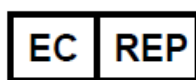
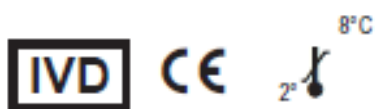




DVVtest® 10	DVVconfirm® 5
DVVtest® 25	DVVconfirm® 10
REF 810/825	REF 815/815L


 Obelis s.a
 Bd. Général Wahis 53, 1030 Brussels, BELGIUM

Použití:

DVVtest® je ředěné Russell's Viper Venom Time (dRVVT) měření určené k stanovení Lupus Antikoagulant (LA) v plazmě pacienta. DVVconfirm® se používá k potvrzení přítomnosti LA v plazmě, která vyšla pozitivně za použití DVVtestu. DVVtest a DVVconfirm jsou jedнокrokové koagulační testy, na které může být použito manuálních, poloautomatických a automatických metod stanovení.

Shrnutí:

Identifikace přítomnosti LA v plazmě je charakteristickým diagnostickým znakem antifosfolipidového syndromu (APS), který je klinicky charakterizován arteriální/žilní trombózou, opakující se samovolnou ztrátou plodu, trombocytopenií a/nebo neurologickými poruchami¹. LA může také být indukován jako důsledek podávání chlorpromazinu, prokainamidu, thorazinu a některých antibiotik. V roce 1952 Conley a Hartmann² poprvé popsali přítomnost LA u pacienta se Systemovým Lupus Erythematodes (SLE). Nyní je známo, že LA je běžně nalézán i u pacientů, kteří nemají SLE³. LA autoproti látky jsou specificky orientovány proti celé řadě proteinů vázajících fosfolipidy, včetně β2-glykoproteinu I (β2GPI), protrombinu a annexinu V, které jsou v komplexu s různými aniontovými fosfolipidy (např. kardiolipin, fosfatidylinositol a fosfatidylserine⁴). LA jsou imunoglobuliny IgG, IgM a IgA izotypů, které prodlužují jeden nebo více in-vitro fosfolipid-dependentních koagulačních testů (např. APTT, ředěný protrombinový čas, Textarinový čas nebo dRVVT). Mezinárodní společnost pro trombózu a hemostázu a vědecké podkomise pro kritéria pro LA a fosfolipidodependentní protilátky doporučily, aby LA byl diagnostikován použitím koagulačních screeningových testů a konfirmačního testu obsahujícího vysokou koncentraci fosfolipidů⁵.

BioMedica Diagnostics vyvinula DVVtest jako primární diagnostický test na stanovení LA a DVVconfirm jako konfirmační test s vysokým obsahem fosfolipidů pro potvrzení diagnózy LA. DVVtest a DVVconfirm jsou speciálně vytvořené testy ke snížení vlivu heparinu a maximální citlivosti a specifity diagnózy LA¹⁴.

Princip stanovení:

DVVtest obsahuje jed hada Russellova Zmije, který přímo aktivuje faktor X na faktor Xa za přítomnosti fosfolipidů a vápníku. Faktor Xa štěpí protrombin na trombin, který přeměňuje fibrinogen na fibrin a vede k detekovatelné formaci koagula v plazmě. Tato přímá aktivace faktoru X obchází kontaktní fázi aktivace a celou vnitřní cestu koagulační kaskády a proto vylučuje interferenci deficiencie faktorů VIII, IX, XI a XII, nebo přítomnost jejich inhibitorů. Pozitivní DVVtest je dán signifikantním prodloužením fosfolipid-dependentního koagulačního času (> 2 směrodatné odchyly nad normálním laboratorním referenčním průměrem). Jestliže je u pacienta podezření na přítomnost LA, DVVtest může být prováděn i u vzorků s normálním APTT, protože ředění a typ fosfolipidů obsažených v reagentii DVVtest zvyšuje citlivost testu a specifitu k LA⁶.

