



LA Confirm

Para la confirmación de anticoagulante lúpico

SIGNIFICACION CLINICA

El Anticoagulante Lúpico (LA) es un inhibidor adquirido (no específico) de la coagulación formado por un grupo heterogéneo de autoanticuerpos que interfieren en los tests de coagulación dependientes de fosfolípidos. Para su detección se emplean tests sensibles como el Tiempo de veneno de víbora de Russell diluido (dRVVT) o Tiempo de tromboplastina parcial activado (aPTT) sensible a LA.

El LA forma parte de los criterios de laboratorio que permiten el diagnóstico del síndrome antifosfolipídico (SAF). Sin embargo, su presencia puede detectarse en individuos asintomáticos o asociarse a otras situaciones clínicas.

FUNDAMENTOS DEL METODO

En el LA Screen, el veneno de víbora de Russell inicia la coagulación del plasma por activación directa del Factor X a Factor Xa en presencia de calcio y una baja concentración de fosfolípidos. En presencia de Anticoagulante Lúpico, se alargan los tiempos de coagulación.

Los tests de mezcla con plasma normal, permiten excluir la deficiencia de factores que también puede prolongar los tiempos de coagulación. Si los mismos continúan siendo prolongados, se sospecha de la presencia de Anticoagulante Lúpico u otros inhibidores, lo cual debe ser confirmado con LA Confirm.

En el LA Confirm la mayor concentración de fosfolípidos neutraliza los LA que puedan estar presentes en el plasma, con el consecuente acortamiento del Tiempo de coagulación, respecto al obtenido con LA Screen.

REACTIVOS PROVISTOS

Reactivo A: mezcla de veneno de víbora de Russell con cloruro de calcio y fosfolípidos en alta concentración. Liofilizado.

INSTRUCCIONES PARA SU USO

Reconstituir el Reactivo A con el volumen de agua destilada indicado en el vial. Mezclar bien invirtiendo el vial para asegurar una completa resuspensión del material liofilizado. Incubar el reactivo disuelto a temperatura ambiente durante 30 minutos y rotar suavemente el vial antes del uso.

REACTIVOS NO PROVISTOS

- LA Screen de Wiener lab.
- LA Control de Wiener lab.
- Coagulation Control N de Wiener lab.
- Pool de plasmas normales pobres en plaquetas

PRECAUCIONES

Los reactivos son para uso diagnóstico "in vitro".

Utilizar los reactivos guardando las precauciones habituales de trabajo en el laboratorio de análisis clínicos.

Todos los reactivos y las muestras deben descartarse de acuerdo a la normativa local vigente.

ESTABILIDAD E INSTRUCCIONES DE ALMACENAMIENTO

El reactivo es estable en refrigerador (2-10°C) hasta la fecha de vencimiento indicada en la caja. Una vez reconstituido es estable:

Reactivo	37°C	TA (< 25°C)	2-10°C	-20°C
Reactivo A	8 horas	24 horas	48 horas	1 mes

MUESTRA

Plasma citratado

a) Recolección: obtener sangre cuidadosamente (evitando estasis o trauma) y colocar en un tubo con anticoagulante en proporción 9 + 1 exacta (ejemplo: 4,5 ml de sangre + 0,5 ml de anticoagulante). Mezclar suavemente y centrifugar durante 15 minutos a 2500 g. Para obtener plasma pobre en plaquetas transferir el plasma a un tubo de plástico limpio y centrifugar durante 15 minutos adicionales.

b) Aditivos: para obtener el plasma debe emplearse Anticoagulante TP de Wiener lab. o citrato de sodio 130 mmol/l (3,8%) o 109 mmol/l (3,2%).

c) Sustancias interferentes conocidas: las muestras que contengan coágulos y/o hematocritos anormales deben desecharse. Las muestras ictericas, lipémicas o hemolizadas deben analizarse mediante técnicas manuales ya que algunos instrumentos fotométricos dan lecturas falsas.

No se observan interferencias por heparina hasta 1 UI/ml. Referirse a la bibliografía de Young para los efectos de las drogas en el presente método.

d) Estabilidad e instrucciones de almacenamiento: el plasma debe mantenerse a temperatura ambiente hasta el momento de efectuar la prueba. Este período no debe prolongarse más de 4 horas. En caso de no poder procesarse en este lapso, el plasma puede congelarse hasta 6 meses a -20°C.

MATERIAL REQUERIDO (no provisto)

- Tubos de hemólisis.

- Pipetas o micropipetas para medir los volúmenes indicados.
- Cronómetro.
- Baño de agua a 37°C.

