

Lupus S, Lupus C

Lupus Screen, Lupus Confirm

REF	CONTENT	N. d'ident.	SYSTEM
06504183190	Lupus S ▽ 60	Lupus S: 07 2005 7	cobas t 511 / cobas t 711
06504787190	Lupus C ▽ 60	Lupus C: 07 2005 8	cobas t 511 / cobas t 711

Italiano

Informazioni relative al sistema

Nome abbreviato	ACN (<i>application code number</i> – codice di applicazione)
Lupus S	28390
Lupus C	28391

Finalità d'uso

Test *in vitro* per lo screening (Lupus S) e la conferma (Lupus C) della presenza di anticoagulanti lupici nel plasma citratato sugli analizzatori **cobas t** indicati. Il test serve per coadiuvare la diagnosi della sindrome antifosfolipidica.

Sommario

Questi test di coagulazione impiegano il reagente di veleno della vipera di Russell diluito per l'attivazione del fattore X nel plasma dei pazienti a seconda di un metodo standardizzato.¹ Gli anticoagulanti lupici (*lupus anticoagulants*: LA) sono anticorpi diretti contro fosfolipidi caricati negativamente, associati a proteine come la β -2-glicoproteina¹ o la protrombina.² Questi anticorpi prolungano i tempi di coagulazione dei test dipendenti dai fosfolipidi, come aPTT o PT.

Gli LA si osservano in caso di malattie autoimmuni (lupus eritematoso sistemico) o perdita ricorrente del feto, e sono considerati un fattore di rischio per eventi trombotici.^{2,3,4} La presenza di LA può essere o transitoria o permanente.^{3,4} La presenza di LA è un marcatore importante per la trombosi ricorrente e può indurre una terapia con anticoagulanti.

Principio del test

Il veleno della vipera di Russell attiva direttamente il fattore X a fattore Xa, il quale, in presenza di fosfolipidi e di fattore V, converte la protrombina in trombina. La trombina trasforma il fibrinogeno in fibrina insolubile. Si determina il tempo intercorso dall'aggiunta del reattivo al plasma al momento dell'inizio della coagulazione.

Lupus S contiene veleno della vipera di Russell e presenta una bassa concentrazione di fosfolipidi. In presenza di LA in un campione, l'inizio della coagulazione sarà ritardato in questo campione. Lupus C contiene veleno della vipera di Russell e presenta un'alta concentrazione di fosfolipidi, che neutralizza gli LA nel campione. Di conseguenza, in presenza di LA nel campione, il tempo di coagulazione si normalizza. Se la coagulazione è sempre prolungata, si consiglia di eseguire studi di miscelazione per identificare deficienze dei fattori II, V e X o la presenza di inibitori del fattore Xa o di inibitori della trombina.^{3,4,5,6}

Dato che i reagenti Lupus Screen/Confirm attivano direttamente il fattore X, il test non è sensibile ad anomalie del fattore VII nonché dei fattori ed inibitori della cascata coagulativa intrinseca.

Reattivi – soluzioni pronte all'uso

cobas t pack

Lupus S

SR^{a)} Lupus Screen: reagente liofilizzato contenente veleno della vipera di Russell, fosfolipidi a bassa concentrazione, una sostanza neutralizzante l'eparina, cloruro di calcio, tamponi, stabilizzatori, sodio azoturo come conservante e un colorante.

a) *Start reagent*: reagente starter

SR si trova nelle posizioni A, B e C.

Lupus C

SR^{a)} Lupus Confirm: reagente liofilizzato contenente veleno della vipera di Russell, fosfolipidi ad alta concentrazione, una sostanza neutralizzante l'eparina, cloruro di calcio, tamponi, stabilizzatori, ciprofloxacina come conservante e un colorante.

SR si trova nelle posizioni A, B e C.

Precauzioni e avvertenze

Per uso diagnostico *in vitro* per i professionisti del settore sanitario. Osservare le precauzioni normalmente adottate durante la manipolazione dei reagenti di laboratorio.

Rifiuti infettivi e microbici:

Avvertenza: trattare i rifiuti come materiale a potenziale rischio biologico. Smaltire i rifiuti a seconda delle istruzioni e procedure di laboratorio riconosciute.

Rischi ambientali:

Per garantire lo smaltimento sicuro, applicare tutte le normative locali rilevanti in materia di rifiuti.

Scheda dati di sicurezza disponibile su richiesta per gli utilizzatori professionali.

I reattivi contengono sodio azoturo (<1 g/L) come conservante. Eliminare con cautela i reagenti contenenti sodio azoturo per evitare la formazione di azidi di metallo esplosive. Se i rifiuti vengono eliminati nello scarico del lavandino, usare grandi quantità di acqua per sciacquare bene le tubazioni.

