

**HEMOCLOT™ LA-S**

REF CK090K R 6 x 1 mL

REF CK094K R 12 x 2 mL

HEMOCLOT™ LA-C

REF CK091K R 6 x 1 mL

Méthode coagulante pour la détection des anticoagulants lupiques.

Français, dernière révision : 02-2022

UTILISATION:

Les coffrets HEMOCLOT™ LA-S et HEMOCLOT™ LA-C sont des réactifs simplifiés du test de venin de vipère de Russell dilué (dRVV) pour la détection quantitative *in vitro* spécifique des anticoagulants lupiques (LA) par méthode coagulante sur plasma humain citraté, en utilisant une méthode manuelle ou automatisée.

- **HEMOCLOT™ LA-S:** Réactif dRVV simplifié pour le dépistage des anticoagulants lupiques.
- **HEMOCLOT™ LA-C:** Réactif dRVV contenant une forte concentration de phospholipides afin de confirmer la présence d'anticoagulants lupiques.

RESUME ET EXPLICATION:**Technique¹ :**

Les LA sont des anticorps dirigés contre les phospholipides/complexes protéiques chargés négativement, entraînant de ce fait des temps de coagulation prolongés dans les tests phospholipides-dépendants.

Le temps de coagulation (TC) des LA-S (faible concentration en phospholipides) est attendu prolongé en présence de LA. Le LA-C (forte concentration en phospholipides) devrait neutraliser le LA et raccourcir le TC.

Clinique¹⁻⁵ :

Les LA sont associés avec de nombreux états cliniques incluant par exemple lupus, maladies auto-immunes, thromboses, perte fœtale et doivent généralement être confirmés par plusieurs tests.

PRINCIPE:

En présence de calcium, le Facteur X présent dans l'échantillon testé est directement activé en FXa par le RVV. En présence de Facteur V, calcium et phospholipides, le FXa active la prothrombine en thrombine qui coagule rapidement le fibrinogène. Par conséquent, les anomalies des facteurs de la phase contact, les carences en FVII, FVIII et FIX ou leurs inhibiteurs ne devraient pas affecter les résultats.

HEMOCLOT™ LA-S contient une faible concentration de phospholipides ; le temps de coagulation LA-S est donc attendu prolongé en présence de LA.

HEMOCLOT™ LA-C contient une concentration plus élevée de phospholipides, qui devrait neutraliser le LA présent dans l'échantillon testé, et donc raccourcir les temps de coagulation.

Une substance neutralisant l'héparine est également incluse (pas d'interférence significative jusqu'à 1 UI/mL d'héparine dans l'échantillon testé). Ainsi les tests HEMOCLOT™ LA-S et HEMOCLOT™ LA-C sont plus spécifiques que les Temps de Céphaline Activée (TCA) pour l'évaluation du LA.

REACTIFS:

R HEMOCLOT™ LA-S, lyophilisé avec des pigments verts. Contient du RVV, des phospholipides, une substance neutralisant l'héparine, du calcium, des stabilisants.

REF CK090K → **R** 6 flacons de 1 mLREF CK094K → **R** 12 flacons de 2 mL

R HEMOCLOT™ LA-C, lyophilisé avec des pigments roses. Contient du RVV, des phospholipides, une substance neutralisant l'héparine, du calcium, des stabilisants.

REF CK091K → **R** 6 flacons de 1 mL**MISE EN GARDE ET AVERTISSEMENTS:**

- Certains réactifs de ce coffret contiennent des produits d'origine animale. Ces réactifs d'origine biologique doivent être manipulés avec les précautions d'usage s'agissant de produits potentiellement infectieux.
- L'élimination des déchets doit être effectuée conformément aux réglementations locales en vigueur.
- Utiliser uniquement les réactifs d'un même lot de coffret.
- Les études de vieillissement montrent que les réactifs peuvent être expédiés à température ambiante sans aucun dommage.
- Ce dispositif de diagnostic *in vitro* est destiné à une utilisation professionnelle en laboratoire.