PROCEDIMIENTO

Precalentar un exceso de Reactivo A a 37°C, a razón de 200 ul/ensayo.

En un tubo de hemólisis colocar:

Muestra o Control	200 ul
--------------------------	--------

Incubar durante 1 minuto a 37°C. Luego agregar:

Reactivo A (a 37°C)	200 ul
----------------------------	--------

Disparar simultáneamente un cronómetro. Agitar brevemente para homogeneizar el contenido, mantener en el baño unos 20 segundos. Luego sacar el tubo del baño, inclinar suavemente una vez por segundo y detener el cronómetro en el momento de la formación del coágulo. Pueden emplearse para la lectura de los resultados aparatos automáticos o semiautomáticos que detecten la formación de coágulos de fibrina, por métodos foto-ópticos o mecánicos.

Tomar nota del tiempo de coagulación.

Repetir para obtener valores duplicados y registrar el promedio como resultado.

CALCULO DE LOS RESULTADOS

Si el tiempo de coagulación con LA Screen se encuentra dentro del rango de referencia no es necesario realizar una prueba posterior para estudiar la presencia de LA.

Si el tiempo con LA Screen se encuentra por encima del rango normal, de debe continuar la investigación realizando un test de mezcla con pool de plasmas normales y un test confirmatorio empleando LA Confirm.

Según las recomendaciones de la ISTH (Sociedad Internacional de Trombosis y Hemostasia) en su up-date 2009, los resultados se deben expresar como una proporción (ratio) normalizada, obtenida luego de dividir el resultado del paciente por el valor correspondiente a un pool normal:

$$\text{Ratio LA Screen} = \frac{\text{Tiempo (seg) LA Screen del paciente}}{\text{Tiempo (seg) LA Screen pool normal}}$$

Si el valor del Ratio LA Screen es superior a 1.20, debe sospecharse la presencia de LA.

En caso de tener que emplear el test confirmatorio LA Confirm, se debe proceder de la misma manera para normalizarlo:

$$\text{Ratio LA Confirm} = \frac{\text{Tiempo (seg) LA Confirm del paciente}}{\text{Tiempo (seg) LA Confirm pool normal}}$$

Luego calcular el Ratio LA normalizado del paciente, dividiendo entre si los ratios normalizados LA Screen y LA Confirm:

$$\text{Ratio LA normalizado} = \frac{\text{Ratio LA Screen}}{\text{Ratio LA Confirm}}$$

Ejemplo:

Tiempo de LA Screen paciente: 42,1 seg

Tiempo medio de LA Screen normal: 37,5 seg

Tiempo de LA Confirm paciente: 34,7 seg

Tiempo medio de LA Confirm normal: 34,0 seg

$$\text{Ratio LA Normalizado} = \frac{(42,1 / 37,5)}{(34,7 / 34,0)} = \frac{1,12}{1,02} = 1,1$$

INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS

Si el Ratio LA Screen es superior a 1.20, se debe realizar una prueba mezclando en proporción 1+1 el plasma del paciente con un pool de plasmas normales pobre en plaquetas, para identificar un déficit de uno o más factores o un tratamiento con antagonistas de la vitamina K. Si no se evidencia corrección con el pool de plasmas normales, es posible confirmar la presencia de un inhibidor circulante. En cuyo caso, el Ratio LA normalizado mayor a 1.20 permite confirmar la naturaleza antifosfolipídica del inhibidor.

En el Síndrome antifosfolipídico, la persistencia del LA se debe confirmar en una segunda muestra extraída al paciente al menos 12 semanas después.

Para un adecuado procedimiento diagnóstico referirse a las guías elaboradas por los diferentes comités científicos (Sociedad Internacional de Trombosis y Hemostasia en su up-date 2009, British Committee for Standards in Haematology publicada en 2012 y Clinical and Laboratory Standards Institute de 2014).

VALORES DE REFERENCIA

Para LA Screen: 31-44 segundos

Para LA Confirm: 30-38 segundos

Ratio LA normalizado = 0,8-1,2

Los valores de referencia pueden variar entre los laboratorios dependiendo de las técnicas y sistemas usados. Por esta razón, cada laboratorio debe establecer sus propios intervalos de referencia.

METODO DE CONTROL DE CALIDAD

LA Control y Coagulation Control N de Wiener lab.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Pueden obtenerse resultados erróneos para muestras con concentraciones de heparina > 1 U/mL, en pacientes que toman anticoagulantes orales y en CID.

Para que los resultados sean comparativos, los tests LA Screen y LA Confirm deben realizarse de manera simultánea y en la misma muestra.

