

Aplicación

Hemosil. D-Dimer HS 500 es un inmunoensayo de partículas de látex automatizado en los Sistemas de la familia ACL TOP[®] para la determinación cuantitativa de Dímero-D en plasma humano citratado. Su utilización conjunta con un modo de valoración clínica de la probabilidad pretest (PTP) permite la exclusión del diagnóstico de tromboembolismo venoso (TEV) en pacientes ambulatorios con sospecha clínica de trombosis venosa profunda (TVP) o tromboembolismo pulmonar (TEP).

Principio

La degradación por plasmina de la fibrina entrelazada por el Factor XIIIa, genera una serie de derivados solubles que contienen el dominio Dímero-D (XDP).¹ Cuando la plasmina, una serinoproteasa, quita libre de inhibidores, digiere la fibrina entrelazada generando una gran variedad de derivados solubles cuyos pesos moleculares dependen de la extensión de la digestión. Estos productos solubles de la degradación contienen un neoantígeno (dominio Dímero-D) que no está presente en la molécula original de fibrinógeno, en sus productos de degradación o en la fibrina soluble.^{2,3} La determinación de Dímero-D es una herramienta cada vez más utilizada para el diagnóstico de trombosis y para la monitorización de terapias trombolíticas.⁴ Ejemplos de condiciones clínicas que elevan el nivel de Dímero-D en plasma son la trombosis venosa profunda (TVP), el tromboembolismo pulmonar (TEP) y la coagulación intravascular diseminada (CID).⁵ Durante un embazo de desarrollo normal los niveles de Dímero-D se elevan aunque mucho menos que en aquellos embazos asociados a complicaciones.⁶

Un resultado negativo de Dímero-D, cuando se combina con una valoración clínica de baja probabilidad pretest, ha demostrado tener un alto valor predictivo negativo para TVP o TEP.⁷⁻¹¹ El Reactivo Látex es una suspensión de partículas de látex de poliestireno de tamaño uniforme, a las que se les ha unido el fragmento F(ab)₂ de un anticuerpo monoclonal altamente específico contra el dominio Dímero-D contenido en los derivados solubles de la fibrina. El uso del fragmento F(ab)₂ permite una detección más específica del Dímero-D evitando la interferencia de algunos factores endógenos como el Factor Haptoma. Cuando un plasma que contiene Dímero-D se mezcla con el Reactivo Látex y el Tampón de Reacción del kit Hemosil. D-Dimer HS 500, las partículas de látex aglutinan. El grado de aglutinación es directamente proporcional a la concentración de Dímero-D en la muestra y se determina midiendo el descenso de la luz transmitida causado por los agregados (inmunoensayo turbidimétrico).¹⁴

Composición

El kit Hemosil. D-Dimer HS 500 contiene:

- R** **Látex Reagent** (Núm. Cat. 0020500110): 3 viales x 4 mL de una suspensión de partículas de látex de poliestireno a las que se les ha unido el fragmento F(ab)₂ de un anticuerpo monoclonal (MA-8D3) específico contra el Dímero-D. Contiene albúmina de suero bovino, tampón, estabilizantes y conservante.
- B** **Reaction Buffer** (Núm. Cat. 0020500120): 3 viales x 6 mL de tampón Hepes que contiene albúmina de suero bovino, estabilizantes y conservante.
- C** **D-Dimer Calibrator** (Núm. Cat. 0020500130): 2 viales x 1 mL de una solución liofilizada de Dímero-D parcialmente purificado a partir de fibrina humana digerida con plasmina. Contiene albúmina de suero bovino, tampón, estabilizantes y conservante.

MEDIDAS DE PRECAUCIÓN Y ADVERTENCIAS:

El material de origen humano usado en este producto ha sido verificado por métodos aprobados por la FDA y encostrado no reactivo al Antígeno de Superficie de la Hepatitis B (HBsAg) y a los anticuerpos anti-HCV y anti-HIV 1/2. Manejar con precaución como si fuese potencialmente infeccioso.¹⁸

El Tampón de Reacción contiene azida sódica (< 0,1%) que puede reaccionar con las tuberías metálicas dando lugar a azidas altamente explosivas. Tomar las precauciones adecuadas para su desecho.

