

**Aplicación**

Inmunoensayo quimioluminiscente totalmente automatizado para la determinación cuantitativa de Dimer-D en plasma humano citratado en el sistema ACL AcuStar<sup>®</sup> como ayuda en el diagnóstico del tromboembolismo venoso (TEV) trombosis venosa profunda (TVP) y embolismo pulmonar (EP).

**Sumario y principio**

Los fragmentos de Dimer-D se encuentran en los derivados solubles surgidos tras la degradación por plasmina de la fibrina entrelazada por el factor XIIIa (XDP)<sup>1</sup>. La plasmina es una serinoproteasa que en ausencia de inhibidores digiere la fibrina entrelazada y genera una serie de derivados solubles cuyo peso molecular depende de la extensión de la digestión. Estos productos solubles de la degradación de la fibrina entrelazada contienen un neoantígeno (dominio Dimer-D) que no está presente en la molécula original del fibrinógeno, en sus productos de degradación o en la fibrina soluble<sup>2,3</sup>. La determinación de los niveles de Dimer-D es una herramienta cada vez más utilizada para el diagnóstico de trombosis y para la monitorización de las terapias trombolíticas<sup>4</sup>. Ejemplos de condiciones clínicas que elevan los niveles de Dimer-D en plasma son la trombosis venosa profunda (TVP), el embolismo pulmonar (EP) y la coagulación intravascular diseminada (CID)<sup>5</sup>. Los niveles de Dimer-D también se incrementan durante un embarazo normal, si bien unos valores extremadamente elevados se asocian con complicaciones<sup>6</sup>.

Se ha demostrado que un resultado negativo de Dimer-D, combinado con una valoración clínica de probabilidad baja, tiene un elevado valor predictivo negativo en los casos de TVP o EP<sup>7,8</sup>.

El ensayo HemosIL AcuStar D-Dimer es un inmunoensayo de dos pasos para cuantificar el Dimer-D en plasma humano citratado, que utiliza partículas magnéticas como fase sólida y un sistema de detección quimioluminiscente. En el primer paso se mezclan la muestra, partículas magnéticas recubiertas con anticuerpos contra el Dimer-D y tampón de ensayo. Derivados solubles de fibrina que contienen el dominio Dimer-D presentes en la muestra se unen a las partículas recubiertas. Tras una separación magnética y lavado, se añade un anticuerpo anti-XDP marcado con Isoluminol y se incuban en un segundo paso. Después de una nueva separación magnética y un lavado, se añaden dos inductores a las partículas lavadas y la reacción quimioluminiscente resultante se mide con el sistema óptico del ACL AcuStar en unidades relativas de luz (RLU). Las RLU son directamente proporcionales a la concentración de Dimer-D que contiene la muestra. El ensayo ACL AcuStar D-Dimer utiliza un método de reducción de datos con una curva logística de 4 parámetros (4PLC) para generar una Curva Maestra. La Curva Maestra se encuentra predefinida y depende del lote, y se almacena en el instrumento a través del código de barras del cartucho. Con la medición de los calibradores, la Curva Maestra predefinida se transforma en una nueva curva de 4PLC, la de Trabajo, específica para el instrumento. Los valores de concentración de los calibradores se incluyen en los códigos de barras de los tubos de plástico de los calibradores.

**Composición**

El kit de AcuStar D-Dimer está formado por:

**R** D-Dimer Cartridge para 100 determinaciones (nº de cat. 0009802001):

1 cartucho que contiene 1 vial de una suspensión de partículas magnéticas recubiertas con un anticuerpo monoclonal de ratón (MA-83C) contra el dominio Dimer-D, 1 vial de tampón del ensayo, 1 vial de trazador formado por un anticuerpo monoclonal de ratón anti-XDP marcado con Isoluminol, y 1 vial de diluyente de muestras que se utiliza para la dilución automática en la función "run". Los reactivos están en una solución de tampón isotónico que contiene albúmina de suero bovino, IgG monoclonal de ratón, estabilizadores y conservantes.

