples using the Staclot LA assay on a STA-R Evolution. The data demonstrated positive percent agreement of 95.6% (95% CI, 91-98%), negative

percent agreement of 95.2% (95% CI, 92%-97%), and overall agreement of 95.3% (95% CI, 93%-97%) as summarized below.

		CRYC	cryo <i>check</i> Hex LA results					
		Negative	Positive	Total				
	Negative	295	15	310				
Comparator device results	Positive	6	130	136				
	Total	301	145	446				

Agreement	Point Estimate (95% Confidence Interval)
Positive Percent Agreement	95.6% (91% - 98%)
Negative Percent Agreement	95.2% (92% - 97%)
Overall Agreement	95.3% (93% - 97%)

Precision

An internal precision study was performed using three different lots of CRYO*check* Hex LA on a STA-R Evolution analyzer in accordance with CLSI EP05-A3 10 . Three lot numbers of CRYO*check* Hex LA were used to test three control plasmas and five plasmas with varying LA positivity, in duplicate, twice a day for 20 days. The results demonstrated a pooled precision of < 5% CV for LA Start and < 8% CV for LA Correct.

	Within-Lab	oratory LA Start)	Precision	Within-Laboratory Precision (LA Correct)			
Sample	Mean Clot Time (s)	SD	%CV	Mean Clot Time (s)	SD	%CV	
CRYOcheck Lupus Negative Control	53.0	1.6	3.0	52.8	2.8	5.3	
CRYOcheck Weak Lupus Positive Control	87.3	3.2	3.7	65.4	2.8	4.2	
CRYO <i>check</i> Lupus Positive Control	125.4	5.2	4.2	79.8	4.5	5.7	
LA Negative PlasmaSample	55.9	1.7	3.1	55.1	2.5	4.5	
LA Near Cut-OffPlasma Sample	67.6	2.5	3.8	58.4	2.6	4.5	
LA Weak Positive Plasma Sample	89.8	3.3	3.7	66.4	3.0	4.6	
LA Moderate Positive Plasma Sample	146.5	6.0	4.1	85.9	5.8	6.7	
LA Strong Positive Plasma Sample	270.7	9.6	3.6	118.0	9.0	7.6	

Reproducibility

Reproducibility studies were conducted at three sites (one internal and two external) using three lots of CRYOCheck Hex LA in accordance with CLSI_EP05-A3 10 . The study tested three control plasmas as well as five plasmas with varying LA positivity. Each sample was tested in triplicate, twice a day for 5 days for each of the 3 lots of CRYOCheck Hex LA. The data across three sites demonstrated a pooled reproducibility of < 5% CV for LA Start and \leq 8% CV for LA Correct as summarized in the reproducibility tables below.

Reproducibility: LA Start											
Sample	Mean ClotTime	Within-Run (Repeatability)		Between-Run		Between-Day		Between-Site		Reproducibility	
	(s)	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV
cryo <i>check</i> Lupus Negative Control	52.8	1.4	2.7	0.3	0.6	0	0	0.4	0.7	1.6	3.0
cryocheck Weak Lupus Positive Control	85.6	3.3	3.9	0.5	0.6	0.5	0.6	1.9	2.2	3.9	4.6
cryocheck Lupus Positive Control	123.6	5.0	4.0	0	0	1.5	1.3	2.1	1.7	5.7	4.6
LA Negative Plasma Sample	55.8	1.5	2.6	0.1	0.2	0.3	0.5	0.7	1.3	1.8	3.2
LA Near Cut-Off Plasma Sample	66.9	2.3	3.5	0.4	0.6	0.8	1.2	0.8	1.2	2.7	4.0
LA Weak Positive Plasma Sample	88.3	3.7	4.1	0	0	1.1	1.3	1.8	2.0	4.3	4.8
LA Strong Positive Plasma Sample	264.9	6.9	2.6	0.3	0.1	2.3	0.9	4.5	1.7	10.3	3.9

