



HEMOCLLOT™ LA-S

REF CK090K (6 x 1 ml)

REF CK094K (12 x 2 ml)

HEMOCLLOT™ LA-C

REF CK091K (6 x 1 ml)

Detekce Lupus antikoagulant koagulačním testem



www.hyphen-biomed.com

155, rue d'Eragny
95000 NEUVILLE SUR OISE
FRANCE

Tel. : +33 (0)1 34 40 65 10
Fax : +33 (0)1 34 48 72 36
info@hyphen-biomed.com

Poslední revize: 01/2023

POUŽITÍ:

HEMOCLLOT™ LA-S a HEMOCLLOT™ LA-C soupravy jsou řaděné Russell's Viper Venom Test (dRVVT) reagentie pro specifickou in vitro kvantitativní detekci Lupus antikoagulant (LA) v lidské citrátové plazmě za použití manuální nebo automatické koagulační metody.

- **HEMOCLLOT™ LA-S:** Reagentie dRVV pro screening přítomnosti LA
- **HEMOCLLOT™ LA-C:** Reagentie dRVV s vysokým obsahem fosfolipidů k potvrzení přítomnosti Lupus antikoagulant.

SOUHRN:

Technický¹:

Jako Lupus antikoagulant se označují protilátky zaměřené proti komplexům fosfolipid/protein s elektronegativním nábojem. Tyto protilátky prodlouží koagulační časy fosfolipid dependentních testů. Koagulační čas (CT) LA-S (nízký počet fosfolipidů) je předpokládán prodloužen v přítomnosti LA. LA-C (vysoký počet fosfolipidů) by pak měl neutralizovat LA a zkrátit CT.

Klinický¹⁻⁵:

Jsou spojeny s četnými patologickými stavy jako např. Lupus, autoimunní choroby, trombózy, opakované potraty. Jejich přítomnost musí být obvykle potvrzena opakovaným testováním.

PRINCIP TESTU:

V přítomnosti vápníku a Faktoru X obsažených v testovaném vzorku je FX přímo aktivován na FXa hadím jedem (RVV). Za účasti FV, vápníku a fosfolipidů pak FXa štěpí FII na FIIa, což vede rychle k vytvoření koagula. Abnormality nebo deficit faktorů kontaktní fáze, FVII, FVIII a FIX neovlivní výsledek testu.

HEMOCLLOT™ LA-S má nízkou koncentraci fosfolipidů a v přítomnosti LA v testované plazmě je koagulační čas prodloužen.

HEMOCLLOT™ LA-C obsahuje vyšší koncentraci fosfolipidů, které vyvazují LA přítomný ve vzorku testované plazmy a koagulační čas je pak kratší než u screeningového testu.

V reagentii je přítomna heparin-neutralizující látka (není vliv heparinu do koncentrace 1IU/ml).

REAGENCIE:

REF CK090K ▶ **REF 6 lahviček po 1 ml**
REF CK094K ▶ **REF 12 lahviček po 2 ml**

REF CK091K ▶ **REF 6 lahviček po 1 ml**

REF CK091K ▶ **REF 6 lahviček po 1 ml**

REF CK091K ▶ **REF 6 lahviček po 1 ml**

UPOZORNĚNÍ:

- Některé reagentie obsahují materiál zvířecího původu. Manipulujte s produktem dle všech bezpečnostních opatření jako s potencionálně infekčním.
- Zacházení s odpadem musí být přízpůsobeno lokálním předpisům.
- Používejte pouze reagentie stejné šarže.
- Studie stability ukazují, že reagentie mohou být převáženy za pokojové teploty bez degradace.
- Pouze pro diagnostické použití in vitro.

PŘÍPRAVA REAGENCIE:

Lahvičky jsou uzavřeny pod vakuem. Zátky odstraňujte opatrně, aby nedošlo ke ztrátě lyofilizátu při otevírání.

REF CK090K / CK091K ▶ **1 ml destilované vody**

REF CK094K ▶ **2 ml destilované vody**

Dobře promíchejte do úplného rozpuštění, zabraňte tvorbě pěny, a ihned vložte do analyzátoru dle příslušného aplikačního protokolu.

Pro manuální metodu nechte reagentie stabilizovat 30 při pokojové teplotě (18-25°C), před použitím homogenizujte.

SKLADOVÁNÍ A STABILITA:

Neotevřené reagentie musí být skladovány při 2-8°C v originálním balení. Pak jsou použitelné do doby expirace uvedené na obalu.