**C1** D-Dimer Calibrator 1 (nº de cat. 0009802002): 1 vial x 1 mL de una solución liofilizada de Dimer-D parcialmente purificado a partir de fibrina humana digerida con plasmina humana, que contiene albúmina de suero bovino, tampón, estabilizadores y conservantes.

**C2** D-Dimer Calibrator 2 (nº de cat. 0009802002): 1 tubo de plástico con código de barras para el calibrador 1 de Dimer-D.

**C3** D-Dimer Calibrator 2 (nº de cat. 0009802003): 1 vial x 1 mL de una solución liofilizada de Dimer-D parcialmente purificado a partir de fibrina humana digerida con plasmina humana, que contiene albúmina de suero bovino, tampón, estabilizadores y conservantes.

**C4** D-Dimer Calibrator 2 (Cat. No. 0009802003): 1 tubo de plástico con código de barras para el calibrador 2 de Dimer-D.

Los calibradores son específicos del lote y no pueden usarse con otros lotes de reactivos.

**PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS:**

El material de origen humano utilizado en este producto ha sido analizado por métodos aprobados por la FDA y se ha encontrado negativo para el antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg) y para anticuerpos anti-HCV y HIV 1/2. Manejarlo con precaución como si fuese potencialmente infeccioso<sup>9</sup>.

Todos los reactivos contienen menos del 0,1% de azida sódica, que puede formar azidas explosivas en contacto con tuberías de metal. Utilizar procedimientos adecuados para su desecho.

Indicaciones de Peligro: **Ninguna**

Frasas de Peligro: **Ninguna**

Frasas de Seguridad: **Ninguna**

Este producto es sólo para el diagnóstico *in vitro*.

**Preparación**

**Cartucho D-Dimer:** Las micropartículas sedimentan durante el envío y el almacenamiento, por lo que se deben mezclar para conseguir su resuspensión.

- Cuando se mezcle el cartucho por primera vez, debe invertirse suavemente 30 veces, evitando que se forme espuma.
- Asegúrese de que las micropartículas estén totalmente resuspendidas. Si no lo están, continuar invirtiendo el cartucho hasta que se resuspendan completamente.

- Si las micropartículas no se resuspenden completamente, NO UTILIZAR EL CARTUCHO.
- Una vez que las micropartículas se han resuspendido, colocar el cartucho sobre una superficie sólida y sacar con cuidado la lengüeta roja de seguridad del cartucho.
- Manteniendo el cartucho sobre la superficie sólida, presionar las dos pestañas situadas en el lateral de la tapa perforadora (parte gris) y presionar la parte superior del cartucho hasta que quede en posición de bloqueo. Una vez en la posición de bloqueo, las pestañas no deben ser visibles. No invertir el cartucho abierto.
- Una vez colocado en el instrumento, el cartucho es sometido a una agitación adicional periódica.



**Calibradores 1 y 2 D-Dimer:** Disolver el contenido de cada uno de los viales con 1 mL de agua de tipo CLSI (anteriormente NCCLS) CLRW o equivalente<sup>10</sup>. Tapar el vial y homogeneizar suavemente. Asegurarse de la completa disolución del producto. Mantener los calibradores a una temperatura de 15-25°C durante 30 minutos y mezclarlos por inversión antes de utilizarlos. No deben agitarse.

Una vez resuspendido, volver todo el contenido del vial de calibrador dentro del tubo de plástico vacío con la etiqueta de código de barras adecuada para utilizar en el sistema ACL AcuStar. Evitar la formación de espuma.

**Conservación y estabilidad de los reactivos**

Los reactivos y calibradores que no hayan sido abiertos son estables hasta la fecha de caducidad indicada en las etiquetas del cartucho y de los tubos, si se conservan a 2-8°C.

