LA Screen / LA Confirm

Simplified Dilute Russell's Viper Venom Test (DRWT) for detection of Lupus Anticoagulants

INTENDED USE
LA Screen and LA Confirm are simplified DRVVT reagents for detection of Lupus Anticoagulants (LA) in one-stage clotting tests.
LA Screen
Simplified DRVV reagent to screen for the presence of Lupus Anticoagulants.
LA Confirm
Phospholipid-rich DRVV reagent for the specific correction of Lupus Anticoagulants.

SUMMARY AND EXPLANATION
LAs are autoantibodies against negatively charged phospholipids or complexes of phospholipids with either beta-2-glycoprotein 1 or clotting factors such as prothrombin. They occur in various clinical conditions, especially autoimmune diseases[1] and are now considered to be a significant risk factor in patients with otherwise unexplained thrombosis and are often present in women who have recurrent fetal loss[5]. LA have traditionally been detected using phospholipid responsive clotting tests, such as the activated partial thromboplastin time (APTT), kaolin clotting time (KCT) and DRVVT[2] where they have an anticoagulant effect.

The DRVV time first became popular following the publication by Thiagarajan et al. in 1986.[6] Life Diagnostics has simplified and standardized this method. [7] According to Petri[8] et al, thrombosis in SLE patients is more closely linked with LA detectable by DRVVT than with anticardiolipin antibodies detected by enzyme linked immunosorbent assays (ELISA)[5]. This observation was recently extended by Galli and Bevers[9] who showed that the LA subtype with most effect on DRVVT tests is beta-2-glycoprotein 1 dependent and different to the prothrombin-requiring LA subtype having more prolonging effect on KCT tests.

Test principle
1. Russell's viper venom present in LA Screen initiate plasma clotting by directly activating factor X. LA antibodies prolong the LA Screen clotting time.
2. LA Confirm reagent is similar to LA Screen but contains a high phospholipid concentration. The extra phospholipid counteracts the LA antibody and largely corrects the clot time[3].
3. DRVV tests "bypass" factor VII of the extrinsic pathway and the contact and antihaemophilic factors of the intrinsic pathway. Therefore LA Screen is more specific for LA than APTTs as they are not affected by contact factor abnormalities or by factor VIII deficiencies or antibodies[8]. There have been a number of tests developed based on phospholipid correction[4] however none have been as convenient to use as LA Confirm subsequent to LA Screen.
4. Mixing tests may be useful to exclude factor II, V and X deficiencies, which may prolong LA Screen and LA Confirm results. Mixing normal plasma with test plasma replenishes any factors deficient in the test plasma. If the mixing test is still prolonged, it indicates that an inhibitor (such as LA) is present in the test plasma.

REAGENT
Composition
LA Screen and LA Confirm contain Russell's viper venom, phospholipids, antiheparin agents, calcium, buffers, stabilizers, sodium azide and dyes

Warnings and precautions
For in-vitro diagnostic use only.

When disposing of azide, always flush with large volumes of water to avoid the possibility of an explosive residue forming in metal plumbing.

Preparation for use
Reconstitute with the volume of distilled water stated on the vial. Mix well by inversion to ensure complete re-suspension of the lyophilized material.

Storage instructions
The lyophilized reagents are stable at least until the expiry date stated on the vial label when stored at 2-8ºC.

Following reconstitution reagents can be stored for 8 hrs at 37ºC, 24 hours at 20-25ºC, 48 hrs at 2-8ºC and 1 month at -20ºC.

Indications of instability / deterioration
If there is no evidence of vacuum when the vial is opened and/or the reagent does not appear dry it should be returned to Life Diagnostics or your local distributor.

SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION
Collect and process blood in accordance with NCCLS Standard H21-A3: Collection, Transport and Processing of Blood Specimens for Coagulation Testing and General Performance of Coagulation Assays; Approved Guideline-3rd Edition (1998). Separated plasma should be stored at 2-8ºC and tested within 4 hours of collection. If the samples are to be frozen before testing, the plasma must be double spun to remove platelets (to below 10 x 10^9/L)[10] prior to freezing as these can shorten the LA Screen clotting time.

TEST PROCEDURE
1. Pre-warm a slight excess of LA Screen or LA Confirm reagent at 37±1ºC in a reagent reservoir, allowing for 200µl per test.
2. Dispense 200µl of test plasma into a glass test tube and warm for 1 minute at 37ºC
3. Add 200µl of pre-warmed reagent to the plasma and time from the moment of reagent addition to a clotting end point.
4. Repeat for duplicate test values and report the average of these as the result.

Automated method
Protocols for most automated clotting machines are available on request. LA Screen tests should be carried out using equal volumes of test plasma and reagent as in most thrombin time protocols.
However, observation or acquisition times should be extended to 120 seconds.

Materials provided
Each pack of LA Screen/ LA Confirm
Order code LASD-10 contains: 10 x lyoph. for 2 ml
Order code LASD-25 contains: 10 x lyoph. for 5 ml
Order code LACD-5 contains: 10 x lyoph. for 1 ml
Order code LACD-10 contains: 10 x lyoph. for 2 ml

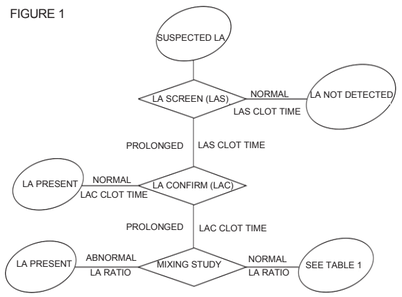
Materials required but not provided
10mm x 75mm glass test tubes
Waterbath at constant temperature of 37 +/- 1ºC
Stopwatch
200µl precision pipette
Purified water, USP or equivalent
Platelet depleted normal plasma
1, 2 or 5ml pipette.
Normal and Abnormal plasma for Quality Control

Quality control
Each laboratory should determine its own acceptable control values and normal range. Gradiplasma LA High (code LAHP) and Gradiplasma LA Low (code LALP) are abnormal control plasmas manufactured by Life Diagnostics for use in quality control of LA Screen and LA Confirm assays.
Quality control plasma must be tested at the same time as patient samples.

RESULTS
If the LA Screen clotting time is within the normal range no further testing for LA may be necessary. If the LA Screen clotting time result is more than 20% longer than pooled platelet depleted normal plasma the result should be considered abnormal and investigated further.
(See Figure 1)
The final result is best expressed as a ratio of the clotting times of LA Screen divided by LA Confirm.

LA Ratio = $\frac{\text{LA Screen clotting time}}{\text{LA Confirm clotting time}}$

FIGURE 1



Mixing tests
If results are borderline, mixing studies may be used to correct for hidden defects in the sample and clarify the presence of LA. These tests should be carried out on a 50:50 mixture of test plasma and platelet depleted normal plasma using the standard test procedure.

TABLE 1: Combination of mixing and confirmatory tests

LA Screen Clotting time		LA Confirm Clotting Time		Interpretation
Patient Plasma	Mix-Patient + Normal	Patient Plasma	Mix-Patient + Normal	
N	N	N	N	LA not detected
ABN	ABN	N	N	LA probably present
ABN	N	ABN	N	Possible factor deficiency/OAT exclude by further investigation
ABN	ABN	ABN	N	Possible factor deficiency exclude by further investigation
ABN	ABN	ABN	ABN	Exclude other inhibitor by further investigation

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE
Samples containing clots and those with abnormal hematocrit should be discarded.
Jaundiced, lipemic and hemolized specimens should be tested by manual techniques as some photoelectric instruments give false results.
Commercially available normal quality control plasmas with unspecified levels of citrate and platelets are not recommended for use in mixing studies.
For comparative studies LA Screen and LA Confirm tests should be performed at the same time.
LA assays based on different properties appear to be more or less sensitive to certain subgroups of LAs. Therefore at least two screening assays, based on different properties, should be performed before the possibility of LA is excluded.[10]
Heparin levels up to 1 unit/ml have no effect due to the presence of a neutralizing agent in both LA Screen and LA Confirm.

EXPECTED VALUES
Normal ranges for LA Screen of 31-44 seconds and for LA Confirm of 30-38 were obtained using a manual tilt-tube method with samples collected from 26 healthy individuals aged 18 to 55 years.
The ratio of LA Screen / LA Confirm was in the range 0.8-1.2. These results should be used as a guide only.
Each laboratory should determine its own normal range for both manual and automated methods to overcome differences in sample collection and instrumentation.

SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS
Intra-laboratory and inter-laboratory precision studies were performed using both manual tilt-tube and automated methods. These studies gave coefficient of variation less than 3.5% on normal plasmas and less than 5% for abnormal samples.
Specificity studies were performed on known plasma samples.
A positive ratio for LA Screen / LA Confirm of greater than 1.2 was found in known*
LA plasma - 90% (26/29)
Heparinised plasma- 12% (1/8)
OAT patient plasma- 0% (0/7)
Factor deficient plasmas- 0% (0/5)
Normal plasma- 2% (1/60)
*N.B. "known" LA identification with APTT + KCT mixing studies.

