

american diagnostica inc.
500 West Avenue, Stamford, Connecticut 06902
Tel. + 1 203 602-7777 • Fax + 1 203 602-2221



DVVtest® 10 (REF 810) / 25 (REF 825)



DVVconfirm® 5 (REF 815) / 10 (REF 815L)



american diagnostica GmbH
Kaplaneigasse 35, D-64319 Pfungstadt, Germany
Tel. + 49 61 57 / 99 08 99 • Fax + 49 61 57 / 99 08 08

- Produkt 810: 10 Fläschchen mit je 2 mL Reagenz nach Rekonstitution
- Produkt 825: 10 Fläschchen mit je 5 mL Reagenz nach Rekonstitution
- Produkt 815: 10 Fläschchen mit je 1 mL Reagenz nach Rekonstitution
- Produkt 815L: 10 Fläschchen mit je 2 mL Reagenz nach Rekonstitution

ANWENDUNGSBEREICH

DVVtest® ist ein vereinfachter "dilute Russell's Viper Venom Time (dRVVT)" Test zum Nachweis von Lupus Antikoagulans (LA) in Humanplasma. **DVVconfirm®** dient zur Bestätigung von LA in Plasma, welches im **DVVtest** positiv bewertet wurde. **DVVtest** und **DVVconfirm** sind Ein-Schritt-Gerinnungstests. Sie sind für die manuelle, halbautomatische und vollautomatische Durchführung geeignet.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Identifizierung von Lupus Antikoagulans (LA) in Plasma ist ein wichtiger Schritt in der Diagnostik des Antiphospholipid-Syndroms (APS). APS ist klinisch charakterisiert durch arterielle/venöse Thrombosen, wiederholte spontane Aborte, Thrombozytopenien und/oder verschiedene neurologische Störungen¹. LA wird auch bei der Einnahme bestimmter Medikamente, wie u.a. Chlorpromazin, Procainamid und Thorazin und anderer Antibiotika, beobachtet. LA wurde erstmals 1952 von CONLEY und HARTMANN² bei Patienten mit systemischem Lupus erythematoses (SLE) beschrieben. In der Folgezeit wurde gefunden, dass LA häufiger bei Patienten auftritt, die nicht an SLE erkrankt waren.³ LA sind Autoantikörper gegen Protein/Phospholipid-Komplexe, wobei bei der Komplexbildung verschiedene Phospholipidbindende Proteine, wie β 2-Glycoprotein-1 (β 2GP1), Prothrombin und Annexin V, sowie verschiedene anionische Phospholipide, wie z.B. Cardiolipin, Phosphatidylinositol oder Phosphatidylserin, eine Rolle spielen.⁴ LA sind Immunglobuline der IgG-, IgM- oder IgA-Klasse. Sie bewirken eine Verlängerung der Gerinnungszeit in Phospholipid-abhängigen *in vitro*-Gerinnungstests (z.B. der aktivierten partiellen Thromboplastinzeit (aPTT), der „dilute Prothrombin Time“ (dPT), der Textarin-Zeit oder des dRVVT). Die Internationale Gesellschaft für Thrombose und Hämostase (Scientific Subcommittee "Criteria on Lupus Anticoagulants and Phospholipid-dependent Antibodies") hat empfohlen, zum diagnostischen Nachweis von LA einen Gerinnungs-Screening-Test und einen Bestätigungstests mit hoher Phospholipid-Konzentration einzusetzen⁵. American Diagnostica Inc. hat den **DVVtest** als einen Screening-Test und dazugehörig den **DVVconfirm** als Bestätigungstest mit hoher Phospholipidkonzentration entwickelt. **DVVtest** und **DVVconfirm** sind in ihrer Zusammensetzung so optimiert, daß bei hoher Empfindlichkeit und Spezifität für LA der Einfluß von Heparin gering ist.

