

CRYOcheck™

Platelet Neutralization Procedure Reagent PLATELET LYSATE

Intended Use

CRYOcheck Platelet Lysate is intended for use in the Platelet Neutralization Procedure (PNP) which is useful in detecting the presence of lupus anticoagulants (LA) in citrated human plasma.

Summary and Principle

The activated partial thromboplastin time (APTT) is an established screening assay used to assess the intrinsic coagulation pathway. Abnormal prolongation of the APTT has many etiologies, one of the more common of which is the presence of LA^{1,2}. LA are immunoglobulins which are directed against a variety of anionic phospholipids and/or phospholipid-protein complexes and consequently interfere with *in vitro* phospholipid dependent coagulation tests^{3,4}.

In 1983, Triplett *et al.* introduced the PNP based on the demonstrated principle that the products of platelet lysis neutralized the inhibitory effect of LA⁵. The PNP offered the further advantage of being able to differentiate between LA and specific factor inhibitors. Subsequently, the SSC Subcommittee on Lupus Anticoagulants established four specific criteria to confirm the presence of LA, including the relative correction of the LA defect by the addition of washed, frozen-thawed platelets, phosphatidylserine or hexagonal phase phospholipids⁶. In a followup study the SSC Subcommittee on Lupus Anticoagulants recommended that for samples suspected of having LA, at least one additional screening assay must be performed if the initial assay is negative⁷.

Reagents

CRYOcheck Platelet Lysate is prepared from human platelets derived from normal healthy donors. The platelet concentrate is adjusted to be equivalent to 250,000 - 300,000 platelets/μL.



All blood products should be treated as potentially infectious. Source material from which this product was derived was found to be negative when tested in accordance with current FDA required tests. No known test methods can offer assurance that products derived from human blood will not transmit infectious agents. Accordingly, these human blood based products should be handled and discarded as recommended for any potentially infectious human specimen⁸.

Storage and Handling

When stored at -40 to -80°C, CRYOcheck Platelet Lysate is stable to the end of the month indicated on the product packaging.

Thaw each vial at 37°C (±1°C) in a waterbath. **The use of a dry bath or heating block for thawing is not recommended.** Thawing times are important and should be strictly adhered to. The use of a timer is recommended. Refer to the Thawing Table for recommended thawing times based on aliquot size. Allow thawed lysate to acclimate to room temperature (18 to 25°C) and invert gently prior to use.

Thawing Table	
Aliquot Size	37°C (±1°C) Waterbath
1.0 mL	4 minutes

CRYOcheck Platelet Lysate may be used for up to eight hours after thawing, if capped in the original vial and maintained at 2 to 8°C. Allow refrigerated lysate to acclimate to room temperature (18 to 25°C) and invert gently prior to use. **Thawed material should be discarded after eight hours and should not be refrozen.**

Availability

Product	Catalog #	Format
Platelet Lysate	PNP-10	25 vials x 1.0 mL

Instruments

Each lab should prepare the local instrument in accordance with the manufacturer's instructions for use.

Procedure

Materials Provided

- CRYOcheck Platelet Lysate

Materials Required but not Provided

- Waterbath capable of maintaining 37°C (±1°C)
- Assay reagents
- Tris buffered saline 0.05 M; pH 7.5
- Coagulation instrument or assay system
- Quality control material (e.g. CRYOcheck Lupus Positive Control, CRYOcheck Weak Lupus Positive Control)
- Sample cups
- Plastic disposable pipettes
- Volumetric pipette
- Timer

Specimen Collection and Preparation

Patient samples should be collected into 105 - 109 mmol/L sodium citrate dihydrate anticoagulant (3.2%) in a ratio of 9 parts blood to 1 part anticoagulant. Patient plasma is derived by centrifugation at 1500 x g for 15 minutes in order to achieve platelet-poor plasma (<10,000 platelets/μL) and should be tested within four hours of collection when maintained at 2 to 4°C in accordance with CLSI guidelines⁹. If samples are to be frozen before testing, plasmas should be centrifuged a second time, and stored at -20°C or below.