Utilizzo dei reattivi

Il reattivo contenuto nella cassetta è stato assemblato in un'unità pronta all'uso (**cobas t pack**).

Tutte le informazioni necessarie per l'utilizzo corretto sono disponibili tramite **cobas link**.

Conservazione e stabilità

Conservare a 2-8 °C.

Conservare il **cobas t pack** in posizione verticale.

Stabilità del **cobas t pack** integro: fino alla data di scadenza indicata.

Stabilità del cobas t pack aperto:	
sull'analizzatore cobas t	8 ore dopo ricostituzione

Non congelare.

Prelievo e preparazione dei campioni

Solo i tipi di campione elencati di seguito sono stati testati e risultano accettabili.

Plasma umano citratato al 3.2 %.

Impiegare provette standard per prelievi di campioni in materiale plastico o in vetro siliconato. Il rapporto tra sangue (9 parti) e soluzione di citrato di sodio (0.11 M; 1 parte) deve essere esattamente rispettato.^{7,8}

I tipi di campione elencati sono stati testati impiegando una selezione di provette per il prelievo di campioni disponibili in commercio al momento dell'analisi; non sono, quindi, state testate tutte le provette disponibili di tutte le case produttrici. Alcuni sistemi per il prelievo di campioni di vari produttori possono contenere diversi materiali e in alcuni casi possono interferire sui risultati del test. Quando si trattano i campioni in provette primarie (sistemi per il prelievo di campioni), seguire le istruzioni del produttore delle provette.

Il plasma deve contenere il minor numero possibile di piastrine, specialmente se i campioni vengono congelati per determinazioni successive. I fosfolipidi procoagulanti provenienti da piastrine danneggiate o attivate influenzano il tempo di coagulazione nel test per gli LA.^{3,4}

Centrifugare 15 minuti a 2500 g oppure finché il conteggio delle piastrine è < 10000 piastrine/ μ L, quindi testare i campioni entro il periodo di stabilità indicato.

Lupus S, Lupus C

Lupus Screen, Lupus Confirm

cobas®

Si consiglia di eseguire una doppia centrifugazione. Se i campioni saranno congelati, l'esecuzione di una doppia centrifugazione è necessaria.^{3,4}

Stabilità:	
a 15-25 °C	4 ore
a -80 °C (± 5 °C)	12 settimane

Le aliquote del plasma congelato devono essere scongelate entro 5 minuti a 37 °C a bagnomaria ed omogeneizzate agitandole con cautela ed evitando la formazione di schiuma. Analizzare i campioni scongelati entro 2 ore. Non ricongelare i campioni.

Materiali a disposizione

Vedere la sezione "Reattivi – soluzioni pronte all'uso".

Materiali necessari (ma non forniti)

- [REF] 07138504190, Lupus Con, 2 x 5 x 1 mL
- Normale attrezzatura da laboratorio
- Acqua distillata o deionizzata
- Analizzatore di coagulazione **cobas t**. Per ulteriori materiali necessari consultare l'Assistenza Clienti del relativo analizzatore.

Esecuzione

Per una performance ottimale dei test, attenersi alle indicazioni riportate in questo documento. Per le istruzioni specifiche dell'analizzatore relative all'esecuzione del test, consultare l'Assistenza Clienti dello strumento.

Roche non risponde delle performance delle applicazioni che non sono state validate dalla stessa Roche – tali performance devono quindi essere definite dall'utilizzatore.

Procedura

Intervallo di riferimento (IR)

Stabilire un intervallo di riferimento per ogni lotto rispettivamente dei reagenti Lupus S e Lupus C. Impiegare almeno 40 plasmi normali individuali di donatori sani, e calcolare la media e l'intervallo di 2 DS.³ Il tempo di coagulazione medio dell'IR (IRM) deve essere utilizzato per la normalizzazione. Un nuovo intervallo di riferimento deve essere creato a cambio di lotto del reattivo o a cambio di analizzatore. Per tener conto della variabilità nella serie, conviene raccogliere i dati relativi all'intervallo di riferimento per alcuni giorni. Per tener conto della variabilità tra le popolazioni di campioni impiegate, si consiglia di stabilire un nuovo intervallo di riferimento per entrambi i reagenti, Lupus S e Lupus C, anche se vi è un cambio di lotto solo per 1 dei 2 reagenti.