Debe asegurarse la remoción completa de las plaquetas de los plasmas, mediante una adecuada centrifugación, ya que los fosfolípidos provenientes de las mismas interfieren en los tests. Dada la heterogeneidad del LA, es importante incluir dos test de screening de principios diferentes (dRVVT/aPTT).

PERFORMANCE

a) Reproducibilidad: se determinó con diferentes muestras (en series y día a día). Se obtuvieron los siguientes resultados:

Precisión intraensayo

Nivel	D.S.	C.V.
37,58 seg	0,33 seg	0,89%
71,74 seg	0,91 seg	1,27%

Precisión interensayo

Nivel	D.S.	C.V.
37,58 seg	0,59 seg	1,57%
71,74 seg	1,38 seg	1,93%

b) Sensibilidad: se encontraron 12 resultados positivos en 12 pacientes con datos clínicos de anticoagulante lúpicos.

c) Especificidad: se ensayaron muestras de pacientes normales, tratados con heparinas y con coumarina, encontrándose los siguientes resultados:

Muestras	Resultados > 1,2 (falsos positivos)
Normales	1,2% (1/79)
Plasmas con coumarina	0% (0/14)
Plasmas con heparina	5,5% (1/18)
Plasmas deficientes en factores VIII y IX	0% (0/6)

PARAMETROS PARA ANALIZADORES AUTOMATICOS

Referirse a las adaptaciones específicas de cada analizador.

PRESENTACION

5 x 1 ml (Cód. 1705024)

BIBLIOGRAFIA

- T. Exner, K. A. Rickard, H. Kronenberg: A Sensitive Test Demonstrating Lupus Anticoagulant and its Behavioural Patterns. Brit. J. Haem. 40 (1978); 143.
- E. Rosner, R. Pauzner, A. Lusky, M. Modan, A. Many: Detection and Quantitative Evaluation of Lupus Circulating Anticoagulant Activity. Thrombos. Haemostas. 57 (1987); 144.
- D. A. Triplett: Screening for the Lupus Anticoagulant. Research in Clin. and Lab. 19 (1989); 379.
- Pengo V, Tripodi A, Reber G, et al; Subcommittee on Lupus Anticoagulant/Antiphospholipid Antibody of the Scientific and Standardisation Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. Update of the guidelines for lupus anticoagulant detection. J Thromb Haemost 2009;7(10):1737-1740.
- Keeling D, Mackie I, Moore GW, Greer IA, Greaves M; British Committee for Standards in Haematology. Guidelines

on the investigation and management of antiphospholipid syndrome. Br J Haematol 2012;157(1):47-58.

- Recent guidelines and recommendations for Laboratory Detection of Lupus Anticoagulants. Gary W. Moore, BSc, DBMS, CSci, FIBMS, CBiol, MSB, CerMHS. Semin. Throm. Hemost. 2014; 40:163-171.
- Guidelines on the Investigation and Management of antiphospholipid syndrome. David Keeling, Ian Mackie, Gary W. Moore, Ian A. Greer, Michael Greaves and British Committee for Standards in Haematology. British Journal of Haematology, 2012 157, 47-58.



LA Confirm

Para a confirmação de anticoagulante lúpus

SIGNIFICADO CLÍNICO

O anticoagulante lúpus (LA) é um inibidor adquirido (não específico) da coagulação formado por um grupo heterogêneo de autoanticorpos que interferem nas provas de coagulação dependentes de fosfolípidios. Testes sensíveis, como o Tempo de veneno de víbora de Russell diluído (dRVVT) ou o Tempo de tromboplastina parcial ativado sensível a LA (aPTT) são usados para a detecção.

O LA faz parte dos critérios laboratoriais que permitem o diagnóstico da síndrome antifosfolípica (SAF). No entanto, sua presença pode ser detectada em indivíduos assintomáticos ou associada a outras situações clínicas.

FUNDAMENTOS DO MÉTODO

No LA Screen, o veneno de víbora de Russell inicia a coagulação por ativação direta do Factor X a Fator Xa na presença de cálcio e baixa concentração de fosfolípidios. Na presença de anticoagulante lúpus os tempos de coagulação são prolongados.

Os testes de mistura com plasma normal são úteis para excluir as deficiências de fatores que também podem prolongar os tempos de coagulação. Se continuarem a ser prolongados, a presença de anticoagulante lúpus ou outros inibidores é suspeita, o que deve ser confirmado com LA Confirm.

No LA Confirm a maior concentração de fosfolípidios neutraliza os LA que podem estar presentes no plasma, com o consequente encurtamento do tempo de coagulação, em comparação com o obtido com LA Screen.