TESTPRINZIP

Das **DVVtest** Reagenz enthält das Gift der Russell-Viper, welches in Plasma bei Anwesenheit von Phospholipiden und Calcium zur direkten Aktivierung des Faktor X zu Faktor Xa führt. Faktor Xa spaltet Prothrombin zu Thrombin, welches den Umsatz von Fibrinogen in Fibrin und schließlich die Gerinnselbildung verursacht. Dieser direkte Aktivierungsweg ist unabhängig von den Faktoren der intrinsischen und extrinsischen Gerinnungsaktivierung und wird demgemäß durch Defizienzen der Faktoren VIII, IX, XI und XII sowie durch deren Inhibitoren nicht beeinflusst. Ein positiver **DVVtest** ist gegeben bei einer signifikanten Verlängerung der Phospholipid-abhängigen Gerinnungszeit (> 2 Standardabweichungen über dem laborinternen Mittelwert des Normbereichs). **DVVtest** hat aufgrund der optimierter Verdünnung und Art der verwendeten Phospholipide eine erhöhte Sensitivität und Spezifität für LA; bei einem Verdacht auf LA sollte der **DVVtest** auch bei normaler aPTT durchgeführt werden.⁶

DVVconfirm enthält neben dem Gift der Russell-Viper eine hohe Phospholipid-Konzentration und ist im Zusammenhang mit dem **DVVtest** für die Bestätigung von LA in Patientenplasmen vorgesehen⁷. Bei Anwesenheit von LA ist die Gerinnungszeit einer Plasmaprobe im **DVVconfirm** signifikant kürzer als im **DVVtest**. Die Anwesenheit von LA in Plasmaproben wird bestätigt wenn der Quotient aus der **DVVtest** und **DVVconfirm** Gerinnungszeit größer als der laborinterne Normbereich (Mittelwert des **DVVtest/DVVconfirm** Quotienten \pm 2 Standardabweichungen).

REAGENZIEN

DVVtest und **DVVconfirm** Reagenzien werden lyophilisiert geliefert und bestehen aus einer Mischung aus dem Gift der Russell Viper, Calcium, Phospholipiden, inerten Zusätze und Konservierungsmittel. Der Inhalt nicht geöffneter Fläschchen ist bei einer Lagerung zwischen +2° und +8°C bis zum aufgedruckten Verfallsdatum stabil.

Die **DVVtest** Reagenzien gibt es in zwei Packungsgrößen: REF 810 besteht aus 10 Fläschchen, jedes Fläschchen ist ausreichend für 20 Bestimmungen unter Verwendung der meisten automatischen Methoden; REF 825 besteht aus 10 Fläschchen, jedes Fläschchen ist ausreichend für 50 Bestimmungen unter Verwendung der meisten automatischen Methoden.

The **DVVconfirm** Reagenzien gibt es in zwei Packungsgrößen: REF 815 besteht aus 10 Fläschchen, jedes Fläschchen ist ausreichend für 10 Bestimmungen unter Verwendung der meisten automatischen Methoden; REF 815L besteht aus 10 Fläschchen, jedes Fläschchen ist ausreichend für 20 Bestimmungen unter Verwendung der meisten automatischen Methoden.

PROBENTNAHME UND -VORBEREITUNG

Blutproben können mit einer Spritze oder unter Vakuum mit silikonisierten Röhrchen entnommen werden. 9 Teile Blut werden mit 1 Teil 3,2% oder 3,8% (109mM bzw. 129 mM) Trinitrium-Zitrat 2 Hydrat gemischt. Bei einem Hämatokrit von über 55 % kann die Genauigkeit des **DVVtest** und **DVVconfirm** beeinträchtigt sein; eine Anpassung des Verhältnisses zwischen Blut und Antikoagulanzen kann dann erforderlich sein⁸. Nach Mischen der Blutprobe ist diese zur Entfernung der Thrombozyten für 10 Minuten bei *mindestens* 5000 x g zu zentrifugieren. Die Thrombozyten können auch durch Filtration des Plasmas (Porengröße 0.22 μ m) entfernt werden⁹. Es ist unbedingt erforderlich, daß plättchenarme Plasmen (Plättchenzahl < 10⁴/ μ l) zum Einsatz kommen, insbesondere wenn Plasmen vor dem Test eingefroren gelagert werden. Andernfalls kann der Test durch die Freisetzung von Phospholipiden aus den zerstörten Thrombozyten gestört werden, so daß der Nachweis von LA beeinträchtigt wird⁹. Vor dem Test kann das plättchenarme Plasma dann bei +2° bis +8°C bis zu 4 Stunden gelagert werden; innerhalb dieser Zeit sollte der Test durchgeführt werden. Alternativ kann das Plasma unverzüglich eingefroren und dann bei -70°C bis zu 6 Monate gelagert werden. Gefrorene Plasmaproben müssen bei 37°C rasch aufgetaut und dann entweder sofort oder - wenn die Lagerung bei +2° und +8°C erfolgt - innerhalb von 2 Stunden getestet werden⁸.

