

CRYOcheck™

Hex LA

Intended Use

CRYOcheck Hex LA is for clinical laboratory use as a qualitative test kit intended to aid in the detection of lupus anticoagulants (LA) in 3.2% citrated human plasma by the application of hexagonal phase phospholipids. CRYOcheck Hex LA should be used as an integrated test for lupus anticoagulant detection. For in vitro diagnostic use. The performance of this device has not been established in neonate and pediatric patient populations.

Summary and Principle

Lupus anticoagulants (LA) are heterogeneous autoantibodies, mainly of the IgG and IgM type, which are directed against phospholipids (PL) or phospholipid-protein complexes involved in coagulation¹. LA antibodies are detected in patients' plasma by PL-dependent clotting assays. There is a significant association between LA and increased risk of clinical complications such as thrombotic events^{2,3} and recurrent fetal loss⁴. Medical diagnosis of LA is based on clinical symptoms and laboratory results. There is no gold standard test for LA. Considering the complexity of mechanism and the heterogeneous nature of LA antibodies, application of different clotting tests that work based on different principles has been recommended⁵.

LA prolongs clot formation of PL-dependent coagulation (LA screening) tests in vitro, such as LA-sensitive activated partial thromboplastin time (APTT) or dilute Russell's Viper Venom Time (dRVVT) screen. To confirm the presence of LA in a plasma sample, correction of a prolonged clot time by extra PL (an LA confirmatory test) needs to be performed by laboratories as well as ruling out other abnormalities, such as factor deficiency and heparin presence⁵.

CRYOcheck Hex LA is an integrated (screen and confirm) silica-based APTT assay for qualitative LA detection. The presence of LA in a plasma sample is confirmed by the correction of the APTT clot time (CT) of the sample upon the addition of a reaction mixture containing hexagonal phase PL. CRYOcheck Hex LA incorporates a pooled normal plasma (mixing test) and a heparin neutralizer.

Reagents and Availability

| Product | Catalog # | 4 Vial Sets, Each Set Containing |
|------------------|-----------|--|
| CRYOcheck Hex LA | HEXLA | LA Start: 2 x 1.5 mL (white cap) LA Correct: 2 x 1.5 mL (purple cap) LA APTT: 2 x 3.0 mL (black cap) |
| | HEXLA-7 | LA Start: 2 x 1.5 mL (white cap) LA Correct: 2 x 1.5 mL (purple cap) LA APTT: 3 x 3.0 mL (black cap) |

Materials Provided

LA Start: Pooled normal plasma with buffer and a heparin neutralizer.

LA Correct: Pooled normal plasma with buffer, a heparin neutralizer, and inverted hexagonal phase phospholipid.

LA APTT: Silica-based LA sensitive APTT reagent with stabilizer.



Caution: All blood products should be treated as potentially infectious. Source plasma used in this product was found to be negative when tested in accordance with current FDA required tests. No known test methods can offer assurance that products derived from human blood will not transmit infectious agents. Accordingly, any human blood-based component should be handled and discarded as recommended for any potentially infectious human specimen⁶.

For prescription use only.

Materials Required but not Provided

- 0.025 M CaCl₂
- Waterbath capable of maintaining 37 °C (± 1 °C)
- Floatie for thawing vials in waterbath
- Timer
- Vortex
- Coagulometer
- Micro magnetic stir bar
- Quality control materials (e.g. CRYOcheck Lupus Positive Control, CRYOcheck Weak Lupus Positive Control, CRYOcheck Lupus Negative Control)

Storage, Preparation and Handling

When stored at -70 °C or below, CRYOcheck Hex LA is stable to the end of the month indicated on the product packaging.

Thaw one vial each of LA Start, LA Correct and LA APTT at 37 °C (± 1 °C) in a waterbath for 5 minutes using the waterbath "floatie" thawing device (available separately). Thawing times are important and should be strictly adhered to. **The use of a dry bath or heating block for thawing is not recommended.** The use of a timer is recommended.

IMPORTANT: All reagents must be vortexed prior to use. After thawing, immediately vortex all capped reagent vials. Ensure each component is vortexed individually for 5 seconds, as insufficient vortexing of reagents may reduce the LA sensitivity of the assay. Ensure any large air bubbles produced as a result of vortexing are broken using a transfer pipette.

IMPORTANT: LA APTT must be stirred when in use. Add a micro magnetic stir bar to LA APTT prior to loading in a stirring position on the instrument.

Once thawed, CRYOcheck Hex LA may be used for 8 hours on board the analyzer, or for 4 hours if capped in the original vials and maintained at room temperature (18-25 °C). If stored at room temperature, invert capped APTT vial 5 times prior to loading on board instrument. **Do NOT store CRYOcheck Hex LA reagents in a refrigerator (at 2-8 °C).**

NB: CRYOcheck Hex LA components are lot-specific and should not be interchanged with other lot numbers.

Instruments

Each lab should prepare the local instrument in accordance with the manufacturer's instructions for use. Protocols for coagulation instruments are available upon request.

Procedure

Specimen Collection and Preparation

Collect and process blood in accordance with Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines⁷ and the guidelines for lupus anticoagulant detection⁸. Patient samples should be collected into 105-109 mmol/L trisodium citrate dihydrate anticoagulant (3.2%) in a ratio of 9 parts blood to 1 part anticoagulant. Patient plasma is derived by double centrifugation at 1500 x g for 15 minutes in order to achieve platelet poor plasma (<10,000 platelets/μL) and should be tested within four hours of collection when maintained at room temperature. If samples are not to be tested within four hours, then plasma should be removed from the cells and frozen at ≤ -70 °C for up to 2 months. Samples should not undergo more than one freeze-thaw cycle prior to testing.