Calcolo

I tempi di coagulazione [s] sia del test di screening che del test di conferma devono essere normalizzati contro l'IRM e sono riportati come rapporti: rapporto di screening = tempo di coagulazione Lupus S del plasma del paziente / IRM Lupus S.

rapporto di conferma = tempo di coagulazione Lupus C del plasma del paziente / IRM Lupus C.

I risultati finali sono espressi come segue:

rapporto normalizzato = rapporto di screening / rapporto di conferma.

Un rapporto normalizzato > 1.2 è considerato un risultato positivo e indica la presenza di LA.

Il rapporto di screening, il rapporto di conferma ed il rapporto normalizzato sono test calcolati, che non saranno automaticamente configurati sul sistema dopo l'installazione dei codici a barre elettronici delle applicazioni Lupus S e Lupus C. Per la configurazione dei test calcolati, procedere secondo le istruzioni riportate nell'Assistenza Clienti dell'analizzatore **cobas t**, sezione "Creazione di un test calcolato".

Interpretazione dei risultati

Le determinazioni degli LA vengono iniziate con il test Lupus S.

Se il rapporto di screening è < 1.2, non si rileva la presenza di LA.

Se il rapporto di screening è > 1.2, si sospetta la presenza di LA. In questo caso sono necessari ulteriori esami impiegando il test Lupus C e, opzionalmente, studi di miscelazione. Se il rapporto di conferma è < 1.2 ed il rapporto normalizzato > 1.2, si rileva la presenza di LA.

Vanno considerate le raccomandazioni del CLSI relative al *Laboratory testing for the Lupus Anticoagulant* (diagnosi di laboratorio

dell'anticoagulante lupico) e dello *Scientific and Standardization Committee of Lupus Anticoagulant*.^{3,4}

Studi di miscelazione

Se il rapporto di screening e/o il rapporto normalizzato sono al limite, o se il rapporto di conferma è > 1.2, o se il rapporto normalizzato è < 1.2, o se i tempi di coagulazione sono prolungati sia nel test di screening che nel test di conferma, per un'ulteriore differenziazione possono essere utili i test di miscelazione. Gli studi di miscelazione consentono la differenziazione tra carenze di fattori e la presenza di un'inibizione,^{3,4} possono, però, essere compromessi da una diluizione con anticorpi diretti contro anticoagulanti.⁹ Gli studi di miscelazione vengono eseguiti su una miscela 1:1 del plasma del paziente con il pool di riferimento.

Controllo di qualità

Per la verifica dell'accuratezza e della riproducibilità dei risultati è necessario l'impiego di controlli.

Per il controllo di qualità, impiegare le confezioni di controlli indicate nella sezione "Materiali necessari (ma non forniti)".

Gli intervalli ed i limiti del controllo dovranno essere conformi alle esigenze individuali di ogni laboratorio. I valori ottenuti devono rientrare nei limiti definiti. Ogni laboratorio deve definire delle misure correttive da attuare nel caso che alcuni valori siano al di fuori dei limiti definiti.

Per il controllo di qualità, attenersi alle normative vigenti e alle linee guida locali.

Limiti del metodo – interferenze

È stato testato l'effetto delle seguenti sostanze endogene e dei seguenti composti farmaceutici sulla performance del test. Non è stata osservata alcuna influenza sui risultati fino alle concentrazioni elencate:

Lupus S e Lupus C:

Sostanze endogene

Composto	Concentrazione
Bilirubina coniugata	5 mg/dL
Bilirubina non coniugata	5 mg/dL
Emoglobina	200 mg/dL
Intralipid	120 mg/dL

Criterio di valutazione: recupero entro ± 10% del valore iniziale.

Nel codice a barre elettronico per i test Lupus S e Lupus C è disattivata la segnalazione con il messaggio relativo all'indice L. I risultati dei test Lupus S e Lupus C saranno, quindi, segnalati esclusivamente con i messaggi relativi agli indici H e I.

Le interferenze da lipemia, emoglobina e bilirubina sono state testate secondo Glick.¹⁰

Non è stata osservata alcuna interferenza significativa in un pool di plasmi addizionati con eparina fino alla concentrazione di 0.8 IU/mL per l'eparina non frazionata (*unfractionated heparin*: UFH) e di 1.0 IU/mL per l'eparina a basso peso molecolare (*low molecular weight heparin*: LMWH).

Farmaci: non si è osservata alcuna interferenza a concentrazioni terapeutiche impiegando le più comuni famiglie di farmaci.^{11,12}

La presenza di inibitori diretti della trombina, quali il dabigatran, l'argatroban e la bivalirudina, o di inibitori del fattore X attivato (FXa), quali l'apixaban, l'edoxaban ed il rivaroxaban, nel campione influenza i risultati del test, il che può essere importante dal punto di vista clinico.