BIBLIOGRAPHY

1. Feinstein DI. Lupus anticoagulant, thrombosis and fetal loss. N.Eng.J.Med. 1985, 313,1248-1350
2. Triplett DA, Brandt JT. Laboratory identification of the lupus anticoagulant. Br.J. Haematol. 1991,73,139-142
3. Exner T, Triplett DA, Taberner D, Machin SJ. Guidelines for testing and revised criteria for lupus anticoagulants. Thromb. Haemostas. 1991,65,320-322
4. Rauch J, Tannenbaum M, Janoff AS. Distinguishing plasma lupus anticoagulants from antifactor antibodies using hexagonal phase II phospholipids. Thromb. Haemostas. 1989,62,892-896
5. Love PE, Santoro SA. Antiphospholipid antibodies: Anticardiolipin and the lupus anticoagulant in systemic lupus erythematosis (SLE) and in non-SLE disorders. Ann. Intern. Med. 1990,112,682-698
6. Thiagarajan P, Pengo V, Shapiro SS. The use of the dilute Russell's viper venom time for the diagnosis of lupus anticoagulants. Blood, 1986,68,869-874
7. 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
8. Petri M, Rheinschmidt. Metal. The frequency of lupus anticoagulant in systemic lupus erythematosus. Ann. Int. Med. 1987,106,524-531
9. Galli M, Finazzi G, Bevers EM, Barbui T. Kaolin clotting time and dilute Russell's viper venom time distinguish between prothrombin dependent and beta-2-glycoprotein 1 dependent antiphospholipid antibodies. Blood. 1995,86,617-623
10. Brandt JT, Triplett DA, Alving B, Scharrer I, Criteria for the Diagnosis of Lupus Anticoagulants: An Update. Thromb.Haemostas. 1995, 74 (4), 1185-90

DSRV, Inc.
330 Waterloo Valley Rd.
Suite 200
Mount Olive, NJ 07828 USA
Email – dsrv@stago.com

LA Screen / LA Confirm

Test simplifié au venin de vipère Russell dilué (TVVRd) pour la détection d'anticoagulants de type lupique

UTILISATION PREVUE
LA Screen et LA Confirm sont des réactifs TVVRd simplifiés pour la détection des anticoagulants de type lupique (LA) dans les tests de coagulation en une étape.
LA Screen
Réactif simplifié TVVRd destiné au dépistage des anticoagulants de type lupique.
LA Confirm
Réactif TVVRd riche en phospholipide pour la correction spécifique des anticoagulants de type lupique.

SOMMAIRE ET EXPLICATION
Les LA sont des autoanticorps contre les phosholipides chargés négativement ou les complexes de phospholipides avec soit la bêta-2-glycoprotéine 1, soit des facteurs de coagulation, tels que la prothrombine. Ils se produisent dans différents états cliniques, en particulier les maladies autoimmunitaires[1]. Ils sont actuellement considérés comme des facteurs de risque important chez les patients atteints de thrombose qui serait sinon inexpliquée, et sont souvent présents chez les femmes sujettes aux avortements spontanés récurrents[5]. Traditionnellement, les LA sont décelés par des tests de coagulation dépendant des phospholipides, tels que le temps de thromboplastine partielle activée (aPTT), le temps de coagulation du kaolin (KCT) et le TVVRd[2] où ils ont un effet anticoagulant.

Le TVVRd a connu ses premiers succès à la suite de la publication de Thiagarajan et col. en 1986. Life Diagnostics a simplifié et standardisé cette méthode[7]. Selon Petri[8] et col., la thrombose chez les patients souffrant de lupus érythémateux disséminé (LED) est plus étroitement liées au LA décelable par TVVRd qu'aux anticorps anticardiolipine décelés par des tests immuno-enzymatiques (ELISA)[5]. Cette observation a été récemment développée par Galli et Bevers[9] qui ont démontré que le sous-type LA ayant le plus d'incidence sur les tests TVVRd est dépendant de la bêta-2-glycoprotein 1 et différent du sous-type LA nécessitant la prothrombine du fait de l'effet prolongé sur les tests KCT.

PRINCIPE DU TEST
1. Le venin de vipère Russel présent dans le test LA Screen déclenche la coagulation du plasma en activant directement le facteur X. Les anticorps LA allongent le temps de coagulation du LA Screen.
2. Le réactif du LA Confirm est similaire à celui du LA Screen, mais contient une concentration élevée de phospholipides. Les phospholipides supplémentaires neutralisent les anticorps LA et corrigent sensiblement le temps de coagulation[3].
3. Les tests TVVRd « contournent » le facteur VII de la voie extrinsèque, ainsi que le contact et les facteurs antihémophiliques de la voie intrinsèque. C'est pourquoi le LA Screen est plus spécifique que les aPPT pour l'anticoagulant lupique, puisqu'ils ne sont pas affectés par les anomalies du facteur de contact, par des déficits en facteur VIII ou ses anticorps[6]. Plusieurs tests basés sur la correction phospholipidique[4] ont été mis au point. Cependant, aucun ne s'est avéré aussi pratique d'emploi que le LA Confirm utilisé à la suite du LA Screen.
4. Il peut s'avérer utile de réaliser des tests de mélange pour exclure les déficits en facteur II, V et X, qui peuvent prolonger les temps des tests LA Screen et LA Confirm. Le mélange de plasma normal avec du plasma à tester reconstitue tous les facteurs déficients dans le plasma à tester. Si le temps du test de mélange est encore prolongé, la présence d'un inhibiteur (tel que le LA) dans le plasma à tester est mise en évidence.

REACTIF
Composition
Les tests LA Screen et LA Confirm contiennent du venin de vipère Russell, des phospholipides, des agents antihéparine, du calcium, des tampons, des stabilisateurs, de l'azide de sodium et des colorants.

Mises en garde et précautions d'emploi
Réservé à un usage in-vitro.

Lors de l'élimination de l'azide de sodium, toujours rincer abondamment avec de l'eau, pour parer à une formation explosive des résidus d'azide de sodium dans les canalisations métalliques.

Préparation avant emploi
Reconstituer avec le volume d'eau distillée, tel qu'indiqué sur le flacon. Bien mélanger par retournement afin d'assurer la remise en suspension complète du produit lyophilisé.

Conservation
Les réactifs lyophilisés sont stables au moins jusqu'à la date de péremption indiquée sur le flacon, s'ils sont conservés entre 2 et 8 °C.

Les réactifs reconstitués peuvent être conservés pendant 8 heures à 37 ºC, 24 heures entre 20 et 25 ºC, 48 heures entre 2 et 8 ºC et un mois à –20 ºC.

Indications d'instabilité ou de détérioration
Lors de l'ouverture du flacon, s'il ne semble pas avoir été sous vide ou si le réactif ne paraît pas sec, le retourner à Life Diagnostics ou au distributeur local.

PRELEVEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS
Le prélèvement et le traitement du sang doivent être effectués conformément à la norme NCCLS H21-A3 portant sur le prélèvement, le transport et le traitement des spécimens sanguins pour les tests de coagulation et la performance générale des tests de coagulation ; directives approuvées – troisième édition (1998). Le plasma séparé doit être conservé entre 2 et 8 ºC et testé dans les 4 heures suivant le prélèvement. Si les échantillons doivent être congelés avant utilisation, le plasma doit être centrifugé deux fois pour extraire les plaquettes (en dessous de 10 x 10^9/L)[10] avant congélation, celles-ci pouvant raccourcir le temps de coagulation du LA Screen.

REALISATION DU TEST
1. Préchauffer une quantité de réactif LA Screen ou LA Confirm légèrement supérieure à la quantité nécessaire, soit 200 µl par test, à 37 ºC±1 ºC dans un réservoir à réactif.
2. Verser 200 µl de plasma à tester dans un tube à essais en verre et faire chauffer pendant une minute à 37 ºC.
3. Ajouter 200 µl de réactif préchauffé au plasma et chronométrer à partir de l'addition du réactif jusqu'au point final de coagulation.
4. Dupliquer et noter le résultat, constitué par la moyenne des valeurs répliquées.

Méthode automatisée
Les protocoles d'utilisation pour la plupart des automates de coagulation sont disponibles sur demande. Les tests LA Screen doivent être réalisés avec des volumes égaux de plasma à tester et de réactif comme dans la plupart des protocoles de temps de thrombine. Cependant, les temps d'observation et d'acquisition doivent être prolongés de 120 secondes.

Matériel fourni
Chaque coffret de LA Screen/LA Confirm contient:
Code de commande LASD-10 : 10 x 2 ml lyoph.
Code de commande LASD-25 : 10 x 5 ml lyoph.
Code de commande LACD-5 : 10 x 1 ml lyoph.
Code de commande LACD-10 : 10 x 2 ml lyoph.