Establishing a Baseline APTT

1. Prepare APTT reagent, CaCl₂, and quality control materials according to manufacturer's directions.
2. Pre-warm APTT reagent and CaCl₂ to 37°C (±1°C).
3. Pipette 0.1 mL of normal control plasma into a reaction cuvette.
4. Add 0.1 mL of pre-warmed APTT reagent, mix, and incubate at 37°C (±1°C) according to manufacturer's directions.
5. Add 0.1 mL of pre-warmed CaCl₂ and simultaneously initiate clot timer. Record clotting time in seconds.
6. Repeat steps 3 to 5 for each of the test plasmas and quality control materials.

Platelet Neutralization Procedure – Saline Dilution

1. Prepare APTT reagent, CaCl₂, quality control materials, and buffered saline according to manufacturer's directions.
2. Pre-warm APTT reagent and CaCl₂ to 37°C (±1°C).
3. Pipette 0.1 mL of normal control plasma into a test cuvette.
4. Add 0.1 mL of Tris buffered saline.
5. Add 0.1 mL of pre-warmed APTT reagent, mix and incubate at 37°C (±1°C) according to manufacturer's directions.
6. Add 0.1 mL of pre-warmed CaCl₂ and simultaneously initiate clot timer.
7. Record clotting time in seconds of the Saline Dilution.
8. Repeat steps 3 to 7 for each test plasma and quality control material.

Platelet Neutralization Procedure – Platelet Lysate Dilution

1. Prepare APTT reagent, CaCl₂, quality control materials, and platelet lysate according to manufacturer's directions.
2. Pre-warm APTT reagent and CaCl₂ to 37°C (±1°C).
3. Pipette 0.1 mL of normal control plasma into a reaction cuvette.
4. Add 0.1 mL of CRYOcheck Platelet Lysate.
5. Add 0.1 mL of pre-warmed APTT reagent, mix and incubate at 37°C (±1°C) according to manufacturer's directions.
6. Add 0.1 mL of pre-warmed CaCl₂ and simultaneously initiate clot timer.
7. Record clotting time in seconds of the Platelet Lysate Dilution.
8. Repeat steps 3 to 7 for each test plasma and quality control material.

Quality Control

Each laboratory should establish its own quality control (QC) ranges using acceptable statistical methods. These QC ranges may then be used to monitor and validate the integrity of the test system¹⁰. For all coagulation tests, the laboratory must include at least two levels

of control for every eight hours of operation and any time a change in reagents occurs¹¹.

Commercial lyophilized quality control plasmas containing unspecified levels of citrate and platelets are not recommended as they may give erroneous results^{12,13}.

Results

For each test plasma, the clotting time of the Saline Dilution is compared to the clotting time of the Platelet Lysate Dilution. The difference between the two results is then compared to the normal cutoff value, as discussed in Expected Values, and interpreted as either LA positive or LA negative based on the degree of reduction in the clotting time. In the presence of LA, the clotting time of the Saline Dilution should be shorter than, or equal to, the clotting time of the Baseline APTT.

PNP results alone cannot be used to conclusively diagnose the presence of LA¹⁴.

Limitations of the Procedure

When proper control values are not obtained, assessment of each component of the test system including reagents, control plasmas, instrumentation and operator technique must be undertaken in order to ascertain that all other components are functioning properly¹⁵.

Patient samples containing heparin, specific factor inhibitors, or oral anticoagulants may exhibit false positive results^{5,7}.

Expected Values

Due to the varied phospholipid content and diverse sensitivity of commercial APTT reagents to LA^{16,17}, as well as differences in instrument clot detection and methodology¹⁵, results may vary from laboratory to laboratory. Studies were performed on 25 normal individuals using photo-optical and mechanical clot detection instrumentation. Photo-optical instrumentation generated a mean neutralization of 2.1 seconds with a standard deviation of 1.1. Mechanical clot detection instrumentation generated a mean neutralization of 3.7 seconds with a standard deviation of 1.2. Each laboratory should establish its own parameters for expected values (i.e. **normal cutoff value**) by evaluating a representative sample of known normal and LA positive patient samples. In accordance with SSC guidelines, PNP clotting time corrections greater than three standard deviations above the normal population are considered to be LA positive⁶.

The following PNP test results were generated on five known normal patients and 10 known positive LA patients using Organon Teknika Auto APTT reagent with CRYOcheck Platelet Lysate on a ST4 analyzer.