L'attività fibrinolitica della streptochinasi (distruzione dei coaguli di fibrina e del fibrinogeno) prolunga i tempi di coagulazione e altera, quindi, il rapporto normalizzato (*normalized ratio*: NR).

La presenza di oritavancina (Orbactiv) nel campione influenza i risultati di Lupus Screen e Lupus Confirm.

Nei pazienti sottoposti a terapia anticoagulante orale, l'attività del FXa e della trombina è ridotta; i risultati di LA ottenuti per tali pazienti possono, quindi, essere fuorvianti.⁴ Per escludere la presenza di anticorpi transitori, che non sono clinicamente significativi, la persistenza di anticorpi anti-LA deve essere determinata a 12 settimane dal rilevamento iniziale.¹³

Non si consiglia di utilizzare come controllo di qualità negli studi di miscelazione plasmi di controllo normali disponibili in commercio con livelli di citrato e di piastrine non chiaramente indicati.

Lupus S, Lupus C

Lupus Screen, Lupus Confirm

cobas®

Prima dell'esclusione di LA, è necessario eseguire almeno 2 test di screening basati su differenti setup del test.^{3,4}

Ai fini diagnostici, i risultati devono sempre essere valutati congiuntamente con la storia clinica del paziente, con gli esami clinici e con altre evidenze cliniche.

Cicli di lavaggio extra: l'uso dei lavaggi extra è obbligatorio quando certe combinazioni di test vengono eseguite insieme sugli analizzatori **cobas t**. Per ulteriori istruzioni, consultare la versione più recente dell'elenco dei possibili carry-over allegato alla metodica relativa a CLEAN e Deproteinizer e rivolgersi all'Assistenza Utente. Se richiesto, i cicli di lavaggio extra/evasione del carryover devono essere implementati prima di generare i report dei risultati con questo test.

Valori di riferimento

Lupus S: 20.5-33.6 s

Lupus C: 24.0-31.6 s

Questi valori corrispondono ai 2.5° e 97.5° percentili dei risultati ottenuti con complessivamente 200 campioni di plasma umano. Cutoff del rapporto normalizzato: 1.2. Il cutoff è stato determinato secondo H60A del CLSI, impiegando un totale di 200 campioni. Il cutoff è stato calcolato impiegando la media + 2 DS.

I valori normali possono variare a seconda delle condizioni locali e delle popolazioni di pazienti. Anche fattori quali il procedimento di prelievo, le condizioni di conservazione dei campioni ed il metodo di misurazione possono interferire sui risultati.

Ogni laboratorio deve controllare l'applicabilità dei valori di riferimento alla propria popolazione di pazienti e, se necessario, determinare intervalli di riferimento propri.

Dati specifici sulla performance del test

Qui di seguito sono riportati i dati rappresentativi delle prestazioni sugli analizzatori. I risultati dei singoli laboratori possono differire da questi.

Precisione

La ripetibilità e la precisione intermedia sono state determinate usando campioni umani e controlli, eseguiti in conformità ai requisiti EP05 del CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) (2 aliquote per serie, 2 serie al giorno, 21 giorni). Sono stati ottenuti i seguenti risultati:

Lupus Screen	Ripetibilità			Precisione intermedia	
	Media (s)	DS (s)	CV (%)	DS (s)	CV (%)
LA Con Low	35.0	0.304	0.9	0.533	1.6
LA Con High	89.7	1.08	1.2	1.73	1.9
Plasma 1	32.3	0.217	0.7	0.470	1.5
Plasma 2	45.4	0.501	1.1	0.963	2.1
Plasma 3	54.2	0.381	0.7	0.989	1.8
Plasma 4	68.5	0.560	0.8	1.14	1.7
Plasma 5	95.5	0.622	0.7	1.38	1.4

Lupus Confirm	Ripetibilità			Precisione intermedia	
	Media (s)	DS (s)	CV (%)	DS (s)	CV (%)
LA Con Low	31.4	0.113	0.4	0.162	0.5
LA Con High	36.1	0.0982	0.3	0.189	0.5
Plasma 1	30.7	0.145	0.5	0.176	0.6
Plasma 2	33.9	0.169	0.5	0.219	0.6
Plasma 3	34.2	0.109	0.3	0.202	0.6
Plasma 4	33.0	0.210	0.6	0.275	0.8
Plasma 5	40.5	0.210	0.5	0.360	0.9