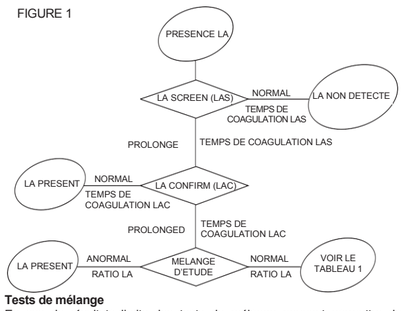
Matériel nécessaire non fourni
10 mm x 75 mm tubes à essais en verre
Bain d'eau à température constante de 37 +/- 1 ºC
Chronomètre
Pipette de précision
Eau purifiée, USP ou équivalent
Plasma normal dépourvu en plaquettes
Pipette de 1,2 ou 5 ml.
Plasma normal et anormal aux fins de contrôle de qualité

Contrôle de qualité
Il appartient à chaque laboratoire d'établir ses propres valeurs acceptables de contrôle et sa fourchette normale. Les tests Gradiplasma LA High (code LAHP) et Gradiplasma LA Low (code LALP) fabriqués par Life Diagnostics sont destinés au contrôle de qualité des tests de LA Screen et de LA Confirm. Le plasma de contrôle de qualité doit être testé en même temps que les échantillons de patients.

RESULTATS
Si le temps de coagulation du LA Screen est compris dans la fourchette normale, il est inutile de réaliser d'autres tests de LA. Si le temps de coagulation du LA Screen est supérieur à 20 % au-dessus de la moyenne du mélange de plasma normal dépourvu en plaquettes, le résultat doit être considéré comme anormal et donner lieu à d'autres recherches (voir Figure 1). Le résultat final est mieux exprimé sous forme de ratio du temps de coagulation du LA Screen divisé par le temps de coagulation du LA Confirm.

Ratio LA = $\frac{\text{Temps de coagulation du LA Screen}}{\text{Temps de coagulation de LA Confirm}}$

FIGURE 1



Tests de mélange
En cas de résultats limite, les tests de mélange peuvent permettre de corriger les anomalies cachées dans l'échantillon et de mieux comprendre la présence éventuelle de LA. Ces tests doivent être réalisés sur un mélange à parts égales (50/50) de plasma à tester et de plasma normal dépourvu en plaquettes suivant le mode opératoire habituel.

TABLEAU 1 : Combinaison de test de mélange et de test de confirmation

LA Screen Temps de coagulation		LA Confirm Temps de coagulation		Interprétation
Plasma Patient	Mélange-Patient + Normal	Plasma Patient	Mélange-Patient + Norma	
N	N	N	N	LA non détecté
ABN	ABN	N	N	LA probablement présent
ABN	N	ABN	N	Déficit en facteur/OAT possible ; exclure avec examen approfondi
ABN	ABN	ABN	N	Déficit en facteur/OAT possible ; exclure avec examen approfondi
ABN	ABN	ABN	ABN	Exclure autre inhibiteur avec examen approfondi

LIMITES DU TEST
Les échantillons contenant des caillots et ceux présentant des hématocrites anormaux doivent être éliminés. Les spécimens ictériques, lipémiques et hémolysés doivent être testés par des méthodes manuelles dans la mesure où certains appareils photoélectriques donnant des résultats erronés.
Il est déconseillé d'utiliser pour les tests de mélange des plasmas de contrôle qualité normaux disponibles dans le commerce comportant des niveaux indéterminés de citrate et de plaquettes.
Pour des études comparatives, les tests LA Screen et LA Confirm doivent être réalisés simultanément. Les tests LA basés sur d'autres principes sont plus ou moins sensibles à certains sous-groupes de LA. En conséquence, il est conseillé de réaliser au moins deux tests de dépistage basés sur des principes différents avant d'exclure la possibilité de LA.[10]
Des niveaux d'héparine jusqu'à 1 unité/ml n'ont pas d'incidence, en raison de la présence d'un agent de neutralisation tant dans le LA Screen que dans le LA Confirm.

VALEURS NORMALES
Des fourchettes normales de 31à 44 secondes pour le LA Screen et de 30 à 38 secondes pour le LA Confirm ont été obtenues avec la méthode manuelle du tube incliné, sur des échantillons prélevés sur 26 individus sains de 18 à 55 ans. Le ratio LA Screen/LA Confirm était compris dans la fourchette 0,8 à 1,2. Ces résultats sont fournis uniquement à titre indicatif.
Il appartient à chaque laboratoire de déterminer sa propre fourchette normale pour les deux méthodes, manuelle et automatique, afin de compenser les différences dans le prélèvement d'échantillons et l'instrumentation.

CARACTERISTIQUES DU TEST
Des études de précision intra et inter-laboratoires ont été réalisées avec la méthode manuelle du tube incliné et la méthode automatique. Ces études ont donné un coefficient de variation inférieur à 3,5 % sur les plasmas normaux et à 5 % sur les échantillons anormaux.
Des études de spécificité ont été réalisées sur des échantillons de plasma connu.
Un ratio positif pour les tests LA Screen/LA Confirm supérieur à 1,2 a été trouvé dans les plasmas connus suivants*:
Plasma LA – 90 % (26/29)
Plasma héparinisé – 12 % (1/8)
Plasma de patients OAT – 0 % (0/7)
Plasmas avec déficit en facteurs - 0 % (0/5)
Plasma normal – 2 % (1/60)
*N.B. Identification LA « connue » avec études de mélange aPTT + KCT.

BIBLIOGRAPHIE

1. Feinstein DI. Lupus anticoagulant, thrombosis and fetal loss. N.Eng.J.Med. 1985, 313,1248-1350
2. Triplett DA, Brandt JT. Laboratory identification of the lupus anticoagulant. Br.J. Haematol. 1991,73,139-142
3. Exner T, Triplett DA, Taberner D, Machin SJ. Guidelines for testing and revised criteria for lupus anticoagulants. Thromb. Haemostas. 1991,65,320-322
4. Rauch J, Tannenbaum M, Janoff AS. Distinguishing plasma lupus anticoagulants from antifactor antibodies using hexagonal phase II phospholipids. Thromb. Haemostas. 1989,62,892-896
5. Love PE, Santoro SA. Antiphospholipid antibodies: Anticardiolipin and the lupus anticoagulant in systemic lupus erythematosis (SLE) and in non-SLE disorders. Ann. Intern. Med. 1990,112,682-698
6. Thiagarajan P, Pengo V, Shapiro SS. The use of the dilute Russell's viper venom time for the diagnosis of lupus anticoagulants. Blood, 1986,68,869-874
7. 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
8. Petri M, Rheinschmidt. Metal. The frequency of lupus anticoagulant in systemic lupus erythematosus. Ann. Int. Med. 1987,106,524-531
9. Galli M, Finazzi G, Bevers EM, Barbui T. Kaolin clotting time and dilute Russell's viper venom time distinguish between prothrombin dependent and beta-2-glycoprotein 1 dependent antiphospholipid antibodies. Blood. 1995,86,617-623
10. Brandt JT, Triplett DA, Alving B, Scharrer I, Criteria for the Diagnosis of Lupus Anticoagulants: An Update. Thromb.Haemostas. 1995, 74 (4), 1185-90

DSRV, Inc.
330 Waterloo Valley Rd.
Suite 200
Mount Olive, NJ 07828 USA
Email – dsrv@stago.com

LA Screen / LA Confirm

Vereinfachter DRVVT-Test (Dilute Russell's Viper Venom Test) zum Nachweis von Lupusantikoagulanzien

VERWENDUNGSZWECK
LA Screen und LA Confirm sind vereinfachte DRVVT-Reagenzien zum Nachweis von Lupusantikoagulanzien (LA) in einstufigen Gerinnungstesten.
LA Screen
Vereinfachtes DRVV-Reagens, um das Vorhandensein von Lupusantikoagulanzien nachzuweisen.
LA Confirm
Phospholipidreiches DRVV-Reagens zur spezifischen Korrektur von Lupusantikoagulanzien.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERLÄUTERUNG
LAs sind Autoantikörper gegen negativ geladene Phospholipide oder Phospholipidkomplexe, entweder mit Beta-2-Glykoprotein 1 oder Gerinnungsfaktoren wie Prothrombin. Sie treten unter verschiedenen klinischen Bedingungen auf, vor allem bei Autoimmunerkrankungen[1], und werden heute als signifikante Risikofaktoren bei Patienten mit ansonsten unerklärter Thrombose betrachtet; häufig sind sie bei Frauen mit rezidivierenden Fetaltod[5] zu finden. Traditionell wurden LA anhand von phospholipidresponsiven Gerinnungstesten, in denen sie antikoagulative Wirkung zeigen, nachgewiesen, z.B. anhand der aktivierten partiellen Tromboplastinzeit (APTT), der Kaolin-Gerinnungszeit (KCT) und DRVVT[2].

