

Diferencias en los resultados de la detección del inhibidor lúpico según el algoritmo diagnóstico utilizado

Differences in the results of lupus inhibitor detection according to the diagnostic algorithm used

Duboscq C, Ceresetto J, Bullorsky E, Shanley C, Rabinovich O, Palmer S, Bullorsky L, Stemmelin G.

Servicio Hematología y Hemoterapia. Hospital Británico de Bs. As. Argentina.

cduboscq58@hotmail.com

Premio al Mejor Trabajo Libre Oral del XXV Congreso Internacional del GRUPO CLAHT

Fecha recepción: 11/11/2017
Fecha aprobación: 19/12/2017



ARTÍCULO ORIGINAL

HEMATOLOGÍA
Volumen 21 n° 3: 281-288
Septiembre - Diciembre 2017

Palabras claves: inhibidor lúpico, guías diagnósticas, ensayo de mezcla.

Keywords: lupus anticoagulant, mixing tests, laboratory detection guidelines.

Resumen

El diagnóstico de inhibidor lúpico (IL) según el algoritmo clásico (ISTH) es prolongación de algunos de los test de detección (Russel o APTT sensible), la no corrección de la prueba de mezcla y el acortamiento de los tiempos de la prueba alargada en presencia de alta concentración de fosfolípidos. La guía de la Sociedad de Hematología Británica (BSH) sostiene que, en ausencia de otras anomalías de la coagulación, si una muestra da positivo el ensayo de detección y confirmatorio, aunque las pruebas de mezclas sean negativas, debe considerarse positivo para IL. La guía de CLSI sugiere realizar las pruebas en el siguiente orden: *screen-confirm-mezcla*, recomienda que el test de mezcla se realice sólo cuando los dos primeros no tengan un resultado claro y ante la sospecha de otras anomalías. El objetivo de este trabajo es comparar en forma retrospectiva el

conjunto de datos de 196 estudios de IL considerados positivos en dos muestras independientes separadas por doce semanas aplicando las guías BSH/CLSI vs el algoritmo clásico (ISTH).

POBLACIÓN: 196 muestras de inhibidor lúpico positivo consecutivas que ingresaron al laboratorio según BSH Y CLSI entre marzo 2015 y mayo 2017.

MÉTODOS: se utilizó un ensayo de APTT sensible con sílica microtonizada como activador (SCT *screen* y *confirm*) y la prueba de veneno de víbora Russell diluida y concentrada. Los puntos de corte de las razones normalizadas (Russell=1.20; APTT=1.31) y del índice de corrección fueron establecidos localmente (ICA mayor 11 % para APTT y mayor a 12 % como no corrección).

ANÁLISIS CON EL ALGORITMO TRADICIONAL: a las muestras con ensayo de detección positivo se les

realizó el ensayo de mezclas: **33/196 por APTT (ICA = 6±4%) y 28/196 por Russell (ICA= 6±4%) corrigieron y no se les realizó prueba confirmatoria y se los consideró negativo para IL.** Ensayo confirmatorio: fueron positivas 123/196 por el APTT y 96/196 por el Russell.

ANÁLISIS CON EL ALGORITMO BSH/CLSI: ensayo de detección: al realizar el ensayo confirmatorio y el ensayo de mezcla en las muestras con detección positivo existían dos posibilidades: a) TEST CONFIRMATORIO mayor al punto de corte y CORRECCIÓN en ensayo de mezcla: **en ausencia de otra alteración de la coagulación, 33/196 por vía del APTT y 28/196 con el test de Russell se consideraron positivos para IL a pesar de que en todas las muestras el ensayo de mezclas corregía (ICA menor que el punto de corte).** Los 61 pacientes presentaron razones próximas a los puntos de corte: razón normalizada Russell 1.27 (rango: 1,22-1.32) y

razón normalizada SCT 1.36 (rango: 1.32-1,41) y b) TEST CONFIRMATORIO mayor al punto de corte y NO CORRECCIÓN en ensayo de mezcla (ICA : rango 11-48 %), por lo que se consideraron positivos para IL 123/196 por vía del APTT y 96/196 con el ensayo de Russell. De los 61 pacientes que no corrigieron, 14 presentaron TVP, 17 patología obstétrica, 12 tenían enfermedades autoinmunes, 3 accidente cerebrovascular y sólo 15 fueron hallazgos del laboratorio.