DVV confirm je test s vysokým obsahem fosfolipidů, určený k použití ve spojitosti s DVVtest na potvrzení přítomnosti LA v plazmě⁷. DVVconfirm byl vytvořen z hadího jedu Russellovy zmije a fosfolipidů o vysoké koncentraci. Koagulační čas u plazmy obsahující LA by měl být signifikantně kratší s DVV confirm při porovnání s DVV testem. Přítomnost LA ve vzorku plazmy je potvrzena, když je poměr DVVtest/DVVconfirm větší než rozmezí normální referenční hodnoty DVVtest/ DVVconfirm (průměrný normální poměr +2 směrodatné odchyly).

Reagencie:



Reagencie DVVconfirm a DVVtest jsou dodávány jako lyofilizované a obsahují vlastní směs hadího jedu Russellovy zmije, vápníku a fosfolipidů, inertních aditiv a konzervačních činidel. Neotevřené lahvičky, skladované při 2° - 8°C jsou stabilní až do data vytištěného na štítku.

Reagencie DVVtest jsou baleny ve dvou velikostech:

REF 810 obsahuje 10 lahviček, kde každá lahvička obsahuje reagentii na 20 testů za použití běžných automatizovaných metod; REF 825 obsahuje 10 lahviček, kde každá lahvička obsahuje reagentii na 50 testů za použití běžných automatizovaných metod.

Reagencie DVVconfirm jsou baleny ve dvou velikostech:
 REF 815 obsahuje 10 lahviček, kde každá lahvička obsahuje reagentii na 10 testů za použití běžných automatizovaných metod;
 REF 815L obsahuje 10 lahviček, kde každá lahvička obsahuje reagentii na 20 testů za použití běžných automatizovaných metod.

Varování:

DVVtest	Varování		H319, H412, P264, P273, P280, P305 + P351 + P338, P337 + P313
DVVconfirm	Nebezpečí		Obsahuje Imidazol H315, H318, H360, H412, P202, P280, P273, P302 + P325, P332 + P313, P305 + P351 + P338

H315 – Způsobuje podráždění kůže.
 H318 – Způsobuje vážné poškození očí.
 H319 – Způsobuje vážné podráždění očí.
 H360 – Může poškodit plodnost nebo plod v těle matky.
 H412 – Škodlivý pro životní prostředí s dlouhodobými následky.
 P202 – Nepoužívejte, dokud jste si nepřečetli všechny bezpečnostní pokyny a neporozuměli jim.
 P264 – Po manipulaci se důkladně omyjte.
 P273 – Zabraňte úniku do životního prostředí.
 P280 – Používejte ochranné rukavice, ochranný oděv, ochranné brýle nebo obličejový štít.
 P302 + 352 – PŘI STYKU S KŮŽÍ: Omyjte velkým množstvím vod a mýdla.
 P305 + 351 + 338 – PŘI ZASAŽENÍ OČÍ: Několik minut opatrně oplachujte vodou. Pokud jsou přítomny a lze, vyjměte kontaktní čočky a dále promývejte.
 P332 + 313 – Při podráždění kůže: Vyhledejte lékařskou pomoc.
 P337 + 313 – Přetrvává-li podráždění: Vyhledejte lékařskou pomoc.

Odběr vzorků a příprava:

