



ACTICLOT® dPT™

REF 824

Dilute Prothrombin Time Test zum Nachweis von Lupus Antikoagulans (LA)



(CPT Code No. 85705)



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

VERWENDUNGSZWECK

ACTICLOT® dPT™ ist ein Test zur qualitativen Bestimmung von Lupus Antikoagulans (LA) in Humanplasma. Der Test kann mit Hilfe von teilautomatisierten und vollautomatisierten Gerinnungsautomaten durchgeführt werden. Der Test ist nur für diagnostische Anwendungen *in vitro* bestimmt, er ist nicht für Anwendungen in Mensch oder Tier bestimmt.

ERKLÄRUNG DES TESTVERFAHRENS

Lupus Antikoagulans (LA) sind Phospholipid abhängige Autoantikörper die mit Erkrankungen des Autoimmunsystems wie dem Antiphospholipidsyndrom (APS) einhergehen.^{1,2} Das primäre APS ist ein pathologischer Zustand der durch ungeklärte Thrombosen, wiederholte Fehlgeburten, Thrombozytopenien und/oder neurologische Erkrankungen charakterisiert ist. Das sekundäre APS entsteht wenn LA mit anderen Autoimmunkrankheiten wie dem Systemischen Lupus Erythematoses (SLE) einhergeht, wie es ursprünglich durch Conley and Hartmann beschrieben wurde.³ LA sind gegen heterogene Komplexe anionischer Phospholipide (z.B. Cardiolipin, Phosphatidylinositol, Phosphatidylethanolamin und Phosphatidylserin)⁴ und Phospholipid bindender gerichtet. Hauptproteine der LA Autoantigene sind β 2GPI, Prothrombin und Annexin V. Antiphospholipid Antikörper sind dadurch gekennzeichnet, dass sie die Gerinnungszeit in verschiedenen *in vitro* Gerinnungstest, wie der Lupus sensitiven APTT, dem Kaolin Clotting Time (KCT) Test, dem Dilute Russell's Viper Venom Test (dRVVT) und dem Dilute Prothrombin Time (dPT) Test verlängern.⁶⁻⁸ Aufgrund der heterogenen Beschaffenheit der pathologischen Phospholipid abhängigen Autoantikörper, ist es weitgehend anerkannt das ein einzelner LA Gerinnungstest nicht ausreicht, um alle LA Antikörper zu identifizieren. 1995, hat das "ISTH Scientific Subcommittee on Antiphospholipid Antibodies (SSC)" empfohlen, dass jedes LA verdächtige Plasma mit mindestens zwei verschiedenen LA Diagnostik-Tests und in einem Mischversuch mit gepooltem Normalplasma durchgeführt wird, um die Anwesenheit von Autoantikörpern oder Faktordefizienzen zu bestimmen.⁹ Zusätzlich empfiehlt das ISTH SSC, das die Diagnose von LA einen Nachweis der Phospholipid abhängigen Natur der Autoantikörper benötigt. Dies kann durch einen bestätigenden Gerinnungstest in Anwesenheit großer Mengen an Phospholipiden ergänzt werden. Die Anwesenheit von LA wird dadurch "bestätigt", das die Plasma-Gerinnungszeit in Anwesenheit hoher Phospholipidkonzentrationen im Vergleich zu geringeren Phospholipidkonzentrationen in einem LA "Screening" Test signifikant verkürzt ist.

Klinische Studien haben gezeigt dass der Dilute Prothrombin Time Test ein effektiver LA Gerinnungstest ist und das er LA nachweisen kann, die mit Hilfe anderer Tests wie z.B. der Lupus-sensitiven APTT und dem Dilute Russell's Viper Venom Test nicht nachgewiesen werden können.¹⁰⁻¹² Durch Zusatz eines Dilute Prothrombin Time Tests zu einer LA Testreihe wird die Sensitivität für den Nachweis von LA in Patientenproben erhöht.^{8,13} ACTICLOT dPT ist ein kompletter Dilute Prothrombin Time Test zum Screening und zur Bestätigung von Phospholipid abhängigen Autoantikörpern. Das Screening Protokoll verwendet ein Aktivator Reagenz, das eine einzigartige Zusammensetzung von relipidiertem rekombinanten Tissue Factor und Calcium beinhaltet. Durch Verwendung des rekombinanten Tissue Factors wird das Testergebnis verbessert. Im Bestätigungsprotokoll wird ein einzigartige Zusammensetzung eines Phospholipid Reagenz verwendet, um die Phospholipid abhängige Natur von LA in Proben nachzuweisen, die im Screening Protokoll als positiv getestet wurden.

TESTPRINZIP

ACTICLOT dPT ist ein Gerinnungstest zum Nachweis von LA im Plasma. Die Gerinnung wird durch Aktivierung des Tissue Factor abhängigen Gerinnungsweges (extrinsisch) durch Tissue Factor in Anwesenheit von Calcium Ionen ausgelöst. Der Tissue Factor bindet an Faktor VIIa, was zu eine Aktivierung von Faktor IX und Faktor X bewirkt. Faktor Xa wandelt Prothrombin in Thrombin um, was zu einer Bildung von Clots, durch die Spaltung von Fibrinogen zu Fibrin führt. Die Aktivierung des Tissue Factor Weges umgeht den Kontakt Weg (intrinsisch) und vermeidet jegliche Interferenzen die durch Faktor XII Defizienzen bedingt sind.