CONCLUSIÓN: existen pacientes que desarrollan un anticuerpo que, *in vitro*, tiene un efecto débil que desaparece, por efecto de dilución, al mezclarlo con plasma normal, lo cual hace que se interprete según el algoritmo tradicional como negativo. Sin embargo estos anticuerpos son persistentes, 34/61 (55,7 %) presentaron manifestaciones clínicas que determinaron el diagnóstico de síndrome antifosfolípido.

Abstract

The diagnosis of lupus anticoagulant (IL) according to the classical algorithm (ISTH) is prolongation of some of the screening tests (Russell or APTT sensitive), the non-correction of the mixing test and the shortening of the elongated test times in presence of high concentration of phospholipids. The guide of the British Hematology Society (BSH) suggests that, in the absence of other coagulation abnormalities, if a sample is positive screen and confirmatory test although the tests of mixtures are negative, should be considered positive for IL. The CLSI guide suggests performing the tests in the following order screen-confirm-mix; recommends that the mixing test be carried out only when the first two do not have a clear result and if other abnormalities are suspected. The objective is to compare the final diagnosis for lupus anticoagulant (IL) applying the BSH/CLSI guidelines vs the classical algorithm (ISTH).

POPULATION: 196 samples of positive lupus inhibitor by BSH and CLSI referred to our laboratory between March 2015 and May 2017.

METHODS: a sensitive APTT assay containing microtonized silica was used as activator (SCT screen and confirm) and the diluted and concentrated Russell viper venom test (VVRT screen and confirm).

RESULTS: analysis with ISTH algorithm: samples with positive screening 33/196 by APTT and

28/196 by Russell corrected the mixing assay, no confirmatory test was performed and they were considered negative for lupus inhibitor.

ANALYSIS WITH THE BSH / CLSI ALGORITHM: positive confirmatory test, correction in the assay of mixtures and absence of another alteration of coagulation in 33/196 via the APTT and 28/196 with the Russell test and were considered positive for IL, positive confirmatory test and no correction in the mixture test 123/196 by the APTT and 96/196 by the Russell. There are 61/196 that would be positive for the BSH / CLSI Guidelines and negative for ISTH with a normalized Russell ratio 1.27 (range: 1.22-1.32) and normalize ratio SCT 1.36 (range: 1.32-1.41). Of the 61 patients, 14 had DVT, 17 obstetric pathology, 12 had autoimmune diseases, 3 presented cerebrovascular accidents and only 15 were laboratory findings.

CONCLUSION: there are patients who develop an antibody that, *in vitro*, has a weak effect that disappears by dilution effect when mixed with normal plasma, which causes it to be interpreted according to the traditional algorithm as negative. However, these antibodies are persistent, 34/61 (55.7%) presented clinical manifestations that determined the diagnosis of anti-phospholipid syndrome.

Introducción

El diagnóstico de inhibidor lúpico (IL) está basado en la realización de una sucesión de pruebas que incluyen una etapa de detección, los ensayos de mezclas y una etapa de confirmación que demuestran la dependencia de los anticuerpos presentes de fosfolípidos^(1,2). Sin embargo, la heterogeneidad de los anticuerpos presentes en los distintos pacientes, la variabilidad en la sensibilidad de reactivos y coagulómetros, las diferentes estrategias de interpretación y la ausencia de métodos de referencia impiden que haya un diagnóstico inequívoco de esta alteración.

En los últimos años se han publicado numerosas guías para estandarizar y mejorar el diagnóstico del IL. La Sociedad Internacional de Hemostasia y Trombosis ha actualizado sus guías en el año 2009 (ISTH 2009)⁽³⁾, la Sociedad Británica de Hematología lo ha revisado en el año 2012 (BSH 2012)⁽⁴⁾ y en el año 2014 el Instituto de Estándares para la Clínica y el Laboratorio ha formulado su primera guía para el diagnóstico del IL (CLSI 2014)⁽⁵⁾.

La **Tabla 1** muestra las sugerencias de las diferentes guías.

Tabla 1. Recomendaciones de las diferentes guías para el diagnóstico de inhibidor lúpico⁽³⁻⁵⁾.

