



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 heterogéneo de autoanticorpos que interferem nas provas de coagulação dependentes de fosfolípidos. 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 antifosfolípida (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 fosfolípidos. 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 fosfolípidos 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 fosfolípidos 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, lipémicas 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. Puzner, 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

Os seguintes símbolos são utilizados nos kits de reagentes para diagnóstico da Wiener lab.



Este produto preenche os requisitos da Diretiva Europeia 98/79 CE para dispositivos médicos de diagnóstico "in vitro"



Elaborado por:



Representante autorizado na Comunidade Europeia



Nocivo



Uso médico-diagnóstico "in vitro"



Corrosivo / Caústico



Conteúdo suficiente para <n> testes



Irritante



Data de validade



Consultar as instruções de uso



Limite de temperatura (conservar a)



Calibrador



Não congelar



Controle



Risco biológico



Controle Positivo



Volume após a reconstituição



Controle Negativo



Conteúdo



Número de lote



Número de catálogo



Wiener lab.

2000 Rosario - Argentina