Patient Sample	Baseline APTT (sec)	Saline Dilution (sec)	Platelet Lysate Dilution (sec)	Correction (sec)
Normal 1	31.4	35.8	36.4	(0.6)
Normal 2	28.7	30.4	31.3	(0.9)
Normal 3	32.6	32.3	32.2	0.1
Normal 4	30.5	35.4	34.5	0.9
Normal 5	31.9	34.7	33.7	1.0
LA 1	75.6	63.1	41.0	22.1
LA 2	55.8	43.6	37.5	6.1
LA 3	51.7	40.9	36.4	4.5
LA 4	103.8	89.6	45.1	44.5
LA 5	62.5	49.4	42.1	7.3
LA 6	53.7	47.0	40.4	6.6
LA 7	47.1	41.2	37.8	3.4
LA 8	80.5	70.0	41.1	28.9
LA 9	64.7	57.7	38.2	19.5
LA 10	73.3	59.2	44.9	14.3

Performance Characteristics

A R²=0.975 was recovered in a correlation study with an established method using normal and LA positive patient samples.

In precision studies over eight hours using two lots of CRYOcheck Platelet Lysate with two lots of CRYOcheck Lupus Positive Control, the following precision data was recovered:

Platelet Lysate Lot #	Lupus Positive Control Lot #	Mean PNP Ratio	SD
PL01	6130	1.94	0.385
PL01	6120	2.10	0.286
PE001	6130	1.94	0.278
PE001	6120	2.14	0.377

Bibliography / Bibliographie

- Corrigan JJ. Coagulation inhibitors. Am J Ped Hem/Oncol 1980; 2:281-288.
- Feinstein DI, Rapaport SI. Acquired inhibitors of blood coagulation. Progress in Hemostasis and Thrombosis 1972; 1:75-95.
- Thiagarajan P, Shapiro S, DeMarco L. Monoclonal immunoglobulin M coagulation inhibitor with phospholipid specificity. J Clin Invest 1980; 66:397-405.
- Bevers EM, Galli M, Barbui T, Comfurious P, Zwall RFA. Lupus anticoagulant IgG's (LA) are not directed to phospholipids only, but to a complex of lipid-bound human prothrombin. Thromb Haemost 1991; 66:629-632.
- Triplett DA, Brandt JT, Kaczor D, Schaeffer J. Laboratory diagnosis of lupus inhibitors. A comparison of the tissue thromboplastin inhibition procedure with a new platelet neutralization procedure. Am J Clin Pathol 1983; 79:678-682.
- Exner T, Triplett DA, Taberner D, Machin SJ. Guidelines for testing and revised criteria for lupus anticoagulants. SSC Subcommittee for the Standardization of Lupus Anticoagulants. Thromb Haemost 1991; 65:320-322.
- Brandt JT, Barna LK, Triplett DA. Laboratory identification of Lupus Anticoagulants: Results of the Second International Workshop for Identification of Lupus Anticoagulants. SSC Subcommittee for the Standardization of Lupus Anticoagulants. Thromb Haemost 1995; 74:1597-1603.
- Biosafety in microbiological and biomedical laboratories 4th ed. Centers for Disease Control and Prevention / National Institutes of Health, 1999.
- Collection, transport, and processing of blood specimens for coagulation testing and general performance of coagulation assays, NCCLS, H21-A3. 1998.
- Cembrowski GS, Carey RN. Laboratory quality management. Chicago: ASCP Press; 1989.
- CLIA 1988 – Code of Federal Regulations, 42CFR493.1253, 1998.
- Adcock DM, Kressin DC, Marlar RA. Effect of 3.2% vs. 3.8% sodium citrate concentration on routine coagulation testing. Am J Clin Pathol 1997; 107:105-10.
- Hirst CF, Poller L. The cause of turbidity in lyophilized plasmas and its effects on coagulation tests. J Clin Pathol 1992; 45:701-3.
- Lupus Anticoagulant Working Party on behalf of BCSH Haemostasis and Thrombosis Task Force. Guidelines on testing for the Lupus Anticoagulant. J Clin Pathol 1991; 44:885-889.
- Gilmer PR. Preanalytical variables in coagulation testing. In: Triplett DA, editor. Laboratory evaluation of coagulation. Illinois: ASCP Press; 1982. p. 1-8.
- Mannucci PM, Canciani MT, Mari D, Meucci P. The varied sensitivity of partial thromboplastin and prothrombin time reagents in the demonstration of the lupus-like anticoagulant. Scand J Haematol 1979; 22:423-432.
- Adcock DM, Marlar RA. Activated partial thromboplastin time reagent sensitivity to the presence of lupus anticoagulants. Arch Pathol Lab Med 1992; 116:837-840.

