CRYO*check*™ IVD

LA SURE™

Confirmation du LA par VVR

CRYO*check*™

dRVVT Confirmatory Reagent

LA SURE™

Intended Use

CRYO*check* LA Sure is a dilute Russell's Viper Venom Time (dRVVT) reagent intended to confirm the presence of lupus anticoagulants (LA) in citrated human plasma.

Summary and Principle

LA are autoantibodies of the IgG and IgM types that are specifically directed against negatively charged phospholipids, such as phosphatidylinositols and phosphatidylserines, or complexes of phospholipids with either β_2-glycoprotein-1 or clotting factors such as prothrombin. They occur in various clinical conditions, especially autoimmune diseases[1]. LA have traditionally been detected using phospholipid sensitive *in vitro* clotting tests, such as the activated partial thromboplastin time (APTT), kaolin clotting time (KCT), and dRVVT[2]. The dRVVT was introduced in 1986 and showed improved sensitivity to LA over the APTT partially due to a reduced phospholipid concentration[3].

LA are usually indicated by a prolonged clotting time result that is not corrected by mixing patient plasma with normal plasma. The correction of a prolonged result by the addition of phospholipids to the plasma is a more specific characteristic of LA[3].

LA prolong phospholipid-sensitive clotting tests; however, they are paradoxically associated with thrombotic problems[4]. LA are a common cause of unexplained prolonged APTTs and need to be carefully distinguished from idiopathic antibodies against factor VIII associated with bleeding.

LA 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[4, 5].They are also associated with a variety of hemostatic problems such as thrombocytopenia and neurological disorders[6].

Russell's viper venom directly activates factor X, bypassing factor VII of the extrinsic pathway and the contact and antihemophilic factors of the intrinsic pathway. Therefore, dRVVT tests are more specific for LA than APTTs as they are not affected by contact factor abnormalities or by factor VIII deficiencies or antibodies[3]. Excess phospholipid is present in CRYO*check* LA Sure to neutralize LA.

Reagents

CRYO*check* LA Sure contains Russell's viper venom, phospholipids, antiheparin agents, calcium, buffers, stabilizers, sodium azide, and red dye (<0.001%).

Sodium azide may react with lead and copper plumbing to form highly explosive metal compounds. Ensure proper disposal of reagent according to federal, state, and local regulations.

Storage and Handling

When stored at -40 to -80°C, CRYO*check* LA Sure 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 duration based on aliquot size. Allow thawed reagent 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

CRYO*check* LA Sure may be used for up to 48 hours after thawing, if capped in the original vial and maintained at 2 to 8°C. Allow refrigerated reagent to acclimate to room temperature (18 to 25°C) and invert gently prior to use. **Thawed material may be refrozen once, and stored at -20°C for up to one month.**

Availability

Product	Catalog #	Format
LA Sure	SUR-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

- CRYO*check* LA Sure

Materials Required but not Provided

- Waterbath capable of maintaining 37°C (± 1°C)
- 12 mm x 75 mm glass test tubes
- CRYO*check* LA Check
- Quality control material (e.g. CRYO*check* Lupus Positive Control, CRYO*check* Weak Lupus Positive Control)
- Plastic disposable pipettes
- Volumetric pipette
- Timer
- Stopwatch

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 guidelines[7]. If samples are to be frozen before testing, plasmas should be centrifuged a second time, and stored at -20°C or below.

Manual Method – Tilt Tube

1. In a 37°C (± 1°C) waterbath, prewarm a slight excess of CRYO*check* LA Sure allowing 200 µL per test.
2. Dispense 200 µL of test plasma into a test tube and warm for one minute at 37°C (± 1°C).
3. Add 200 µL of prewarmed CRYO*check* LA Sure to the plasma and simultaneously initiate the clot timer. Record clotting times in seconds.
4. Repeat for duplicate test values and report the average of these as the result.

Automated Methods

Reagent preparation instructions and instrument settings for a variety of analyzers are available upon request from Precision BioLogic.

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 system[8]. 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 occurs[9].

Commercial lyophilized quality control plasmas containing unspecified levels of citrate and platelets are not recommended as they may give erroneous results[10, 11].

Results

The CRYO*check* LA Sure test is indicated in the event that the CRYO*check* LA Check™ test result is prolonged (i.e. greater than three standard deviations (SD) above the laboratory-established normal reference mean). Perform the CRYO*check* LA Sure test and calculate the ratio result by dividing the CRYO*check* LA Check clotting time by the CRYO*check* LA Sure clotting time as follows:

$$\text{LA Check/LA Sure ratio} = \frac{\text{LA Check clotting time (sec.)}}{\text{LA Sure clotting time (sec.)}}$$

If the LA Check/LA Sure ratio is greater than the upper limit of the established 3 SD normal reference range, the test is positive for LA. If the LA Check/LA Sure ratio is less than or equal to the upper limit of the 3 SD normal reference range, then LA is absent.