Vzorky krve mohou být odebrány za použití stříkaček nebo silikonovaných odběrových zkumavek. Smíchejte 9 částí krve s 1 částí 3,2% nebo 3,8% (109 nebo 129 mM) citrátu sodného. Pokud je pacientův hematokrit větší než 55%, potom výsledky DVVtest a DVVconfirm mohou být nepřesné a vyžadují nastavení objemu krve ku antikoagulačnímu roztoku v jiném poměru⁸. Po promíchání vzorky odstředíte minimálně při 5 000g po dobu 10 minut. Je nutné, aby všechny plazmy testované těmito reagentii byly chudé na krevní destičky (méně než 10 000 destiček / μ l), což je obzvláště důležité při jejich zmrazení – jinak se mohou falešně zkrátit výsledné časy a tak maskovat přítomnost LA⁵. Nízkého obsahu destiček může být dosaženo centrifugací nebo filtrováním plazmy přes 0,22 mikronové filtry⁵. Získaná plazma může být skladována při 2° - 8°C - pak ale musí být testována do 4 hodin, nebo může být plazma rychle zamrazena na -70°C na dobu až 6 měsíců. Zamražená plazma musí být před použitím rychle rozmrazena při teplotě 37°C a okamžitě testována, nebo skladována ne více jak 2 hodiny při 2° - 8°C⁸.

Materiál požadovaný ale v kitu neobsažený:

Plazmy LATrol® Abnormal Control (REF 816A), LATrol® Normal Control (REF 816N) nebo jejich ekvivalent.
 Pipety schopné dávkovat od 100 μ l do 5,0ml
 Purifikovaná neionizovaná nebo destilovaná voda.

Příprava reagentii a stabilita:

Pozn: Lyofilizát DVVconfirm má práškovitý vzhled; nicméně lyofilizát DVVtest může vypadat jako krystalický.
 Naředte každou lahvičku reagentie neionizovanou vodou dle instrukcí uvedených na štítku.

REF	810	825	815	815L
Objem vody	2,0ml	5,0ml	1,0ml	2,0ml

Dobře reagentie promíchejte a nechte stát při pokojové teplotě alespoň 15 minut, aby došlo k dokonalému rozpuštění. Po rozpuštění jsou reagentie stabilní následovně:

Doba	24 hodin	7 dní	1 měsíc
Teplota	20 – 25°C	2 – 8°C	-20°C

Naředěné reagentie ze zásobníku přístroje mohou být znovu použity za předpokladu, že nebyla překročena 24-hodinová stabilita při pokojové teplotě.

Naředěné reagentie mohou být zamrazeny v plastových skladovacích zkumavkách aby se zajistila jejich stabilita.

Při použití zamražené reagentie, rozpouštějte reagentii po dobu alespoň 10 minut při teplotě +37°C a před použitím dobře promíchejte na Vortexu.

Metody stanovení:

Manuální zkumavková metoda nebo poloautomatická metoda za použití ST4 nebo BBL Fibrometer. Metody jsou dostupné na vyžádání¹⁰.

Automatizovaná metoda:

Testy DVVtest a DVVconfirm mohou být prováděny na většině automatických analyzátorů. Zvolený postup na přístroji by měl být nastaven tak, aby byl zachován ekvivalentní poměr reagentii a vzorku (např. 100 μ l DVVtest nebo DVVconfirm a 100 μ l testované plazmy). Jak obě reagentie, tak i testovaná plazma, by měly být inkubovány při teplotě +37°C po dobu alespoň 2 minut před testováním. Před vložením do přístroje dobře promíchejte naředěné reagentie. Výsledky DVVtest a DVVconfirm jsou udávány v čase (sekundy). LATrol (REF816N) může být použita jako normální kontrolní plazma při provádění DVVtestu nebo DVVconfirm (viz. interpretace výsledků při stanovení LA negativity nebo pozitivitu).

Používejte na reagentie doporučené nádoby a do zásobníku reagentii vložte magnetické míchadlo. Po použití reagentii použijte proplachovou a /nebo čistící proceduru před zahájením dalších koagulačních nebo chromogenních stanovení. Prostudujte si i manuál obsluhy od výrobce automatického přístroje, kde získáte náležitě informace.

Pozn.: Každý vzorek určený reagentii DVV test jako pozitivní by měl být testován reagentii DVVconfirm.