Clase de peligro: **ninguna**

Indicaciones de peligro: **ninguna**

Consejos de prudencia: **ninguno**

Este producto es para uso diagnóstico *in vitro*.

Preparación

Látex Reagent: Rotar el vial suavemente varias veces para mezclar bien el contenido del mismo antes de usarlo. No agitar fuertemente. Evitar la formación de espuma.

Reaction Buffer: Mezclar el vial suavemente varias veces. No agitar. Evitar la formación de espuma.

D-Dimer Calibrator: Disolver el contenido de cada vial con 1 mL de agua Tipo CLRW según CLSI (anteriormente NCCLS) o equivalente.¹⁸ Tapar el vial y homogeneizar suavemente. Asegurarse de la completa reconstitución del producto. Mantener el reactivo entre 15-25°C durante 30 minutos. Mezclar suavemente el vial por inversión antes de usarlo. No agitar. Evitar la formación de espuma.

Nota: Las burbujas formadas en la superficie de los líquidos pueden interferir con los sensores de nivel de líquido de los instrumentos.

Conservación y estabilidad de los reactivos

Los viales que no hayan sido abiertos y se hayan conservado a 2-8°C son estables hasta la fecha de caducidad indicada en el vial.

Látex Reagent - El reactivo una vez abierto es estable 1 mes a 2-8°C en el vial original o 7 días a 15°C en los sistemas de la familia ACL TOP.

Reaction Buffer - El reactivo una vez abierto es estable durante 1 mes a 2-8°C en el vial original o 7 días a 15°C en los sistemas de la familia ACL TOP.

NOTA: El Reactivo Látex y el Tampón de Reacción tienen las mismas características de estabilidad y deben utilizarse aparejados en los Sistemas de Coagulación de IL. Si se sustituye un vial, el otro componente (ya sea el Reactivo Látex o el Tampón de Reacción) debe ser también sustituido al mismo tiempo independientemente del contenido residual del mismo.

D-Dimer Calibrator - Estabilidad una vez reconstituido: 1 mes a 2-8°C, 3 días a 15-25°C, o 2 meses a -20°C en el vial original. El calibrador congelado debe descongelarse a 37°C y homogeneizarse suavemente antes de usarlo. No recongelar.

Para una óptima estabilidad, retirar los reactivos de los instrumentos y conservarlos a 2-8°C en el vial original bien tapado.



La baja humedad relativa se asocia a un aumento de la evaporación de los reactivos contenidos en viales no tapados, lo que puede reducir su estabilidad cuando se conservan en analizadores. Para obtener una estabilidad óptima en el analizador, la temperatura y la humedad del laboratorio deben estar controladas.

Método de ensayo

Las instrucciones completas del ensayo se encuentran en el correspondiente Manual del Usuario del Instrumento y/o en el Manual de Aplicaciones.

Recolección y preparación de las muestras

Recoger nueve partes de sangre recién extraída por punción venosa sobre una parte de anticoagulante citrato trisódico. Para la recolección, manejo y conservación del plasma seguir las recomendaciones del documento H21-A5 del CLSI.¹⁷

Si se han congelado las muestras, descongelarlas rápidamente a 37°C y centrifugarlas antes de analizarlas. Se debe realizar el ensayo de las mismas antes de transcurridas 2 horas de su descongelación y centrifugación.

Reactivos adicionales y plasmas de control

Los siguientes materiales no se suministran con el kit y deben pedirse por separado.