NOTWENDIGE MATERIALIEN, DIE NICHT GELIEFERT WERDEN

- **DVVtroll™** LA Normal (REF 816N) und Abnormale (REF 816A)⁹ Kontrollplasmen oder äquivalente Kontrollplasmen
- Geeichte Pipetten im Bereich von 100 μ l - 5000 μ l
- Gereinigtes deionisiertes oder destilliertes Wasser

VORBEREITUNG DES REAGENZ UND STABILITÄT

BEACHTEN SIE: Das **DVVconfirm** Lyophilisat hat ein pulveriges Erscheinungsbild, das **DVVtest** Lyophilisat kann ein kristallines Erscheinungsbild aufweisen. Rekonstituieren Sie jedes Fläschchen mit gereinigtem deionisiertem oder destilliertem Wasser entsprechend der Beschriftung des Etiketts:

REF	810	825	815	815L
Volumen H ₂ O	2.0 mL	5.0 mL	1.0 mL	2.0 mL

Nach Zusatz des Wassers wird das Reagenz gut gemischt und zur vollständigen Lösung für mindestens 15 Minuten bei Raumtemperatur belassen. Nach Rekonstitution ist das Reagenz wie folgt stabil:

	24 Stunden	7 Tage	1 Monat
	20° to 25°C	2° to 8°C	-20°C

Das Reagenz kann aus Vorratsbehältern von Analysegeräten zurückgewonnen werden, wenn es nicht länger als 24 Stunden bei Raumtemperatur gelagert wurde. Rekonstituiertes Reagenz kann in Plastikröhrchen eingefroren werden, um seine Stabilität zu gewährleisten. Das Reagenz sollte 10 Minuten bei 37°C aufgetaut und dann gut gemischt werden (vortexen).

TESTDURCHFÜHRUNG

Manuelle Durchführung (z.B. „Kippröhrchen-Technik“) oder halbautomatische Durchführung mit dem ST4 oder BBL-Fibrometer Die detaillierte Testdurchführung ist auf Anfrage erhältlich¹⁰

Automatische Testdurchführung

DVVtest und **DVVconfirm** können auf den meisten Testautomaten durchgeführt werden. Gleiche Volumina des Reagenz und der Plasmaprobe, z.B. je 100 μ l **DVVtest** oder **DVVconfirm** Reagenz und 100 μ l Testplasma, sollten eingesetzt werden. Sowohl das Reagenz als auch das Plasma sollten vor dem Test für zwei Minuten bei 37°C vorinkubiert werden. Das Reagenz muß vor Zugabe zu dem Plasma gut gemischt werden. **DVVtest** und **DVVconfirm** Ergebnisse werden in Zeiteinheiten (Sekunden) mitgeteilt. **DVVtroll** (REF 816N) kann als Normalplasmakontrolle für den **DVVtest** oder **DVVconfirm** eingesetzt werden.

(Siehe: Testinterpretation und Befundmitteilung). In dem Reagenzienreservoir sollten magnetische Rührfische eingesetzt werden und die Reagenzienzuführung sollte, falls möglich, über separate Reagenzienschläuche erfolgen. Nach dem Reagenziedurchsatz sollten geeignete Spül- und/oder Waschkänge durchgeführt werden (insbesondere bei Instrumenten, die nicht über separate Reagenzienschläuche verfügen), bevor andere Gerinnungstests oder chromogene Tests durchgeführt werden. Für die genaue Einstellung des Automaten richten Sie sich bitte nach der Bedienungsanleitung des Herstellers.

BEACHTEN SIE: Jede Probe, die im *DVVtest* positiv befundet wurde sollte im *DVVconfirm* nachgetestet werden.