D-Dimer Cartridge - Estabilidad tras apertura, en el instrumento ACL AcuStar: 2 meses.

D-Dimer Calibrator 1 & 2 - Estabilidad tras la reconstitución, en el instrumento ACL AcuStar: 3,5 horas.

Para una estabilidad óptima, retirar los calibradores del sistema y conservarlos a 2-8°C en los tubos de plástico con código de barras y tapón.

**Método de ensayo**

Consultar el Manual del Usuario correspondiente del ACL AcuStar, donde se encuentran todas las instrucciones del ensayo.

**Recolección y preparación de las muestras**

Recoger nuevo par de sangre venosa recién extraída en una parte de anticoagulante citrato trisódico. Para obtener más información sobre recolección, manejo y conservación de muestras, consultar el documento H21-A5 del CLSI<sup>11</sup>.

Las muestras congeladas se deben descongelar rápidamente a 37°C. El ensayo se debe llevar a cabo en un plazo de 2 horas tras la descongelación.

Centrifugar las muestras que contengan partículas visibles antes de realizar el ensayo.

**Reactivos adicionales y plasmas de control**

Los siguientes reactivos no se incluyen en el kit y deben adquirirse por separado.

AcuStar D-Dimer Controls Nº de cat. 0009802100

**Control de calidad**

Se recomiendan tres niveles de control para realizar un programa completo de control de calidad<sup>12</sup>. Los controles AcuStar D-Dimer bajo, alto y muy alto se han elaborado para dicho programa. Cada laboratorio debería establecer su propio promedio y su desviación estándar, además de implantar un programa de control de calidad para supervisar los ensayos del laboratorio. Los controles deben analizarse como mínimo una vez en cada turno de 8 horas de acuerdo con las buenas prácticas de laboratorio. Consultar el Manual del Usuario del instrumento si se desea más información. Consultar la publicación de Westgard et al. para la identificación y resolución de situaciones anormales del control de calidad<sup>13</sup>.

**Trazabilidad de los calibradores y controles**

Los valores indicados se establecieron mediante múltiples determinaciones con el sistema ACL AcuStar utilizando lotes específicos de reactivos y se compararon con un estándar interno.

Dado que actualmente no se dispone de un estándar internacional de Dimer-D, el valor de este estándar interno se ha asignado de acuerdo con los criterios de armonización propuestos por W. Niewolna-Zimianin<sup>14,15</sup> y P. Molje<sup>16</sup>.

**Resultados**

Los resultados de Dimer-D se expresan en ng/mL, que corresponden a ng/mL de Unidades Equivalentes de Fibrinógeno (UEF).

Consultar el Manual del Usuario del ACL AcuStar si se desea más información.

**Limitaciones/sustancias interferentes**

Los resultados de Dimer-D en el ACL AcuStar no son afectados por la hemoglobina hasta 500 mg/dL, por la bilirrubina hasta 18 mg/dL, por los triglicéridos hasta 1250 mg/dL, por la heparina (de bajo peso molecular y no fraccionada) hasta 2 U/mL, y por el factor reumatoide hasta 450 U/mL.

Fibrinógeno: La concentración obtenida en un ensayo de dilución de un plasma citratado positivo en Dimer-D con un título de 2072 ng/mL no varía significativamente cuando la muestra positiva se diluye en plasma ampicobrido en Dimer-D o en diluyente de muestras.

Los resultados de Dimer-D en el ACL AcuStar no se ven afectados por un anticuerpo humano purificado anti-ratón (HAMA)<sup>17</sup> hasta 1 µg/mL. El ensayo ACL AcuStar D-Dimer contiene aditivos para evitar la interferencia de HAMA. Sin embargo, si los resultados de los ensayos son coherentes con otras observaciones clínicas, puede que se necesite más información para realizar un diagnóstico correcto. HemosIL AcuStar D-Dimer no ha sido evaluado para ser utilizado como una prueba para descartar TEV.