REAGENTES FORNECIDOS

A. Reagente A: mistura de veneno de víbora de Russell com cloreto de cálcio e fosfolípidios em alta concentração. Liofilizado.

REAGENTES NÃO FORNECIDOS

- LA Screen da Wiener lab.
- LA Control da Wiener lab.
- Coagulation Control N da Wiener lab.
- Pool de plasmas normais pobres em plaquetas

INSTRUÇÕES DE USO

Reconstituir o Reagente A com o volume de água destilada indicado no frasco. Misturar perfeitamente invertendo o frasco para assegurar uma resuspensão completa do material liofilizado. Incubar o reagente dissolvido à temperatura ambiente por até 30 minutos e rotar suavemente o frasco antes de usar.

PRECAUÇÕES

Os reagentes são para uso diagnóstico "in vitro". Utilizar os reagentes observando as precauções habituais de trabalho no laboratório de análises clínicas. Todos os reagentes e as amostras devem ser descartadas conforme à regulação local vigente.

ESTABILIDADE E INSTRUÇÕES DE ARMAZENAMENTO

O Reagente é estável sob refrigeração (2-10°C) até a data de vencimento indicada na embalagem. Uma vez reconstituído é estável:

Reagente	37°C	TA (< 25°C)	2-10°C	-20°C
Reagente A	8 horas	24 horas	48 horas	1 mês

AMOSTRA

Plasma citratado

a) Coleta: obter sangue cuidadosamente (evitando estase ou trauma), e colocar num tubo com anticoagulante na proporção 9 + 1 exata (exemplo: 4,5 ml de sangue + 0,5 ml de anticoagulante). Misturar suavemente. Centrifugar durante 15 minutos a 2500 g. Para obter plasma pobre em plaquetas transferir o plasma a um tubo plástico limpo e centrifugar por até 15 minutos adicionais.

b) Aditivos: para obter o plasma deve-se utilizar citrato de sódio 130 mmol/l (3,8%) ou 109 mmol/l (3,2%).

c) Estabilidade e instruções de armazenamento: o plasma deve ser conservado a temperatura ambiente até o momento de realizar a prova. Este período não deve prolongar-se mais que 4 horas. Caso não seja possível realizar a prova na hora, o plasma pode ser conservado por até 6 meses a -20°C.

INTERFERÊNCIAS

Amostras com coágulos e/ou hematocritos anormais devem ser descartados.

Amostras ictericas, lipêmicas ou hemolisadas devem ser analisadas por técnicas manuais devido a que alguns instrumentos fotométricos originam leituras falsas.

Não é observada interferência por heparina plasmática até 1 UI/ml.

Referência bibliográfica de Young para efeitos de drogas neste método.

MATERIAL NECESSÁRIO (não fornecido)

- Tubos de hemólise.

- Pipetas e micropipetas para medir os volumes indicados.
- Banho-maria a 37°C.
- Cronômetro.

PROCEDIMENTO

Pré-aquecer o Reagente A a 37°C em 200 ul/teste. Em um tubo de hemólise colocar:

Amostra ou Controle	200 ul
----------------------------	--------

Incubar por até 1 minuto a 37°C. Depois adicionar:

Reagente A (37°C)	200 ul
--------------------------	--------

Dispare o cronômetro simultaneamente. Agitar ligeiramente para homogeneizar o conteúdo, manter no banho por cerca de 20 segundos. Retirar o tubo do banho, inclinar suavemente uma vez por segundo e deter o cronômetro no momento da formação do coágulo.

Podem ser utilizados para a leitura dos resultados aparelhos automáticos ou semi-automáticos que detectem a formação de coágulos de fibrina, por métodos foto-ópticos ou mecânicos.

Anotar o tempo de coagulação.

Repetir o procedimento para obter valores duplicados e registrar a média como resultado.

CÁLCULO DOS RESULTADOS

e o tempo de coagulação utilizando LA Screen é dentro do intervalo de referência não é necessário realizar uma prova posterior para estudar presença de LA.

Se o tempo com LA Screen estiver acima do intervalo normal, a investigação deve continuar, realizando um teste de mistura com pool de plasma normal e um teste de confirmação usando LA Confirm.

Segundo as recomendações da ISTH (Sociedade Internacional de Trombose e Hemostasia) na sua atualização 2009, os resultados devem ser expressos como uma relação normalizada obtida após dividir o resultado do paciente pelo valor correspondente a um pool normal:

$$\text{Relação LA Screen} = \frac{\text{Tempo (seg) LA Screen do paciente}}{\text{Tempo (seg) LA Screen pool normal}}$$

Se o valor da Relação La Screen for maior do que 1,20, a presença de LA é suspeita.