	ISTH 2009	BCSH 2012	CLSI 2014
V preanalítica	Doble centrifugación Plaq < 10x10 ⁹ /L No estudiar muestras con heparina, DOACS o AVK INR > 3	Doble centrifugación Plaq < 10x10 ⁹ /L No estudiar muestras con heparina, DOACS o AVK INR > 3	Doble centrifugación Plaq < 10x10 ⁹ /L No estudiar muestras con heparina, DOACS o AVK INR > 3
Ensayos	APTT y dRVVT	dRVVT más APTT u otros	dRVVT más APTT u otros
Orden de los ensayos	Screen-mezcla-confirmatorio	Screen-mezcla-confirmatorio (sugiere hacer confirmatorio si la mezcla da que corrige)	Screen-mezcla-confirmatorio-mezcla
Cutoffs IRef	99th percentil	97,5th percentil	97,5th percentil
Cálculos	% corrección Razón normalizada (NPP)	% corrección Razón normalizada (NPP)	% corrección Razón normalizada (IR)
Ensayos de mezclas	1 vol PP + 1 vol PN Interpretación con ICA o <i>cutt off</i> de la mezcla	1 vol PP + 1 vol PN Interpretación con ICA o <i>cutt off</i> de la mezcla	1 vol PP + 1 vol PN Interpretación con ICA o <i>cutt off</i> de la mezcla
Reporte final	Recomendado	Recomendado	Recomendado

Las tres coinciden en que: a) debe utilizarse plasma citratado doblemente centrifugado para lograr un número de plaquetas menor a 10 x10⁹/L; b) se deben realizar las pruebas globales tiempo de protrombina (TP), tiempo de tromboplastina parcial activado (APTT) y tiempo de trombina (TT) para excluir coagulopatías o detectar si el paciente está anticoagulado; c) se debe realizar más de un ensayo de detección para establecer que el IL es negativo, ISTH 2009 sugiere un APTT sensible a fosfolípidos y el tiempo de veneno de víbora Russell diluido (dVVRT) mientras que la BSH 2012 y la CLSI 2014 aceptan además de APTT sensible a fosfolípidos y dVVRT otros ensayos; d) se debe realizar un ensayo confirmatorio que permita ver la dependencia de fosfolípidos de los anticuerpos presentes; e) todas las guías sugieren que los puntos de corte deben establecerse localmente, pero difieren en el modo: la

guía ISHT 2009 sugiere utilizar el percentil 99 de la población normal mientras que la BSH 2012 y CLSI 2014 establecen el percentil 97 (si es una distribución Gaussiana); f) se debe colocar al final del ensayo un comentario de interpretación de los resultados acerca de que si el IL es positivo o negativo y las tres guías sugieren repetir la prueba a las 12 semanas.

La mayor discrepancia entre las guías es en el orden en que realizan los ensayos de mezcla. Las tres guías coinciden en que la mezcla debe ser una parte de plasma del paciente con una parte de plasma normal y para evaluar los resultados sugieren el índice de anticoagulante circulante descrito por Rosner en 1987(ICA)⁽⁶⁾, definido por la ecuación $ICA = 100 \times ((\text{Screen (PN+PP)}(\text{seg}) - \text{Screen PN}(\text{seg}))/\text{Screen PP}(\text{seg}))$. Otra forma sugerida para evaluar los resultados del ensayo de mezcla es utilizar un valor de referencia para el tiempo de coagulación de las mez-

clas expresado en segundos o un tiempo de coagulación de referencia normalizado para las mezclas. No obstante, ninguna ecuación matemática aplicada al ensayo de mezclas puede discriminar perfectamente entre las deficiencias de factores y la presencia de inhibidores; por otro lado hay que tener en cuenta que los puntos de corte varían entre los diferentes ensayos y reactivos^(7,8).