Die DRVV-Zeit-Methode verbreitete sich erstmals nach der Veröffentlichung von Thiagarajan et al. 1986[6]. Life Diagnostics hat diese Methode vereinfacht und standardisiert.[7] Nach Petri[8] et al. steht Thrombose bei SLE-Patienten in engerem Zusammenhang mit durch DRVVT nachweisbaren LA als mit durch ELISA-Verfahren (Enzyme Linked Immunosorbent Assays)[5] nachgewiesenen Antikardiolipin-Antikörpern. Diese Beobachtung wurde kürzlich von Galli und Bevers[9] erweitert, die zeigten, dass der LA-Subtyp mit der größten Auswirkung auf DRVVT-Tests von Beta-2-Glykoprotein 1 abhängig ist und sich vom Prothrombin-abhängigen LA-Subtyp, der einen stärker verlängernden Effekt auf KCT-Tests hat, unterscheidet.

TESTPRINZIP
1. Das in LA Screen enthaltene Gift der Russell-Viper initiiert Plasmagerinnung durch direkte Aktivierung des Faktors X. LA-Antikörper verlängern die LA Screen-Gerinnungszeit.
2. LA Confirm-Reagens ist LA Screen ähnlich, enthält jedoch eine hohe Phospholipidkonzentration. Das zusätzliche Phospholipid wirkt dem LA-Antikörper entgegen und korrigiert die Gerinnungszeit weitgehend[3].
3. DRVV-Tests „umgehen" Faktor VII des extrinsischen Gerinnungswegs sowie die Kontakt- und antihämophilischen Faktoren des intrinsischen Gerinnungswegs. Aus diesem Grund ist LA Screen LA-spezifischer als APTTs, da diese von Abnormitäten der Kontaktfaktoren, einem Mangel an Faktor VIII oder Faktor-VIII-Antikörpern nicht beeinflusst werden[6]. Eine Reihe von Tests wurden auf Grundlage der Phospholipidkorrektur[4] entwickelt, doch ist bisher keiner so einfach in der Anwendung wie LA Screen, gefolgt von LA Confirm.
4. Mischtests können zum Ausschluss eines Mangels an Faktor II, V oder X, der zu einer Verlängerung der Ergebnisse von LA Screen und LA Confirm führen kann, hilfreich sein. Durch Mischen von Normalplasma mit Testplasma werden Faktoren ergänzt, die im Testplasma möglicherweise unzureichend sind. Bleibt auch der Mischtest verlängert, ist dies ein Hinweis auf Vorhandensein eines Inhibitors (z.B. LA) im Testplasma.

REAGENS
Zusammensetzung
LA Screen und LA Confirm enthalten Gift der Russell-Viper, Phospholipide, Antiheparinagenzien, Kalzium, Puffer, Stabilisatoren, Natriumazid und Farbstoffe.

Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen
Nur für in-vitro-Diagnosezwecke.

Bei der Entsorgung von Azid stets mit reichlich Wasser nachspülen, um den möglichen Aufbau eines explosiven Rückstands in Metallrohren zu verhindern.

Vorbereitung der Reagenzien
Mit der auf dem Fläschchen angegebenen Menge destillierten Wassers auflösen. Vorsichtig durch Kippen mischen um vollständiges Auflösen des lyophilisierten Materials zu gewährleisten.

Lagerung
Lyophilisierte Reagenzien sind bei Lagerung bei 2-8 °C mindestens bis zum auf dem Fläschchen angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil. Aufgelöste Reagenzien lassen sich bei 37 °C 8 Stunden lang lagern, bei 20-25 °C 24 Stunden, bei 2-8 °C 48 Stunden und bei -20 °C einen Monat lang.

Anzeichen für Instabilität/Verfall
Besteht bei der Öffnung der Fläschchen kein Hinweis auf ein Vakuum und/oder erscheint das Reagens nicht trocken, dann geben Sie es bitte an den Hersteller oder Vertriebshändler zurück.

PROBENAHME UND - VORBEREITUNG
Blut entsprechend NCCLS-Norm H21-A3 entnehmen und verarbeiten: Abnahme, Transport mit anschließender Bestimmung der Blutproben in Koagulationstests und allgemeine Durchführung von Koagulationsassays; Zugelassene Richtlinie - Dritte Fassung (1998). Separiertes Plasma bei 2-8 °C lagern und innerhalb von 4 Stunden nach Entnahme testen. Sollen die Proben vor dem Test eingefroren werden, ist das Plasma vor dem Einfrieren doppelt zu zentrifugieren, um Thrombozyten (auf weniger als 10 x 10^9/L)[10], zu reduzieren, da sie sonst die LA Screen-Gerinnungszeit verkürzen können.

TESTDURCHFÜHRUNG
1. Leichten Überschuss an LA Screen- oder LA Confirm-Reagens (pro Test 200 µl vorsehen) in einem Reagenzglas auf 37 °C ± 1 °C vorwärmen.
2. 200 µl Testplasma in ein gläsernes Teströhrchen pipettieren und 1 Minute lang bei 37 °C erwärmen.
3. 200 µl vorgewärmtes Reagens zum Plasma geben und die Zeit von der Reagenszugabe bis zum Gerinnungsendpunkt messen.
4. Test für Doppelbestimmung wiederholen und Mittelwert der Testresultate bilden.

AUTOMATISIERTE METHODE
Protokolle für die meisten automatisierten Koagulationsgeräte sind auf Anfrage erhältlich. LA Screen-Tests sollten unter Verwendung gleicher Volumina an Testplasma und Reagens wie bei den meisten Thrombinzeitprotokollen durchgeführt werden. Beobachtungs- und Erfassungszeiten sollten jedoch auf 120 Sekunden verlängert werden.

Gelieferte Materialien
Jede Packung LA Screen / LA Confirm
Bestellnr. LASD-10 enthält: 10 x lyophilisiert für 2 ml
Bestellnr. LASD-25 enthält: 10 x lyophilisiert für 5 ml
Bestellnr. LACD-5 enthält: 10 x lyophilisiert für 1 ml
Bestellnr. LACD-10 enthält: 10 x lyophilisiert für 2 ml

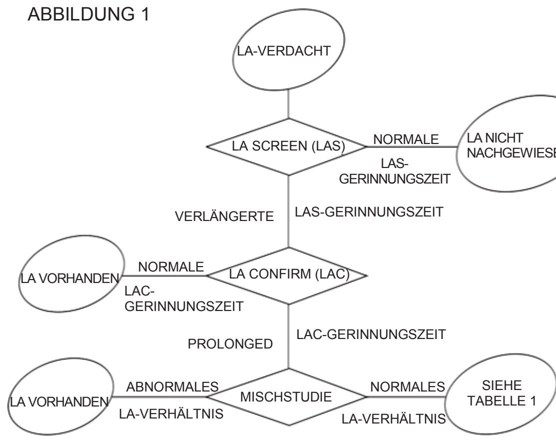
Benötigte Materialien (nicht im Lieferumfang enthalten)
10 mm x 75 mm gläserne TeströhrchenWasserbad mit konstanter Temperatur von 37 +/- 1 ºC
Stoppuhr
200 µl Präzions-Pipette
Gereinigtes Wasser nach USP, oder Äquivalent
Blutplättchenarmes, normales Plasma
1, 2 oder 5 ml-Pipette
Normales und anormales Plasma zur Qualitätskontrolle

QUALITÄTSKONTROLLE
Jedes Labor sollte seinen Normalbereich und seine eigenen akzeptablen Kontrollwerte festlegen.
Die Life Diagnostics-Produkte Gradiplasma LA High (Code LAHP) und Gradiplasma LA Low (Code LALP) ist anormales Kontrollplasma für die Qualitätskontrolle der Assays LA Screen und LA Confirm. Qualitätskontrollplasma
ist zur gleichen Zeit wie Patientenproben zu testen.

ERGEBNISSE
Liegt die LA Screen-Gerinnungszeit im Normalbereich, sind weitere LA-Tests möglicherweise nicht mehr erforderlich. Ist das Ergebnis der LA Screen-Gerinnungszeit mehr als 20 % länger als bei gebündeltem, blutplättchenarmen Normalplasma, ist das Resultat als nicht normal zu betrachten und es sollten weitere Untersuchungen angestellt werden (siehe Abb. 1).
Das Endresultat lässt sich am besten darstellen als Verhältnis der Gerinnungszeiten von LA Screen dividiert durch die LA Confirm.

LA-Verhältnis = $\frac{\text{LA Screen-Gerinnungszeit}}{\text{LA Confirm-Gerinnungszeit}}$

ABBILDUNG 1



Mischstudien
Sind die Resultate grenzwertig, kann eine Mischung von Studien zur Korrektur versteckter Defekte in der Probe und zur Abklärung des Vorhandenseins von LA angewendet werden. Diese Tests sollten anhand des Standard-Testverfahrens durch Mischung von Testplasma mit bluttplättchenarmes Normalplasma im Verhältnis 50:50 durchgeführt werden.