Caso utilizar o teste confirmatório LA Confirm deve-se proceder da mesma maneira para normalizá-lo:

$$\text{Relação LA Confirm} = \frac{\text{Tempo (seg) LA Confirm do paciente}}{\text{Tempo (seg) LA Confirm pool normal}}$$

Em seguida, calcule a Relação LA normalizada do paciente, dividindo as relações normalizadas LA Screen e LA Confirm:

$$\text{Relação LA normalizada} = \frac{\text{Relação LA Screen}}{\text{Relação LA Confirm}}$$

Exemplo:

Tempo de LA Screen paciente: 42,1 seg

Tempo médio de LA Screen normal: 37.5 seg

Tempo de LA Confirm paciente: 34.7 seg

Tempo médio de LA Confirm normal: 34.0 seg

$$\text{Relação LA normalizada} = \frac{(42,1 / 37,5)}{(34,7 / 34,0)} = \frac{1,12}{1,02} = 1,1$$

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Se a Relação LA Screen for superior a 1,20, um teste deve ser realizado misturando o plasma do paciente com um grupo de plasma pobre em plaquetas em uma proporção de 1 + 1 para identificar um déficit de um ou mais fatores ou um tratamento com antagonistas de Vitamina K. Se a correção não for evidente com o pool de plasma normal, é possível confirmar a presença de um inibidor em circulação. Nesse caso, a Relação LA normalizada superior a 1,20 confirma a natureza antifosfolipídica do inibidor.

Na síndrome antifosfolipídica, a persistência de LA deve ser confirmada em uma segunda amostra extraída do paciente pelo menos 12 semanas depois.

Para um procedimento de diagnóstico adequado, consulte os guias desenvolvidos pelos diferentes comitês científicos (Sociedade Internacional de Trombose e Hemostasia na sua atualização de 2009, British Committee for Standards in Haematology, 2012 e Clinical and Laboratory Standards Institute, 2014).

VALORES DE REFERÊNCIA

Para LA Screen: 31-44 segundos

Para LA Confirm: 30-38 segundos

Relação LA normalizada = 0,8-1,2

Cada laboratório deve estabelecer os seus próprios valores de referência de acordo com as técnicas e equipamento utilizado.

MÉTODO DE CONTROLE DE QUALIDADE

LA Control e Coagulation Control N da Wiener lab.

LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

Podem ser obtidos resultados errados para amostras com concentrações de heparina > 1 U/mL, em pacientes que tomam anticoagulantes orais e na CID.

Para que os resultados sejam comparativos, os testes LA Screen e LA Confirm devem ser realizados simultaneamente e na mesma amostra.

A remoção completa das plaquetas dos plasmas deve ser assegurada por centrifugação apropriada, uma vez que os fosfolípidos deles interferem com os testes.

Dada a heterogeneidade de LA, é importante incluir dois testes de triagem de diferentes princípios (dRVVT / aPTT).

DESEMPENHO

a) Reprodutibilidade: a precisão foi determinada com diferentes amostras (em série e dia a dia). Os seguintes resultados foram obtidos:

Precisão intra-ensaio

Nível	D.P.	C.V.
62,4 seg	0,35 seg	0,56%
42,5 seg	0,41 seg	0,97%

Precisão inter-ensaio

Nível	D.P.	C.V.
62,4 seg	0,60 seg	0,96%
42,5 seg	0,87 seg	2,05%

b) Sensibilidade: foram obtidos 12 resultados positivos em 12 pacientes com dados clínicos de anticoagulante lúpico.

c) Especificidade: foram analisadas amostras de pacientes normais, tratados com heparina e cumarina, obtendo os seguintes resultados:

Amostras	Resultados > 1,2 (falsos positivos)
Normal	1,2% (1/79)
Plasmas com cumarina	0% (0/14)
Plasmas com heparina	5,5% (1/18)
Plasmas deficientes em fatores VIII e IX	0% (0/6)

PARÂMETROS PARA ANALISADORES AUTOMÁTICOS

Vide as adaptações específicas para cada tipo de analisador.