In accordance with the SSC Subcommittee for the Standardization of LA guidelines[12], results should be compared to other established LA tests performed on the same sample, since no single assay can guarantee, with certainty, that LA is present or absent.

Limitations of the Procedure

Patients with deficiencies of factors II, V, or X or patients on anti-vitamin K therapy may exhibit prolonged CRYO*check* LA Sure times. Typically, the final ratio (LA Check/LA Sure) should be normal unless LA is present. However, false-positive results have been known to occur with patients on anti-vitamin K therapy. This may be overcome by mixing the patient's plasma sample with pooled normal plasma and repeating the CRYO*check* LA Check screening and CRYO*check* LA Sure confirmatory tests[13]. CRYO*check* LA Check results on plasmas subjected to mixing studies should be interpreted with care as published data has demonstrated that further dilution of weak inhibitors can produce false-negative results[14].

CRYO*check* LA Sure is unaffected by heparin levels up to 1.0 unit/mL. Plasmas containing heparin levels greater than 1.0 unit/mL may give false-positive results and should not be tested with this reagent.

Plasma samples with visible hemolysis should not be used due to possible clotting factor activation and endpoint measurement interference[7]. Icteric or lipemic samples may also interfere with endpoint determination on some optical instruments[7].

Expected Values

In a study of 20 healthy males and females using a Diagnostica Stago ST4® analyzer, an LA Check/LA Sure ratio normal reference range (3 SD confidence interval) of 0.72 - 1.26 was established. These values should be used as a guide only. Each laboratory should establish its own normal reference range.

Performance Characteristics

In precision studies over 48 hours at 2 to 8°C with CRYO*check* Lupus Positive Control plasma on a Diagnostica Stago ST4® analyzer, CRYO*check* LA Sure exhibited an overall coefficient of variation (CV) of 4.03%.

An R^2=0.991 was derived in a correlation study using Gradipore LA Confirm™ dRVVT confirmatory test involving OAT patient plasmas (n=15), known LA positive samples (n=12), and plasmas with depleted levels of factors II (n=3), V (n=3), and X (n=3). An R^2=0.956 was derived for the corresponding ratios.

PrecisionBioLogic

CRYO*check*™

LA SURE™

Confirmation du LA par VVR

Intérêt du Coffret

Le CRYO*check* LA Sure est un réactif pour mesurer un Temps de Venin de Vipère Russel dilué (dRVVT) afin de confirmer la présence d'un lupus anticoagulant (LA) dans le plasma citraté humain.

Résumé et Principe

Les LA sont des auto anticorps de type IgG et IgM directement dirigées contre une variété de phospholipides anioniques (chargés négativement) tels que les phosphatidyl-inositols et les phosphatidyl-sérines /ou contre des complexes phospholipides avec soit de la β_2-glycoprotéine-1 ou des facteurs de la coagulation tels que la prothrombine. Ils apparaissent surtout au cours des maladies auto-immunes[1]. Les LA sont traditionnellement détectés en utilisant des phospholipides dans des tests sensibles in vitro tels que le TCA (Temps de Céphaline Activateur), le KCT (Kaolin clotting Time) et le dRVVT[2]. Le dRVVT a été introduit en 1986 et a montré qu'il améliorait la sensibilité de la mesure du LA en utilisant un TCA modifié dont la concentration de phospholipides avait été réduite[3].

Les LA prolongent couramment le TCA et ne sont pas corrigés par le mélange plasmas malade-plasma normal. La correction d'un TCA allongé par addition de phospholipides au plasma est une caractéristique des LA[3].

Les LA prolongent les tests sensibles aux phospholipides cependant ils sont paradoxalement associés aux problèmes de thromboses[4]. Les LA sont la cause la plus commune d'allongement inexpliqué du TCA au laboratoire et doivent être distingués des anticorps idiopathiques dirigés contre le facteur VIII, lesquels font saigner.

Les LA sont maintenant considérés comme représentant un facteur de risque de thrombose et sont souvent présents chez des femmes ayant des pertes fœtales à répétition[4, 5]. Ils sont souvent associés à toute une variété de problèmes hémostatiques tels que la thrombocytopénie et les désordres neurologiques[6].