Assay Procedure

- Prepare CRYOcheck Hex LA reagents according to Storage, Preparation and Handling instructions above. **IMPORTANT: after thawing, ensure each component is vortexed individually for 5 seconds.** Ensure any large air bubbles produced as a result of vortexing are broken using a transfer pipette.
- Prepare instrument according to the manufacturer's instructions for use. Protocols for coagulation instruments are available upon request.
- IMPORTANT: LA APTT must be stirred.** Uncap LA APTT vial, add a micro magnetic stir bar to LA APTT reagent and load in a stirring position on the instrument.
- Uncap LA Start and LA Correct vials and load on the instrument.
- Allow uncapped reagents to acclimate to the instrument temperature for at least 10 minutes before testing.
- Load samples on the instrument.
- Measure LA Start and LA Correct clot times using the appropriate instrument protocol.

Results and Interpretation

Calculate the difference in clot time (CT) in seconds ("delta correction") obtained with the LA Start and LA Correct reagents:

$$\text{Delta Correction} = \text{CT LA Start} - \text{CT LA Correct}$$

The delta correction result is then compared to an established assay cut-off^{8,9}. A result greater than or equal to the established cut-off is considered LA positive, while a result less than the established cut-off is considered LA negative.

On normal samples, the CT of LA Correct may be longer than the CT of LA Start, resulting in a negative delta correction value. This is of no consequence, and the sample in question should be considered LA negative.

Refer to Pengo et al, 2009 and CLSI H60 for guidelines on lupus anticoagulant detection^{5,8}.

Quality Control

For all coagulation tests, the laboratory must include at least two levels of control for every eight hours of operation and any time a change in reagents occurs¹⁰.

Assay controls are available for purchase separately. These include CRYOcheck Lupus Negative Control, CRYOcheck Weak Lupus Positive Control and CRYOcheck Lupus Positive Control. Refer to the Assay Certificate for results with CRYOcheck Hex LA specific to each lot of control.

Expected Values

A normal range study was performed in-house on two analyzers using normal samples (Analyzer A, n=137; Analyzer B, n=126) according to CLSI EP28: A3c⁹. Each sample was tested using three lots of CRYOcheck Hex LA. A pooled mean ± 2 SD range was determined for delta correction results and is shown in the table below.

| Normal Range | |
|-----------------|-----------------|
| Lower Range (s) | Upper Range (s) |
| -5.9 | 2.0 |

Cut-Off

The cut-off for the assay delta correction was determined using pooled data from the normal range study and calculating the mean + 4 SD, with the following results:

| Delta Correction | Interpretation |
|------------------|----------------|
| < 6.0 seconds | LA Negative |
| ≥ 6.0 seconds | LA Positive |

The results were obtained using specific lots of reagent. The cut-off is calculated as the mean of the delta correction + 4 SD, consistent with accepted methods for hexagonal phase neutralization tests. This method of establishing cut-off is different than that indicated for confirmatory tests in Pengo et al., 2009⁵. Each laboratory should verify its own cut-off, by testing the plasma of at least 20 normal individuals.

Interferences

Interference studies were conducted according to CLSI EP07, 3rd ed. using a single lot of CRYOcheck Hex LA¹¹. Patient plasma samples were spiked with possible interferents and 20 replicates were tested alongside 20 replicates of the corresponding blank matrix control. The following substances showed no interference up to the concentrations indicated:

| Substance Tested | Test Concentration |
|------------------------------|--------------------|
| Hemoglobin | ≤ 500 mg/dL |
| Bilirubin (unconjugated) | ≤ 20 mg/dL |
| Bilirubin (conjugated) | ≤ 2 mg/dL |
| Intralipid | ≤ 500 mg/dL |
| Unfractionated heparin | ≤ 2 IU/mL |
| Low molecular weight heparin | ≤ 2 IU/mL |

- Dabigatran, rivaroxaban, and fondaparinux do not interfere with the interpretation of CRYOcheck Hex LA results but may increase the delta correction of LA positive samples.
- Elevated factor VIII activity (up to 180%) does not interfere with CRYOcheck Hex LA.
- Elevated fibrinogen concentrations do not interfere with the interpretation of CRYOcheck Hex LA results but may increase the delta correction of LA positive samples.
- C-reactive protein does not interfere with the interpretation of CRYOcheck Hex LA results but at concentrations above 15 µg/mL may increase the delta correction of LA positive samples.
- Factor VIII inhibitor antibodies do not interfere with the interpretation of CRYOcheck Hex LA results, but at titers above 15 BU/mL may increase the delta correction of LA positive samples.
- Plasma samples with elevated INR (up to 4.5) do not interfere with the interpretation of CRYOcheck Hex LA results.
- High platelet counts (>10,000 platelets/μL) showed interference with CRYOcheck Hex LA results when compared with platelet poor (<10,000/μL, single centrifuged) or platelet free (double centrifuged) plasma samples from the same donors.
- Abnormally low factor II activities (below 50%) may interfere with the interpretation of CRYOcheck Hex LA, potentially resulting in false negative results for weakly LA positive plasmas.
- Factor VII and factor IX deficiencies do not interfere with CRYOcheck Hex LA.
- Abnormally low factor X activities (below 50%) do not interfere with the interpretation of CRYOcheck Hex LA results but may increase the delta correction of LA positive samples.

Performance Characteristics

All studies were performed using CRYOcheck Hex LA on Stago STA-R Evolution[®] analyzer(s).