Kontrola kvality:

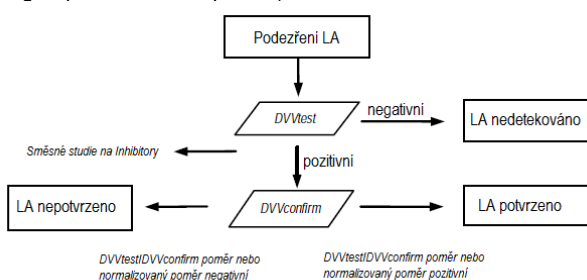
Obě normální a abnormální kontrolní plazmy by měly být testovány s každou sérií stanovení a pak po každých 40 vzorcích¹¹, nebo při změně pracovníka. Kontrolní plazmy musí být chudé na destičky (obsah méně než 10 000 destiček/ μ l). Abnormální a normální LATrol plazmy (REF 816A a 816N)¹⁰ mohou být použity ke kontrole kvality. Hodnoty pro normální a abnormální kontrolní plazmy by měly se pohybovat v laboratoři stanoveném rozmezí, dříve než jsou testovány vzorky pacientů⁸.

Normální referenční rozmezí:

Každá laboratoř by si měla stanovit svoje vlastní referenční rozmezí pro DVVtest a DVVconfirm (průměrná hodnota $\pm 2S.D.$). Mělo by být použito minimálně 20 plazem od zdravých dárců reprezentujících místní populaci, včetně mužů a žen a rozloženého věkového rozmezí (viz. Očekávané hodnoty)⁸. Při stanovování tohoto normálního referenčního rozmezí zacházejte se vzorky normálních plazem stejným způsobem jako s testovanými vzorky. Pokud jsou testovány pouze zamražené vzorky, mělo by být i pro ně stanoveno normální rozmezí ze zamražených normálních plazem. Nedoporučuje se testovat směsnou plazmu z čerstvých a zamražených vzorků pro stanovení referenčního rozmezí nebo pro rutinní testování. Nové referenční normální rozmezí MUSÍ být stanoveno kdykoli, když je použita nová šarže reagentie, nebo alespoň jednou za rok (podle toho co přijde dříve). Získejte data během několika dnů a stanovte variace, které vznikají ze dne na den.

Interpretace a hlášení výsledků:

(viz. graf pro rozhodnutí pro LA)



Výsledky testů DVVtest:

Pokud je naměřený čas testu DVVtestu ve stanoveném rozmezí (průměrná hodnota $\pm 2 SD$), potom je test negativní na LA. Pokud je naměřený čas testu DVVtestu ve vzorku delší než 2 SD nad průměrem normální reference, potom je test pozitivní na LA.

Pozn: Pozitivní DVVtest znamená, že buď je přítomen LA, nebo že plazma může mít sníženou hladinu faktoru II, V nebo X (nebo je přítomen jejich inhibitor). Když je DVVtest pozitivní, potom by přítomnost LA měla být potvrzena opětovným testováním za použití DVVconfirm, abychom získali poměr DVVtest/DVVconfirm (viz níže). Test DVVconfirm by měl být proveden na stejném vzorku pacienta a v ten samý den. K vyloučení deficitu faktorů by měly být provedeny směsné testy.

Výsledky testů DVVconfirm:

Pokud je testovaný vzorek pozitivní testem DVVtest, pak by se měl provést test DVVconfirm. Výsledky testování testem DVVconfirm mohou být udány poměrem DVVtest/DVVconfirm nebo Normalizovaným poměrem.

1) Poměr DVVtest/DVVconfirm je kalkulován vydělením času testu DVVtest (v sekundách) časem DVVconfirm testu (v sekundách) jak je uvedeno následovně)

$$\text{POMĚR DVVtest/DVVconfirm} = \text{DVVtest(sec)} : \text{DVVconfirm(sec)}$$

Poměr DVVtest/DVVconfirm musí být stanoven pro normální referenční plazmy. Když je výsledný poměr testované plazmy větší než jsou 2 směrodatné odchylky nad průměrem laboratorní normální referenční hodnoty, poměr DVVtest/DVVconfirm potvrdí pozitivní test na LA. Pokud je poměr DVVtest/DVVconfirm v rozmezí normálního referenčního poměru, pak je test na LA negativní nebo jsou přítomny jiné abnormální skutečnosti.