Le venin de vipère Russel active directement le facteur X en facteur Xa et court-circuite la voie intrinsèque et extrinsèque au niveau du facteur X. Pour cette raison, les tests à base de dRVV ne sont pas affectés par les taux bas ou les déficiences ou la présence d'anticorps anti-facteurs pour les facteurs en amont du facteur X[3]. Un excès de phospholipides est présent au sein du CRYO*check* LA Sure pour neutraliser les LA.

Réactifs

Le CRYO*check* LA Sure contient du Venin de Vipère Russel, des phospholipides, des agents anti-héparine, du calcium, du tampon, des stabilisants et de l'azide de sodium et un colorant rouge pour moins de 0.001%.

Le réactif contient de l'azide de sodium comme conservateur. Les réactifs contenant de l'azide de sodium doivent être éliminés avec précaution. L'azide de sodium peut générer des composants explosifs au contact des canalisations en plomb ou en cuivre. Afin d'éviter ce risque, éliminer toute trace de réactif conformément à la législation en vigueur.

Conservation et préparation du réactif

Ce réactif est stable s'il est 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 le réactif décongelé 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 réactif doit être utilisé dans les 48 heures suivant la décongélation, s'il est conservé dans son flacon d'origine, à 2 à 8°C. Il est nécessaire de laisser le réactif se stabiliser à la température ambiante (18 à 25°C), puis de l'agiter doucement avant de l'utiliser. **Le matériel décongelé peut être recongelé une fois et peut être conservé à -20°C jusqu'à un mois.**

Disponibilité

Produit	Référence	Présentation
LA Sure	SUR-10	25 flacons de 1.0 ml

Instruments

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

Procédure

Après décongélation du réactif, utilisez-le selon les procédures établies au laboratoire.

Matériel fourni

- CRYO*check* LA Sure

Matériels requis mais non fournis

- Bain-marie à 37°C (± 1°C)
- Instrument de coagulation ou système de dosage
- Matériel de contrôle qualité (ex. CRYO*check* Lupus Positive Control, CRYO*check* Weak Lupus Positive Control)
- Tubes et plastiques plastiques
- Micro pipette
- Chronomètre
- Réactifs spécifiques

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 (<10000 plaquettes/µl) et doit être testé quatre heures après le prélèvement quand il est maintenu à 2 à 4°C comme convenu dans les instructions du CLSI[7]. 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.

Méthode manuelle

1. Préchauffer le CRYO*check* LA Sure à 37°C (± 1°C).
2. Prélever et distribuer 0.2 mL de plasma dans une cuvette de réaction et incuber à 37°C (± 1°C) pendant une minute.
3. Prélever et distribuer 0.2 ml de CRYO*check* LA Sure préchauffé, déclencher le chronomètre simultanément et mesurer le temps nécessaire à la coagulation.
4. Répéter les étapes 1 à 3 pour dupliquer le test et calculer la moyenne.

Méthodes automatisées

De nombreux protocoles d'adaptation sont disponibles auprès du distributeur.

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 test[8]. 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 intervenir[9].

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[10, 11].

Résultats

Un test de confirmation est effectué si le CRYO*check* LA Check™ a donné des résultats prolongés au delà de trois déviations standards comparés à la moyenne des résultats établis sur une population normale sans LA. Calculer le ratio selon la formule suivante:

$$\text{Ratio LA Check/LA Sure} = \frac{\text{Temps LA Check (sec.)}}{\text{Temps LA Sure (sec.)}}$$

Si le ratio est supérieur à trois déviations standards (DS) comparés à la moyenne des résultats établis sur une population normale sans LA, alors le test est positif. Si le ratio est inférieur à trois DS, alors le test est négatif et le LA est absent.

Selon les recommandations du sous comité pour la standardisation des LA[12], les résultats doivent être comparés à ceux d'autres méthodes pour la détection des LA avec les mêmes plasmas afin d'être certain de la présence ou l'absence de LA au sein de ces plasmas.

Limites de la Méthode

Les patients ayant un déficit de facteur II,V, X ou les patients ayant un traitement anticoagulant oral (AVK) peuvent avoir des temps prolongés avec ce réactif. Cependant le ratio final obtenu (LA Check/LA Sure) devrait être normal sauf en cas de présence d'un LA. Les rares résultats faussement positifs connus ont été reliés à des patients sous traitement AVK. Cette difficulté peut être surmontée en diluant le plasma du patient dans du pool de plasma et en répétant les tests de screening LA Check et de confirmation LA Sure[13]. Les résultats du CRYO*check* LA Check sur des plasmas ayant eu une étude du test du mélange doivent être interprété avec soin dans la mesure où des données publiées ont démontré qu'une dilution supplémentaire d'un inhibiteur non spécifique faiblement positif peut produire des résultats faussement négatifs[14].