PREPARATION DES REACTIFS:

Retirer délicatement le bouchon de lyophilisation, pour s'affranchir de toute perte de produit à l'ouverture du flacon.

R Reconstituer chaque flacon avec exactement :

REF CK090K / CK091K → 1 mL d'eau distillée

REF CK094K → 2 mL d'eau distillée

Agiter vigoureusement jusqu'à dissolution complète, en évitant la formation de mousse et charger directement sur l'automate en suivant les instructions du guide d'application.

Pour la méthode manuelle, laisser stabiliser pendant 30 min à température ambiante (18-25°C), homogénéiser avant utilisation.

STOCKAGE ET STABILITE:

Les réactifs non ouverts doivent être conservés à 2-8°C dans leur emballage d'origine. Ils sont alors utilisables jusqu'à la date de péremption imprimée sur le coffret.

R La stabilité du réactif après reconstitution, sous réserve de toute contamination ou d'évaporation, conservé fermé est de :

REF CK090K / CK091K / CK094K :

- 7 jours à 2-8°C.
- 24 heures à température ambiante (18-25°C).
- 2 mois congelé à -20°C ou moins*
- **Stabilité à bord de l'automate : se référer à l'application spécifique.**

*Décongeler une seule fois le plus rapidement possible à 37°C et utiliser immédiatement.

REACTIFS ET MATERIELS REQUIS MAIS NON FOURNIS:**Réactifs:**

- Eau distillée, préférentiellement stérile.
- Plasmas de contrôle adaptés normal et anormal pour LA, par exemple :

Nom du produit	Référence
BIOPHEN™ Normal Control Plasma	223201
LA Control Plasma	SC081K / SC082K / SC083K

Se référer également au guide d'application spécifique de l'automate utilisé.

Matériels:

- Bain-Marie électromagnétique, automate de coagulation semi-automatique ou automatique.
- Chronomètre, Pipettes calibrées, tubes pour tests en plastique ou en verre siliciné.

PRELEVEMENTS ET PREPARATION DES ECHANTILLONS:

Le sang (9 volumes) doit être collecté sur l'anticoagulant citrate trisodique (1 volume) (0,109M, 3,2%) avec précautions, par ponction veineuse franche. Le premier tube doit être éliminé.

La préparation et la conservation des échantillons doivent être réalisées selon les recommandations locales en vigueur (pour les Etats-Unis, se référer aux recommandations du CLSI H21-A5⁶ pour plus d'informations concernant le prélèvement, la manipulation et la conservation). Pour la conservation des plasmas, se référer aux références^{6,7}.

PROCEDURE:

Il est recommandé d'utiliser les tests HEMOCLOT™ LA-S et LA-C ensemble.

Le coffret peut être utilisé en méthode manuelle ou automatisée. Le test est réalisé à **37°C±1°C**, et le temps de coagulation, déclenché par l'ajout du réactif, est mesuré.

Méthode de dosage:

1. Reconstituer les contrôles comme indiqué dans les notices spécifiques.
2. Les plasmas doivent être testés **non dilués**.
3. Principe: détection du temps de coagulation par méthode mécanique ou optique.

Préchauffer à 37°C le volume approprié de réactif (0,2 mL par test).

Dans un petit tube à essai, introduire:

	Volume
Plasma à tester	200 µL
Incuber à 37°C, pendant 1-2 minutes, puis introduire (en déclenchant le chronomètre):	
R préincubé à 37°C	200 µL
Enregistrer le temps de coagulation (TC, sec) exact.	

Si un volume réactionnel différent de celui indiqué ci-dessus est requis pour la méthode utilisée, le rapport des volumes doit être strictement respecté afin de garantir les performances du dosage. L'utilisateur est responsable de la validation des modifications et de leur impact sur tous les résultats.

Pour une méthode automatisée, les guides d'applications sont disponibles sur demande. Se référer aux guides d'application et aux précautions spécifiques pour chaque automate.

CONTRÔLE QUALITE:

L'utilisation de contrôles de qualité permet de valider la conformité de la méthode ainsi que l'homogénéité des dosages entre les différents essais pour un même lot de réactifs.