TABELLE 1: Kombination von Misch- und Bestätigungstests

LA Screen Gerinnungszeit		LA Confirm Gerinnungszeit		Interpretation
Patienten-plasma	Mischung Patient + Normal	Patienten-plasma	Mischung Patient + Normal	
N	N	N	N	LA nicht nachgewiesen
ABN	ABN	N	N	LA wahrscheinlich vorhanden
ABN	N	ABN	N	Potenzieller Faktormangel/OAT durch weitere Untersuchung ausschließen
ABN	ABN	ABN	N	Potenzieller Faktormangel, durch weitere Untersuchung ausschließen
ABN	ABN	ABN	ABN	Anderen Inhibitor durch weitere Untersuchung ausschließen

EINSCHRÄNKUNGEN DES VERFAHRENS
Proben mit Gerinnseln oder abnormen Hämatokritwerten sollten verworfen werden.
Ikterische, lipämische und hämolysierte Proben sollten anhand manueller Techniken getestet werden, da einige photometrische Instrumente falsche Resultate liefern.
Die Verwendung von kommerziell erhältlichen normalen Kontrollplasmen, die keine Angabe zu Citrat- und Thrombozytenkonzentrationen machen, sind für Mischstudien nicht zu empfehlen.
Für Vergleichsstudien sollten der LA Screen- und der LA Confirm-Test zur gleichen Zeit durchgeführt werden.
LA-Assays basierend auf unterschiedlichen Eigenschaften scheinen mehr oder weniger sensibel auf gewisse LA-Untergruppen zu sein.
Es sollten daher mindestens zwei Screening-Assays auf Grundlage verschiedener Eigenschaften durchgeführt werden, bevor potenzielle LA ausgeschlossen werden. [10].
Heparinspiegel bis zu 1 IU/ml bleiben ohne Einfluss, da sowohl LA Screen als auch LA Confirm eine neutralisierende Substanz enthalten.

ERWARTUNGSWERTE
Mit Proben von 26 gesunden Personen im Alter zwischen 18-55 Jahren wurde bei Anwendung der manuellen Kippmethode (Tilt Tube), für LA Screen ein Normalbereich von 31-44 Sekunden und für LA Confirm ein Normalbereich von 30-38 Sekunden ermittelt.
Das Verhältnis von LA Screen zu LA Confirm lag im Bereich 0,8-1,2. Diese Resultate sind nur als Anhaltspunkt zu verstehen.
Jedes Labor sollte sowohl für die manuelle als auch für die automatisierte Methode seinen eigenen Normalbereich ermitteln, um Unterschiede bei der Probenahme und Instrumentenbestückung zu eliminieren.

SPEZIFISCHE LEISTUNGSCHARAKTERISTIKA
Laborinterne und laborübergreifende Präzisionsstudien wurden sowohl anhand der manuellen Kippmethode als auch anhand der automatisierten Methode vorgenommen. Diese Studien ergaben Schwankungskoeffizienten von weniger als 3,5 % für Normalplasmen und weniger als 5 % für abnorme Proben.
Spezifitätsstudien wurden an bekannten Plasmaproben vorgenommen.
Ein über 1,2 liegendes positives Verhältnis für LA Screen / LA Confirm wurde gefunden in bekanntem*

LA-Plasma -	90 % (26/29)
Heparinisiertem Plasma -	12 % (1/8)
OAT-Patientenplasma -	0 % (0/7)
Plasmen mit Faktormangel -	0 % (0/5)
Normalplasma -	2 % (1/60)

*NB: „bekannte" LA-Identifizierung durch APTT + KCT-Mischstudien.

LITERATURVERZEICHNIS

1. Feinstein DI. Lupus anticoagulant, thrombosis and fetal loss. N.Eng.J.Med. 1985, 313,1248-1350
2. Triplett DA, Brandt JT. Laboratory identification of the lupus anticoagulant. Br.J. Haematol. 1991,73,139-142
3. Exner T, Triplett DA, Taberner D, Machin SJ. Guidelines for testing and revised criteria for lupus anticoagulants. Thromb. Haemostas. 1991,65,320-322
4. Rauch J, Tannenbaum M, Janoff AS. Distinguishing plasma lupus anticoagulants from antifactor antibodies using hexagonal phase II phospholipids. Thromb. Haemostas. 1989,62,892-896
5. Love PE, Santoro SA. Antiphospholipid antibodies: Anticardiolipin and the lupus anticoagulant in systemic lupus erythematosis (SLE) and in non-SLE disorders. Ann. Intern. Med. 1990,112,682-698
6. Thiagarajan P, Pengo V, Shapiro SS. The use of the dilute Russell's viper venom time for the diagnosis of lupus anticoagulants. Blood, 1986,68,869-874
7. 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
8. Petri M, Rheinschmidt. Metal. The frequency of lupus anticoagulant in systemic lupus erythematosus. Ann. Int. Med. 1987,106,524-531
9. Galli M, Finazzi G, Bevers EM, Barbui T. Kaolin clotting time and dilute Russell's viper venom time distinguish between prothrombin dependent and beta-2-glycoprotein 1 dependent antiphospholipid antibodies. Blood. 1995,86,617-623
10. Brandt JT, Triplett DA, Alving B, Scharrer I, Criteria for the Diagnosis of Lupus Anticoagulants: An Update. Thromb.Haemostas. 1995, 74 (4), 1185-90

DSRV, Inc.
330 Waterloo Valley Rd.
Suite 200
Mount Olive, NJ 07828 USA
Email – dsrv@stago.com

LA Screen / LA Confirm

Prueba de veneno de víbora de Russel diluido (DRVVT) simplificada para la detección de anticoagulantes lúpicos

USO INDICADO
LA Screen y LA Confirm son reactivos para la DRVVT simplificada para la detección de anticoagulantes lúpicos (*Lupus Anticoagulants,* LA) en pruebas de coagulación de un solo paso.
LA Screen
Reactivo DRVV simplificado para detectar la presencia de anticoagulantes lúpicos.
LA Confirm
Reactivo DRVV rico en fosfolípidos para la corrección específica de anticoagulantes lúpicos.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN
Los anticoagulantes lúpicos son autoanticuerpos contra fosfolípidos cargados negativamente o complejos de fosfolípidos con beta-2-glucoproteína-1 o factores de coagulación, tal como protrombina. Se producen en varias enfermedades, especialmente en las autoinmunitarias[1] y ahora se consideran un importante factor de riesgo en pacientes con trombosis inexplicables y con frecuencia se presentan en mujeres que han tenido abortos recurrentes.[5] Los LA se han detectado tradicionalmente mediante pruebas de coagulación con respuesta a fosfolípidos, tal como el tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPA), el tiempo de coagulación del caolín (TCC) y el DRVVT[2] donde tienen un efecto anticoagulante.

El tiempo de DRVV se hizo popular en un principio después de la publicación de Thiagarajan y cols. en 1986.[6] Life Diagnostics ha simplificado y estandarizado este método.[7] Conforme a Petri[8] y cols., la trombosis en pacientes con LES está más relacionada con el LA detectable mediante DRVVT que con los anticuerpos anticardiolipina detectados mediante ensayos de inmunoadsorción enzimática (ELISA)[5]. Esta observación ha sido recientemente ampliada por Galli y Bevers[9] que demostraron que el subtipo de LA con mayor efecto sobre las pruebas de DRVVT es la beta-2-glucoproteína-1 dependiente y diferente al subtipo de LA que requiere protrombina que tiene un efecto más prolongado sobre las pruebas del TTC.

PRINCIPIO DE LA PRUEBA
1. El veneno de la víbora de Russell existente en LA Screen inicia la coagulación del plasma activando directamente el factor X. Los anticuerpos LA prolongan el tiempo de coagulación de LA Screen.
2. El reactivo LA Confirm es similar al reactivo LA Screen pero contiene una concentración alta de fosfolípidos. Los fosfolípidos extra contrarrestan los anticuerpos LA y corrigen en gran medida el tiempo de coagulación[3].
3. Las pruebas DRVV "circunvalan" el factor VII de la vía extrínseca y el contacto y los factores antihemofílicos de la vía intrínseca. Por tanto, LA Screen es más específico para el LA que el TTPA ya que no se ve afectado por anomalías del factor de contacto ni por anticuerpos o deficiencias en el factor VIII.[6] Se han desarrollado diversas pruebas basadas en la corrección de los fosfolípidos[4]; sin embargo, ninguna ha sido tan conveniente de usar como LA Confirm después de LA Screen.
4. La mezcla de pruebas podría ser útil para excluir deficiencias en los factores II, V y X, que pueden prolongar los resultados de LA Screen y LA Confirm. La mezcla de plasmas normales con plasmas para análisis repone cualquier factor deficiente en el plasma para análisis. Si la prueba de la mezcla todavía es prolongada, indica la existencia de un inhibidor (tal como LA) en el plasma para análisis.

REACTIVO
Composición
LA Screen y LA Confirm contienen veneno de víbora de Russell, fosfolípidos, agentes antiheparínicos, calcio, soluciones amortiguadoras, estabilizantes, azida sólida y colorantes.

Advertencias y precauciones
Para uso exclusivo en diagnóstico *in vitro.*

Cuando se deseche la azida, enjuague siempre con gran cantidad de agua para evitar la posibilidad de que se forme un residuo explosivo en las tuberías de metal.