Le réactif est insensible à l'héparine jusqu'à un taux de 1.0 UI/ml. Les échantillons de plasma contenant de l'héparine audelà de 1.0 UI/ml peuvent induire des résultats faussement positifs et ne doivent pas être testés avec ces réactifs.

Les échantillons de plasma ayant une hémolyse visible ne doivent pas être testés avec ces réactifs du fait de l'activation des facteurs de l'hémostase[7]. Les échantillons de plasma ictérique ou lipémique peuvent aussi interférer sur certains appareils à lecture optique[7].

Valeurs Attendues

Des études ont été effectuées sur 20 plasmas normaux en utilisant une méthode de détection de type mécanique avec l'appareil ST4® de la société STAGO. Le ratio LA Check/LA Sure et son intervalle de trois DS a été mesuré entre 0.72 - 1.26. Ces valeurs sont indicatives et 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.

Performances

Les données suivantes ont été obtenues sur 48 heures à 2 à 8°C en utilisant des lots de CRYO*check* Lupus Positive Control sur ST4®. Le réactif CRYO*check* LA Sure a montré un CV de 4.03% pour le réactif.

Un coefficient de corrélation R^2=0.991 a été trouvé sur la base d'une étude comparant ce réactif à celui de Gradipore en utilisant des plasmas de patients sous AVK (n=15), des plasmas de patient avec LA (n=12), et des plasmas de patients ayant un déficit en facteur II (n=3), V (n=3), X (n=3). Un R^2=0.956 a été trouvé sur la base des ratios.

Bibliography / Bibliographie

1. Arnout J. Antiphospholipid syndrome: Diagnostic aspects of lupus anticoagulants. Thromb Haemost 2001; 86(1):83-91.
2. Triplett DA, Brandt JT. Laboratory identification of the lupus anticoagulant. Br J Haematol 1989; 73(2):139-142.
3. 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(4):869-874.
4. 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(9):682-698.
5. Feinstein DI. Lupus anticoagulant, thrombosis and fetal loss. N Engl J Med 1985; 313:1348-1350.
6. Harris EN, Asherson RA, Hughes GRV. Antiphospholipid antibodies – autoantibodies with a difference. Ann Revs Med 1998; 39:261-271.
7. Collection, Transport, and Processing of Blood Specimens for Testing Plasma-Based Coagulation Assays and Molecular Hemostasis Assays; Approved Guideline-Fifth Edition; CLSI, H21-A5 Vol. 28 No. 5. 2008.
8. Cembrowski GS, Carey RN. Laboratory quality management. Chicago: ASCP Press; 1989. p. 166-171.
9. CLIA 2004 – Code of Federal Regulations, 42CFR493.1269, 2004.
10. 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(1):105-110.
11. Hirst CF, Poller L. The cause of turbidity in lyophilized plasmas and its effects on coagulation tests. J Clin Pathol 1992; 45(8):701-703.
12. Pengo V, Tripodi A, Reber G, Rand JH, Ortel TL, Galli M, De Groot PG; Update of the guidelines for lupus anticoagulant detection. Subcommittee on Lupus Anticoagulant /Antiphospholipid Antibody of the Scientific and Standardisation Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. J Thromb Haemust 2009; 7(10):1737-1740.
13. Tripodi A, Chantarangkul V, Clerici M, Mannucci PM. Laboratory diagnosis of lupus anticoagulants for patients on oral anticoagulant treatment. Performance of dilute Russell viper venom test and silica clotting time in comparison with Staclot LA. Thromb Haemost 2002; 88(4):583-6.
14. Thom J, Ivey L, Eikelboom J. Normal plasma mixing studies in the laboratory diagnosis of lupus anticoagulant. J Thromb Haemost 2003; 1: 2689-2691

As of June 30 2017/
À partir de 30 juin 2017:
EC REP **EMERGO EUROPE**
Prinsessegracht 20
2514 AP The Hague
The Netherlands

EC REP European Authorized Representative (Regulatory affairs only)
Emergo Europe Molenstraat 15, 2513 BH The Hague, The Netherlands
Tel: (+31) 70 345 8570 Fax: (+31) 70 346 7299

CE

Symbols used / Symboles utilisés 09.60.00030 Rev. 16 December / décembre 2012

IVD	LOT					EC REP
In vitro diagnostic medical device	Batch code	Use by	Temperature limitation	Warning	Manufacturer	Authorized representative
Dispositif médical de diagnostic *in vitro*	Désignation du lot	Date de péremption	Températures limites de conservation	Attention	Fabricant	Mandataire