Patient Echantillon	Temps TCA (sec)	Dilution Saline (sec)	PNP (sec)	Correction (sec)
Normal 1	31.4	35.8	36.4	(0.6)
Normal 2	28.7	30.4	31.3	(0.9)
Normal 3	32.6	32.3	32.2	0.1
Normal 4	30.5	35.4	34.5	0.9
Normal 5	31.9	34.7	33.7	1.0
LA 1	75.6	63.1	41.0	22.1
LA 2	55.8	43.6	37.5	6.1
LA 3	51.7	40.9	36.4	4.5
LA 4	103.8	89.6	45.1	44.5
LA 5	62.5	49.4	42.1	7.3
LA 6	53.7	47.0	40.4	6.6
LA 7	47.1	41.2	37.8	3.4
LA 8	80.5	70.0	41.1	28.9
LA 9	64.7	57.7	38.2	19.5
LA 10	73.3	59.2	44.9	14.3

Performances

Un coefficient de corrélation R²=0.975 a été trouvé sur la base de cette étude. Les données suivantes ont été obtenues sur huit heures en utilisant deux lots de *CRYOcheck* Platelet Lysate et deux lots de *CRYOcheck* Lupus Positive Control:

Platelet Lysate Lot #	Lupus Positive Control Lot #	Ratio PNP Moyen	DS
PL01	6130	1.94	0.385
PL01	6120	2.10	0.286
PE001	6130	1.94	0.278
PE001	6120	2.14	0.377

- Préchauffer le réactif pour TCA et le CaCl₂ à 37°C (±1°C).
- Prélever et distribuer 0.1 ml de plasma dans une cuvette de réaction.
- Prélever et distribuer 0.1 ml de *CRYOcheck* Platelet Lysate.
- Prélever et distribuer 0.1 ml de réactif pour TCA, agiter et incuber à 37°C (±1°C) selon les recommandations du fabricant.
- Prélever et distribuer 0.1 ml de CaCl₂, déclencher le chronomètre simultanément.
- Mesurer le temps en seconde nécessaire à la coagulation de la dilution en lysat de plaquettes.
- Répéter les étapes 3 à 7 pour chaque plasma à doser.

Contrôle de qualité

Chaque laboratoire doit établir ses propres normes de contrôle qualité utilisant des méthodes statistiques acceptables. Ces normes doivent être utilisées afin de contrôler et de valider l’intégrité des systèmes de test¹⁰. Pour tous les tests de coagulation, le laboratoire doit inclure au moins deux niveaux de contrôle toutes les huit heures et en aucun cas, un changement de réactifs ne doit intervenir¹¹.

Les plasmas lyophilisés contiennent des taux non spécifiés de citrate et de plaquettes. Ils ne sont donc pas recommandés car ils peuvent donner des valeurs erronées^{12,13}.

Résultats

Pour chaque plasma, le temps d’obtention du caillot avec la dilution saline est comparé au temps obtenu avec la dilution en lysat de plaquettes. La différence entre les deux résultats est alors comparée à la valeur obtenue avec des plasmas témoins normaux et doit être interprétée comme indiquant soit un LA positif ou négatif en fonction de la réduction du temps d’obtention du caillot. En présence de LA, le TCA de la dilution saline devrait être inférieur ou égal au TCA du plasma. Les résultats du PNP ne peuvent pas à eux seuls conclure au diagnostic d’un LA¹⁴.

Limites de la Méthode

Quand des valeurs attendues des contrôles ne sont pas conformes, le contrôle de chaque composant du système de mesure (réactifs, plasmas de contrôle, instrument et techniques opératoires) doit être effectué afin de s’assurer que tous les composants sont fonctionnellement corrects¹⁵.