Preparación para usar
Reconstituya con el volumen de agua destilada que se indica en la etiqueta del vial. Mezcle bien mediante inversión para asegurar la resuspensión total del material liofilizado.

Instrucciones de conservación
Los reactivos liofilizados son estables al menos hasta la fecha de caducidad que se indica en la etiqueta del vial cuando se conservan a 2-8 ºC.

Después de reconstituir, los reactivos se pueden conservar durante 8 horas a 37 ºC, 24 horas a 20-25 ºC, 48 horas a 2-8 ºC y 1 mes a -20 ºC.

Indicación de inestabilidad/deterioro
Si no se detecta vacío al abrir los viales, y/o si el reactivo no parece estar seco, el kit se debe devolver a Life Diagnostics o su distribuidor local.

OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS
Recoja y procese la sangre conforme a la norma H21-A3 del Comité Nacional de Normas de Laboratorio Clínico (*National Committee for Clinical Laboratory Standards,* NCCLS): Collection, Transport and Processing of Blood Specimens for Coagulation Testing and General Performance of Coagulation Assays; Approved Guideline-3rd Edition (1998). Los plasmas separados se deben conservar a 2-8 ºC y analizar en las 4 horas siguientes a su obtención. Si las muestras se van a congelar antes de analizarlas, el plasma se debe centrifugar dos veces para eliminar las plaquetas (hasta niveles inferiores a 10 x 10^9/L)[10] antes de la congelación ya que estas pueden acortar el tiempo de coagulación de LA Screen.

PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA
1. Caliente previamente una cantidad ligeramente superior de reactivo LA Screen o LA Confirm a 37±1 ºC en un recipiente de reactivo, a razón de 200 µl por prueba
2. Dispense 200 µl del plasma para análisis en un tubo de ensayo de vidrio y caliéntelo durante 1 minuto a 37 ºC
3. Añada al plasma 200 µl del reactivo que haya calentado previamente y cronometre el tiempo desde el momento de la adición del reactivo hasta el punto final de coagulación.
4. Repita la prueba para obtener valores por duplicado e informe el promedio de estos como el resultado.

Método automático
Los protocolos para la mayoría de los sistemas automáticos de coagulación están disponibles bajo petición. Las pruebas LA Screen se deben realizar utilizando volúmenes equivalentes de plasma para análisis y de reactivo como en la mayoría de los protocolos para determinar el tiempo de la trombina. Sin embargo, los tiempos de observación u obtención no deben superar los 120 segundos.

Materiales proporcionados
Cada paquete de LA Screen/LA Confirm

Código de pedido LASD-10 contiene:	10 x liof. para 2 ml
Código de pedido LASD-25 contiene:	10 x liof. para 5 ml
Código de pedido LACD-5 contiene:	10 x liof. para 1 ml
Código de pedido LACD-10 contiene:	10 x liof. para 2 ml

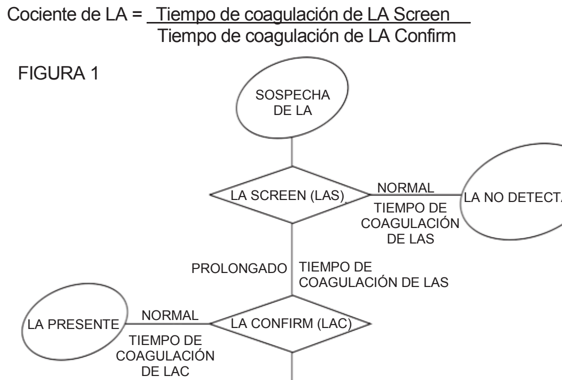
Materiales necesarios pero no suministrados
Tubos de ensayo de vidrio de 10 mm x 75 mm
Baño de agua a temperatura constante de 37 +/- 1 ºC
Cronómetro
Pipeta de precisión de 200 µl
Agua purificada de grado USP o equivalente
Plasma normal sin plaquetas
Pipeta de 1,2 o 5 ml
Plasma normal y anormal para control de calidad

Control de calidad
Cada laboratorio debe determinar sus propios valores de control aceptables e intervalo normal. Gradiplasma LA High (código LAHP) y Gradiplasma LA Low (código LALP) son plasmas de control anormales fabricados por Life Diagnostics para usar en el control de calidad de los ensayos LA Screen y LA Confirm. El plasma de control de calidad se debe analizar al mismo tiempo que las muestras de los pacientes.

RESULTADOS
Si el tiempo de coagulación de LA Screen está dentro del intervalo normal, no se requiere más análisis para LA. Si el resultado del tiempo de coagulación de LA Screen es más de un 20 % más largo que el del grupo de plasmas normales sin plaquetas, el resultado se debe considerar anormal e investigar más. (Véase la Figura 1) El resultado final se expresa mejor como el cociente de los tiempos de coagulación de LA Screen dividido por los de LA Confirm.

$$\text{Cociente de LA} = \frac{\text{Tiempo de coagulación de LA Screen}}{\text{Tiempo de coagulación de LA Confirm}}$$

FIGURA 1



Pruebas mixtas
Si los resultados son dudosos, se pueden utilizar estudios mixtos para corregir los defectos ocultos en la muestra y aclarar la presencia de LA. Estas pruebas se deben llevar a cabo con una mezcla 50:50 de plasma para análisis y plasma normal sin plaquetas utilizando el procedimiento estándar de la prueba.

TABLA 1: Combinación de pruebas mixtas y confirmatorias

Tiempo de coagulación de LA Screen		Tiempo de coagulación de LA Confirm		Interpretación
Plasma del paciente	Mezcla plasma de paciente + plasma normal	Plasma del paciente	Mezcla plasma de paciente + plasma normal	
N	N	N	N	LA no detectado
ABN	ABN	N	N	Presencia probable de LA
ABN	N	ABN	N	Excluir posible deficiencia de factor/tratamiento anticoagulante oral (*Oral Anti-coagulant Therapy*, OAT) estudiando más la muestra
ABN	ABN	ABN	N	Excluir posible deficiencia de factor estudiando más la muestra
ABN	ABN	ABN	ABN	Excluir otra inhibición estudiando más la muestra

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO
Las muestras que contienen coágulos y aquellas con un hematocrito anormal se deben desechar.
Las muestras ictéricas, lipémicas y hemolizadas se deben analizar mediante técnicas manuales ya que algunos instrumentos fotoeléctricos dan resultados falsos.
No se recomienda el uso de plasmas de control de calidad normales, disponibles comercialmente, con concentraciones no especificadas de citrato y plaquetas en los estudios mixtos.
Para estudios comparativos, las pruebas LA Screen y LA Confirm se deben realizar simultáneamente.
Los ensayos de LA basados en diferentes propiedades parecer ser más o menos sensibles a determinados subgrupos de LA. Por tanto, se deben realizar al menos dos ensayos de detección sistemática basados en diferentes propiedades antes de excluir la posibilidad de LA.[10]
Concentraciones de heparina de hasta 1 unidad/ml no tienen ningún efecto debido a la presencia de un agente neutralizador en LA Screen y LA Confirm.

VALORES ESPERADOS
Los intervalos normales de 31-44 segundos y 30-38 segundos para LA Screen y LA Confirm, respectivamente, se obtuvieron mediante un método manual de tubo inclinado con muestras obtenidas de 26 personas sanas que tenían entre 18 y 55 años de edad.
El cociente de LA Screen/LA Confirm estuvo en el rango de 0,8-1,2. Estos resultados se deben utilizar como una orientación exclusivamente.
Cada laboratorio debe determinar su propio intervalo normal para los métodos manuales y automáticos para superar las diferencias en la obtención de muestras y el instrumental.

CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DE RENDIMIENTO
Se realizaron estudios de precisión intralaboratorio y entre-laboratorios utilizando métodos manuales y automáticos de tubo inclinado. Estos estudios dieron un coeficiente de variación inferior al 3,5 % en plasmas normales e inferior al 5 % en muestras anormales.
Se realizaron estudios de especificidad en muestras conocidas de plasma.
Se encontró un cociente positivo para LA Screen/LA Confirm superior a 1,2 en plasma con

LA conocido* -	90 % (26/29)
Plasma heparinizado -	12 % (1/8)
Plasma de paciente con OAT -	0 % (0/7)
Plasmas deficientes en factor-	0 % (0/5)
Plasma normal -	2 % (1/60)

*N.B. Identificación de LA "conocido" con estudios mixtos de TTPA + TTC.