Reproducibility: LA Correct											
Sample	Mean ClotTime	Within-Run (Repeatability)		Between-Run		Between-Day		Between-Site		Reproducibility	
	(s)	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV
cryocheck Lupus Negative Control	53.7	1.7	3.1	0.8	1.6	0	0	0	0	3.1	5.8
cryocheck Weak Lupus Positive Control	65.7	2.4	3.6	1.0	1.5	0.7	1.0	0.7	1.1	3.1	4.8
cryocheck Lupus Positive Control	80.2	3.2	4.0	1.5	1.8	1.4	1.7	1.8	2.2	4.8	5.9
LA Negative Plasma Sample	56.0	1.7	3.0	0.6	1.1	0.2	0.4	0	0	2.9	5.2
LA Near Cut-Off Plasma Sample	59.2	2.2	3.7	1.2	2.0	0.7	1.1	0.3	0.6	3.0	5.0
LA Weak Positive Plasma Sample	66.9	2.7	4.0	1.3	2.0	1.2	1.8	2.2	3.3	4.0	6.0
LA Strong Positive Plasma Sample	117.4	4.5	3.9	3.1	2.6	2.0	1.7	2.6	2.2	9.4	8.0

Interferences

Interference studies were conducted according to CLSI EP07, 3rd ed. using a single lot of CRYOcheck Hex LA¹¹. Patient plasma samples were spiked with possible interferents and 20 replicates were tested alongside 20 replicates of the corresponding blank matrix control. The following substances showed no interference up to the concentrations indicated:

Substance Tested	Test Concentration
Hemoglobin	≤ 500 mg/dL
Bilirubin (unconjugated)	≤ 20 mg/dL
Bilirubin (conjugated)	≤ 2 mg/dL
Intralipid	≤ 500 mg/dL
Unfractionated heparin	≤ 2 IU/mL
Low molecular weight heparin	≤2 IU/mL

- Dabigatran, rivaroxaban, and fondaparinux do not interfere with the interpretation of cryocheck Hex
 LA results but may increase the delta correction of LA positive samples.
- Elevated factor VIII activity (up to 180%) does not interfere with CRYOcheck Hex LA.
- Elevated fibrinogen concentrations do not interfere with the interpretation of CRYOcheck Hex LA results but may increase the delta correction of LA positive samples.
- C-reactive protein does not interfere with the interpretation of CRYOCHeck Hex LA results but at concentrations above 15 μg/mL may increase the delta correction of LA positive samples.

IFU-HEXLA-EN-REV.01 04.2023 6/9

- Factor VIII inhibitor antibodies do not interfere with the interpretation of CRYOcheck Hex LA results, but at titers above 15 BU/mL may increase the delta correction of LA positive samples.
- Plasma samples with elevated INR (up to 4.5) do not interfere with the interpretation of CRYOcheck Hex LA results.
- High platelet counts (>10,000 platelets/μL) showed interference with CRYOcheck Hex LA results when compared with platelet poor (<10,000/μL, single centrifuged) or platelet free (double centrifuged) plasma samples from the same donors.
- Abnormally low factor II activities (below 50%) may interfere with the interpretation of CRYOcheck Hex
 LA, potentially resulting in false negative results for weakly LA positive plasmas.
- Factor VII and factor IX deficiencies do not interfere with CRYOcheck Hex LA.
- Abnormally low factor X activities (below 50%) do not interfere with the interpretation of cryocheck
 Hex LA results but may increase the delta correction for LA positive samples.

Precautions/Warnings

Do not use the product if it is thawed upon receipt or if the vials appear cracked. Transferring the material into another container other than siliconized glass or polypropylene could have a performance impact and is not recommended.

Any serious incident that has occurred in relation to the use of this device shall be reported to the manufacturer and the competent authority of the Member State in which the user and/or patient is established.