La ISTH 2009 sugiere realizar el ensayo de mezcla ante un ensayo de detección prolongado. Está implícito que sólo realiza el ensayo confirmatorio si el ensayo de mezcla es prolongado⁽⁸⁾. La guía BSH 2012 indica que los ensayos de mezcla mejoran la especificidad pero introduce el concepto de que puede haber inhibidores a baja concentración cuyo efecto puede desaparecer al mezclar el plasma del paciente con el plasma normal; también sugiere que, en ausencia de otras anomalías, las muestras con ensayos de mezclas negativos pero ensayos de detección y confirmatorios positivos deben considerarse positivas para IL⁽⁴⁾. La guía CLSI 2014 cambió el orden de las pruebas y sugiere hacer ensayo de detección y, si da prolongado, ensayo confirmatorio y de mezcla. Incluso hasta sugiere omitir el ensayo de mezcla si hay ausencia de otras alteraciones de la coagulación⁽⁵⁾.

Al día de hoy existe un gran debate acerca de la utilidad del ensayo de mezclas y son numerosos los grupos que sugieren eliminar este ensayo por completo⁽⁹⁻¹³⁾.

El objetivo de este trabajo es evaluar en forma retrospectiva el conjunto de datos de 196 estudios considerados positivos en dos muestras independientes separadas por doce semanas para inhibidor lúpico aplicando las guías BSH/CLSI vs el algoritmo tradicional (ISTH).

Materias y métodos

Población: 196 muestras de inhibidor lúpico positivo de acuerdo a las guías BSH y CLSI, consecutivas en dos muestras independientes separadas 12 semanas, que ingresaron al laboratorio del Servicio de Hematología del Hospital Británico entre marzo 2015 y mayo 2017. Ningún paciente estaba anticoagulado al momento del diagnóstico de inhibidor lúpico. En los pacientes que había sufrido una trombosis venosa o habían presentado problemas obstétricos el estudio se realizó al menos 3 meses posteriores al evento agudo.

Métodos

Variable pre analíticas. Se extrajo sangre en citrato 3,2 % relación 1+9; se centrifugó dos veces a 3000 g por 10 minutos y los ensayos que se señalan a continuación fueron realizadas antes de 4 hs de extraída la sangre.

Variables analíticas. Tiempo de protrombina (TP) tromboplastina de cerebro de conejo (PT-Fibrinogen HS Plus, Instrumentation Laboratory), tiempo de tromboplastina parcial activado (APTT-SP Instrumentation Laboratory) y tiempo de trombina (thrombin time, Instrumentation Laboratory) como estudio basal.

Dos pruebas de detección: SCT-screen y dRVVT screen (Silica clotting time y dVVRT screen Instrumentation Laboratory)

Ensayos de mezcla con *pool* de plasma normal (1 vol de PP + 1 vol PN) para ver si corrige. Preparación del *pool* normal: se mezclan plasmas, procesados en iguales condiciones que los pacientes, de 20 individuos normales y se conservan alicuotados a -80°C.

Se consideró no corrección si ICA > 11% (para APTT y SCT) e ICA > 12 % para el Russell.

Criterio con el tiempo de coagulación (TC): no corrección cuando el valor obtenido de la mezcla expresada en segundos es mayor que el percentil 99 del tiempo de coagulación de 60 mezclas preparadas con volúmenes iguales con plasma de individuos normales y *pool* normal. Percentil 99 TC = 36 seg para el SCT y 34 seg para el Russell.

Pruebas confirmatorias dependientes de fosfolípidos: ensayos confirmatorios para SCT y dRVVT.

Se consideró positivo una razón normalizada SCT *confirm* >1,3 y una razón normalizada dRVVT >1,20 para el Russell *confirm*. Para las razones se utiliza la media geométrica normal del valor de referencia calculado en 60 normales.

El ajuste de los puntos de corte se realizó localmente y se confirmó por lote de reactivo. Todos los ensayos fueron realizados en un coagulómetro automatizado con detección foto óptica (ACL TOP 500, Instrumentation Laboratory).

Post Analítica: exclusión de otras coagulopatías. Confirmación del resultado en dos muestras independientes separadas 12 semanas, para considerar la prueba de inhibidor lúpico positivo.

Resultados

El 68% de los pacientes estudiados fueron mujeres, entre 21-68 años de edad. En el grupo femenino la mayor causa de solicitudes fue por problemas obstétricos, mientras que en los hombres por haber tenido

una TVP (**Figura 1**). El tiempo de protrombina 83% (72-113, mediana y rango) y el tiempo de trombina 17 seg (14-21) fueron normales en todos los pacientes.