**Valores esperados**

Se llevó a cabo un estudio del rango de normalidad con 180 muestras de plasmas citratados de donantes de sangre adultos y sanos con reactivos y calibradores AcuStar D-Dimer. El valor umbral para clasificar una muestra como positiva de Dimer-D se estableció en el percentil 97,5.

Sistema	N	Límite superior del rango normal (ng/mL)
ACL AcuStar	180	830

Dado que son muchas las variables que pueden afectar a los resultados (incluyendo la edad de la población)<sup>18,19</sup>, cada laboratorio debería establecer su propio rango de normalidad. Los resultados del ensayo deberían utilizarse con otras informaciones, incluyendo el contexto clínico, para establecer un diagnóstico.

**Características técnicas****Precisión:**

Se evaluó la precisión intraserie y la total (serie a serie y día a día) en múltiples series.

ACL AcuStar	Media (ng/mL)	CV% (Intraserie)	CV% (Total)
Control bajo Dimer-D	234	4,0%	6,8%
Control alto Dimer-D	841	2,3%	4,9%
Control muy alto Dimer-D	8467	2,5%	5,6%
Calibrador 1	358	2,7%	5,4%

**Correlación:**

Sistema	N	Pendiente	Intersección	r	Método de referencia
ACL AcuStar	179	1,16	-247	0,888	Test ELISA

En un estudio clínico comparando este kit de Dimer-D con el kit HemosIL D-Dimer HS en un ACL TOP se evaluaron muestras de 102 pacientes (5 con TVP, 7 EP, 2 TVP y EP, y 98 con diferentes enfermedades). La correlación (r) del ACL AcuStar fue 0,895.

Se realizó un estudio clínico adicional comparando este kit de Dimer-D con un test de ELISA comercial aprobado por la FDA en el cual se evaluaron muestras de 100 pacientes (76 normales, 9 con TVP y 5 con EP). La correlación (r) del ACL AcuStar fue 0,986.

En todos las muestras de pacientes con diagnóstico clínico de CID, EP y TVP se detectaron niveles anormales de Dimer-D.

Los resultados de precisión, correlación y comportamiento clínico se obtuvieron utilizando lotes concretos de reactivos y controles.

**Comportamiento clínico**

Se llevó a cabo un estudio de gestión de pacientes con 344 plasmas citratados congelados de pacientes ingresados de forma consecutiva en una unidad de emergencia con sospecha de padecer EP o TVP (frecuencia de enfermedad tromboembólica vascular: 28,2%). De las 344 muestras, 97 se confirmaron como positivas para TEV (64 para EP y 33 para TVP) mediante pruebas objetivas estándares y las 247 restantes se confirmaron como negativas.

Los resultados que se resumen a continuación se basan en un valor umbral de 500 ng/mL.

Sistema	N	Sensibilidad (95% IC)	Especificidad (95% IC)	VPN (95% IC)
ACL AcuStar	344	100% (96,3%-100,0%)	55,5% (40,0%-61,8%)	100,0% (97,3%-100,0%)

**Límite de detección:**

Sistema	Linealidad:
ACL AcuStar	6,51 ng/mL
Sistema	Auto run desactivado
ACL AcuStar	Auto run activado
ACL AcuStar	54,3 - 74000 ng/mL
ACL AcuStar	54,3 - 1110000 ng/mL

Cuando la función "run" del instrumento está activada, éste lleva a cabo una dilución automática y corrige el resultado final con el factor de dilución (1/5), por lo que se expande el rango del ensayo a 1110000 ng/mL.

El ensayo no muestra efecto prozona. El protocolo de ensayo tiene un paso de lavado después de la incubación de la muestra, que evita el efecto prozona. Las muestras por encima de 74000 ng/mL que se probaron durante el estudio de linealidad y de comportamiento clínico superaron la función "run".