Method Comparison: A method comparison study was conducted to assess the efficacy of CRYOcheck Hex LA in the qualitative detection of LA relative to a comparator assay, Staclot[®] LA. A total of 446 samples were included in the study: 124 known (previously characterized) LA positive samples, 75 normal (presumed LA negative) samples, 27 samples from individuals with other medical conditions including autoimmune disorders and 220 LA target screening population samples. The study was conducted at one internal and three external sites. Each site performed the investigational device assay on their assigned portion of the samples using a single lot of CRYOcheck Hex LA. One external site, acting as the central laboratory, performed the comparator device testing on all 446 samples

| Reproducibility: LA Start | | | | | | | | | | | |
|---------------------------------------|--------------------|----------------------------|-----|-------------|-----|-------------|-----|--------------|-----|-----------------|-----|
| Sample | Mean Clot Time (s) | Within-Run (Repeatability) | | Between-Run | | Between-Day | | Between-Site | | Reproducibility | |
| | | SD | %CV | SD | %CV | SD | %CV | SD | %CV | SD | %CV |
| CRYOcheck Lupus Negative Control | 52.8 | 1.4 | 2.7 | 0.3 | 0.6 | 0 | 0 | 0.4 | 0.7 | 1.6 | 3.0 |
| CRYOcheck Weak Lupus Positive Control | 85.6 | 3.3 | 3.9 | 0.5 | 0.6 | 0.5 | 0.6 | 1.9 | 2.2 | 3.9 | 4.6 |
| CRYOcheck Lupus Positive Control | 123.6 | 5.0 | 4.0 | 0 | 0 | 1.5 | 1.3 | 2.1 | 1.7 | 5.7 | 4.6 |
| LA Negative Plasma Sample | 55.8 | 1.5 | 2.6 | 0.1 | 0.2 | 0.3 | 0.5 | 0.7 | 1.3 | 1.8 | 3.2 |
| LA Near Cut-Off Plasma Sample | 66.9 | 2.3 | 3.5 | 0.4 | 0.6 | 0.8 | 1.2 | 0.8 | 1.2 | 2.7 | 4.0 |
| LA Weak Positive Plasma Sample | 88.3 | 3.7 | 4.1 | 0 | 0 | 1.1 | 1.3 | 1.8 | 2.0 | 4.3 | 4.8 |
| LA Strong Positive Plasma Sample | 264.9 | 6.9 | 2.6 | 0.3 | 0.1 | 2.3 | 0.9 | 4.5 | 1.7 | 10.3 | 3.9 |

| Reproducibility: LA Correct | | | | | | | | | | | |
|---------------------------------------|--------------------|----------------------------|-----|-------------|-----|-------------|-----|--------------|-----|-----------------|-----|
| Sample | Mean Clot Time (s) | Within-Run (Repeatability) | | Between-Run | | Between-Day | | Between-Site | | Reproducibility | |
| | | SD | %CV | SD | %CV | SD | %CV | SD | %CV | SD | %CV |
| CRYOcheck Lupus Negative Control | 53.7 | 1.7 | 3.1 | 0.8 | 1.6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3.1 | 5.8 |
| CRYOcheck Weak Lupus Positive Control | 65.7 | 2.4 | 3.6 | 1.0 | 1.5 | 0.7 | 1.0 | 0.7 | 1.1 | 3.1 | 4.8 |
| CRYOcheck Lupus Positive Control | 80.2 | 3.2 | 4.0 | 1.5 | 1.8 | 1.4 | 1.7 | 1.8 | 2.2 | 4.8 | 5.9 |
| LA Negative Plasma Sample | 56.0 | 1.7 | 3.0 | 0.6 | 1.1 | 0.2 | 0.4 | 0 | 0 | 2.9 | 5.2 |
| LA Near Cut-Off Plasma Sample | 59.2 | 2.2 | 3.7 | 1.2 | 2.0 | 0.7 | 1.1 | 0.3 | 0.6 | 3.0 | 5.0 |
| LA Weak Positive Plasma Sample | 66.9 | 2.7 | 4.0 | 1.3 | 2.0 | 1.2 | 1.8 | 2.2 | 3.3 | 4.0 | 6.0 |
| LA Strong Positive Plasma Sample | 117.4 | 4.5 | 3.9 | 3.1 | 2.6 | 2.0 | 1.7 | 2.6 | 2.2 | 9.4 | 8.0 |

using the Staclot LA assay on a STA-R Evolution. The data demonstrated positive percent agreement of 95.6% (95% CI, 91-98%), negative percent agreement of 95.2% (95% CI, 92%-97%), and overall agreement of 95.3% (95% CI, 93%-97%) as summarized below.

| Comparator device results | CRYOcheck Hex LA results | | | |
|---------------------------|--------------------------|----------|-------|-----|
| | Negative | Positive | Total | |
| | 6 | 130 | 136 | |
| | Total | 301 | 145 | 446 |

| Agreement | Point Estimate (95% Confidence Interval) |
|----------------------------|--|
| Positive Percent Agreement | 95.6% (91% - 98%) |
| Negative Percent Agreement | 95.2% (92% - 97%) |
| Overall Agreement | 95.3% (93% - 97%) |

Precision: An internal precision study was performed using three different lots of CRYOcheck Hex LA on a STA-R Evolution analyzer in accordance with CLSI EP05-A3¹². Three lot numbers of CRYOcheck Hex LA were used to test three control plasmas and five plasmas with varying LA positivity, in duplicate, twice a day for 20 days. The results demonstrated a pooled precision of < 5% CV for LA Start and < 8% CV for LA Correct.