2) Normalizovaný poměr je kalkulován následovně:

$$\text{Normalizovaný poměr} = \frac{\text{DVVtest(vzorek)} : \text{DVVtest(průměr normální reference)}}{\text{DVVconfirm(vzorek)} : \text{DVVconfirm(průměr normální reference)}}$$

Distributor: Diagnostica s.r.o., Za Tratí 686, Praha 9, Česká republika, tel. +420 266 315 909, Fax. +420 266 316 000, e-mail: info@diagnostica.cz, www.diagnostica.cz

Příklad:

Pacient DVVtest	58,9s
Pacient DVVconfirm	32,2s
Průměr DVVtest	35,8s
Průměr DVVconfirm	32,8s

$$\text{Normalizovaný poměr} = \frac{58,9 / 35,8}{32,2 / 32,8} = \frac{1,64}{0,98} = 1,67$$

Interpretace výsledků Normalizovaného poměru:

Normalizovaný poměr	LA Status
> 2,0	LA je silně přítomen
1,5 až 2,0	LA je středně přítomen
1,2 až 1,5	LA je slabě přítomen

Výsledky pro LA mohou být uváděny buď jako negativní nebo pozitivní, poměrem DVVtest/DVVconfirm nebo Normalizovaným poměrem. Pokud jsou výsledky uváděny poměrem, potom musí být uvedeny rovněž hodnoty referenčního rozmezí.

Očekávané hodnoty:

Normální referenční rozmezí ($\pm 2 SD$)¹²

Metoda/Přístroj	MLA 1000C	ST4	ACL 300+
DVVtest čas (s)	28 – 45	29 – 51	28 – 47
DVVconfirm čas (s)	30 – 40	21 – 46	28 – 40
DVVtest/DVVconfirm poměr	0,77 – 1,21	0,95 – 1,47	0,83 – 1,35
N	21	25	20

Referenční rozmezí byla získána firmou BioMedica Diagnostics v souladu s CLSI Dokumentem H21-A5⁸. Dárci jsou muži a ženy, různých věkových kategorií a mající normální hodnoty PT a APTT. Tyto výsledky by měly sloužit pouze jako vodičko.

Výsledky se budou mezi jednotlivými laboratořemi měnit a každá laboratoř si musí stanovit svoje normální referenční rozmezí pro všechny přístroje a zvolené metody.

Interference:

Vzorky podezřelé z přítomnosti inhibitorů faktorů II, V nebo X, mohou dávat falešně pozitivní výsledky ve směsných testech.

Pokud je DVVtest vyšetřen v plazmě obsahující vysokou hladinu faktoru VIII (větší jak 200%), potom reagentie nemusí identifikovat přítomnost LA a dává falešně negativní výsledky¹².

Orální antikoagulanci a antagonisté K vitamínu mohou prodloužovat časy DVV testu a DVVconfirm. V nově doplněných doporučeních pro klasifikační kritéria pro antifosfolipidový syndrom (APS) z roku 2006 je toto zmiňováno¹³. Tento update doporučuje, že pokud je pacient léčen orálními antikoagulačními látkami, měl by být vzorek ředěn v poměru 1:2 normální plazmou (1 díl plazmy pacienta a 1 díl normální plazmy) před vlastním provedením testu. Toto platí za předpokladu, že INR je < 3,5. Pokud je INR > 3,5, neměl by být LA testován.