Hemosil. D-Dimer HS 500 Controls Núm. Cat. 0020500200

Diluyente de factores Núm. Cat. 0009757600

Control de Calidad

Para realizar un programa completo de control de calidad, se recomienda el uso de dos niveles de control. Los controles D-Dimer HS 500 Bajo y Alto se han diseñado para este programa.¹⁸ Cada laboratorio debe establecer su propia media y desviación estándar, y debe realizar un programa de control de calidad para monitorizar sus resultados. Los controles deben ser analizados como mínimo una vez por cada turno de 8 horas, de acuerdo con la normativa de Buenas Prácticas del Laboratorio. El Manual del Usuario contiene información adicional. Consultar la publicación de Westgard *et al* para la identificación y resolución de situaciones anormales del control de calidad.¹⁹

Trazabilidad de los calibradores y controles

Los valores indicados se han obtenido, a través de múltiples determinaciones en los Sistemas de la familia ACL TOP, usando lotes específicos de reactivos y un Estándar Interno.

Como actualmente no hay Estándar Internacional de Dímero-D disponible, el valor del Estándar Interno ha sido asignado siguiendo el criterio de armonización propuesto por W. Niswenderhuzen^{20,21} y P. Meijer.²²

Resultados

Los resultados de Dímero-D obtenidos con el kit Hemosil. D-Dimer HS 500 se informan en ng/mL. Estas unidades corresponden a ng/mL de Unidades Equivalentes de Fibrinógeno (UEF). Consultar el Manual del Usuario para información adicional.

Limitaciones/Interferencias

Concentraciones de hemoglobina hasta 500 mg/dL, de bilirrubina hasta 18 mg/dL, de triglicéridos hasta 1327 mg/dL, y de factor reumatoide hasta 1400 U/mL, no afectan a los resultados de Dímero-D en el los Sistemas de la familia ACL TOP.

El anticuerpo monoclonal (MA-8D3) utilizado en el Reactivo Látex D-Dimer HS 500 tiene especificidad principalmente por el dominio Dímero-D de los productos de degradación de la fibrina entrelazada. Se ha observado una ligera reacción cruzada con productos de degradación del fibrinógeno con muestras de plasma a las que se les ha añadido más de 10 µg/mL de los fragmentos purificados D y E.

Las muestras de pacientes que han recibido preparados de anticuerpos monoclonales con fines diagnósticos o terapéuticos pueden contener anticuerpos humanos anti-ratón (HAMA). La presencia de HAMA puede causar una sobrevaloración de los resultados en inmunoensayos que utilicen anticuerpos monoclonales de ratón. El Tampón de Reacción contiene un agente bloqueante de los HAMA para minimizar su interferencia en los resultados del análisis.

Valores esperados

Se ha realizado un estudio del rango de normalidad utilizando 138 muestras individuales de donantes de banco de sangre.

Sistema	N	Límite Superior del Rango (unidades)
Familia ACL TOP	138	500 ng/mL

Debido a las muchas variables que pueden afectar a los resultados (incluida la edad de la población),^{24,25} cada laboratorio debe establecer su propio rango de normalidad. Para establecer un diagnóstico, los resultados del análisis deben ser usados conjuntamente con el resto de la información, incluyendo el contexto clínico.

Características técnicas**Precisión:**

El estudio de precisión intraserie (reproducibilidad) y total (entre instrumentos) fue realizado en diferentes series.

Familia ACL TOP	Media (ng/mL)	CV% (Intraserie)	CV% (Total)
Pool Plasma Dímero-D	423	7,2	9,5
Control Bajo D-Dimer HS 500	877	2,9	8,9
Control Alto D-Dimer HS 500	2469	2,5	7,3

Correlación:²⁷

Sistema	N	Pendiente	Intersección	r	Método de referencia
Familia ACL TOP	100	1,00	-147	0,981	Método ELISA (ng/mL)

Se realizó un estudio además con 295 muestras congeladas no seleccionadas de pacientes admitidos en una unidad de emergencia por sospecha de TEP o TVP (frecuencia de enfermedad tromboembólica venosa: 25,4%). De las 295 muestras, 75 se confirmaron como TEV positivas (47 TEP y 28 TVP) con tests "objetivos" estándares y las 220 restantes se confirmaron como negativas.