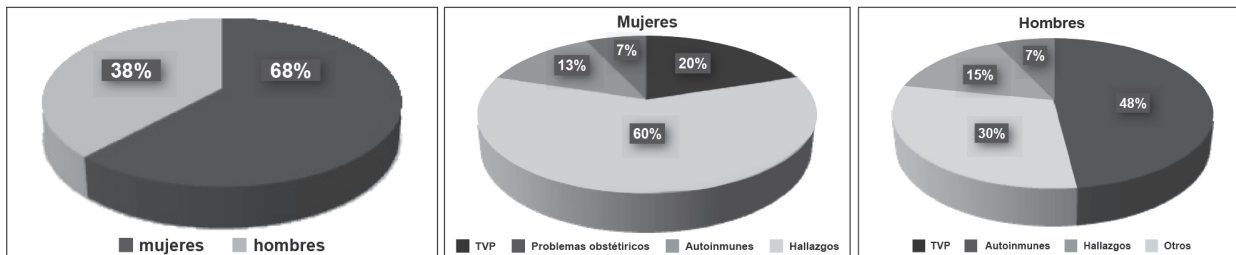


Figura 1. Causas por las cuales se solicitó el estudio de inhibidor lúpico.

La **Figura 2 A** muestra los resultados obtenidos interpretados con el algoritmo de la ISTH 2009 mien-

tras que en la **Figura 2B** se muestran los resultados siguiendo las guías BSH 2012 y CLSI 2014.