QUALITÄTSKONTROLLE

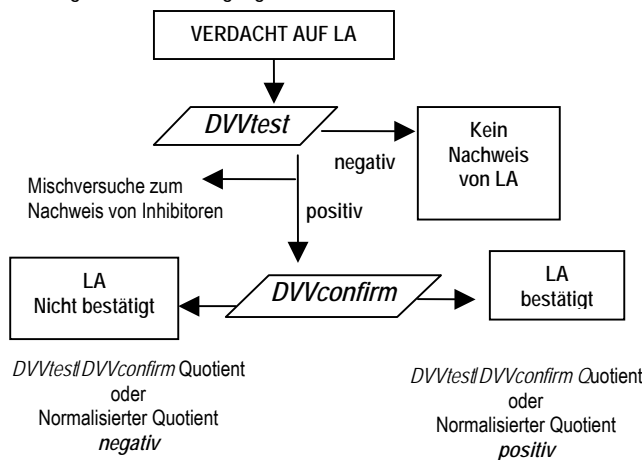
Bei jeder Untersuchungsserie ist eine normale und eine pathologische Kontrolle mitzuführen, auch bei Personal- oder Schichtwechsel und bei jeder 40. Probe¹¹. Die Kontrollplasmen müssen plättchenarm mit einer Thrombozytenzahl < 10⁴/µl sein. *DVVtroll* LA Normal und Abnormale Kontrollplasmen (REF 816N und 816A)¹⁰ können verwendet werden. Die Normal- und Abnormale-Kontrollen sollten Testergebnisse im laborinternen Sollbereich liefern, bevor Patientenproben getestet werden⁸.

REFERENZBEREICH

Jedes Laboratorium sollte seinen eigenen *DVVtest* und *DVVconfirm* Referenzbereich (Normbereich; Mittelwert ± 2 Standardabweichungen) ermitteln. Hierfür sind Plasmen von mindestens 20 gesunden Probanden (ungefähr gleiche Anzahl erwachsener weiblicher und männlicher Personen; siehe ERWARTETE WERTE) einzusetzen⁸. Bei der Erstellung des Normbereichs sind die Proben exakt so zu bearbeiten wie die späteren Testproben. Falls unter Routinebedingungen nur vorher eingefrorene Plasmaproben zum Einsatz kommen, sollte auch der Normbereich mit vorher gefrorenen Proben ermittelt werden. Bei der Ermittlung des Normbereichs als auch bei der Testung von Patientenproben sollten entweder nur vorher eingefrorene oder nur frisch präparierte Plasmen eingesetzt werden. Der Referenzbereich muß immer dann erneut ermittelt werden, wenn die Reagenziencharge oder das Instrument gewechselt werden. Ansonsten sollte der Referenzbereich mindestens einmal im Jahr ermittelt werden. Die Daten sollten über mehrere Tage gewonnen werden, um auch die Variabilität zwischen verschiedenen Testserien („Interassay-Variabilität“) zu erfassen.

TESTINTERPRETATION UND BEFUNDMITTEILUNG

Flussdiagramm zur Bestätigung von LA



DVVtest Ergebnisse:

Falls das Patientenplasma ein Ergebnis innerhalb des laborinternen Normbereichs des *DVVtest* (Mittelwert ± 2 Standardabweichungen) liefert, dann ist der Test negativ für LA. Falls das Patientenplasma ein Ergebnis liefert, welches über dem Normbereich des *DVVtest* liegt, dann ist der Test positiv für LA.

BITTE BEACHTEN SIE: Ein positiver *DVVtest* weist darauf hin, dass in dem Plasma entweder LA oder ein Defekt der Faktoren II, V oder X vorliegt. Bei einem positiven *DVVtest* muß das Vorhandensein von LA durch eine erneute Testung des Plasmas im *DVVconfirm* bestätigt werden (s.u.). *DVVconfirm* sollte am selben Tag wie der *DVVtest* und mit demselben Patientenplasma durchgeführt werden. Evtl. bestehende Faktorendefekten sollten durch Mischversuche abgeklärt werden.