APRESENTAÇÃO

5 x 1 ml (Cód. 1705024)

REFERÊNCIAS

- T. Exner, K. A. Rickard, H. Kronenberg: A Sensitive Test Demonstrating Lupus Anticoagulant and its Behavioural Patterns. Brit. J. Haem. 40 (1978); 143.
- E. Rosner, R. Pazner, A. Lusky, M. Modan, A. Many: Detection and Quantitative Evaluation of Lupus Circulating Anticoagulant Activity. Thrombos. Haemostas. 57 (1987); 144.
- D. A. Triplett: Screening for the Lupus Anticoagulant. Research in Clin. and Lab. 19 (1989); 379.
- Pengo V, Tripodi A, Reber G, et al; Subcommittee on Lupus Anticoagulant/Antiphospholipid Antibody of the Scientific and Standardisation Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. Update of the guidelines for lupus anticoagulant detection. J Thromb Haemost 2009;7(10):1737–1740.
- Keeling D, Mackie I, Moore GW, Greer IA, Greaves M; British Committee for Standards in Haematology. Guidelines on the investigation and management of antiphospholipid syndrome. Br J Haematol 2012;157(1):47–58.

- Recent guidelines and recommendations for Laboratory Detection of Lupus Anticoagulants. Gary W. Moore, BSc, DBMS, CSci, FIBMS, CBiol, MSB, CerMHS. Semin. Throm. Hemost. 2014; 40:163-171.

- Guidelines on the Investigation and Management of antiphospholipid syndrome. David Keeling, Ian Mackie, Gary W. Moore, Ian A. Greer, Michael Greaves and British Committee for Standards in Haematology. British Journal of Haematology, 2012 157, 47-58.



LA Confirm

For the confirmation of lupus anticoagulant

SUMMARY

Lupus Anticoagulant (LA) is a (non-specific) acquired inhibitor of coagulation formed by a heterogeneous group of autoantibodies that interfere with phospholipid-dependent coagulation tests. Sensitive tests such as dilute Russell's Viper Venom Time (dRVVT) or LA-sensitive activated partial thromboplastin time (aPTT) are used for detection.

LA forms part of the laboratory criteria that allow the diagnosis of the antiphospholipid syndrome (APS). However, their presence can be detected in asymptomatic individuals or associated with other clinical situations.

PRINCIPLE

In LA Screen, Russell's viper venom initiates plasma coagulation by direct activation of Factor X to Factor Xa in the presence of calcium and a low concentration of phospholipids. In the presence of Lupus Anticoagulant, clotting times are prolonged. The tests mixing normal plasma pools, allow to exclude factor deficiencies that can also prolong clotting times. If they continue to be prolonged, the presence of Lupus Anticoagulant or other inhibitors is suspected, which must be confirmed by LA Confirm.

In LA Confirm the higher concentration of phospholipids neutralizes LA that may be present in plasma, with the consequent shortening of clotting time, compared to that obtained with LA Screen.

PROVIDED REAGENTS

Reagent A: mixture of Russell viper venom with calcium chloride and phospholipids. Lyophilized.

INSTRUCTIONS FOR USE

Reconstitute Reagent A with the volume of distilled water indicated in the vial. Mix well by inverting the vial to ensure complete resuspension of the lyophilized material. Incubate the reagent dissolved at room temperature for 30 minutes and gently rotate the vial before use.

NON-PROVIDED REAGENTS

- Wiener lab's LA Screen
- Wiener lab's LA Control
- Wiener lab's Coagulation Control N
- Pool of normal platelet-poor plasma

WARNINGS

Reagents are for "in vitro" diagnostic use.
Use the reagents according to the working procedures for clinical laboratories.

The reagents and samples should be discarded according to the local regulations in force.

STABILITY AND STORAGE INSTRUCTIONS

The Reagent is stable in refrigerator (2-10°C) until the expiration date shown on the box. Once reconstituted the reagent is stable for:

Reagent	37°C	RT (< 25°C)	2-10°C	-20°C
Reagent A	8 hours	24 hours	48 hours	1 month

SAMPLE

Citrated plasma

a) Collection: obtain blood carefully (avoiding stasis or trauma) and place in a tube with anticoagulant in 9+1 exact ratio (example: 4.5 ml blood + 0.5 ml anticoagulant). Mix gently and centrifuge for 15 minutes at 2500 g. To obtain platelet poor plasma, transfer the plasma to a clean plastic tube and centrifuge for an additional 15 minutes.

b) Additives: to obtain plasma use Anticoagulant TP from Wiener lab. or 130 mmol/l (3.8%) or 109 mmol/l (3.2%) sodium citrate.

c) Known interfering substances: samples containing clots and/or abnormal hematocrits should be discarded. The icteric, lipemic or hemolyzed samples should be analyzed by manual techniques as some photometric instruments yield false readings.

No interference was observed by 1 IU/ml heparin.

Refer to the literature of Young for effects of drugs on the present method.

d) Stability and storage instructions: the plasma must be kept at room temperature until the test is performed. This period should not exceed more than 4 hours. In case plasma is not processed within that period, it may be frozen up to 6 months at -20°C.