Rapporto normalizzato	Ripetibilità			Precisione intermedia	
	Media (NR)	DS (NR)	CV (%)	DS (NR)	CV (%)
LA Con Low	1.10	0.00988	0.9	0.0199	1.8
LA Con High	2.45	0.0295	1.2	0.0485	2.0
Plasma 1	1.04	0.00816	0.8	0.0184	1.8
Plasma 2	1.32	0.0145	1.1	0.0300	2.3
Plasma 3	1.56	0.0117	0.7	0.0338	2.2
Plasma 4	2.05	0.0159	0.8	0.0365	1.8
Plasma 5	2.33	0.0187	0.8	0.0416	1.8

Confronto tra metodi

Il confronto dei test Lupus S e Lupus C, eseguiti impiegando il calcolo dei test appaiati ed il rapporto normalizzato come risultato finale, su un analizzatore **cobas t 711 (y)**, con un test di coagulazione automatico (x), ha prodotto le seguenti correlazioni (%):

Numero dei campioni misurati: 286

Conformità totale (%): 90.6

I rapporti normalizzati ottenuti con i test Lupus S e Lupus C erano compresi tra 0.770 e 3.08.

Letteratura

- Exner T, Papadopoulos G, Koutts J. Use of a simplified dilute Russell's viper venom time (DRVVT) confirms heterogeneity among "lupus anticoagulants". *Bl. Coag. Fibrinol.* 1990; 1: 259-266.
- Devreese KMJ, Ortel TL, Pengo V et al. Laboratory criteria for antiphospholipid syndrome: communication from the SSC of the ISTH, *J. Thromb Haemostasis* 2018; 16: 809-
- CLSI document H60-A. Laboratory testing for the Lupus Anticoagulant; Approved guideline (April 2014).
- Pengo V, Tripodi A, Reber G, et al. Official communication of the scientific and standardization committee on lupus anticoagulant/phospholipid-dependent antibodies: update of the guidelines for lupus anticoagulant detection. *J Thromb Haemostasis* 2009;7:1737-1740.
- Genzen JR, Miller JL. Presence of direct thrombin inhibitors can affect the results and interpretation of lupus anticoagulant testing. *Am J Clin Pathol.* 2005;124(4):586-593.
- Moore GW, Recent Guidelines and Recommendations for Laboratory Detection of Lupus Anticoagulants, *Semin Thromb Hemost* 2014;40:163-171
- CLSI Document H21-A5, Vol.28, No.5, 2008. Collection, transport, and processing of blood specimens for testing plasma-based coagulation assays and molecular hemostasis assays; approved guideline, 5th edition.
- CLSI Document H3-A6. Procedures for the collection of diagnostic blood specimens by venipuncture; approved standard - Sixth Edition, vol. 27, No. 26, 2007.
- Moore GW, Savidge GF. The dilution effect of equal volume mixing studies compromises confirmation of inhibition by lupus anticoagulant even when mixture specific reference ranges are applied. *Thrombosis Research* 2006;118:523-528.
- Glick MR, Ryder KW, Jackson SA. Graphical Comparisons of Interferences in Clinical Chemistry Instrumentation. *Clin Chem* 1986;32:470-475.
- Breuer J. Report on the Symposium "Drug effects in Clinical Chemistry Methods". *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1996;34:385-386.
- Sonntag O, Scholer A. Drug interference in clinical chemistry: recommendation of drugs and their concentrations to be used in drug interference studies. *Ann Clin Biochem* 2001;38:376-385.
- Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, et al. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemostasis* 2006;4: 295-306.

Lupus S, Lupus C

Lupus Screen, Lupus Confirm

cobas®







In questa metodica, per separare la parte intera da quella frazionaria in un numero decimale si usa sempre il punto. Il separatore delle migliaia non è utilizzato.

Per ulteriori informazioni, consultare l'Assistenza Clienti appropriata per il relativo analizzatore e le metodiche di tutti i componenti necessari.

Esiste la necessità di segnalare qualsiasi incidente grave verificatosi in relazione al dispositivo, sia al fabbricante che all'autorità competente dello Stato membro in cui l'utilizzatore e/o il paziente è stabilito.

Simboli

Oltre a quelli indicati nello standard ISO 15223-1, Roche Diagnostics impiega i seguenti simboli (per gli USA: per la definizione dei simboli impiegati, vedere dialog. Roche.com):

	Contenuto della confezione
	Analizzatori/strumenti su cui i reagenti possono essere usati
	Reagente
	Calibratore
	Volume per la ricostituzione
	Global Trade Item Number

Le aggiunte, cancellazioni o modifiche sono indicate mediante una linea verticale posizionata al margine.

© 2022, Roche Diagnostics

 0123



Roche Diagnostics GmbH, Sandhofer Strasse 116, D-68305 Mannheim
www.roche.com

+800 5505 6606