DVVconfirm Ergebnisse:

Falls das Patientenplasma im *DVVtest* positiv getestet wurde, dann sollte der *DVVconfirm* Test durchgeführt werden. Die Befunde des *DVVconfirm* können entweder als *DVVtest/DVVconfirm*-Quotient oder als Normalisierter Quotient mitgeteilt werden:

1) Der *DVVtest/DVVconfirm* Quotient wird berechnet indem die ermittelte Gerinnungszeit (in Sekunden) des *DVVtest* durch die ermittelte Gerinnungszeit des *DVVconfirm* geteilt wird:

$$DVVtest/DVVconfirm \text{ Quotient} = DVVtest \text{ (sek)} \div DVVconfirm \text{ (sek)}$$

Ein Normbereich des *DVVtest/DVVconfirm*-Quotienten muss mit Normalplasmen erstellt werden. Ein *positives* Ergebnisse für LA liegt vor wenn der *DVVtest/DVVconfirm*-Quotient des Patientenplasmas mehr als 2 Standardabweichungen über dem laborinternen Nomwert für den *DVVtest/DVVconfirm*-Quotienten liegt. Wenn der *DVVtest/DVVconfirm*-Quotient innerhalb des Normbereichs für den Quotienten liegt, dann liegt ein negatives Testergebnis vor und andere Störungen müssen angenommen werden.

2) Der Normalisierte Quotient wird wie folgt berechnet:

$$\text{Normal. Quotient} = \frac{DVVtest \text{ (Probe)} \div DVVtest \text{ (Mittelwert Normbereich)}}{DVVconfirm \text{ (Probe)} \div DVVconfirm \text{ (Mittelwert Normbereich)}}$$

Beispiel:

Probe <i>DVVtest</i> :	58.9 Sekunden
Probe <i>DVVconfirm</i> :	32.2 Sekunden
Mittelwert Normbereich <i>DVVtest</i> :	35.8 Sekunden
Mittelwert Normbereich <i>DVVconfirm</i> :	32.8 Sekunden

$$\text{Normalisierter Quotient} = \frac{58.9 / (35.8)}{32.2 / (32.8)} = \frac{1.64}{0.98} = 1.67$$

Interpretation der Ergebnisse des Normalisierten Quotienten

Normal. Quotient	LA Status
> 2.0	LA stark positiv
1.5 to 2.0	LA positiv
1.2 to 1.5	LA schwach positiv

Die Befunde können entweder als „*positiv/negativ*“ für Lupus-Antikoagulans oder als *DVVtest/DVVconfirm*-Quotient oder als Normalisierter Quotient mitgeteilt werden. Bei der Befundmitteilung als Quotient sollte der Referenzbereich ebenfalls mitgeteilt werden.

ERWARTETE WERTE

Normbereich (± 2 Standardabweichungen)¹²

INSTRUMENT:	MLA 1000C	ST4	ACL 300*
<i>DVVtest</i> Zeit (sek)	28 – 45	29 - 51	28 – 47
<i>DVVconfirm</i> Zeit (sek)	30 – 40	21 - 46	28 – 40
<i>DVVtest/DVVconfirm</i> Quotient	0.77 – 1.21	0.95 - 1.47	0.83 - 1.35
N	21	25	20

Normbereiche wurden bei American Diagnostica Inc. in Übereinstimmung mit dem NCCLS Dokument H21-A2 ermittelt.⁹ Normalpersonen waren erwachsene Männer und Frauen mit normalen Werten für PT und aPTT.

Diese Ergebnisse sollen nur als Beispiel dienen; Ergebnisse variieren von Labor zu Labor. Deshalb muß jedes Labor den eigenen laborinternen Normbereich für alle verwendeten Instrumente und Methoden selbst erstellen.

EINSCHRÄNKUNGEN DES VERFAHRENS

- Verwenden Sie keine hämolytischen, lipämischen oder ikterischen Blutproben.
- Blutproben mit Verdacht auf Defizienzen der Faktoren II, V, oder X sollten in Mischversuchen geprüft werden.
- Blutproben, die Inhibitoren der Faktoren II, V, oder X enthalten können falsch positive Werte liefern.
- Wenn der *DVVtest* mit Blutproben durchgeführt wird, die hohe Konzentrationen an Faktor VIII (größer 200%) enthalten, dann kann das Reagenz das Vorhandensein von LA nicht feststellen und somit falsch negative Resultate liefern.¹²
- DVVtest* und *DVVconfirm* enthalten Komponenten, die unfractioniertes Heparin bis zu 1.0 U/mL neutralisieren. Plasmen mit einem Heparinspiegel über 1.0 U/mL können erhöhte Testergebnisse liefern.
- Einige niedermolekulare Heparine können mit dem *DVVtest* interferieren. In Plasmen, welche mit 2.0 Units/mL Fragmin® (Dalteparin-Natrium) angereichert wurden, wurden die Testergebnisse nicht beeinträchtigt. In Plasmen, welche mit Lovenox® (Enoxaperin-Natrium) über 0.25 Units/mL angereichert wurden, wurde eine Beeinträchtigung der Testergebnisse festgestellt.¹²
- Cumarin-Derivate und andere Vitamin K-Antagonisten können die Gerinnungszeiten im *DVVtest* und *DVVconfirm* verlängern. Der *DVVtest/DVVconfirm*-Quotient sollte dennoch ausserhalb des Normbereichs liegen, wenn LA in der Probe vorliegt.
- Blutproben sollten mit einem weiteren LA Gerinnungstest getestet werden, da mit Hilfe eines einigen LA Tests keine absoluter Nachweis auf das Vorhandensein von LA geführt werden kann.⁵