BIBLIOGRAFÍA

1. Feinstein DI. Lupus anticoagulant, thrombosis and fetal loss. N.Eng.J.Med. 1985, 313,1248-1350
2. Triplett DA, Brandt JT. Laboratory identification of the lupus anticoagulant. Br.J. Haematol. 1991,73,139-142
3. Exner T, Triplett DA, Taberner D, Machin SJ. Guidelines for testing and revised criteria for lupus anticoagulants. Thromb. Haemostas. 1991,65,320-322
4. Rauch J, Tannenbaum M, Janoff AS. Distinguishing plasma lupus anticoagulants from antifactor antibodies using hexagonal phase II phospholipids. Thromb. Haemostas. 1989,62,892-896
5. Love PE, Santoro SA. Antiphospholipid antibodies: Anticardiolipin and the lupus anticoagulant in systemic lupus erythematosis (SLE) and in non-SLE disorders. Ann. Intern. Med. 1990,112,682-698
6. Thiagarajan P, Pengo V, Shapiro SS. The use of the dilute Russell's viper venom time for the diagnosis of lupus anticoagulants. Blood, 1986,68,869-874
7. 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
8. Petri M, Rheinschmidt. Metal. The frequency of lupus anticoagulant in systemic lupus erythematosus. Ann. Int. Med. 1987,106,524-531
9. Galli M, Finazzi G, Bevers EM, Barbui T. Kaolin clotting time and dilute Russell's viper venom time distinguish between prothrombin dependent and beta-2-glycoprotein 1 dependent antiphospholipid antibodies. Blood. 1995,86,617-623
10. Brandt JT, Triplett DA, Alving B, Scharrer I, Criteria for the Diagnosis of Lupus Anticoagulants: An Update. Thromb.Haemostas. 1995, 74 (4), 1185-90

DSRV, Inc.
330 Waterloo Valley Rd.
Suite 200
Mount Olive, NJ 07828 USA
Email – dsrv@stago.com

LA Screen / LA Confirm

Test semplificato del veleno di vipera di Russell diluito (DRVVT) per la rilevazione degli anticoagulanti lupici

USO PREVISTO
LA Screen e LA Confirm sono reagenti DRVVT semplificati per il rilevamento degli anticoagulanti lupici (LA) nei test monofase di coagulazione.
LA Screen
Reagente DRVV semplificato per rilevare la presenza di anticoagulanti lupici.
LA Confirm
Reagente DRVV ricco di fosfolipidi per la correzione specifica degli anticoagulanti lupici.

RIEPILOGO E SPIEGAZIONE
Gli LA sono anticorpi contro fosfolipidi o contro complessi di fosfolipidi a carica negativa con beta-2-glicoproteina 1 o fattori di coagulazione come la protrombina. Si manifestano in varie patologie cliniche, soprattutto le malattie autoimmuni[1] , e sono ormai considerati un fattore di rischio significativo in pazienti con trombosi altrimenti inspiegata e sono spesso presenti in donne con perdite fetali ricorrenti[5]. Tradizionalmente, gli LA vengono rilevati utilizzando test di coagulazione reattivi ai fosfolipidi, come il tempo di tromboplastina parziale attivata (APTT), il tempo di coagulazione al caolino (KCT) e DRVVT[2] , dove hanno un effetto anticoagulante.

Il tempo DRVV divenne noto per la prima volta dopo la pubblicazione di Thiagarajan et al. nel 1986.[6] Life Diagnostics ha semplificato e standardizzato questo metodo. [7] Secondo Petri[8] et al, la trombosi nei pazienti con LES è maggiormente correlata agli LA rilevabili tramite DRVVT che agli anticorpi anticardiolipina rilevati dai test immunoenzimatico (ELISA)[5]. Questa osservazione è stata recentemente ampliata da Galli e Bevers[9], che hanno dimostrato che il sottotipo di LA con il maggiore effetto sui test DRVVT dipende dalla beta- 2-glicoproteina 1 ed è diverso dal sottotipo di LA che richiede la prototrombina, il quale ha effetti più prolungati sui test KCT.

Principio del test
1. Il veleno della vipera di Russell presente in LA Screen avvia la coagulazione del plasma attivando direttamente il fattore X. Gli anticorpi LA prolungano il tempo di coagulazione di LA Screen.
2. Il reagente LA Confirm è simile a LA Screen, ma contiene un'alta concentrazione di fosfolipidi. I fosfolipidi aggiuntivi contrastano l'anticorpo LA e correggono in gran parte il tempo di coagulazione[3].
3. I test DRVV "saltano" il fattore VII del sistema estrinseco e i fattori di contatto e antiemofilici del sistema intrinseco. LA Screen è quindi più specifico per gli LA rispetto agli APTT, poiché non è influenzato da anomalie del fattore di contatto o da carenze o anticorpi del fattore VIII[6]. Sono stati sviluppati svariati test sulla base della correzione dei fosfolipidi[4], ma nessuno ha una convenienza pari a LA Confirm successivo a LA Screen.
4. I test di miscelazione possono essere utili per escludere le carenze del fattore II, V e X, che possono prolungare i risultati di LA Screen e di LA Confirm. La miscelazione del plasma normale con il plasma da test rifornisce gli eventuali fattori carenti nel plasma da test. Se il test di miscelazione viene ancora prolungato, indica la presenza di un inibitore (come LA) nel plasma da test.

REAGENTE
Composizione
LA Screen E LA Confirm contengono veleno della vipera di Russell, fosfolipidi, agenti antieparina, calcio, tamponi, stabilizzatori, azide sodica e coloranti.

Avvertenze e precauzioni
Solo per uso diagnostico in vitro.

Per lo smaltimento dell'azide, lavare sempre con grandi volumi di acqua per evitare la possibilità che si formi un residuo esplosivo nei tubi metallici.

Preparazione per l'uso
Ricostituire con il volume di acqua distillata indicato sulla fiala. Miscelare bene capovolgendo la fiala per completare la risospensione del materiale liofilizzato.

Istruzioni per la conservazione
I reagenti liofilizzati sono stabili almeno fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta della fiala quando conservati a 2-8 °C.

Dopo la ricostituzione i reagenti possono essere conservati per 8 ore a 37 ºC, 24 ore a 20-25 ºC, 48 ore a 2-8 ºC e 1 mese a -20 °C.

Indicazioni di instabilità/deterioramento
Se non vi è alcun segno di vuoto all'apertura della fiala e/o il reagente non sembra asciutto, restituire al produttore o al distributore locale.

RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI
Prelevare e trattare il sangue in conformità allo standard NCCLS H21-A3: Prelievo, trasporto e trattamento dei campioni ematici per i test di coagulazione e rendimento generale degli esami di coagulazione; Linee guida approvate - Terza edizione (1998). Il plasma separato deve essere conservato a 2-8 ºC e analizzato entro 4 ore dal prelievo. Se i campioni devono essere congelati prima del test, il plasma deve essere centrifugato due volte per rimuovere le piastrine (a meno di 10 x 10^9/L)[10] prima del congelamento, poiché queste possono accorciare il tempo di coagulazione di LA Screen.

PROCEDIMENTO ANALITICO
1. Pre-riscaldare un piccolo eccesso di reagente LA Screen o LA Confirm a 37±1 ºC in un serbatoio di reagente, ammettendo 200 µl per test.
2. Distribuire 200 µl di plasma da test in una provetta di vetro e riscaldare per 1 minuto a 37 °C.
3. Aggiungere 200 µl di reagente pre-riscaldato al plasma e calcolare il tempo dal momento dell'aggiunta del reagente fino a un endpoint di coagulazione.
4. Campionare in doppio e documentare la media di tali valori.

Metodo automatizzato
I protocolli per la maggior parte degli analizzatori di coagulazione automatizzati sono disponibili su richiesta. I test LA Screen devono essere effettuati utilizzando volumi uguali di plasma da test e di reagente come per la maggior parte dei protocolli del tempo di trombina. Tuttavia, i tempi di osservazione o di acquisizione devono essere estesi a 120 secondi.

Materiale fornito
Ogni confezione di LA Screen/ LA Confirm,

codice d'ordine LASD-10 contiene:	10 x liof. per 2 ml
Il codice d'ordine LASD-25 contiene:	10 x liof. per 5 ml
Il codice d'ordine LACD-5 contiene:	10 x liof. per 1 ml
Il codice d'ordine LACD-10 contiene:	10 x liof. per 2 ml

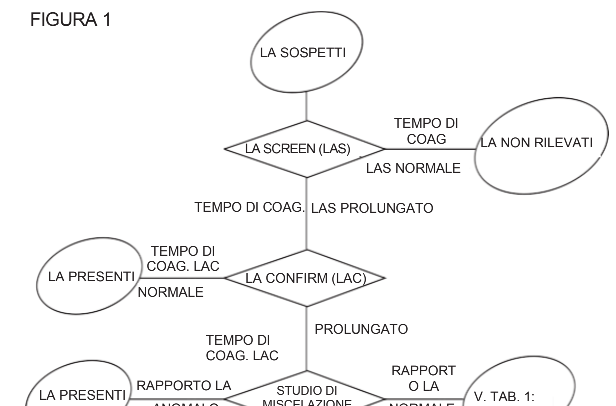
Materiale necessario ma non fornito
Provette di vetro da 10 mm x 75 mm
Bagnomaria a una temperatura costante di 37 +/- 1 °C
Cronometro
Pipetta di precisione da 200 µl
Acqua depurata, USP o equivalente
Plasma normale privo di piastrine
Pipetta da 1, 2 o 5 ml.
Plasma normale e anomalo per il controllo qualità

Controllo qualità
Ogni laboratorio deve determinare i propri valori di controllo accettabili e l'intervallo normale. Gradiplasma LA High (codice LAHP) e Gradiplasma LA Low (codice LALP) sono plasma di controllo anomali prodotti da Life Diagnostics per il controllo qualità dei test LA Screen e LA Confirm. Il plasma di controllo qualità deve essere testato contemporaneamente ai campioni dei pazienti.