All blood products should be treated as potentially infectious. Source material from which this product was derived was found to be negative when tested in accordance with current required tests for transfusion-transmitted diseases. No known test methods can offer assurance that products derived from human blood will not transmit infectious agents. Accordingly, these human blood-based products should be handled and discarded as recommended for any potentially infectious human specimen¹².

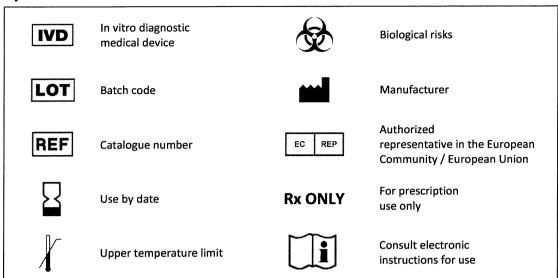
IFU-HEXLA-EN-REV.01 04.2023 7/9

Bibliography

- Bertolaccini ML, Roch B, Amengual O, Atsumi T, Khamashta MA, Hughes GRV. Multiple antiphospholipid tests do not increase the diagnostic yield in antiphospholipid syndrome. Br. J. Rheumatol. 1998;37(11):1229-1232.
- Male C, Foulon D, Hoogendoorn H, Vegh P, Silverman E, David M, Mitchell L. Predictive value of persistent versus transient antiphospholipid antibody subtypes for the risk of thrombotic events in pediatric patients with systemic lupus erythematosus. Blood. 2005;106(13):4152-4158.
- 3. Galli M, Luciani D, Bertolini G, Barbui T. Lupus anticoagulants are stronger risk factors for thrombosis than anticardiolipin antibodies in the antiphospholipid syndrome: a systematic review of the literature. Blood. 2003;101(5):1827-1832.
- Lockshin MD, Kim M, Laskin CA, Guerra M, Branch DW, Merrill J, Petri M, Porter TF, Sammaritano L, Stephenson MD, Buyon J, Salmon JE. Prediction of adverse pregnancy outcome by the presence of lupus anticoagulant, but not anticardiolipin antibody, in patients with antiphospholipid antibodies. Arthritis Rheum. 2012;64(7):2311-2318.
- Pengo V, Tripodi A, Reber G, Rand JH, Ortel TL, Galli M, deGroot PG. Update of the guidelines for lupus anticoagulant detection. J. Thromb. Haemost. 2009;7(10):1737-1740.
- CLSI. Collection, Transport, and Processing of Blood Specimens for Testing Plasma- Based Coagulation Assays and Molecular Hemostasis Assays; Approved Guideline- Fifth Edition. H21-A5. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA (USA); 2008.
- 7. CLSI. Laboratory Testing for the Lupus Anticoagulant; Approved Guideline. CLSI H60-A. Wayne, PA (USA); 2014.
- 8. CLSI. Defining, Establishing, and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory; Approved Guideline Third Edition. CLSI C28-A3. Wayne, PA (USA); 2015.
- 9. CLIA 2004 Code of Federal Regulations, 42CFR493.1269, 2004.
- CLSI. Evaluation of Precision of Quantitative Measurement Procedures; Approved Guideline Third Edition. EP05-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA (USA); 2014
- CLSI. Interference Testing in Clinical Chemistry; Approved Guideline-Third Edition. EP07. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA (USA); 2018.
- U.S. Department of Health and Human Services; Public Health Service. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories-Sixth Edition. Centers for Disease Control and Prevention, National Institutes of Health. Atlanta, GA (USA); 2020.

IFU-HEXLA-EN-REV.01 04.2023 8/9

Symbols Used





European Authorized Representative (Regulatory affairs only)
Emergo Europe— Westervoortsedijk 60, 6827 AT Arnhem, The Netherlands





Precision BioLogic Inc.

140 Eileen Stubbs Avenue | Dartmouth, Nova Scotia | B3B 0A9 | Canada

Tel: 1.800.267.2796 / +1.902.468.6422 Fax: 1.800.267.0796 / +1.902.468.6421

www.precisionbiologic.com