REQUIRED MATERIAL (non-provided)

- Hemolysis tubes
- Pipettes and micropipettes for measuring the stated volumes
- Stopwatch
- Water bath at 37°C

PROCEDURE

Preheat excess Reagent A at 37°C, at 200 ul/assay.
In a hemolysis tube place:

Sample or Control	200 ul
Incubate for 1 minute at 37°C. Then add:	
Reagent A (at 37°C)	200 ul
Simultaneously start stopwatch. Stir briefly to homogenize the content, keep in water bath for approximately 20 seconds. Then remove the tube from the bath, gently tilt once per second and stop the timer at the time of clot formation. Automatic or semiautomatic instruments may be used for reading the results, detecting the formation of fibrin clots by photo-optical or mechanical methods. Note the clotting time. Repeat to obtain duplicate values and record the average as a result.	

CALCULATION OF RESULTS

If the clotting time with LA Screen is within the reference range further testing for the presence of LA is not required. If the time with LA Screen is above the normal range, the investigation must continue by performing a mixing test with normal plasma pool and a confirmatory test using LA Confirm. According to the ISTH (International Society of Thrombosis and Haemostasis) recommendations in its 2009 update, the results should be expressed as a normalized ratio, obtained after dividing the patient's result by the value corresponding to a normal pool

$$\text{LA Screen ratio} = \frac{\text{Patient's LA Screen time (sec)}}{\text{Normal pool LA Screen time (sec)}}$$

If the value of the LA Screen Ratio is greater than 1.20, the presence of LA should be suspected.

If you have to use the LA Confirm confirmatory test, proceed in the same way to standardize it:

$$\text{LA Confirm ratio} = \frac{\text{Patient's LA Confirm time (sec)}}{\text{Normal pool LA Confirm time (sec)}}$$

Then calculate the normalized LA Ratio of the patient, dividing LA Screen and LA Confirm normalized ratios:

$$\text{Normalized LA ratio} = \frac{\text{LA Screen ratio}}{\text{LA Confirm ratio}}$$

Example:

Patient's LA Screen time: 42.1 sec

Normal LA Screen Average time: 37.5 sec

Patient's LA Confirm time: 34.7 sec

Normal LA Confirm average time: 34.0 sec

$$\text{Normalized LA ratio} = \frac{(42.1 / 37.5)}{(34.7 / 34.0)} = \frac{1.12}{1.02} = 1.1$$

INTERPRETATION OF RESULTS

If the LA Screen Ratio is greater than 1.20, perform a test by mixing the patient's plasma with a pool of normal platelet-poor plasma in a 1 + 1 ratio to identify a deficit of one or more factors or a treatment with Vitamin K antagonists. If no correction is evident with the pool of normal plasmas, it is possible to confirm the presence of an a circulating inhibitor. In which case, the normalized LA Ratio greater than 1.20 confirms the antiphospholipidic nature of the inhibitor. In antiphospholipid syndrome, persistence of LA should be confirmed in a second sample drawn from the patient at least 12 weeks later.

For an adequate diagnostic procedure refer to the guidelines developed by the different scientific committees (International Society of Thrombosis and Hemostasis in its 2009 update, British Committee for Standards in Haematology published in 2012 and Clinical and Laboratory Standards Institute of 2014).

REFERENCE VALUES

For LA Screen: 31-44 seconds

For LA Confirm: 30-38 seconds

Normalized LA ratio = 0.8-1.2

Reference values vary between laboratories depending on the techniques and systems used. Therefore, each laboratory should establish its own reference intervals.

QUALITY CONTROL METHOD

Wiener lab's LA Control & Coagulation Control N

PROCEDURE LIMITATIONS

Erroneous results may be obtained for samples with heparin concentrations > 1 U / mL, in patients taking oral anticoagulants and in DIC.

For the results to be comparative, the LA Screen and LA Confirm tests must be performed simultaneously and in the same sample. Complete removal of platelets from plasmas should be ensured by appropriate centrifugation, as phospholipids interfere with the tests.

Given LA heterogeneity, it is important to include two screening tests of different principles (dRVVT/aPTT).