REF Stabilita rekonstituované reagentie, pokud je zabráněno kontaminaci a odpařování, a pokud je uchovávána uzavřena v originální lahvičce:

- **7 dní** při 2-8°C
- **24 hodin** za pokojové teploty (18-25°C)
- **2 měsíce** při -20°C nebo nižší*

*Rozmrazujte pouze jednou co nejrychleji při 37°C a ihned použijte.

REAGENCIE A MATERIÁL POTŘEBNÝ, ALE NEDODANÝ:

Reagentie:

- Destilovaná voda, přednostně sterilní.
- Vhodný kontrolní materiál pro normální a abnormální výsledek LA např.:

Název produktu	Reference
BIOPHEN™ Normal Control Plasma	223201
LA Control Plasma	SC081K / SC082K / SC083K

Odkazujeme na specifický aplikační protokol pro daný analyzátor.

Materiál:

- Elektromagnetická vodní lázeň, poloautomatický nebo automatický koagulometr.
- Stopky, kalibrované pipety, testovací zkumavky z plastu nebo silikonového skla.

PŘÍPRAVA VZORKU:

Krev (9 dílů) musí být opatrně odebrána do 0,109 M (3,2%) citrátového antikoagulantia (1 díl), přímou venepunkcí. První odebraná zkumavka by měla být znehodnocena.

Vzorky by měly být připraveny a skladovány dle relevantních řádů (CLSI H21-A5⁶).

Pro skladování plazmy se odkažte na reference⁵⁻⁸.

PROVEDENÍ:

Doporučuje se testovat HEMOCLLOT™ LA-S a LA-C společně.

Vzorky mějte neřaděné.

Soupravy jsou určeny pro manuální nebo automatické koagulační stanovení. Test probíhá za teploty 37°C±1°C, měří se koagulační čas. Koagulace je spuštěna přidáním reagentie.

Testovací metody:

1. Rekonstituujte kontroly dle jejich příbalového letáku.
2. Vzorek je testován **neřaděný**.
3. Princip: detekce koagulačního času mechanickou nebo optickou metodou. Předehřejte na 37°C patřičný objem reagentie (0,2 ml na test).

Do malé testovací zkumavky potom přidejte:

	Objem
Testovaná plazma	200 µl
Inkubujte při 37°C 1-2 minuty , potom přidejte (a zapněte stopky):	
REF předehřátá na 37°C	200 µl
Zaznamenejte přesný koagulační čas (CT, sec)	

Pokud jsou zapotřebí jiné objemy, než je napsáno výše, poměr objemů musí být zachován. Uživateli je zodpovědný za validaci jakýchkoliv změn a jejich dopadu na výsledky.

Pro automatickou metodu se odkažte na specifický aplikační protokol pro použitý analyzátor.

KONTROLA KVALITY:

Použití kontrolních plazem umožní validovat shodu metody a homogenitu reaktivity mezi šaržemi za použití stejné šarže reagentie.

Kontrola kvality musí být začleněna do každé testovací série, podle správných laboratorních postupů, aby byly získané výsledky validní. Proveďte novou verifikaci normálního rozmezí alespoň pro každou novou šarži reagentie, po každé významné opravě analyzátoru, nebo pokud jsou kontroly mimo přijatelné rozmezí pro danou metodu.

Koagulační časy získané za použití stejné šarže reagentie mohou mírně kolísat dle použitého přístroje a citlivosti detekce koagula.

Každá laboratoř by měla verifikovat svoje vlastní přijatelné rozmezí kontrolních materiálů pro konkrétní podmínky (přístroj, pipetovací protokol, šarže reagentie, šarže kontrol).

VÝSLEDEK:

Výsledky testů by měly být hodnoceny dle místních doporučení a regulací (např.: reference 4, 5, 8).

Pro každou novou šarži HEMOCLOT LA-S a LA-C zjistíte průměr normálního času dle místních doporučení.^{4,8}

Výsledky mohou být vykazovány jako čas koagulace nebo jako poměr.

Poměr se počítá následovně:

HEMOCLOT™ LA-S: LA-S poměr = Vzorek LA-S (CT, s) / Průměr normálního rozmezí pro LA-S (CT, s).

HEMOCLOT™ LA-C: LA-C poměr = Vzorek LA-C (CT, s) / Průměr normálního rozmezí pro LA-C (CT, s).

Normalizovaný LA poměr = LA-S poměr / LA-C poměr

V případě abnormálního nebo hraničního výsledku (abnormálně prodloužený čas koagulace a/nebo pokud je normalizovaný poměr LA \geq 1,20 nebo lokální cut-off hodnoty) musí být výsledky potvrzeny oběma následujícími způsoby:

Směsné testy, 50:50 testované a normální plazmy, pro průzkum deficitů faktorů nebo inhibitorů^{4,5,8}. Směsné testy jsou často prováděny u screeningových měření. Směsný test jako konfirmace může být proveden, pokud neřaděná měřená plazma vykazuje prodloužený koagulační čas.