Les échantillons de plasma contenant de l’héparine, des inhibiteurs spécifiques aux facteurs hémostatiques ou des anticoagulants par voie orale peuvent induire des résultats faussement positifs^{5,7}.

Valeurs Attendues

Le nombre important de phospholipides différents, les différentes sensibilités au LA^{16,17} des réactifs mesurant le TCA, les différences observées de mesure du caillot entre les appareils peuvent induire des résultats qui varient entre différents laboratoires¹⁵. Des études ont été effectuées sur 25 plasmas normaux en utilisant une méthode de détection de type optique et mécanique. Les appareils à lecture optique ont mesuré un temps de neutralisation de 2.1 secondes avec une déviation standard de 1.1 seconde. Les appareils à lecture mécanique ont mesuré un temps de neutralisation de 3.7 secondes avec une déviation standard de 1.2 seconde. Pour cette raison, chaque laboratoire doit établir ces propres références de valeur normale en mesurant un panel représentatif de plasmas normaux et un panel représentatif de plasmas ayant un LA. Selon les recommandations du SSC, le temps de correction du PNP doit être supérieur à 3 fois celui d’un panel représentatif de plasmas normaux pour être considéré comme LA positif⁹.

Les résultats suivants ont été obtenus sur 5 plasmas de patients normaux et sur 10 patients ayant un LA positif en utilisant le réactif d’Organon Teknika APTT avec le *CRYOcheck* Platelet Lysate sur un appareil de type ST4.

Disponibilité

Produit	Référence	Présentation
Platelet Lysate	PNP-10	25 flacons de 1.0 ml

Instruments

Chaque laboratoire doit préparer les instruments nécessaires stipulés dans les instructions du fabricant.

Procédure

Matériel fourni

- CRYOcheck* Platelet Lysate

Matériels requis mais non fournis

- Bain-marie à 37°C (±1°C)
- Réactifs complémentaires
- Tampon Tris NaCl 0.05M, pH 7.5
- Instrument de coagulation ou système de dosage
- Matériel de contrôle qualité (ex. *CRYOcheck* Lupus Positive Control, *CRYOcheck* Weak Lupus Positive Control)
- Tubes plastiques
- Pipettes plastiques
- Micro-pipette
- Chronomètre

Prélèvement et préparation

Les prélèvements du sang de patients doivent être collectés sur une solution anticoagulante de citrate trisodique (3.2%) de concentration 105 - 109 mmol/l dans un ratio de 9 volumes de sang pour 1 volume d’anticoagulant. Le plasma de patient est obtenu par centrifugation à 1500 x g pendant 15 minutes afin d’obtenir un plasma pauvre en plaquettes (<10,000 plaquettes/µL) et doit être testé quatre heures après le prélèvement quand il est maintenu à 2 - 4°C comme convenu dans les instructions du CLSI⁹. Si les échantillons doivent être congelés avant d’être testés, les plasmas doivent être centrifugés une seconde fois et conservés à une température inférieure ou égale à -20°C.

Procédure de dosage du TCA avec des plasmas témoins normaux.

- Préparer le réactif pour TCA, le CaCl₂, et les contrôles de qualité selon les recommandations du fabricant.
- Préchauffer le réactif pour TCA et le CaCl₂ à 37°C (±1°C).
- Prélever et distribuer 0.1 mL de plasma dans une cuvette de réaction.
- Prélever et distribuer 0.1 ml de réactif pour TCA, agiter et incuber à 37°C (±1°C) selon les recommandations du fabricant.
- Prélever et distribuer 0.1 ml de CaCl₂, déclencher le chronomètre simultanément et mesurer le temps nécessaire à la coagulation.
- Répéter les étapes 3 à 5 pour chaque plasma à doser.