Im Screening Protokoll wird das Patientenplasma mit ACTICLOT LA Buffer™ und ACTICLOT dPT Activator™ gemischt. Die Gerinnungszeit wird mit halbautomatisierten oder automatisierten Methoden bestimmt. Ein positives Ergebnis wird durch eine verlängerte Gerinnungszeit im Vergleich zu einem etablierten Normalbereich angezeigt. Im Bestätigungsprotokoll wird das Patientenplasma mit den ACTICLOT LA Phospholipids™ und dem ACTICLOT dPT Activator gemischt. Ein positives Ergebnis wird durch eine signifikante Verminderung der Gerinnungszeit im Vergleich zur Gerinnungszeit im Screeningprotokoll angezeigt.

Plasmen werden als LA positiv identifiziert, wenn sowohl das Screening als auch das Bestätigungsprotokoll durchgeführt werden und beide Tests positiv sind (siehe auch Algorithmus zur Diagnostik von LA auf Seite 11). Das Screening und das Bestätigungsprotokoll können zur gleichen Zeit durchgeführt werden, so kann eine schnellstmögliche komplette Charakterisierung des Patientenplasmas gewährleistet werden. Alternativ können Plasmen zuerst auf die Anwesenheit von LA untersucht werden und dann nochmals zur Bestätigung auf Phospholipid abhängige Autoantikörper getestet werden.

REAGENZIEN

- R1 LA Buffer™:** 3 Fläschchen, 40 Tests pro Fläschchen, enthält eine Mischung aus Puffer, Salzen und inerten Zutat
- R2 LA Phospholipids™:** 3 Fläschchen, 40 Tests pro Fläschchen, enthält eine einzigartige Mischung aus Phospholipiden, inerten Schutzmitteln und Zusätzen
- R3 dPT Activator™:** 6 Fläschchen, 40 Tests pro Fläschchen, enthält eine Mischung aus rekombinantem humanen Tissue Factor, Calcium, Phospholipiden, inerten Schutzmitteln und Zusätzen

WARNUNG

Die Reagenzien enthalten geringe Mengen an Natriumazid, die nach Reaktion mit Kupfer oder Bleirohren explosive Verbindungen bilden können. Wenn diese Lösungen über das Spülbecken entsorgt werden, müssen sie mit einer großen Menge Wasser verdünnt werden.



Nur für den *in vitro* Gebrauch geeignet. Nicht für den Gebrauch in Menschen oder Tier geeignet. Keine Komponenten des Testkits nach dem Verfallsdatum verwenden. Keine Reagenzien aus verschiedenen Chargen mischen. Mikrobielle Verunreinigungen sind zu vermeiden. Bei der Arbeit nicht rauchen, essen oder trinken. Nicht mit dem Mund pipettieren. Laborschutzkleidung und Einweghandschuhe bei der Arbeit tragen und Hände anschließend waschen.

VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

Alle Reagenzien sind lyophilisiert. Ungeöffnete Reagenzien sind bis zu dem auf den Etiketten aufgedruckten Verfallsdatum zu verwenden, wenn sie bei 2°-8°C gelagert werden. Die Reagenzien sind entsprechend der untenstehenden Anleitung zu rekonstituieren.

- 1. LA Buffer™ (R1):** Inhalt des Fläschchens in 3.0 mL gefiltertem deionisiertem oder destilliertem Wasser lösen. Reagenzien gut durchmischen und mindestens für 15 min bei Raumtemperatur inkubieren um ein vollständiges Auflösen zu gewährleisten.
- 2. LA Phospholipids™ (R2):** Inhalt des Fläschchens in 2.0 mL gefiltertem deionisiertem oder destilliertem Wasser lösen. Reagenzien gut durchmischen und mindestens für 15 min bei Raumtemperatur inkubieren um ein vollständiges Auflösen zu gewährleisten.
- 3. dPT™ Activator™ (R3):** Inhalt des Fläschchens in 2.0 mL gefiltertem deionisiertem oder destilliertem Wasser lösen. Reagenzien gut durchmischen und mindestens für 15 min bei Raumtemperatur inkubieren um ein vollständiges Auflösen zu gewährleisten.
NICHT VORTEXEN! BEI RAUMTEMPERATUR HALTEN!
NICHT KÜHLEN! NICHT EINFRIEREN!

Stabilität der rekonstituierten Reagenzien:



	R1	R2	R3
	10 Tage	10 Tage	8 Stunden
	2°-8°C 18°-25°C	2°-8°C 18°-25°C	18°-25°C

Die rekonstituierten Reagenzien R1 und R2 können aus dem Automaten innerhalb von 10 Tagen zurück gewonnen werden. Das rekonstituierte Reagenz R3 kann aus dem Automaten innerhalb von 8 Stunden zurück gewonnen werden (siehe auch obige Tabelle zur Temperaturempfindlichkeit).