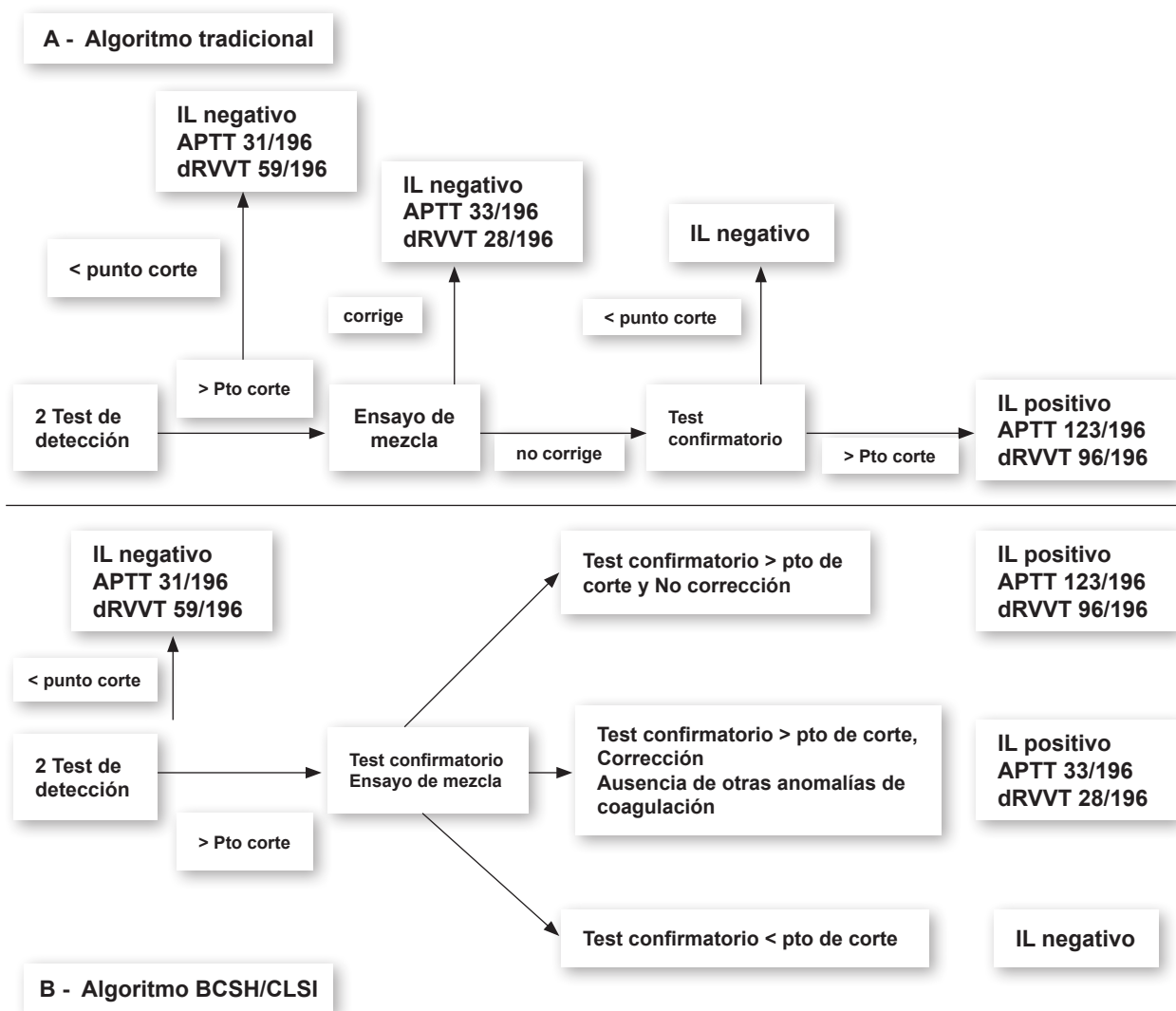


Figura 2. A) Resultados cuando las muestras se procesan por el algoritmo ISTH 2009 y B) resultados cuando las muestras se procesan por el algoritmo BSH2012 y CLSI 2014⁽³⁻⁵⁾.

Del análisis de los resultados se puede observar que 123 pacientes por la vía del APTT y 96 por la vía de Russell fueron diagnosticados como positivos por los tres algoritmos. Sin embargo 61/196 eran positivos por la BSH 2012 y la CLSI 2014 pero negativos por la guía ISHT 2009, ya que corregían en la prueba de mezcla y no se les realizaba el ensayo confirmatorio. La corrección se daba utilizando como criterio de corte con el ICA (ICA SCT *screen* = 18 % (12- 58 %) y ICA dVVRT= 18% (13- 39 %) como utilizando el TC de la mezclas TC SCT *screen* = 48 seg (34-79) y TC dVVRT = 38 seg (35-58).

Análisis de los resultados de los 61 pacientes con resultados discordantes

De los 61 pacientes que diferían, 33/61 fue por la vía del Russell y 28/61 por la vía del APTT.

La razones normalizadas para el ensayo con veneno de víbora Russell fue de 1,27 (rango 1,22-1,32), siendo el valor de corte de 1,20. Las razones normalizadas para el ensayo de *silica clotting time* fue de 1,36 (1,32-1,41) con un valor de corte: 1,31. Se puede observar que las razones obtenidas fueron ligeramente superiores al valor de corte para ambas pruebas, Russell y APTT, pero, sin embargo, repitieron cuando fueron estudiados a las doce semanas. Anticuerpos anticardiolipinas con títulos mayores a 40 UGPL/mL fueron encontrados en 47/61 pacientes. Los anticuerpos anti beta 2 glicoproteína mayores al percentil 99 de la población normal se encontraron en 32/61. Un solo paciente de los 61 estudiados no tuvo anticuerpos detectables por enzimoinmunoensayo.

Presentación clínica 61 pacientes con resultados discordantes

De los 61 pacientes que corrigieron, 14 presentaron trombosis venosa profunda en miembros inferiores confirmada por ecodoppler, 17 mujeres presentaron patología obstétrica (12 abortos del primer trimestre en más de dos ocasiones, 3 otros problemas obstétricos y 2 preeclampsia), 12 tenían enfermedades autoinmunes, 3 accidente cerebrovascular y sólo 15 fueron hallazgos del laboratorio en ensayos pre quirúrgicos. (**Figura 3**). Los 14 pacientes con TVP fueron estudiados nuevamente entre 6 y 12 meses: 8 mantuvieron la positividad por la guía BSH y CLSI, 2 fueron positivos por las tres guías y 4 fueron negativos.