RISULTATI
Se il tempo di coagulazione di LA Screen è entro l'intervallo normale, non sono necessari altri test per gli LA. Se il tempo di coagulazione di LA Screen risulta essere il 20% più lungo del pool di plasma normale privo di piastrine, il risultato va considerato anomalo e va ulteriormente esaminato (vedere la Figura 1). Il risultato finale viene idealmente espresso come un rapporto dei tempi di coagulazione del LA Screen diviso per LA Confirm.

$$\text{Rapporto LA} = \frac{\text{Tempo di coagulazione di LA Screen}}{\text{Tempo di coagulazione di LA Confirm}}$$

FIGURA 1



Test di miscelazione
Se i risultati sono borderline, è possibile utilizzare studi di miscelazione per correggere i difetti occulti nel campione e chiarire la presenza di LA. Questi test vanno eseguiti su una miscela 50:50 di plasma da test e plasma normale privo di piastrine utilizzando il procedimento analitico standard.

TABELLA 1: Combinazione di test di miscelazione e di conferma

Tempo di coagulazione di LA Screen		Tempo di coagulazione di LA Confirm		Interpretazione
Plasma paziente	misc. paziente + normale	Plasma paziente	misc. paziente + normale	
N	N	N	N	LA non rilevati
ABN	ABN	N	N	LA probabilmente presenti
ABN	N	ABN	N	Possibile carenza di un fattore/TAO; escludere tramite ulteriori esami
ABN	ABN	ABN	N	Possibile carenza di un fattore; escludere tramite ulteriori esami
ABN	ABN	ABN	ABN	Escludere altri inibitori tramite ulteriori esami

LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA
I campioni contenenti coaguli e quelli con ematocriti anomali vanno scartati.
I campioni itterici, lipemici ed emolizzati devono essere testati con tecniche manuali, poiché alcuni strumenti fotoelettrici danno risultati sfalsati.
Per gli studi di miscelazione è sconsigliato l'uso di plasma di controllo qualità disponibile in commercio con livelli non specificati di citrato e piastrine.
Per gli studi comparativi, i test LA Screen e LA Confirm devono essere svolti contemporaneamente.
I test per gli LA basati su proprietà diverse sembrano essere più o meno sensibili a determinati sottogruppi di LA. È quindi necessario eseguire almeno due test di screening, basati su proprietà diverse, prima di escludere la possibilità di LA.[10]
Livelli di eparina fino a 1 unità/ml non hanno alcun effetto per via della presenza di un agente neutralizzante sia in LA Screen sia in LA Confirm.

VALORI PREVISTI
Gli intervalli normali di 31-44 secondi per LA Screen e di 30-38 secondi per LA Confirm sono stati ottenuti impiegando un metodo manuale con provetta inclinata con campioni prelevati da 26 individui sani di età compresa tra 18 e 55 anni.
Il rapporto di LA Screen/LA Confirm era compreso nell'intervallo 0,8-1,2. Questi risultati rappresentano solo una guida.
Ogni laboratorio deve determinare il proprio intervallo normale per i metodi manuale e automatizzato per superare le differenze nel prelievo dei campioni e nella strumentazione.

CARATTERISTICHE DI RENDIMENTO SPECIFICHE
Gli studi di precisione intra e inter-laboratorio sono stati condotti utilizzando sia il metodo manuale con provetta inclinata che il metodo automatizzato. Questi studi hanno fornito un coefficiente di variazione inferiore al 3,5% sul plasma normale e inferiore al 5% per i campioni anomali.
Sono stati condotti studi di specificità su campioni di plasma conosciuti.
È stato rilevato un rapporto positivo per LA Screen/LA Confirm maggiore di 1,2 con identificazione nota*

Plasma LA -	90% (26/29)
Plasma eparinizzato -	12% (1/8)
Plasma paziente TAO -	0% (0/7)
Plasma deficitario di fattore -	0% (0/5)
Plasma normale -	2% (1/60)

*N.B. Identificazione di LA "nota" con studi di miscelazione APTT + KCT.

BIBLIOGRAFIA

1. Feinstein DI. Lupus anticoagulant, thrombosis and fetal loss. N.Eng.J.Med. 1985, 313,1248-1350
2. Triplett DA, Brandt JT. Laboratory identification of the lupus anticoagulant. Br.J. Haematol. 1991,73,139-142
3. Exner T, Triplett DA, Taberner D, Machin SJ. Guidelines for testing and revised criteria for lupus anticoagulants. Thromb. Haemostas. 1991,65,320-322
4. Rauch J, Tannenbaum M, Janoff AS. Distinguishing plasma lupus anticoagulants from antifactor antibodies using hexagonal phase II phospholipids. Thromb. Haemostas. 1989,62,892-896
5. Love PE, Santoro SA. Antiphospholipid antibodies: Anticardiolipin and the lupus anticoagulant in systemic lupus erythematosis (SLE) and in non-SLE disorders. Ann. Intern. Med. 1990,112,682-698
6. Thiagarajan P, Pengo V, Shapiro SS. The use of the dilute Russell's viper venom time for the diagnosis of lupus anticoagulants. Blood, 1986,68,869-874
7. 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
8. Petri M, Rheinschmidt. Metal. The frequency of lupus anticoagulant in systemic lupus erythematosus. Ann. Int. Med. 1987,106,524-531
9. Galli M, Finazzi G, Bevers EM, Barbui T. Kaolin clotting time and dilute Russell's viper venom time distinguish between prothrombin dependent and beta-2-glycoprotein 1 dependent antiphospholipid antibodies. Blood. 1995,86,617-623
10. Brandt JT, Triplett DA, Alving B, Scharrer I, Criteria for the Diagnosis of Lupus Anticoagulants: An Update. Thromb.Haemostas. 1995, 74 (4), 1185-90

DSRV, Inc.
330 Waterloo Valley Rd.
Suite 200
Mount Olive, NJ 07828 USA
Email – dsrv@stago.com

Symbols Key / Symbolschlüssel / Explication des Symboles / Interpretazione simboli / Clave de los Símbolos

Symbol	Meaning
2	Do not reuse / Nicht zur Wiederverwendung / Ne pas réutiliser / Non riutilizzare / No reutilizar
CCYY-MM-DD	Use By / Verwendbar bis / A utilizer avant le / Utilizzare entro il / Usar antes del
LOT	Batch Code / Chargenbezeichnung / Code du lot / Codice lotto / Código de lote
REF	Catalogue Number / Bestellnummer / Catalogue nº / Numero di catalogo / Número de referencia
	Caution, consult accompanying documents / Achtung, Begleitdokumente beachten / Attention : Consulter les documents d'appui / Attenzione, consultare i documenti accompagnatori / Precaución, consulte los documentos adjuntos
	Manufacturer / Hersteller / Fabricant / Produttore / Fabricante
EC REP	Authorized Representative in the European Community / Bevollmächtigter in der Europäischen Gemeinschaft / Représentant autorisé dans la Communauté Européenne / Rappresentante autorizzato nella Comunità Europea / Representante autorizado en la Comunidad Europea
Σ	Contains sufficient for <n> tests / Inhalt ausreichend für <n> Tests / Contient suffisamment pour, n. tests / Contiene quantità sufficiente per n. test / Contiene suficiente para n pruebas
IVD	In Vitro Diagnostic Medical Device / In Vitro-Diagnostikum / Dispositif medical de diagnostic in vitro / Dispositivo medico diagnostico in vitro / Dispositivo médico para diagnóstico in vitro
	Temperature Limitation / Temperaturbegrenzung / Limites de temperature / Limite di temperatura / Límite de temperatura
i	Consult Instructions for Use / Gebrauchsanweisung beachten / Consulter les instructions d'utilisation / Consultare le istruzioni per l'uso / Consulte las instrucciones de uso
NON STERILE	Non-sterile / Nicht steril / Non sterile / Non sterile / No estéril
CE	CE Mark / CE-Zeichen / Marquage « CE » / Marchio CE / Marcado CE
CONTENTS	Contents / Inhalt / Contenu / Contenuto / Contenido /
→	Reconstitution Volume / Rekonstitutionsvolumen / Volume de reconstitution / Volume di ricostituzione / Volumen de reconstitución
LEVEL	Level / Niveau / Niveau / Livello / Nivel

2006-09_EF | GSP

EC REP Authorized Representative according to IVD 98/79/ EC
MDSS
Schiffgraben 41
D-30175 Hannover, Germany