PROBENENTNAHME UND VORBEREITUNG DER PROBEN

Für den ACTICLOT dPT Test muss Thrombozytenarmes Citratplasma verwendet werden. Siehe "Entnahme, Transport und Behandlung von Blutproben zur Untersuchung in Plasma-basierenden Gerinnungs Tests"; Anerkannte Guidelines- Vierte Auflage", NCCLS Dokument H21-A4, Vol. 23, No. 35, Dezember 2003.¹⁴ Das Plasma sollte wie im folgenden beschrieben entnommen werden:

- Mit einer Spritze oder silikonisierten Vakuumröhrchen, 9 Teile Blut entnehmen und auf einen Teil 3.2% (0.109 M) Tri-Natriumzitat (Dihydrat Form) Antikoagulations Lösung geben.
- Die Blutprobe bei mindestens 5,000 x g für 10 Minuten zentrifugieren um thrombozytenarmes Plasma zu erhalten. Das Plasma sollte weniger als Thrombozyten/µL enthalten. Thrombozyten können auch entfernt werden indem das Plasma durch einen 0.22 micron Filter gefiltert wird.
- Das Plasma sollte bei 2°-8°C gelagert werden und innerhalb von 4 Stunden getestet werden. Alternativ kann das Plasma bei -70°C bis zu 6 Monate gelagert werden

	4 Stunden	6 Monate
		
	2°-8°C	-70°C

- Gefrorenes Plasma sollte schnell bei 37°C aufgetaut werden. Aufgetautes Plasma sollte bei 2°- 8°C gelagert und innerhalb von 4 Stunden getestet werden.

Beachte:

- Wenn der Hämatokritwert in der ursprünglichen Blutprobe größer als 55% ist, können die Testergebnisse des ACTICLOT dPT Tests ungenau sein und eine Anpassung an das Blut-zu-Antikoagulations Verhältnis kann erforderlich sein.
- Keine ikterischen oder lipämischen Proben mit photo-optischen Instrumenten untersuchen, da dadurch falsche Gerinnungszeiten gemessen werden können. Eine alternative manuelle oder teilautomatische Testmethode ist empfehlenswert.
- Der ACTICLOT dPT Test darf nicht mit hämolysierten Proben durchgeführt werden.

DURCHFÜHRUNG

Kitkomponenten – Siehe Reagenzien

Notwendige Materialien die nicht mitgeliefert werden

LAtrol™ Normal Kontrollplasma (American Diagnostica Inc. REF 816N)
 LAtrol™ Abnormal Kontrollplasma (American Diagnostica Inc. REF 816A)
 Gepooltes Normalplasma (PNP)
 0-200 µL, 200-1000 µL, 1000-5000 µL Einkanalpipetten
 0.22 µm gefiltertes deionisiertes oder destilliertes Wasser
 Vollautomatischer oder teilautomatischer Gerinnungsautomat

ACTICLOT dPT Protokoll für den Screening Test

Teilautomatisierte Durchführung für den ST4

1. Ausreichend ACTICLOT dPT Activator und ACTICLOT LA Buffer in die auf 37°C erwärmten Reagenzien Behältnisse eines ST4 geben.
2. 100 µL des Testplasmas (z.B. Patientenplasma, PNP, LA Positiv Kontrolle oder LA Negativ Kontrolle) in eine Gerinnungsküvette pipettieren. Für 2 Minuten bei 37°C inkubieren.
3. 50 µL vorgewärmten ACTICLOT LA Buffer in die Küvette mit dem Testplasma geben.
4. 50 µL vorgewärmten ACTICLOT dPT Activator in die Küvette mit dem Testplasma geben. Sofort die Uhr starten und die Gerinnungszeit protokollieren.

Automatisierte Durchführung

Der ACTICLOT dPT Screening Test kann auf den meisten vollautomatisierten Gerinnungsautomaten durchgeführt werden. Anwendungen für spezielle automatisierte Geräte sind auf Anfrage erhältlich.

1. ACTICLOT LA Buffer und ACTICLOT dPT Activator in die Reagenzbehältnisse des automatisierten Gerinnungsautomaten geben.
2. 100 µL Testplasma (z.B. Patientenplasma, PNP, LA Positiv Kontrolle oder LA Negativ Kontrolle) in die Gerinnungsküvette pipettieren.
3. 50 µL vorgewärmten ACTICLOT LA Buffer in die Küvette mit dem Testplasma geben. Für 2 Minuten bei 37°C inkubieren.
4. 50 µL vorgewärmten (37°C) ACTICLOT dPT Activator in die Küvette mit dem Testplasma geben. Gerinnungszeit protokollieren.

ACTICLOT dPT Protokoll für den Bestätigungstest

Teilautomatisierte Durchführung für den ST4

1. Genügend ACTICLOT dPT Activator und ACTICLOT LA Phospholipids in die auf 37°C vorgewärmten Reagenzbehältnisse des ST4 geben.
2. 100 µL Testplasma (z.B. Patientenplasma, PNP, LA Positiv Kontrolle oder LA Negativ Kontrolle) in die Gerinnungsküvette pipettieren. Für 2 Minuten bei 37°C inkubieren.
3. 50 µL vorgewärmte ACTICLOT LA Phospholipids in die Küvette mit dem Testplasma geben.
4. 50 µL vorgewärmten ACTICLOT dPT Activator in die Küvette mit dem Testplasma geben. Sofort die Uhr starten und die Gerinnungszeit protokollieren.

Automatisierte Durchführung

Das ACTICLOT dPT Bestätigungsprotokoll kann auf den meisten vollautomatisierten Gerinnungsautomaten durchgeführt werden. Anwendungen für spezielle automatisierte Geräte sind auf Anfrage erhältlich.