Pokud není laboratoři známo, zda je pacient léčen, musí být výsledek DVV confirm posuzován pečlivě. Pokud DVVconfirm nedává signifikantní korekci (zkrácení času) vzhledem k DVV testu a je prodloužený čas DVV confirm v porovnání s normální plazmou, pak je přítomnost orálního antikoagulačního léku pravděpodobná. V tom případě by měla být plazma pacienta smíchána 1:2 s normální plazmou a znovu testována. Pokud je DVV test opět prodloužený, měl by být proveden DVV confirm také ve směsi s normální plazmou pro ověření fosfolipid-dependentního prodloužení času.

DVVtest a DVVconfirm obsahují složky, které neutralizují standardní nefrakcionovaný heparin až do a včetně 1,0U/ml. Plazmy obsahující hladinu heparinu větší než 1,0 U/ml mohou dávat v těchto testech prodloužené výsledky. Některé LMW hepariny mohou interferovat s DVVtest. Studie ukázaly, že plazma obohacená s 2,0 jednotkami/ml Fragminu® (dalteparin sodium) neovlivňuje výsledky testu. Plasma obohacená s Lovenoxem® (enoxaparin sodium) při koncentracích větších než 0,25 jednotek/ml interferují s výsledky testu¹².

Limity testu:

Netestujte hemolytické, lipemické nebo ikterické vzorky. Vzorky podezřelé z deficitu FII, V a X by měly být testovány smíšenými testy.

Vzorky by měly být testovány za použití více koagulačních testů zaměřených na LA a ne pouze jediným testem. Jeden test nemusí odhalit přítomnost LA v každé plazmě⁵.

Charakteristika stanovení:

Přesnost:

Testy DVVtest a DVVconfirm byly vyšetřeny dle programu kontroly kvality firmy BioMedica Diagnostics a dvou nezávislých laboratoří. Celkový variační koeficient (CV) pro normální plazmy byl menší než 4,0% pro test DVVtest a menší než 5,0% pro test DVVconfirm. Pro abnormální plazmy byl celkový CV menší než 6,5% pro test DVVtest a menší než 5,0% pro test DVVconfirm¹².

Specifita:

Reagencie testů DVVtest a DVVconfirm byly testovány za použití obou normálních a abnormálních plazem jak je popsáno níže.

Vzorek plazmy	Pozitivní DVVtest/DVVconfirm
Lupus anticoagulans plazma	100% (17/17)
Normální plazma	2,1% (2/96)
Heparinizovaná plazma	0% (0/2)
Faktor deficitní plazma	0% (0/8)
Faktor VIII inhibitor plazma	0% (0/2)

Reference:

- Harris, E. N., Asherson, R. A., and Hughes, G. R. V. Antiphospholipid antibodies - autoantibodies with a difference. *Ann Revs Med* 1988, **39**: 261-271.
- 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. DVV_E@BMD28JUNE2018 13
- Triplett, D. A., Brandt, J. T. and Maas, R. L. The laboratory heterogeneity of lupus -anticoagulants. *Arch Path Lab Med* 1985; **109**: 946-951.
- 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.
- Pengo V, Tripodi A, Reber G, Rand JH, Ortel TL, Galli M, de Groot PG. Update of the guidelines for lupus anticoagulant detection. *J Thromb Haemost* 2009; **7**: 1737-40.
- 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.
- 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.
- CLSI. *Collection, transport and processing of blood specimens for testing plasma-based coagulation assays and molecular*

hemostasis assays – 5th Edition. CLSI document H21-A5. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.

9. Brandt, J. T. "Q & A". *CAP Today*, August 1992; Page 61.

10. Available from BioMedica Diagnostics, or your local distributor

11. Passey, R. B. Walking the straight and narrow on quality control. *MLO* 1993; **2**: 39-43.

12. Data on file, BioMedica Diagnostics.

13. Miyakis, S., *et al.* International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2006, **4**: 295-306.

14. CLSI. *Laboratory Testing for the Lupus Anticoagulant; Approved Guideline*. CLSI document H60-A. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2014.

Revize: 30_07_2018