| Sample | Within-Laboratory Precision (LA Start) | | | Within-Laboratory Precision (LA Correct) | | |
|---------------------------------------|--|-----|-----|--|-----|-----|
| | Mean Clot Time (s) | SD | %CV | Mean Clot Time (s) | SD | %CV |
| CRYOcheck Lupus Negative Control | 53.0 | 1.6 | 3.0 | 52.8 | 2.8 | 5.3 |
| CRYOcheck Weak Lupus Positive Control | 87.3 | 3.2 | 3.7 | 65.4 | 2.8 | 4.2 |
| CRYOcheck Lupus Positive Control | 125.4 | 5.2 | 4.2 | 79.8 | 4.5 | 5.7 |
| LA Negative Plasma Sample | 55.9 | 1.7 | 3.1 | 55.1 | 2.5 | 4.5 |
| LA Near Cut-Off Plasma Sample | 67.6 | 2.5 | 3.8 | 58.4 | 2.6 | 4.5 |
| LA Weak Positive Plasma Sample | 89.8 | 3.3 | 3.7 | 66.4 | 3.0 | 4.6 |
| LA Moderate Positive Plasma Sample | 146.5 | 6.0 | 4.1 | 85.9 | 5.8 | 6.7 |
| LA Strong Positive Plasma Sample | 270.7 | 9.6 | 3.6 | 118.0 | 9.0 | 7.6 |

Reproducibility: Reproducibility studies were conducted at three sites (one internal and two external) using three lots of CRYOcheck Hex LA in accordance with CLSI EP05-A3¹². The study tested three control plasmas as well as five plasmas with varying LA positivity. Each sample was tested in triplicate, twice a day for 5 days for each of the 3 lots of CRYOcheck Hex LA. The data across three sites demonstrated a pooled reproducibility of < 5% CV for LA Start and ≤ 8% CV for LA Correct as summarized in the reproducibility tables below.

CRYOcheck

Hex LA

Utilisation du produit

crYOcheck Hex LA vise une utilisation en laboratoire clinique, à titre de trousse de test qualitatif destinée à permettre la détection d’anticoagulants circulants (LA) dans le plasma humain citraté à 3,2 % par l’application de phospholipides en phase hexagonale. *crYOcheck* Hex LA devrait être utilisé comme test intégré pour la détection d’anticoagulants circulants. Pour utilisation dans le cadre d’un diagnostic in vitro. Les performances de cet ce coffret n’ont pas été établies chez les populations nouveau-nés et les enfants.

Résumé et principe

Les anticoagulants circulants (LA) sont des autoanticorps hétérogènes, principalement de type IgG et IgM, qui attaquent les phospholipides (PL) ou les complexes protéiques phospholipidiques qui interviennent dans la coagulation¹. Des épreuves de coagulation dépendantes des PL servent à détecter la présence d’anticorps LA dans le plasma des patients. Il existe un lien important entre les LA et le risque accru de complications cliniques telles que les événements thrombotiques^{2,3} et les pertes fœtales récurrentes⁴. Le diagnostic médical de LA est fondé sur des symptômes cliniques et des résultats en laboratoire. Il n'existe pas de test de référence pour les LA. Compte tenu de la complexité du mécanisme et de la nature hétérogène des anticorps LA, il a été recommandé d’appliquer différentes épreuves de coagulation qui fonctionnent en fonction de principes différents⁵.

Les LA prolongent la formation de caillots des tests de coagulation in vitro dépendants des PL (dépistage de LA), comme le test du temps de thromboplastine partielle activée (TTPA) sensible aux LA ou du temps de coagulation du venin de la vipère de Russell dilué (dVVR). Pour confirmer la présence de LA dans un échantillon de plasma, les laboratoires doivent effectuer la correction du temps de coagulation prolongé en ajoutant des PL (un test de confirmation de LA) en plus d’éliminer d’autres anomalies, comme le déficit en facteur et la présence d’héparine⁵.

crYOcheck Hex LA est une épreuve intégrée (dépistage et confirmation) de TTPA à base de silice pour la détection qualitative de LA. La présence de LA dans l'échantillon de plasma est confirmée par la correction du temps de coagulation (TC) TTPA de l'échantillon au moment de l'ajout d'un mélange réactif contenant des PL en phase hexagonale. *crYOcheck* Hex LA intègre un mélange de plasmas normaux (test du mélange) et un neutralisant d'héparine.

Réactifs et disponibilité

| Produit | Nº de catalogue | Composantes |
|--------------------------------|-----------------|---|
| <p><i>crYOcheck</i> Hex LA</p> | HEXLA | <p>LA Start: 2 x 1,5 mL (bouchon blanc)</p> <p>LA Correct: 2 x 1,5 mL (bouchon mauve)</p> <p>LA APTT: 2 x 3,0 mL (bouchon noir)</p> |
| | HEXLA-7 | <p>LA Start: 2 x 1,5 mL (bouchon blanc)</p> <p>LA Correct: 2 x 1,5 mL (bouchon mauve)</p> <p>LA APTT: 3 x 3,0 mL (bouchon noir)</p> |

Matériel fourni

LA Start: Mélange de plasmas normaux avec tampon et un neutralisant d’héparine.

LA Correct: Mélange de plasmas normaux avec tampon, un neutralisant d’héparine et des phospholipides en phase hexagonale inverse.

LA APTT: Réactif TTPA sensible aux LA à base de silice avec stabilisant.

⚠ *Mise en garde: Il faut traiter tous les produits sanguins comme potentiellement infectieux.* Lors d'essais réalisés conformément aux exigences actuelles de la FDA, le plasma destiné au fractionnement utilisé dans ce produit a obtenu un résultat négatif. Il n'existe aucune méthode d'essais qui garantit que les produits dérivés du sang humain ne transmettront pas d'agens infectieux. Par conséquent, il faut manipuler et traiter toute composante à base de sang humain en suivant les méthodes recommandées pour tout spécimen humain potentiellement infectieux⁶.

Uniquement sur ordonnance.