Inclure des contrôles qualité dans chaque série, selon les bonnes pratiques de laboratoire, afin de valider le test. Une vérification de la zone normale doit être établie au moins pour chaque nouveau lot de réactifs, ou après chaque maintenance de l'automate, ou quand les valeurs des contrôles de qualité sont mesurés en dehors de la zone d'acceptation définie pour la méthode. Le temps de coagulation obtenu avec le même lot de réactif peut varier légèrement en fonction de l'instrument utilisé et de la sensibilité à la détection du caillot.

Chaque laboratoire doit établir les zones d'acceptation et vérifier les performances attendues dans son système analytique.

RESULTATS:

Les tests et résultats doivent être interprétés selon des recommandations ou guidelines reconnus (pour les Etats-Unis, se référer aux recommandations du CLSI H60-A⁸).

• HEMOCLOT™ LA-S :

Le TC obtenu pour l'échantillon doit être comparé à celui de la zone normale de référence du laboratoire (se référer au guideline approprié ; la zone normale est idéalement établie à partir de plasmas normaux individuels ; alternativement, un pool de plasma humain normal pour lequel le résultat doit être dans cette zone et testé dans chaque série).

Les résultats peuvent être exprimés en ratio :

Ratio LA-S = Echantillon LA-S (CT, sec) / Moyenne des normaux pour LA-S (TC, sec).

Si les résultats du LA-S sont anormalement prolongés (ex: **CT > moyenne +2ET** comparé à la référence normale du laboratoire), confirmer la présence de LA avec le test LA-C.

• HEMOCLOT™ LA-C :

Les résultats peuvent être exprimés en ratio :

Ratio LA-C = Echantillon LA-C (TC, sec) / Moyenne des normaux pour LA-C (TC, sec).

• Ratio LA normalisé :

Etablir le ratio normalisé LA = ratio LA-S / ratio LA-C.

• Test de mélange :

Un test de mélange peut être réalisé pour confirmer la présence de LA, par mélange 50:50 du plasma à tester avec un plasma normal.

Interprétation :

Les plasmas contenant des anticoagulants lupiques donnent généralement un résultat prolongé avec réactif LA-S et plus court avec LA-C.

A titre indicatif :

- **Ratio normalisé ≥ 1,20** indique la présence d'anticoagulants lupiques (et la quantité présente augmente avec le ratio).
- **Ratio normalisé < 1,20** (ou limite) et TC obtenus avec tests LA-S et LA-C prolongés : les résultats doivent être confirmés par des investigations complémentaires telles que test de mélange.
- Le mélange de plasma normal avec l'échantillon (50:50) remplace les facteurs potentiellement absents dans le plasma testé. Si le résultat de l'échantillon mélangé est encore prolongé, un anticoagulant ou un autre inhibiteur est présent.

Les résultats du test doivent toujours être interprétés en lien avec l'état biologique et clinique du patient, et les autres données d'exploration.

LIMITATIONS:

- Pour obtenir les performances optimales du test et répondre aux spécifications, suivre scrupuleusement les instructions techniques validées par HYPHEN BioMed.
- Tout réactif présentant un aspect inhabituel ou des signes de contamination doit être rejeté.

- Tout échantillon suspect ou présentant des signes d'activation doit être rejeté.
- Il n'est pas recommandé de tester la présence de LA sur patient sous héparine. Toutefois, les réactifs HEMOCLOT™ LA-S et LA-C contiennent une substance neutralisant l'héparine jusqu'à une concentration de 1 UI/mL.
- Les autres nouveaux agents antithrombotiques peuvent avoir des effets inattendus sur test et ratio.
- Dans une étude externe, les résultats obtenus sont moins influencés par une faible coagulation sous warfarine ou rivaroxaban que d'autres dispositifs dRVV Test du commerce.
- Les plasmas normaux de contrôle de qualité disponibles dans le commerce avec des taux de citrate et de plaquettes non spécifiés ne sont pas recommandés pour les études de mélange.
- Une étude supplémentaire devrait être menée afin de déterminer l'origine de chaque résultat inattendu ou anormal. Au moins 2 tests de dépistage avec des propriétés et des sensibilités différentes doivent être effectués avant d'avoir la possibilité d'exclure le LA. Les résultats limites doivent être considérés en lien avec d'autres marqueurs pour syndrome anti-phospholipides (APS) tels que l'anticardiolipine ou l'anti-B₂GPI et vérifiés par méthode Elisa.
- Pour les études comparatives il est recommandé de tester HEMOCLOT™ LA-S et LA-C en même temps.
- Les échantillons icteriques, lipémiques, hémolysés, ou les échantillons avec un aspect anormal (par exemple avec une coagulation partielle) peuvent donner de faux résultats et doivent être interprétés avec prudence.