PERFORMANCE

a) Reproducibility: determined with different samples (in series and daily). The following results were obtained:

Intra-assay precision

Level	S.D.	C.V.
37,58 sec	0,33 sec	0,89%
71,74 sec	0,91 sec	1,27%

Inter-assay precision

Level	S.D.	C.V.
37,58 sec	0,59 sec	1,57%
71,74 sec	1,38 sec	1,93%

b) Sensitivity: 12 positive results were found in 12 patients with clinical evidence of lupus anticoagulant.

c) Specificity: samples of normal patients treated with heparin and coumarin were tested, obtaining the following results:

Samples	Results > 1.2 (false positive)
Normal	1.2% (1/79)
Plasma with coumarin	0% (0/14)
Plasmas with heparin	5.5% (1/18)
Factors VIII and IX deficient plasmas	0% (0/6)

PARAMETERS FOR AUTOANALYZERS

For programming instructions consult the user manual of the analyzer in use.

WIENER LAB PROVIDES

5 x 1 ml (Cat. N° 1705024)

REFERENCES

- T. Exner, K. A. Rickard, H. Kronenberg: A Sensitive Test Demonstrating Lupus Anticoagulant and its Behavioural Patterns. Brit. J. Haem. 40 (1978); 143.
- E. Rosner, R. Pazner, A. Lusky, M. Modan, A. Many: Detection and Quantitative Evaluation of Lupus Circulating Anticoagulant Activity. Thrombos. Haemostas. 57 (1987); 144.
- D. A. Triplett: Screening for the Lupus Anticoagulant. Research in Clin. and Lab. 19 (1989); 379.
- Pengo V, Tripodi A, Reber G, et al; Subcommittee on Lupus Anticoagulant/Antiphospholipid Antibody of the Scientific and Standardisation Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. Update of the guidelines for lupus anticoagulant detection. J Thromb Haemost 2009;7(10):1737–1740.
- Keeling D, Mackie I, Moore GW, Greer IA, Greaves M; British Committee for Standards in Haematology. Guidelines on the investigation and management of antiphospholipid syndrome. Br J Haematol 2012;157(1):47–58.
- Recent guidelines and recommendations for Laboratory Detection of Lupus Anticoagulants. Gary W. Moore, BSc, DBMS, CSci, FIBMS, CBiol, MSB, CerMHS. Semin. Throm. Hemost. 2014; 40:163-171.
- Guidelines on the Investigation and Management of antiphospholipid syndrome. David Keeling, Ian Mackie, Gary W. Moore, Ian A. Greer, Michael Greaves and British Committee for Standards in Haematology. British Journal of Haematology, 2012 157, 47-58.

SÍMBOLOS // SÍMBOLOS // SYMBOLS

Símbolos que podrían encontrarse en los kits de reactivos para diagnóstico de Wiener lab. // Símbolos que podem ser encontrados nos kits de reagentes para diagnóstico da Wiener lab. // Symbols that might be found on Wiener lab diagnostic reagent kits.



Este producto cumple con los requerimientos previstos por la Directiva Europea 98/79 CE de productos sanitarios para el diagnóstico "in vitro" // Este produto preenche os requisitos da Diretiva Europeia 98/79 CE para dispositivos médicos de diagnóstico "in vitro" // This product fulfills the requirements of the European Directive 98/79 EC for "in vitro" diagnostic medical devices



Representante autorizado en la Comunidad Europea // Representante autorizado na Comunidade Europeia // Authorized representative in the European Community



Uso diagnóstico "in vitro" // Uso médico-diagnóstico "in vitro" // "In vitro" diagnostic medical device



Contenido suficiente para <n> ensayos // Conteúdo suficiente para <n> testes // Contains sufficient for <n> tests



Fecha de caducidad // Data de validade // Use by



Límite de temperatura (conservar a) // Limite de temperatura (conservar a) // Temperature limitation (store at)



No congelar // Não congelar // Do not freeze



Riesgo biológico // Risco biológico // Biological risks



Volumen después de la reconstitución // Volume após a reconstituição // Volume after reconstitution



Contenido // Conteúdo // Contents



Número de lote // Número de lote // Batch code



Elaborado por: // Elaborado por: // Manufactured by:



Nocivo // Nocivo // Harmful



Corrosivo / Cáustico // Corrosivo / Caústico // Corrosive / Caustic



Irritante // Irritante // Irritant



Consultar instrucciones de uso // Consultar as instruções de uso // Consult instructions for use



Calibrador // Calibrador // Calibrator



Control // Controle // Control



Control Positivo // Controle Positivo // Positive Control



Control Negativo // Controle Negativo // Negative Control



Número de catálogo // Número de catálogo // Catalog number



Wiener Laboratorios S.A.I.C.
Riobamba 2944
2000 - Rosario - Argentina
<http://www.wiener-lab.com.ar>
Dir. Téc.: Viviana E. Cétola
Bioquímica
Producto Autorizado A.N.M.A.T.
PM-1102-121



Wiener lab.

2000 Rosario - Argentina