1. ACTICLOT LA Phospholipids und ACTICLOT dPT Activator in die Reagenzienbehältnisse des automatisierten Gerinnungsautomaten geben.
2. 100 µL Testplasma (z.B. Patientenplasma, PNP, LA Positiv Kontrolle oder LA Negativ Kontrolle) in eine Gerinnungsküvette pipettieren.
3. 50 µL der vorgewärmten ACTICLOT LA Phospholipids in die Küvette mit dem Testplasma pipettieren. Für 2 Minuten bei 37°C inkubieren.
4. 50 µL vorgewärmten (37°C) ACTICLOT dPT Activator in die Küvette mit dem Testplasma geben. Gerinnungszeit protokollieren.

NORMAL REFERENZBEREICH

Für eine korrekte Durchführung des ACTICLOT dPT Tests sollte jedes Labor seinen eigenen Normal Referenzbereich für den Screening- und den Bestätigungstest erstellen. Es sollten mindestens 20 gesunde Blutspender, Männer und Frauen im Erwachsenenalter, getestet werden um den Normal Referenzbereich zu erstellen (siehe ERWARTETE WERTE). Wenn die Normal Referenzbereiche erstellt werden, muss die Probenentnahme und Vorbereitung der Normalplasmen auf die gleiche Art und Weise erfolgen wie bei den zu testenden Proben. Wenn ausschließlich gefrorene Proben getestet werden, sollte der Normalbereich ebenfalls mit gefrorenen Normalplasmen erstellt werden. Es sollten keine gemischten Plasma Populationen, die aus frischen und gefrorenen Proben stammen getestet werden um den Normal Referenzbereich für die Routine Testung zu erstellen. Der Normal Referenzbereich sollte immer neu erstellt werden wenn die Reagenziencharge oder der Gerinnungsautomat wechselt, oder mindestens einmal im Jahr. Die Normal Referenz Bereichsdaten sollten über einen Zeitraum von mehreren Tagen beobachtet werden, um die Tag-zu-Tag Variationen zu berücksichtigen.

Bestimmung der mittleren Screening Zeit und des Normal Referenzbereichs für den dPT Screening Test

Testen Sie die 20 Normalplasmen im Screening Test und bestimmen Sie die durchschnittliche Screening Zeit (in Sekunden) für die 20 Plasmen. Die mittlere Screening Zeit + 2 SD ist die obere Grenze des Normal Referenzbereichs und wird als cut-off Wert benutzt, um zu bestimmen ob eine Patientenprobe im Screening Test positiv ist.

Bestimmung der mittleren Bestätigungszeit für den Bestätigungstest

Testen Sie die 20 Normalplasmen im Bestätigungstest und bestimmen Sie die mittlere Bestätigungszeit. Bestimmen Sie die mittlere Bestätigungszeit (in Sekunden) für die gleichen 20 Normalplasmen die Sie im Screening Protokoll getestet haben.

BEACHTEN: Zum Nachweis, dass die Probe LA positiv ist muss jedes Plasma im Screening- und im Bestätigungstest getestet werden. Die mittlere Screening- und Bestätigungszeit der Normalplasmen wird zur Berechnung verwendet, um die Anwesenheit von LA in Patientenproben nachzuweisen. Zwei Methoden zur Berechnung von Patientenproben sind unten beschrieben: Screening Zeit/Bestätigungszeit (S/C) und der normalisierte Quotient.

Bestimmung des Normal Referenzbereichs unter Verwendung des S/C Quotienten

Der S/C Quotient wird für jedes der 20 Normalplasmen erstellt indem die Screening Zeit durch die Bestätigungszeit geteilt wird:

$$S/C \text{ Quotient} = \text{dPT Screening Zeit (sek)} \div \text{dPT Bestätigungszeit (sek)}$$

Bestimmen Sie den mittleren S/C Quotienten (± 2 S.D) der 20 Normalplasmen. Der mittlere Normal S/C Quotient + 2 SD wird verwendet um die obere Grenze des Normal Referenzbereichs festzulegen, um die Anwesenheit von LA in den Proben nachzuweisen.

Bestimmung des Normal Referenzbereichs unter Verwendung des Normalisierten Quotienten

Teilen Sie die Screening Zeit jedes einzelnen Normalplasmas durch die mittlere Screening Zeit des Normal Referenzbereichs (siehe oben). Als nächstes teilen Sie die Bestätigungszeit jedes Normalplasmas durch die mittlere Bestätigungszeit des Normal Referenzbereichs (siehe oben). Der Normalisierte Quotient wird bestimmt indem der normalisierte Screening Quotient durch den normalisierten Bestätigungsquotienten geteilt wird:

$$\text{Normalisierter Quotient} = \frac{\text{Normal Plasma dPT Screening Zeit (Sek)} \div \text{Mittlere Normal dPT Screening Zeit (Sek)}}{\text{Normal Plasma dPT Bestätigungszeit (Sek)} \div \text{Mittlere Normal dPT Bestätigungszeit (Sek)}}$$

Bestimmen Sie den mittleren Normalisierten Quotienten (± 2 SD) der 20 Normalplasma Proben. Der mittlere Normalisierte Quotient + 2 SD wird verwendet, um die obere Grenze des Normal Referenzbereichs festzulegen, um die Anwesenheit von LA in den Proben nachzuweisen.

INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

Ein Algorithmus zum Testen von Patientenplasmen ist am Ende dieser Produktbeschreibung zu finden, um die Interpretation der Ergebnisse zu verdeutlichen.

- A. Patientenplasmen werden mit dem Screening Test getestet. Bestimmen Sie, ob die Gerinnungszeit der Plasmaprobe unterhalb oder oberhalb der oberen Grenze des etablierten Normal Referenzbereichs liegt.
1. Falls das Plasma im Screening Test eine Gerinnungszeit (Sek) hat, die innerhalb des etablierten Normal Referenzbereichs liegt, (Mittelwert + 2 SD), ist das Testergebnis negativ für LA.
 2. Falls das Plasma im Screening Test eine Gerinnungszeit (Sek) hat, die oberhalb des etablierten Normal Referenzbereichs liegt, (Mittelwert + 2 SD), besteht der Verdacht das die Probe LA positiv ist.

Plasmen die im ACTICLOT dPT Screening Test positiv getestet werden, müssen im ACTICLOT dPT Bestätigungsprotokoll nachgetestet werden, um die Anwesenheit von LA in der Plasmaprobe nachzuweisen. Ein positives Ergebnis auf LA im ACTICLOT dPT Screening Test kann nur durch den ACTICLOT dPT Bestätigungstest und durch keine andere LA Bestätigungsmethode bestätigt werden.

- B. Jedes Plasma das im Screening Test als positiv getestet wurde, wird im Bestätigungstest nachgetestet. Bestimmen Sie den S/C Quotienten oder den Normalisierten Quotienten der Testplasmen.
1. Das Plasma ist als positiv für LA bestätigt, falls der S/C Quotient oder der Normalisierte Quotient größer ist als die obere Grenze die für den etablierten Normal Referenzbereich (Mittelwert + 2 SD) erstellt wurde.
 2. Das Plasma ist nicht als LA positiv bestätigt, falls der S/C Quotient oder der Normalisierte Quotient innerhalb des Normal Referenzbereichs (Mittelwert ± 2 SD) liegt. Mit diesen Plasmen sollten Mischstudien durchgeführt werden (siehe unten).

MISCHSTUDIEN

Das Vorhandensein von biologischen Abnormalitäten wie Blutfaktor Defizienzen (z.B Faktor II, V oder X Defizienzen), oder Faktorinhibitoren (z.B. FVIII Inhibitor), oder die Einnahme von oralen Gerinnungshemmern (OAC; z.B. Coumadin™) kann angenommen werden, wenn das Plasma eine verlängerte ACTICLOT dPT Screening Zeit hat, aber der S/C Quotient oder der Normalisierte Quotient in den Normal Referenzbereich fallen. In diesem Fall, wird die Durchführung von Mischstudien empfohlen. Eine Mischstudie wird durch Zugabe von gleichen Mengen an Testplasma und gepooltem Normalplasma durchgeführt. Der ACTICLOT dPT Screening- und Bestätigungstest sollte mit dem 1:1 gemischten Plasma durchgeführt werden.

1. Wenn die dPT Screening Zeit der 1:1 Mischung größer ist als der durch das Labor erstellte Quotient des Normal Referenzbereichs (Mittelwert + 2 SD), besteht der Verdacht von LA im Plasma. Wenn die dPT Screening Zeit der 1:1 Mischung im Normalbereich liegt (Mittelwert ± 2 SD), besteht der Verdacht auf eine Blutfaktordefizienz. Falls gewünscht können entsprechende Faktor Tests durchgeführt werden (siehe Algorithmus).
2. Wenn der S/C Quotient oder der Normalisierte Quotient der 1:1 Mischung größer ist als der durch das Labor erstellte Quotient des Normal Referenzbereichs (Mittelwert + 2 SD), ist das Plasma LA positiv. Wenn der S/C Quotient oder der Normalisierte Quotient der Mischung im Normalbereichs des Labors liegt (Mittelwert ± 2 SD), besteht der Verdacht auf andere Abnormalitäten (z.B. Coumadin, Faktor Inhibitor).

ERWARTETE WERTE

In Tabelle 1 sind typische Normal Referenzbereiche für den ACTICLOT dPT Screening- und Bestätigungstest, Gerinnungszeiten und der S/C Quotient angegeben, wenn kommerzielle Gerinnungsautomaten verwendet werden. Diese Ergebnisse sind nur als Hinweise zu verwenden. Gefrorene Plasmaproben von individuellen Spendern wurden entweder von kommerziellen Anbietern bezogen oder gesammelt und in den Labors die den Test durchführen entsprechend dem „NCCLS Document H21-A4“¹⁴ vorbereitet. Spender waren Männer und Frauen im Erwachsenenalter mit normalen PT und APTT Werten. Weitere demographische Daten waren nicht verfügbar.