Matériel requis non inclus

- 0,025 M CaCl₂
- Bain d'eau pouvant maintenir une température de 37 °C (±1 °C)
- Flotteur pour faire dégeler les flacons dans un bain d'eau
- Minuterie
- Vortex
- Coagulomètre
- Barre d'agitation micro-magnétique
- Équipement de contrôle de la qualité (p. ex., *crYOcheck* Lupus Positive Control, *crYOcheck* Weak Lupus Positive Control, *crYOcheck* Lupus Negative Control)

Entreposage, préparation et manipulation

Lorsqu'il est entreposé à -70 °C ou moins, *crYOcheck* Hex LA est stable jusqu'à la fin du mois indiqué sur l'emballage du produit.

| | | |
|---|-------------|--------------------------|
| <i>Symbols Used / Symboles utilisés</i> | 09.60.00033 | Rev. 04 Dec. / déc. 2020 |
|---|-------------|--------------------------|

| | | | | | | | | |
|---------------------|--|---------------|---|---|---|---|---------------------------|---------------------------|
| REF | IVD | LOT |  |  |  |  | EC REP | Rx Only |
| Catalogue Number | <i>In vitro</i> diagnostic medical device | Batch code | Use by | Temperature limitation | Biological risks | Manufacturer | Authorized representative | For prescription use only |
| Numéro du catalogue | Dispositif médical de diagnostic <i>in vitro</i> | Numéro de lot | Date de péremption | Températures limites de conservation | Risques biologiques | Fabricant | Mandataire | Uniquement sur ordonnance |

Faire dégeler un flacon chacun de LA Start, LA Correct et LA APTT à 37 °C (± 1 °C) dans un bain d'eau pendant cinq (5) minutes en utilisant le dispositif de décongélation flottant (offert séparément). Les temps de décongélation sont importants et doivent être strictement respectés. **Il n'est pas recommandé d'utiliser un bain sec ou un bloc de chauffage pour la décongélation.** Il est recommandé d'utiliser une minuterie.

IMPORTANT : Il faut agiter tous les réactifs au vortex avant de les utiliser. Après la décongélation, agitez immédiatement au vortex tous les flacons fermés. Assurez-vous d'agiter chaque composante au vortex individuellement pendant cinq (5) secondes, car une agitation insuffisante au vortex peut réduire la sensibilité LA de l'épreuve. Assurez-vous de briser les grosses bulles d'air produites par l'agitation au vortex au moyen d'une pipette de transfert.

IMPORTANT : Il faut mélanger LA APTT pendant son utilisation. Ajoutez une barre d'agitation micro-magnétique à LA APTT avant de le charger en position d'agitation sur l'instrument.

Après la décongélation, *crYOcheck* Hex LA peut être utilisé pendant huit (8) heures à bord de l'analyseur, ou pendant quatre (4) heures s'il est fermé dans les flacons originaux et conservés à la température ambiante (18 à 25 °C). S'il est entreposé à la température ambiante, inverser le flacon de TTPA fermé cinq (5) fois avant de le charger à bord de l'instrument. **NE PAS entreposer les réactifs *crYOcheck* Hex LA au réfrigérateur (2 à 8 °C).**

N. B. Les composants du crYOcheck Hex LA sont propres à chaque lot et ne doivent pas être interchangeés avec des composants d'autres numéros de lot.

Instruments

Chaque laboratoire devrait préparer l'instrument local conformément au manuel d'emploi du fabricant. Les protocoles à suivre pour les instruments de coagulation sont disponibles sur demande.

Procédure

Collecte et préparation des spécimens

Collecter et traiter le sang conformément aux directives du Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)⁷ et aux directives sur la détection d'anticoagulants circulants⁸. Les échantillons du patient devraient être collectés dans 105 à 109 mmol/L d'anticoagulant de citrate trisodique dihydraté (3,2 %) dans un ratio de 9 volumes de sang pour 1 volume d'anticoagulant. Le plasma du patient découle de la centrifugation double à 1500 x g pendant 15 minutes afin d'obtenir du plasma pauvre en plaquettes (<10 000 plaquettes/µL) et devrait être testé dans les quatre heures après avoir été collecté, conservé à temperature ambiante. Si les échantillons ne doivent pas être testés dans les quatre heures, le plasma devrait alors être retiré des cellules et congelé à ≤-70 °C jusqu'à concurrence de deux (2) mois. Les échantillons ne devraient pas subir plus d'un (1) cycle de gel-dégel avant d'être testés.

Procédure de dosage

- Préparer les réactifs *crYOcheck* Hex LA conformément aux instructions de Stockage, préparation et manipulation qui précèdent. **IMPORTANT : après le dégel, s'assurer que chaque composante soit agitée au vortex individuellement pendant cinq (5) secondes.** Assurez-vous de briser les grosses bulles d'air produites par l'agitation au vortex au moyen d'une pipette de transfert.
- Préparer l'instrument conformément au manuel d'emploi du fabricant. Les protocoles à suivre pour les instruments de coagulation sont disponibles sur demande.
- IMPORTANT : Il faut mélanger LA APTT.** Retirer le bouchon du flacon de LA APTT, ajouter une barre d'agitation micro-magnétique au réactif LA APTT, puis le charger en position d'agitation sur l'instrument.
- Retirer le bouchon des flacons de LA Start et de LA Correct, et les charger sur l'instrument.
- Donner le temps aux réactifs ouverts de s'acclimater à la température de l'instrument pendant au moins 10 minutes avant les tests.
- Charger les échantillons dans l'instrument.
- Mesurer le temps de coagulation de LA Start et de LA Correct à l'aide du protocole d'instrument approprié.

Résultats et interprétation

Calculez la différence du temps de coagulation (TC) en secondes (« correction delta ») obtenue avec les réactifs LA Start et LA Correct :

Correction Delta = TC LA Start - TC LA Correct

Le résultat de correction delta est ensuite comparé à un temps limite d'épreuve établi^{8,9}. Un résultat supérieur ou égal au temps limite établi est considéré comme LA positif, alors qu'un résultat inférieur au temps limite établi est considéré comme LA négatif.