Procédure de neutralisation des plaquettes (PNP) avec une dilution saline

- Préparer le réactif pour TCA, le CaCl₂, les contrôles de qualité et le tampon Tris NaCl selon les recommandations du fabricant.
- Préchauffer le réactif pour TCA et le CaCl₂ à 37°C (±1°C).
- Prélever et distribuer 0.1 ml de plasma dans une cuvette de réaction.
- Prélever et distribuer 0.1 ml de tampon Tris NaCl.
- Prélever et distribuer 0.1 ml de réactif pour TCA, agiter et incuber à 37°C (±1°C) selon les recommandations du fabricant.
- Prélever et distribuer 0.1 ml de CaCl₂, déclencher le chronomètre simultanément.
- Mesurer le temps en seconde nécessaire à la coagulation de la dilution saline.
- Répéter les étapes 3 à 7 pour chaque plasma à doser.

Procédure de neutralisation des plaquettes (PNP) avec une dilution en lysat de plaquettes

- Préparer le réactif pour TCA, le CaCl₂, les contrôles de qualité et le *CRYOcheck* Platelet Lysate selon les recommandations du fabricant.

CRYOcheck™

PLATELET LYSATE LYSAT DE PLAQUETTES

Intérêt du Coffret

CRYOcheck Platelet Lysate est recommandé pour la procédure de neutralisation des plaquettes (PNP) afin de mettre en évidence la présence d’un lupus anticoagulant (LA) dans le plasma citraté.

Résumé et Principe

Le temps de céphaline activateur (TCA) est un test utilisé en routine pour identifier des anomalies dans la voie intrinsèque de la coagulation. L’allongement anormal du TCA peut avoir de nombreuses causes parmi lesquelles la présence de lupus anticoagulants^{1,2}. Les LA sont des immunoglobulines directement dirigées contre une variété de phospholipides anioniques et/ou contre des complexes phospholipides-protéines et par conséquent interfèrent avec les tests de coagulation phospholipides dépendants^{3,4}.

En 1983, Triplett *et al.* ont introduit le PNP basé sur le principe que le produit de la lyse plaquettaire neutralisait les effets inhibiteurs du LA⁵. Le PNP offrait en plus l’avantage de faire la différence entre un LA et des inhibiteurs spécifiques aux facteurs. Par conséquent, le sous-comité du SSC sur les lupus anticoagulant a établi quatre critères spécifiques pour confirmer la présence de lupus anticoagulant, incluant la correction relative due à un LA par addition plaquettes décongelées, de phosphatidylsérine ou de phospholipides en phase hexagonale⁶. Par la suite, ce sous-comité a recommandé que pour les échantillons suspectés d’avoir un LA, au moins un autre seul test complémentaire devait être fait si le test initial était négatif⁷.

Réactifs

CRYOcheck Platelet Lysate est préparé à partir de plaquettes humaines de donneurs sains. La concentration de plaquettes est ajustée pour être équivalente à 250 000 à 300 000 plaquettes/µL.



Tous les produits sanguins doivent être traités comme potentiellement infectieux. Les matières dont ils dérivent, ont été testées suivants les directives imposées par la FDA. Cependant, aucune méthode connue ne peut offrir l’assurance que les produits dérivés du sang humain ne transmettent pas d’agents infectieux. En conséquence, ces produits issus de sang humain doivent être manipulés et détruits comme préconisés pour tout échantillon potentiellement infectieux⁸.

Conservation et préparation du réactif

CRYOcheck Platelet Lysate est stable, conservé congelé entre -40 et -80°C, jusqu’à la fin du mois de la date de péremption indiquée sur l’emballage.

Décongeler chaque flacon à 37°C (±1°C) dans un bain-marie. **L’utilisation d’un bain sec ou d’un bloc chauffant pour la décongélation n’est pas recommandée.** Les temps de décongélation sont importants et doivent être rigoureusement respectés, un chronomètre est recommandé. Se référer aux tables de décongélation basées sur la taille des aliquotes. Laisser les plasmas décongelés se stabiliser à la température ambiante (18 à 25°C) et retourner doucement avant utilisation.

Table de Décongélation	
Taille de l’aliquote	Bain-marie à 37°C (±1°C)
1.0 ml	4 minutes

Ce lysat doit être utilisé dans les huit heures suivant la décongélation, s’il est conservé dans son flacon d’origine, à 2 - 8°C. Il est nécessaire de laisser le lysat stabiliser à la température du laboratoire (18 - 25°C), puis de l’agiter doucement avant de l’utiliser. **Le réactif décongelé doit être détruit après huit heures et ne doit pas être recongelé.**