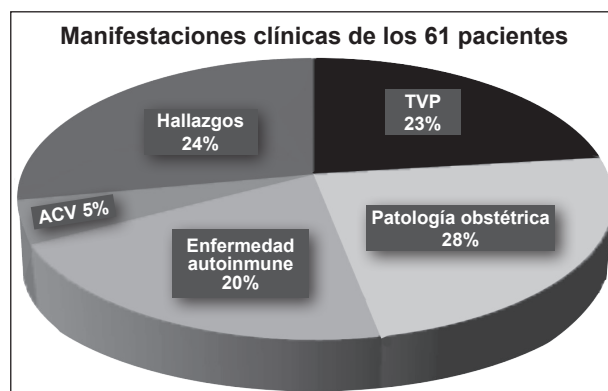


Figura 3. Manifestaciones clínicas de los 61 pacientes con resultados discordantes.

De las 17 pacientes con patología obstétrica, 11 fueron evaluadas nuevamente entre 6 y 12 meses después: 8/11 mantuvieron la positividad por la guía BSH y CLSI y siguieron siendo negativas por ISTH 2009 y 3/11 fueron negativas. Los 6 restantes no pudieron ser re evaluadas.

De los 15 pacientes que fueron hallazgos, sólo 5 fueron re evaluados entre 6 y 12 meses después, 3 mantuvieron la positividad por las guías BSH y CLSI, 1 negativizó y el paciente restante fue positivo por las tres guías. De estos 5 pacientes, ninguno tuvo manifestación clínica de trombosis.

Conclusión

Los resultados muestran que, de acuerdo al algoritmo que se utilice, el diagnóstico de inhibidor lúpico es diferente con el mismo conjunto de ensayos realizados en los pacientes. Este hecho tiene implicancias clínicas, ya que en el 55,7 % de los 61 pacientes, que eran negativos según la guía ISTH 2009, tuvieron criterios clínicos de síndrome antifosfolípido. **Sólo 15 fueron hallazgos del laboratorio en estudios pre quirúrgicos y 12 tenían una enfermedad autoinmune.** La discrepancia en los resultados se da cuando no se realiza el ensayo confirmatorio si el ensayo de mezclas es negativo, es decir corrige.

Hoy día existe una gran controversia acerca de la utilidad de los ensayos de mezclas⁽⁹⁻¹³⁾. Los que están a favor de la realización del ensayo de mezclas sostienen que al no realizarlo el laboratorio podría no informar positivo un IL positivo fuerte que prolongue tanto el ensayo de detección como el ensayo confirmatorio. Este hecho fue demostrado por algunos programas externos de calidad donde los laboratorios que no realizaron ensayos de mez-

clas informaron negativos inhibidores lúpicos de alta concentración. Los detractores del ensayo de mezclas, en cambio, señalan el hecho de que este requerimiento complica realizar el diagnóstico de IL, agrega pasos adicionales al proceso y genera la necesidad de preparar un *pool* de plasmas normales apropiado para realizar el ensayo.

Al día de hoy, no **sólo** no hay consenso acerca de realizar el ensayo de mezclas, sino que tampoco hay acuerdo acerca de con qué criterio se lo debe evaluar para establecer la corrección o no del ensayo de mezclas^(7,9,14). Algunos autores sugieren la utilización del ICA mientras que otros sugieren usar el valor de referencia del percentil 99 del TC de la mezcla entre *pool* normal y plasma de individuos normales⁽⁷⁾. Otros trabajos muestran que tiene mayor sensibilidad utilizar el ICA para el APTT y el TC para el ensayo de Russell⁽¹⁵⁾. En este pequeño grupo de pacientes no vimos diferencia entre usar el ICA o el TC como criterio de corrección de la mezcla.

Además de lo señalado se ha demostrado recientemente que los puntos de corte de los diferentes ensayos, detección, mezcla y confirmatorio dependen fuertemente de los reactivos y de los métodos de detección del coágulo utilizado, razón por la cual cada vez es más importante establecer los valores de punto de corte en cada laboratorio⁽¹⁶⁾.

Los resultados hallados en este trabajo muestran que existen pacientes que desarrollan un anticuerpo que, *in vitro*, tiene un efecto débil que desaparece por un efecto de dilución al mezclarlo con plasma normal. Es decir que corrige en el ensayo de mezclas, lo cual hace que se interprete, según la guía de la ISTH 2009, como negativo. Una de las limitaciones de este estudio es que, si bien se confirmó en 61 pacientes la persistencia del inhibidor lúpico en una segunda muestra tomada a las doce semanas, no todos tuvieron un seguimiento de al menos un año para demostrar la persistencia de estos inhibidores que *in vitro* tienen un efecto débil.