Pour les échantillons normaux, le TC de LA Correct peut être plus long que le TC de LA Start, ce qui donne une valeur de correction delta négative. Ce résultat est sans conséquence, et l'échantillon en question devrait être considéré comme LA négatif.

Consultez Pengo et coll., 2009 et CLSI H60 pour obtenir des lignes directrices sur la détection d’anticoagulants circulants^{5,8}.

Contrôle de la qualité

Pour tous les tests de coagulation, le laboratoire doit inclure au moins deux niveaux de contrôle toutes les huit heures d'ouverture, et chaque fois qu'un changement de réactifs survient¹⁰.

Les contrôles d’épreuves peuvent être achetés séparément. Ils incluent *crYOcheck* Lupus Negative Control, *crYOcheck* Weak Lupus Positive Control et *crYOcheck* Lupus Positive Control. Consultez le Certificat d’épreuve pour obtenir des résultats avec *crYOcheck* Hex LA propre à chaque lot de contrôle.

Valeurs attendues

Une étude de gamme normale a été effectuée en interne sur deux analyseurs à l'aide d'échantillons normaux (Analyzeur A, n=137; Analyzeur B, n=126) conformément à CLSI EP28: A3c9. Chaque échantillon a été testé au moyen de trois lots de *crYOcheck* Hex LA. Une étendue moyenne cumulée de ± 2 SD a été déterminée pour les résultats de correction delta et figure dans le tableau ci-dessous.

| Étendue normale | |
|------------------------|------------------------|
| Étendue inférieure (s) | Étendue supérieure (s) |
| -5.9 | 2.0 |

Temps limite

Le temps limite pour la correction delta de l'épreuve a été déterminé au moyen des données mises en commun d'étude de gamme normale et du calcul de la moyenne de + 4 SD, avec les résultats suivants:

| Correction delta | Interprétation |
|------------------|----------------|
| < 6.0 secondes | LA négatif |
| ≥ 6.0 secondes | LA positif |

Les résultats ont été obtenus à l'aide des lots de réactifs spécifique. Le temps limite est calculé comme la moyenne de la correction delta + 4 SD, compatible avec les méthodes d'essai de neutralization de phase hexagonale. Cette méthode d'établissement de temps limite est différente de celle indiquée pour les testes de confirmation cité en Pengo et al, 2009⁵. Chaque laboratoire devrait vérifier son propre temps limite, en testant le plasma d'au moins 20 personnes normales.

Interférences

Des études d'interférence ont été effectuées conformément à CLSI EP07, 3^e ed. à l'aide d'un seul lot de *crYOcheck* Hex LA¹¹. Des substances interférentes possibles ont été ajoutées aux échantillons de plasma du patient et 20 réplicats ont été testés avec 20 réplicats du contrôle de matrice témoin correspondant. Les substances suivantes n'ont présenté aucune interférence jusqu'à concurrence des concentrations indiquées:

| Substance testée | Concentration testée |
|--------------------------------------|----------------------|
| Hémoglobine | ≤ 500 mg/dL |
| Bilirubine (non conjugué) | ≤ 20 mg/dL |
| Bilirubine (conjugué) | ≤ 2 mg/dL |
| Intralipide | ≤ 500 mg/dL |
| Héparine non fractionnée | ≤ 2 UI/mL |
| Héparine de faible poids moléculaire | ≤ 2 UI/mL |

Reproductibilité : Des études de reproductibilité ont été effectuées dans trois sites (un interne et deux externes) à l'aide de trois lots de *crYOcheck* Hex LA conformément à CLSI EP05-A3¹². L'étude a testé trois plasmas de contrôle ainsi que cinq plasmas ayant diverses positivités LA. Chaque échantillon a été testé trois fois, deux par jour pendant cinq (5) jours pour chacun des trois (3) lots de *crYOcheck* Hex LA. Les données parmi les trois sites ont indiqué une reproductibilité cumulative de < 5 % CV pour LA Start et de ≤ 8 % CV pour LA Correct comme le résument les tableaux de reproductibilité ci-dessous.

| Reproductibilité: LA Start | | | | | | | | | | | |
|---|--------------------------------|--|-----|------------------|-----|-----------------|-----|-----------------|-----|------------------|-----|
| Échantillon | Temps de coagulation moyen (s) | À l'intérieur de la série (répétabilité) | | Entre les séries | | Entre les jours | | Entre les sites | | Reproductibilité | |
| | | SD | %CV | SD | %CV | SD | %CV | SD | %CV | SD | %CV |
| <i>crYOcheck</i> Lupus Negative Control | 52.8 | 1.4 | 2.7 | 0.3 | 0.6 | 0 | 0 | 0.4 | 0.7 | 1.6 | 3.0 |
| <i>crYOcheck</i> Weak Lupus Positive Control | 85.6 | 3.3 | 3.9 | 0.5 | 0.6 | 0.5 | 0.6 | 1.9 | 2.2 | 3.9 | 4.6 |
| <i>crYOcheck</i> Lupus Positive Control | 123.6 | 5.0 | 4.0 | 0 | 0 | 1.5 | 1.3 | 2.1 | 1.7 | 5.7 | 4.6 |
| Échantillon de plasma LA négatif | 55.8 | 1.5 | 2.6 | 0.1 | 0.2 | 0.3 | 0.5 | 0.7 | 1.3 | 1.8 | 3.2 |
| Échantillon de plasma LA près du temps limite | 66.9 | 2.3 | 3.5 | 0.4 | 0.6 | 0.8 | 1.2 | 0.8 | 1.2 | 2.7 | 4.0 |
| Échantillon de plasma LA faible positif | 88.3 | 3.7 | 4.1 | 0 | 0 | 1.1 | 1.3 | 1.8 | 2.0 | 4.3 | 4.8 |
| Échantillon de plasma LA fortement positif | 264.9 | 6.9 | 2.6 | 0.3 | 0.1 | 2.3 | 0.9 | 4.5 | 1.7 | 10.3 | 3.9 |