TABELLE 1. Normal Referenzbereiche für den ACTICLOT dPT Test unter Verwendung von kommerziellen

Gerinnungsautomat	ACL® 300+ (n=25)	BCT® (n=32)	CA7000 (n=20)	MLA® 900C (n=93)	ST4 (n=25)	STA Compact® (n=25)
Screening Zeit (Sek)	34.4 ± 4.5	51.2 ± 7.8	38.8 ± 8.8	26.7 ± 4.8	38.4 ± 4.2	36.6 ± 5.9
Bestätigungszeit (Sek)	29.2 ± 4.8	50.5 ± 11.0	35.8 ± 4.0	26.2 ± 5.2	34.9 ± 8.5	35.7 ± 3.1
S/C Quotient	1.18 ± 0.12	1.02 ± 0.12	1.08 ± 0.26	1.02 ± 0.16	1.11 ± 0.19	1.03 ± 0.09

^a Daten von American Diagnostica Inc.¹⁶

QUALITÄTSKONTROLLE

Ein normales und ein abnormales LA Kontrollplasma sollte mit jeder Gruppe eines Testlaufs zusammen getestet werden, mit einem Wechsel im Personal oder einer Arbeitsschicht, oder entsprechend den Leitlinien des Testlabors. Die Kontrollen müssen thrombozytenarm sein, mit weniger als Thrombozyten/µL. Normale und Abnormale Kontrollen sind bei American Diagnostica Inc. (REF 816N und REF 816A) erhältlich. Die Werte für die Normal und die Abnormal LA Kontrollplasmen sollten beide in die vom jeweiligen Labor etablierten Kontrollwertbereiche fallen. Falls die Kontrollwerte nicht innerhalb der vom Labor zuvor etablierten Kontrollgrenzen liegen und festgestellt wurde das die Geräte richtig funktionieren, sollten die Testergebnisse verworfen werden und die Proben sollten nochmals mit frischen Reagenzien gemessen werden. Es sollten korrekte Normal und Abnormal Kontrollen erhalten werden bevor Patientenproben getestet werden.

RÜCKVERFOLGUNG DES STANDARDMATERIALS

Informationen bezüglich der Rückverfolgung des Standardmaterials sind auf Anfrage bei American Diagnostica Inc. erhältlich.

GRENZEN DES VERFAHRENS

Die ACTICLOT dPT Screening Zeit kann in Patienten mit angeborenen oder erworbenen Faktor Defizienzen verlängert sein. Angeborene Faktor Defizienzen können bestimmt werden, indem die zuvor beschriebenen Mischstudien durchgeführt werden. Plasmen die Faktor Inhibitoren enthalten (erworbene Defizienzen) können oder können auch nicht durch Mischstudien identifiziert werden, da der Inhibitor möglicherweise nicht vollständig durch das in den Mischstudien verwendete PNP neutralisiert wird.

Der ACTICLOT dPT Aktivator enthält Stoffe, die unfraktioniertes Heparin bis zu einschließlich 1.0 U/mL neutralisieren. Plasmen, die unfraktionierte Heparinkonzentrationen von mehr 1.0 U/mL enthalten, können inkorrekte Ergebnisse liefern und sollten daher nicht mit diesem Test getestet werden.

Plasmen von Patienten, die mit oder anderen oralen Gerinnungshemmern behandelt wurden, können verlängerte ACTICLOT dPT Screening und Bestätigungs Gerinnungszeiten haben. Mischstudien können diese Gerinnungszeiten bis zum Normalbereich verkürzen, vorausgesetzt LA ist nicht vorhanden.

Kein LA Test alleine identifiziert alle LA positiven Proben. Das ISTH SSC empfiehlt, dass jede Probe bei der Verdacht auf LA besteht mit 2 oder mehr LA Screening Tests getestet und zusätzlich mit mindestens einem Bestätigungstest bestätigt wird der hohe Phospholipidkonzentrationen enthält.⁹

LEISTUNGSMERKMALE

Präzision

ACTICLOT dPT Präzisionsstudien wurden von American Diagnostica Inc. und zwei weiteren unabhängigen Labors auf folgenden Gerinnungsautomaten durchgeführt: 300R, Dade Behring BCT®, Sysmex® CA-7000, Instrumentation Laboratory MLA® 900C, Diagnostica Stago STart® 4 und STA Compact®. Die Teststudien beinhalten multiple Tests, die über mehrere Tage unter Verwendung von kommerziellen Kontrollplasmen durchgeführt wurden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

TAB. 2. Präzisionsdaten für ACTICLOT dPT für Normale und Abnormale (Lupus Positive) Kontrollplasmen

Gerinnungs-automat	Kontrolle*	dPT Screening (sek)	Intra-Assay CV (%)	Inter-Assay CV (%)	dPT Bestätigungstest (sek)	Intra-Assay CV (%)	Inter-Assay CV (%)
ACL 300R	Normal	32.8	2.5	5.1	30.2	3.8	5.3
	Abnormal	63.8	1.9	7.1	36.9	3.2	3.8
BCT	Normal	47.5	0.5	3.2	51.6	1.7	4.5
	Abnormal	89.2	0.6	5.2	61.9	1.2	3.7
CA-7000	Normal	44.3	0.9	ND	37.9	2.0	ND
	Abnormal	84.1	5.4	ND	48.6	3.3	ND
MLA 900C	Normal	27.9	2.5	3.7	27.2	2.8	4.1
	Abnormal	51.6	2.4	8.6	30.5	1.5	3.7
STart 4	Normal	38.1	0.7	ND	37.3	3.8	ND
	Abnormal	60.6	6.5	ND	44.0	6.7	ND
STA Compact	Normal	40.2	0.8	3.4	39.7	0.9	4.3
	Abnormal	77.9	1.1	7.2	46.0	1.0	4.8