Ostatní LA detekční metody, s jinými principy měření, například aPTT^{4,5,8}.

Výsledky by měly být vždy interpretovány dle klinického a biologického stavu pacienta a výsledků ostatních vyšetření.

LIMITY:

- Abyste zajistili optimální výkon testu a dostali potřebným specifikacím, technické instrukce validované společností HYPHEN BioMed musí být pozorně dodrženy.
- Reagentie neobvyklého vzhledu nebo vykazující známky kontaminace musí být znehodnocena.
- Podezřelý vzorek, nebo vzorek vykazující známky aktivace musí být znehodnocen.
- Nedoporučuje se vyšetřovat LA u nemocných léčených heparinem^{4,5}. Nicméně reagentie HEMOCLOT™ LA-S a LA-C obsahují inhibitor heparinu, který neutralizuje heparin do 1 IU/ml. Doporučuje se měřit anti-FXa aktivitu společně s LA u pacientů léčených heparinem (LMWH nebo UFH)⁴.
- Dle potřeby proveďte měření PT/INR, aPTT, TT a fibrinogenu pro vytvoření lepšího přehledu o koagulopatii pacienta⁴.
- Dle stávajících studií se nedoporučuje provádět dRVVT u vzorků s Vitamin K antagonisty nebo přímými orálními antikoagulans (VKA nebo DOAC), jelikož mohou mít nepředvídatelné následky na měření, nebo, jako u léků ovlivňující akutní fázi, velmi nízkou hladinu Faktoru II. Opakovaná konfirmace nebo měření může být použita, když je pacientovi vysazena terapie^{4,5,8}.
- Měření během těhotenství může vykazovat falešně pozitivní nebo falešně negativní výsledky. Interpretace na uvážení, popřípadě opakování po porodu⁴.
- Komerční normální kontrolní plazmy s nespecifickým citrátem a hladinou destiček nejsou vhodné pro směsné testy^{4,8}.
- Pro další vyšetření abnormálních vzorků by měly být použity nejméně 2 další screeningové testy s rozlišnou citlivostí a s různými vlastnostmi. Hraniční výsledky by měly být posuzovány společně s ostatními markery APS, jako jsou protilátky proti kardioplipinu a beta-2-glykoproteinu I. LA pozitivní výsledky by měly být potvrzeny dalším odběrem alespoň 12 týdnů po prvotním odběru⁴.
- Pro porovnávací měření doporučujeme testovat HEMOCLOT™ LA-S a LA-C společně.
- Ikterická, lipemická, hemolytická plazma nebo plazma abnormálního vzhledu (např.: částečná koagulace), mohou dávat falešně negativní výsledky.

OČEKÁVANÉ HODNOTY:

LA je negativní v normální lidské plazmě.

Každá laboratoř by si měla stanovit vlastní normální meze dle kombinace použité reagentie, přístroje a protokolu.

CHARAKTERISTIKA:

- Ve vnější studii, výsledky ukazují podobnou distribuci 59 dRVVT pozitivních vzorků a 62 normálních vzorků oproti komerčním dRVV Screen and Confirm produktům.
- Byly provedeny studie výkonu, interně na Sysmex CS-5100. Měření bylo provedeno laboratorními kontrolami po dobu 6 dní, 2 série denně, 2 opakování v každé sérii pro kontrolní hladinu. Byly získány následující výsledky:

kontrola	Intra assay			Inter assay		
	Normal	Abnormal		Normal	Abnormal	
Test	LA-S	LA-S	LA-C	LA-S	LA-S	LA-C
N	30	30	30	24	24	24
Prům.(sec)	32,1	84,2	37,0	31,6	84,4	37,0
SD (sec)	0,19	1,05	0,26	0,66	1,16	0,33
CV%	0,59	1,24	0,71	2,10	1,38	0,89

- Korelace s referenční metodou (Siemens LA1/LA2 vs HEMOCLOT™ LA-S/LA-C na Sysmex CS-5100):

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

- **Interference:**

Žádné interference na analyzátoru Sysmex CS-5100 nebyly zaznamenány do následujících koncentrací:

Hemoglobin	Bilirubin (konjugovaný)	Intralipidy	Hepariny (UFH/LMWH)
500 mg/dl	25 mg/dl	250 mg/dl	1 IU/ml

REFERENCE:

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

SYMBOLY:

Použité znaky a symboly jsou v seznamu ISO 15223-1 standard, viz dokument definice symbolů.