| Reproductibilité: LA Correct | | | | | | | | | | | |
|---|--------------------------------|--|-----|------------------|-----|-----------------|-----|-----------------|-----|------------------|-----|
| Échantillon | Temps de coagulation moyen (s) | À l'intérieur de la série (répétabilité) | | Entre les séries | | Entre les jours | | Entre les sites | | Reproductibilité | |
| | | SD | %CV | SD | %CV | SD | %CV | SD | %CV | SD | %CV |
| <i>crYOcheck</i> Lupus Negative Control | 53.7 | 1.7 | 3.1 | 0.8 | 1.6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3.1 | 5.8 |
| <i>crYOcheck</i> Weak Lupus Positive Control | 65.7 | 2.4 | 3.6 | 1.0 | 1.5 | 0.7 | 1.0 | 0.7 | 1.1 | 3.1 | 4.8 |
| <i>crYOcheck</i> Lupus Positive Control | 80.2 | 3.2 | 4.0 | 1.5 | 1.8 | 1.4 | 1.7 | 1.8 | 2.2 | 4.8 | 5.9 |
| Échantillon de plasma LA négatif | 56.0 | 1.7 | 3.0 | 0.6 | 1.1 | 0.2 | 0.4 | 0 | 0 | 2.9 | 5.2 |
| Échantillon de plasma LA près du temps limite | 59.2 | 2.2 | 3.7 | 1.2 | 2.0 | 0.7 | 1.1 | 0.3 | 0.6 | 3.0 | 5.0 |
| Échantillon de plasma LA faible positif | 66.9 | 2.7 | 4.0 | 1.3 | 2.0 | 1.2 | 1.8 | 2.2 | 3.3 | 4.0 | 6.0 |
| Échantillon de plasma LA fortement positif | 117.4 | 4.5 | 3.9 | 3.1 | 2.6 | 2.0 | 1.7 | 2.6 | 2.2 | 9.4 | 8.0 |

- Le dabigatran, le rivaroxaban et le fondaparinux n'interfèrent pas avec l'interprétation des résultats de *crYOcheck* Hex LA, mais peuvent augmenter la correction delta des échantillons LA positifs.
- L'activité de facteur VIII élevé (jusqu'à concurrence de 180 %) n'interfère pas avec *crYOcheck* Hex LA.
- Les concentrations élevées de fibrinogène n'interfèrent pas avec l'interprétation des résultats de *crYOcheck* Hex LA, mais peuvent accroître la correction delta des échantillons LA positifs.
- La protéine C réactive n'interfère pas avec l'interprétation des résultats de *crYOcheck* Hex LA, mais à des concentrations supérieures à 15 µg/mL, elle peut accroître la correction delta des échantillons LA positifs.
- Les anticorps inhibiteurs de facteur VIII n'interfèrent pas avec l'interprétation des résultats de *crYOcheck* Hex LA, mais à des titres supérieurs à 15 BU/mL, ils peuvent accroître la correction delta des échantillons LA positifs.
- Les échantillons de plasma ayant un INR élevé (jusqu'à 4,5) n'interferent pas avec l'interprétation des résultats de *crYOcheck* Hex LA.
- Avec une numération plaquettaire élevée (>10,000 plaquettes/µL) a montré une interférence avec les résultats de *crYOcheck* Hex LA par rapport aux échantillons de plasma pauvres en plaquettes (<10,000/µL, centrifugation simple) ou sans plaquettes (centrifugation double) provenant des mêmes individus.
- Le carence d'activité du facteur II (moins de 50%) peut interférer avec l'interpretation des résultats de *crYOcheck* Hex LA, pouvant entraîner des résultats faussement négatifs pour les échantillons faiblement LA positifs.
- Les carences d'activités du facteur VII ou facteur IX n'interfèrent pas avec *crYOcheck* Hex LA.
- Le carence d'activité du facteur X (moins de 50%) n'interfère pas avec l'interpretation des résultats de *crYOcheck* Hex LA, mais peuvent augmenter la correction delta des échantillons LA positifs.

Caractéristiques de rendement

Toutes les études ont été effectuées au moyen de *crYOcheck* Hex LA sur des analyseurs Stago STA-R Evolution[®].

Comparaison des méthodes : Une étude des méthodes de comparaison a été effectuée afin d'évaluer l'efficacité de *crYOcheck* Hex LA pour la détection qualitative du LA relativement à une épreuve comparatrice, Statclot® LA. En tout, 446 échantillons ont été inclus à l'étude: 124 échantillons LA positifs connus (caractérisés antérieurement), 75 échantillons normaux (présumés LA négatifs), 27 échantillons provenant de personnes ayant d'autres troubles médicaux, y compris des troubles auto-immunes, et 220 échantillons de la population cible de dépistage pour LA. L'étude a été menée à un site interne et trois sites externes. Chaque site a effectué l'épreuve des dispositifs de recherche sur leurs échantillons assignés à l'aide d'un seul lot de *crYOcheck* Hex LA. Un site externe, agissant en tant que laboratoire central, a mené le test d'instruments comparateur sur l'ensemble des 446 échantillons à l'aide de l'épreuve de Statclot LA sur un STA-R Evolution. Les données ont indiqué une correspondance positive en pourcentage de 95.6 % (95 % CI, 91 % à 98 %), une correspondance négative en pourcentage de 95.2 % (95 % CI, 92 % à 97 %) et une correspondance générale de 95.3 % (95 % CI, 93 % à 97 %), comme elles sont résumées ci-dessous.