VALEURS ATTENDUES:

Les LA sont absents des plasmas humains normaux.

A titre indicatif, pour le plasma normal, la valeur de TC est généralement attendue < 45 sec, et le ratio normalisé < 1.20.

Chaque laboratoire doit établir sa propre zone normale pour chaque combinaison de lot, instrument et protocole utilisés.

PERFORMANCES:

- Dans une étude externe, les résultats ont montré une distribution similaire sur 59 échantillons dRVVT positifs et 62 échantillons normaux, comparativement à d'autres dispositifs commerciaux dRVV Test Screen et Confirm.
- Les études de performances ont été réalisées en interne sur Sysmex CS-5100. Les performances ont été évaluées avec les contrôles du laboratoire sur 6 jours, 2 séries par jour et 2 répétitions à chaque série pour un niveau de contrôle. Les résultats suivants ont été obtenus :

Echantillon	Intra essai			Inter essais		
	Normal	Pathologique		Normal	Pathologique	
Test	LA-S	LA-S	LA-C	LA-S	LA-S	LA-C
n	30	30	30	24	24	24
Moyenne (sec)	32,1	84,2	37,0	31,6	84,4	37,0
SD (sec)	0,19	1,05	0,26	0,66	1,16	0,33
CV%	0,59	1,24	0,71	2,10	1,38	0,89

- Corrélation avec une autre méthode (Siemens LA1/LA2 vs HEMOCLOT™ LA-S/LA-C sur Sysmex CS-5100) :
n = 50 y = 1,08x - 0,08 r = 0,930

• Interférences :

Aucune interférence, sur l'automate Sysmex CS-5100 n'a été observée avec les molécules et jusqu'aux concentrations suivantes :

Hémoglobine	Bilirubine (conjuguée)	Intralipides	Héparines (HNF/HBPM)
500 mg/dL	25 mg/dL	250 mg/dL	1 UI/mL

REFERENCES:

1. Thiagarajan P. *et al.* The use of the dilute Russels viper venom time for the diagnosis of lupus anticoagulants. Blood. 1986.
2. Moore GW. *et al.* Newly developed dilute Russell's viper venom reagents for lupus anticoagulant detection with improved specificity. Lupus. 2017.
3. Favaloro EJ. The Russell viper venom time (RVVT) test for investigation of lupus anticoagulant (LA). Wiley Periodicals, Inc. 2019.
4. Rauch J. *et al.* Distinguishing lupus anticoagulants from antifactor antibodies using hexagonal phase II phospholipids Thromb Haemost. 1989.
5. Pengo V. *et al.* Update of the guidelines for lupus anticoagulant detection. J. Thromb Haemost 2009.
6. CLSI Document H21-A5: "Collection, transport, and processing of blood specimens for testing plasma -based coagulation assays and molecular hemostasis assays; approved guideline". 2008.
7. Woodhams B. *et al.* Stability of coagulation proteins in frozen plasma. Blood coagulation and Fibrinolysis. 2001.
8. CLSI Document H60-A: "Laboratory Testing for the Lupus Anticoagulant; Approved Guideline". 2014

SYMBOLES:

Symboles utilisés et signes énumérés dans la norme ISO 15223-1, se référer au document Définition des symboles.

Changements par rapport à la précédente version.