KENNDATEN DES TESTS

Präzision

Der *DVVtest* und *DVVconfirm* Test wurden einer Qualitätskontrolle bei American Diagnostica Inc. und bei zwei unabhängigen Laboratorien unterzogen. Der Gesamtvariationskoeffizient für Normalplasmen lag unter 4.0% für *DVVtest* und unter 5.0% für *DVVconfirm*. Für Plasmen mit pathologischen Werten ergab sich ein Gesamtvariationskoeffizient von unter 6.5% für *DVVtest* und unter 5.0% für *DVVconfirm*.¹²

Richtigkeit

DVVtest und *DVVconfirm* wurden mit normalen und pathologischen Plasmen getestet und folgende Ergebnisse erzielt:¹²

PLASMAPROBE	Positiver <i>DVVtest</i> / <i>DVVconfirm</i> -Quotient
LA-positive Plasmen	100% (17/17)
Normalplasmen	2.1% (2/96)
Heparinhaltige Plasmen	0% (0/2)
Faktordefiziente Plasmen	0% (0/8)
Faktor VIII Inhibitor positive Plasmen	0% (0/2)

LITERATUR

1. Harris, E. N., Asherson, R. A., and Hughes, G. R. V. Antiphospholipid antibodies - autoantibodies with a difference. *Ann Revs Med* 1988; 39: 261-271.
2. Conley CL, Hartmann RC. A hemorrhagic disorder caused by a circulating anticoagulant in patients with disseminated lupus erythematosus. *J Clin Invest* 1952; 31: 621-622.
3. Triplett, D. A., Brandt, J. T., and Maas, R. L. The laboratory heterogeneity of lupus anticoagulants. *Arch Path Lab Med* 1985; 109: 946-951.
4. Thiagarajan P, Shapiro SS, DeMarco L. Monoclonal immunoglobulin M lambda coagulation inhibitor with phospholipid specificity: Mechanism of a lupus anticoagulant. *J Clin Invest* 1980; 66: 397-405.
5. Brandt, J. T., Triplett, D. A., Alving, B., and Scharrer, I. Criteria for the diagnosis of lupus anticoagulants, an update: on behalf of the subcommittee on lupus anticoagulant/antiphospholipid antibody of the scientific and standardization committee of the ISTH *Thromb Haem* 1995; 74(6): 1597-1603.
6. Exner, T., Papadopoulos, G., and Koutts, J. Use of a simplified dilute Russell viper venom time (dRVVT) confirms heterogeneity among 'Lupus Anticoagulants.' *Blood Coag Fibrinol* 1990; 1: 259-266.
7. Thiagarajan, P., Pengo, V., and Shapiro, S. S. The use of the dilute Russell viper venom time for the diagnosis of lupus anticoagulants. *Blood* 1986; 68: 869-874.
8. Collection, transport and processing of blood specimens for coagulation testing and performance of coagulation assays - Second Edition. *NCCLS Document H21-A2* December 1991; Vol. 11, No. 23.
9. Brandt, J. T. "Q & A". *CAP Today*, August 1992; Page 61.
10. Erhältlich über American Diagnostica GmbH, Kaplaneigasse 35, D-64319 Pfungstadt
11. Passey, R. B. Walking the straight and narrow on quality control. *MLO* 1993; 2: 39-43.
12. Daten verfügbar bei American Diagnostica Inc., Stamford, Connecticut 06902

© ADGmbH 810/825/815/815L Rev. 05 2004-02-27