PrecisionBioLogic

| Résultats des instruments comparateurs | Résultats <i>crYOcheck</i> Hex LA | | |
|--|-----------------------------------|---------|-------|
| | Négatif | Positif | Total |
| | 295 | 15 | 310 |
| | | Positif | 136 |
| | | Total | 446 |

| Correspondance | Estimation des points (intervalle de confiance de 95 %) |
|---|--|
| Correspondance de pourcentages positifs | 95.6% (91% - 98%) |
| Correspondance de pourcentages négatifs | 95.2% (92% - 97%) |
| Correspondance globale | 95.3% (93% - 97%) |



Précision: Une étude de précision interne a été effectuée à l'aide de trois lots différents de *crYOcheck* Hex LA sur un analyseur STA-R Evolution conformément à CLSI EP05-A3¹². Trois numéros de lot de *crYOcheck* Hex LA ont servi à tester trois plasmas de contrôle et cinq plasmas ayant diverses positivités LA, en double, deux fois par jour pendant 20 jours. Les résultats ont indiqué une précision cumulative de < 5 % CV pour LA Start et de < 8 % CV pour LA Correct.

| Échantillon | Dans la limite de la précision du laboratoire (LA Start) | | | Dans la limite de la précision du laboratoire (LA Correct) | | |
|---|--|-----|-----|--|-----|-----|
| | Temps de coagulation moyen (s) | SD | %CV | Temps de coagulation moyen (s) | SD | %CV |
| <i>crYOcheck</i> Lupus Negative Control | 53.0 | 1.6 | 3.0 | 52.8 | 2.8 | 5.3 |
| <i>crYOcheck</i> Weak Lupus Positive Control | 87.3 | 3.2 | 3.7 | 65.4 | 2.8 | 4.2 |
| <i>crYOcheck</i> Lupus Positive Control | 125.4 | 5.2 | 4.2 | 79.8 | 4.5 | 5.7 |
| Échantillon de plasma LA négatif | 55.9 | 1.7 | 3.1 | 55.1 | 2.5 | 4.5 |
| Échantillon de plasma LA près du temps limite | 67.6 | 2.5 | 3.8 | 58.4 | 2.6 | 4.5 |
| Échantillon de plasma LA faible positif | 89.8 | 3.3 | 3.7 | 66.4 | 3.0 | 4.6 |
| Échantillon de plasma LA modérément positif | 146.5 | 6.0 | 4.1 | 85.9 | 5.8 | 6.7 |
| Échantillon de plasma LA fortement positif | 270.7 | 9.6 | 3.6 | 118.0 | 9.0 | 7.6 |

Matériel requis non inclus

Bibliography / Bibliographie

- Bertolaccini ML, Roch B, Amengual O, Atsumi T, Khamashta MA, Hughes GRV. Multiple antiphospholipid tests do not increase the diagnostic yield in antiphospholipid syndrome. Br J Rheumatol. 1998;37(11):1229-1232.
- Male C, Foulon D, Hoogendoorn H, Vegh P, Silverman E, David M, Mitchell L. Predictive value of persistent versus transient antiphospholipid antibody subtypes for the risk of thrombotic events in pediatric patients with systemic lupus erythematosus. Blood. 2005;106(13):4152-4158.
- Galli M, Luciani D, Bertolini G, Barbui T. Lupus anticoagulants are stronger risk factors for thrombosis than anticardiolipin antibodies in the antiphospholipid syndrome: a systematic review of the literature. Blood. 2003;101(5):1827-1832.
- Lockshin MD, Kim M, Laskin CA, Guerra M, Branch DW, Merrill J, Petri M, Porter TF, Sammaritano L, Stephenson MD, Buyon J, Salmon JE. Prediction of adverse pregnancy outcome by the presence of lupus anticoagulant, but not anticardiolipin antibody, in patients with antiphospholipid antibodies. Arthritis Rheum. 2012;64(7):2311-2318.
- Pengo V, Tripodi A, Reber G, Rand JH, Ortel TL, Galli M, deGroot PG. Update of the guidelines for lupus anticoagulant detection. J Thromb. Haemost. 2009;7(10):1737-1740.
- U.S. Department of Health and Human Services; Public Health Service. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories-Fifth Edition. Centers for Disease Control and Prevention, National Institutes of Health. Atlanta, GA (USA); 2009.
- CLSI. Collection, Transport, and Processing of Blood Specimens for Testing Plasma-Based Coagulation Assays and Molecular Hemostasis Assays; Approved Guideline-Fifth Edition. H21-A5 . Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA (USA); 2008.
- CLSI. Laboratory Testing for the Lupus Anticoagulant; Approved Guideline. CLSI H60-A. Wayne, PA (USA); 2014.
- CLSI. Defining, Establishing, and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory; Approved Guideline – Third Edition. CLSI C28-A3. Wayne, PA (USA); 2015.
- CLIA 2004 – Code of Federal Regulations, 42CFR493.1269. 2004.
- CLSI. Interference Testing in Clinical Chemistry; Approved Guideline-Third Edition. EP07. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA (USA); 2018.
- CLSI. Evaluation of Precision of Quantitative Measurement Procedures; Approved Guideline – Third Edition. EP05-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA (USA); 2014.

  European Authorized Representative (Regulatory affairs only)
Emergo Europe—Prinsessegracht 20, 2514 AP The Hague, The Netherlands



 Precision Biologic Inc. • 140 Eileen Stubbs Avenue • Dartmouth, NS • B3B 0A9 • Canada

Tel: 1.800.267.2796 / +1.902.468.6422 • Fax 1.800.267.0796 / +1.902.468.