* American Diagnostica Inc. REF 816N, 816A

ND: Nicht bestimmt

Sensitivität und Spezifität

In der klinischen Studie I, wurde die Spezifität und Sensitivität des ACTICLOT dPT Tests mit 20 Normalplasmen und 23 bekannten schwach LA positiven Plasmen bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 dargestellt. Die Ergebnisse des ACTICLOT dPT zusammen mit den kommerziell erhältlichen LA Tests *DVVtest/DVVconfirm* (von American Diagnostica Inc.) sind ebenfalls dargestellt:

TAB. 3. Klinische Studie I – Spezifität und Sensitivität

	ACTICLOT dPT Screening Test	ACTICLOT dPT Bestätigungstest	ACTICLOT dPT (S/C) + DVV (T/C)
<u>Anzahl der negativ getesteten Normalplasmen</u> Anzahl der getesteten Normalplasmen	20/20	20/20	
Spezifität	100%	100%	
<u>Anzahl der als LA positiv getesteten Plasmen</u> Anzahl der bekannten LA positiven Plasmen	21/23	18/23	22/23
Sensitivität	91%	78%	95.6%

^a Die Tests wurden auf einem CA-7000 Gerinnungsautomaten durchgeführt

^b Nicht mitgeteilt

In der klinischen Studie II, wurden 29 bekannte LA positive Plasmen mit ACTICLOT dPT, *DVVtest/DVVconfirm* und einem kommerziell erhältlichen LA sensitiven aPTT Reagenz getestet. Die Sensitivität des ACTICLOT dPT Tests, wenn er in einer LA Testreihe zusammen mit diesen Tests verwendet wurde ist in Tabelle 4 dargestellt. Die Sensitivität erhöhte sich wenn die Ergebnisse der einzelnen Tests kombiniert wurden.

TAB. 4. Klinische Studie II: Sensitivität einer LA Testreihe mit ACTICLOT dPT, *DVVtest/DVVconfirm* und aPTT.

	ACTICLOT	ACTICLOT +	ACTICLOT + +
<u>Anzahl der als LA positiv getesteten Plasmen</u> Anzahl der bekannten LA positiven Plasmen	23/29	25/29	28/29
Sensitivität	78%	86%	97%

^a Die Tests wurden auf einem ACL[®] 300R Gerinnungsautomaten durchgeführt

^b Die Tests wurden auf einem Sysmex CA-1500 Gerinnungsautomaten durchgeführt

Methodenvergleich

Zwei Methodenvergleichsstudien wurden mit dem ACTICLOT dPT und dem *DVVtest[®]* (REF 810)/*DVVconfirm[®]* (REF 815) durchgeführt. In den Studien wurden Patientenproben verwendet die zuvor als LA positiv getestet wurden oder im Normalbereich lagen. In der ersten Studie, die auf einem STA Compact durchgeführt wurde, stimmten die Ergebnisse bei 49 von insgesamt 54 getesteten Patienten Proben (90.7%) überein. In der zweiten Studie die auf einem BCT Gerät durchgeführt wurden, stimmten 82 von insgesamt 93 getesteten Patientenproben (88.2%) überein.¹⁶

LITERATUR

- Harris, E. N. The Antiphospholipid Syndrome. Diagnosis, Management, and Pathogenesis. *Clin Rev Allergy Immunol* 1995, **13**(1): 39-48.
- Levine, J. S., Branch, D. W. and Rauch, J. The Antiphospholipid Syndrome. *NEJM* 2002, **346**: 752-763.
- Conley, C. L. and Hartmann, R. C. A Hemorrhagic Disorder Caused by a Circulating Anticoagulant in Patients with Disseminated Lupus Erythematosus. *J Clin Invest* 1952, **31**: 621-622.
- Thiagarajan, P., Shapiro, S. S. and DeMarco, L. Monoclonal Immunoglobulin M lambda Coagulation Inhibitor with Phospholipid Specificity: Mechanism of a Lupus Anticoagulant. *J Clin Invest* 1980, **66**: 397-405.
- Triplett, D. A. Antiphospholipid Antibodies. *Arch Pathol Lab Med* 2002, **126**(11): 1424-1429.
- 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.
- 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.
- Johns, A. S., Chamley, L., Ockelford, P. A., Pattison, N. S., McKay, E. J., Corkill, M. and Hart, H. Comparison of tests for the lupus anticoagulant and antiphospholipid antibodies in systemic lupus erythematosus. *Clinical and Experimental Rheumatology* 1994, **12**: 523-526.
- Brandt, J. T., Triplett, D. A., Alving, B. and Scharer, I. Criteria for the Diagnosis of Lupus Anticoagulants: An Update. *Thromb Haemost* 1995, **74**(4): 1185-1190.
- Liestøl, S., Jacobsen, E. M. and Wisloff, F. Dilute Prothrombin Time-based Lupus Ratio Test. Integrated LA Testing with Recombinant Tissue Thromboplastin. *Thromb Res* 2002, **105**: 177-182.
- Triplett, D. A., Brandt, J. T., Kaczor, D., and Schaeffer, J. Laboratory Diagnosis of Lupus Inhibitors: a Comparison of the Tissue Thromboplastin Inhibition Procedure with a New Platelet Neutralization Procedure. *Am J Clin Path* 1983, **79**: 678-682.
- Arnout, J., Vanrusselt, M., Huybrechts, E. and Vermeylen, J. Optimization of the Dilute Prothrombin Time for the Detection of the Lupus Anticoagulant by Use of a Recombinant Tissue Thromboplastin. *Br J Haematol* 1994, **87**: 94-9.