Los resultados resumidos a continuación se basan en un cut-off de 500 ng/mL:

Sistema	N	Sensibilidad	Especificidad	Valor Predictivo Negativo (95% CI)
Familia ACL TOP	295	100% (95,2% - 100%)	42,3% (35,7% - 49,1%)	100% (96,1% - 100%)

Estudio clínico de evaluación de pacientes ambulatorios con sospecha de trombosis venosa profunda (TVP) y tromboembolismo pulmonar (TEP) utilizando el Hemosil. D-Dimer HS 500 conjuntamente con el resultado de la valoración clínica de la probabilidad pretest (PTP) del paciente para excluir el diagnóstico de tromboembolismo venoso (TEV).

Se realizó un estudio multicéntrico en 4 hospitales sobre 747 muestras de pacientes admitidos consecutivamente en la unidad de urgencias con sospecha clínica de TEP o TVP, de los cuales 401 pacientes con sospecha de DVT y 346 pacientes con sospecha de TEP. Como parte del estudio, los pacientes fueron sometidos a una valoración de la probabilidad pretest (PTP) usando el modo de Wells y fueron clasificados de tener una alta, media o baja probabilidad de TVP o TEP. Los pacientes con un valor negativo de Dímero-D y una PTP baja no fueron sometidos a pruebas de diagnóstico adicionales y fueron seguidos al cabo de 3 meses para descartar la existencia de TVP o TEP. En los pacientes con un valor negativo de Dímero-D y una PTP media, quedó a criterio de los facultativos el realizar una revisión a los 3 meses o proceder con técnicas de imagen. Los pacientes con un resultado positivo de Dímero-D o una PTP alta fueron sometidos a técnicas de imagen.

La prevalencia general de TVP en el total de las muestras fue de un 22,4% (90/401). La prevalencia general de TEP en el total de las muestras fue de un 15,0% (52/346). Después del seguimiento de los 3 meses, ninguno de los pacientes que había dado un test negativo de Dímero-D desarrolló TVP o TEP.

La sensibilidad, especificidad y valor predictivo negativo (VPN) del Hemosil. D-Dimer HS 500 utilizando el cut-off previamente establecido de 500 ng/mL, con los correspondientes intervalos de confianza (IC) del 95%, se resumen a continuación:

TVP	Todas las muestras	PTP alta	PTP Baja + media
n	401	70	322
Sensibilidad	100,0% (99/99) (96,0% - 100,0%)	100,0% (45/45) (92,1% - 100,0%)	100,0% (45/45) (92,1% - 100,0%)
Especificidad	42,1% (131/311) (36,6% - 47,8%)	32,4% (11/34) (17,4% - 50,5%)	43,3% (120/277) (37,4% - 49,4%)
Valor Predictivo Negativo	100,0% (131/131)	100,0% (11/11)	100,0% (120/120)

TEP	Todas las muestras	PTP alta	PTP Baja + media
n	346	24	322
Sensibilidad	100,0% (52/52) (93,2% - 100,0%)	100,0% (9/9) (66,4% - 100,0%)	100,0% (43/43) (91,8% - 100,0%)
Especificidad	48,3% (142/294) (42,5% - 54,2%)	33,3% (5/15) (11,8% - 61,8%)	49,1% (137/279) (43,1% - 55,1%)
Valor Predictivo Negativo	100,0% (142/142)	100,0% (5/5)	100,0% (137/137)

La precisión y los datos de correlación se han obtenido usando kits específicos de reactivos y de controles.

Límite de detección:

Sistema	Sin Auto Run	Con Auto Run
Familia ACL TOP	203 ng/mL	215 - 7650 ng/mL

Cuando el instrumento tiene activada la capacidad "run", el instrumento realiza una dilución automática y corrige el resultado final por el factor de dilución, expandiendo el rango del test a 128000 ng/mL. Si el resultado todavía es superior al rango válido expandido, es decir las muestras que informan resultados por encima de 128000 ng/mL, deben diluirse manualmente 1:100 con el Diluyente de factores (20 µL de muestra + 1980 µL de Diluyente) y reanalizarse como si fuera una muestra normal. Los resultados deben corregirse multiplicando por 100, el factor de dilución.

El ensayo no tiene efecto de prozona hasta 320000 ng/mL.