Debido a la trascendencia clínica que tiene el diagnóstico de inhibidor lúpico, creemos que se deben realizar siempre los tres ensayos, detección, mezcla y confirmatorio y analizar cada paciente en particular, excluyendo la existencia de alguna otra coagulopatía y la presencia de anticoagulantes para establecer si el inhibidor lúpico es negativo o positivo.

Declaración de conflictos de interés:

La Dra. Cristina Duboscq es asesora científica de la firma WM Argentina para los productos Instrumentation Laboratory. El resto de los autores manifiesta no tener conflictos de interés.

Bibliografía

1. Adams M. Measurement of lupus anticoagulants: an update on quality in laboratory testing. *Semin Thromb Hemost.* 2013;39 (3):267-71.
2. Devreese KM. Antiphospholipid antibody testing and standardization. *Int J Lab Hematol.* 2014; 36(3):352-63.
3. 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. Subcommittee on Lupus Anticoagulant/Antiphospholipid Antibody of the Scientific and Standardisation Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *J Thromb Haemost.* 2009;7 (10):1737-40.
4. 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.
5. CLSI. Laboratory Testing for the Lupus Anticoagulant; Approved Guideline. CLSI document H60-A Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute;2014.
6. Rosner E, Pazner R, Lusky A, Modan M, Many A. Detection and quantitative evaluation of lupus circulating anticoagulant activity. *Thromb Haemost.* 1987;57 (2):144-7.
7. Moore GW, Culhane AP, Daw CR, Noronha CP, Kumano O. Mixing test specific cut-off is more sensitive at detecting lupus anticoagulants than index of circulating anticoagulant. *Thromb Res.* 2016;139:98-101.

8. Kumano O, Leko M, Naito S et al. Index of circulating anticoagulant cut-off value establishment in activated partial thromboplastin time mixing test for lupus anticoagulant diagnosis. *J Thromb Haemost.* 2013;11(10):1919-1922.
9. Moore GW, Savidge GF. The dilution effect of equal volume mixing studies compromises confirmation of inhibition by lupus anticoagulants even when mixture specific reference ranges are applied. *Thromb Res.* 2006;118(4):523-8.
10. Tripodi A. To mix or not to mix in lupus anticoagulant testing? That is the question. *Semin Thromb Hemost.* 2012;38(4):385-9.
11. Kershaw G, Orellana D. Mixing tests: diagnostic aides in the investigation of prolonged prothrombin times and activated partial thromboplastin times. *Semin Thromb Hemost.* 2013;39(3):283-90.
12. Favaloro EJ, Bonar R, Zebeljan D, Kershaw G, Marsden K. Laboratory investigation of lupus anticoagulants: mixing studies are sometimes required. *J Thromb Haemost.* 2010 Dec;8(12):2828-31.
13. Aboud M, Roddie C, Ward C, Coyle L. To mix with pooled normal plasma or not to mix: a comparative study of 2 approaches for assessing lupus anticoagulant inhibitory activity in the dilute Russell viper venom method. *Clin Chem.* 2007;53 (1):143-5.
14. Depreter B, Devreese KM. Differences in lupus anticoagulant final conclusion through clotting time or Rosner index for mixing test interpretation. *Clin Chem Lab Med.* 2016;54(9):1511-6.
15. Martinuzzo ME, Cerrato GS, Varela ML, Adamczuk YP, Forastiero RR. New guidelines for lupus anticoagulant: sensitivity and specificity of cut-off values calculated with plasmas from healthy controls in mixing and confirmatory tests. *Int J Lab Hematol.* 2012;34(2):208-13.
16. Tripodi A, Chantarangkul V, Cini M, Devreese K, Dlott JS, Giacomello R, Gray E, Legnani C, Martinuzzo ME, Pradella P, Siegemund A, Subramanian S, Suchon P, Testa S. Variability of cut-off values for the detection of lupus anticoagulants: results of an international multicenter multiplatform study. *J Thromb Haemost.* 2017 Jun;15(6):1180-1190.