13. Mackie, I. J., Lawrie, A. S., Greenfield, R. S., Guinto, E. R. and Machin, S. J. A New Lupus Anticoagulant Test Based on Dilute Prothrombin Time. *Thromb Res* 2004, 114: 673-674.
14. Collection, Transport and Processing of Blood Specimens for Testing Plasma-based Coagulation Assays: Approved Guidelines-Fourth Edition", NCCLS Document H21-A4, Vol. 23, No. 35, December 2003.
15. Lawrie, A. A., Mackie, I. J., Purdy, G. and Machin, S. J. The Sensitivity and Specificity of Commercial Reagents for the Detection of Lupus Anticoagulants Show Marked Differences in Performance between Photo-optical and Mechanical Coagulometers. *Thromb Haemost* 1999, 81: 758-762.
16. Daten bei American Diagnostica Inc., Stamford, Connecticut 06902, 2004

ACL ist eine eingetragene Marke von Instrumentation Laboratory, SpA

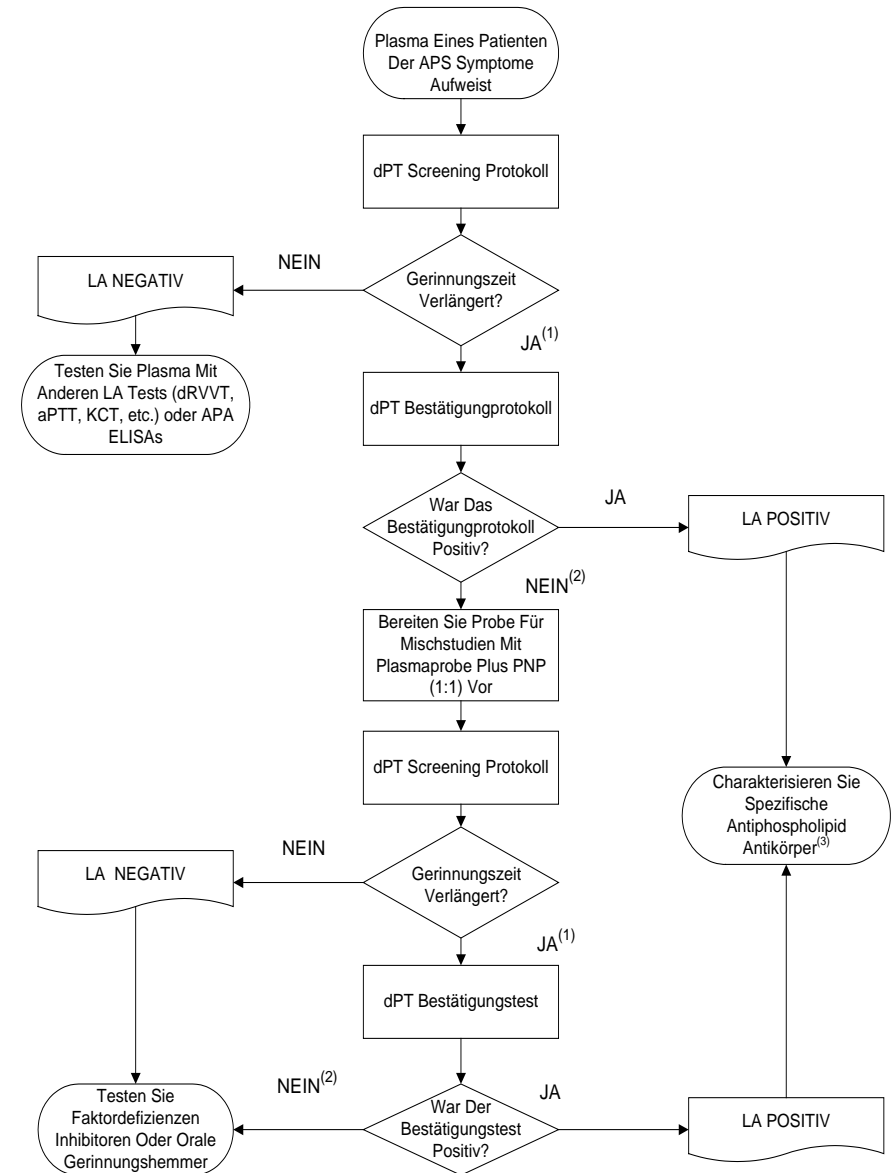
BCT ist eine eingetragene Marke von Dade Behring Inc.

MLA ist eine eingetragene Marke von Instrumentation Laboratory, SpA

STACLOT und STA Compact sind registrierte Marken von Diagnostica Stago SAS

Sysmex ist eine eingetragene Marke von Sysmex Corporation

Algorithmus zum Testen von Patientenproben mit dem ACTICLOT dPT Test



(1) Verdacht auf LA

(2) Die verlängerte Gerinnungszeit im Screening Protokoll wurde nicht signifikant durch das Bestätigungsprotokoll korrigiert.

(3) ELISA tests für anti-β2GP1, anti-prothrombin, anti-cardiolipin, anti-annexin V, etc.