

Aplicación

Hemosil D-Dimer HS 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 modelo de valoración clínica de la probabilidad pretest (PTP) permite la inclusión 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 plasma de la fibrina entrelazada por el Factor XIIIa, genera una serie de derivados solubles que contienen al dominio Dímero-D (DXP).¹ Cuando la plasmina, una serproteasa, queda 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 embarazo de desarrollo normal los niveles de Dímero-D se elevan aunque mucho menos que en aquellos embarazos asociados a complicaciones.⁶

Un resultado negativo de Dímero-D, cuando se combina con una valoración clínica de baja probabilidad, ha demostrado tener un alto valor predictivo negativo para TVP o TEP.^{7,8} El Reactivo Látex Dímero-D HS 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 Reumatoide. Cuando se mezcla un plasma que contiene Dímero-D con el Reactivo Látex y el Tampón de Reacción, las partículas aglutinan. El grado de aglutinación es directamente proporcional a la concentración de Dímero-D contenida en el plasma. Los agregados causan un descenso de la luz transmitida (inmunoensayo turbidimétrico).¹⁴

Composición

El kit Hemosil D-Dimer HS contiene:

A **Látex Reagent** (Núm. Cat. 0020007720): 3 viales de 2 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. Se presenta liofilizado. Contiene albúmina de suero bovino, tampón, estabilizantes y conservantes.

B **Reaction Buffer** (Núm. Cat. 0020007721): 3 viales de 8 mL de un tampón isotónico que contiene albúmina de suero bovino, estabilizantes y conservantes.

C **D-Dimer Calibrator** (Núm. Cat. 0020007722): 2 viales de 1 mL de una disolución de Dímero-D parcialmente purificado a partir de fibrina humana digerida con plasmina. Se presenta liofilizado. Contiene albúmina de suero bovino, conservantes y estabilizantes.

MEDIDAS DE PRECAUCIÓN Y ADVERTENCIAS:

Látex Reagent:
Clase de peligro: ninguna
Indicaciones de peligro: ninguna
Consejos de prudencia: ninguna
El Reactivo Látex contiene material de origen animal por lo que debe tratarse como material potencialmente infeccioso.
Reaction Buffer:

Atención
Clase de peligro: Irrit. Ocular, 2, H319, Irrit. cut., 2, H315
Indicaciones de peligro: H315: Provoca irritación cutánea, H319: Provoca irritación ocular grave. Consejos de prudencia: P280: Llevar guantes/protector ocular/mascarilla de protección.

P302+P352: EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con agua y jabón abundantes.
P332+P313: En caso de irritación cutánea: Consultar a un médico. **P305+P351+P338: EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS:** Acchar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lo lleva y seguir así. Seguir adelante. **P337+P313:** Si persiste la irritación ocular: Consultar a un médico. **P362:** Quitarse las prendas contaminadas y lavarlas antes de volver a usarlas. El Tampón de Reacción contiene ácido sulfúrico (< 0.1%) que puede reaccionar con las tuberías metálicas dando lugar a ácidos altamente explosivos. Tomar las precauciones adecuadas para su desecho.

El Tampón de Reacción contiene material de origen animal por lo que debe tratarse como material potencialmente infeccioso.

D-Dimer Calibrator:
Clase de peligro: ninguna
Indicaciones de peligro: ninguna
Consejos de prudencia: ninguna
El Calibrator de Dímero-D contiene material de origen animal por lo que debe tratarse como material potencialmente infeccioso.

El Calibrator de Dímero-D contiene material de origen humano que ha sido verificado no reactivo al Antígeno de Superficie de la Hepatite B y a los anticuerpos anti-HCV y anti-HIV 1/2. Este producto, como todos los productos de origen humano, debe usarse con procedimientos de laboratorio apropiados y seguros para minimizar el riesgo de transmisión de enfermedades infecciosas.¹⁴
Este producto es para diagnóstico *in vitro*.

Preparación

Látex Reagent: Disolver el contenido del vial con 2 mL de agua Tipo CLRW según CLSI (anteriormente NCCLS) o equivalente.¹⁵ Tapar el vial y homogeneizar suavemente. Asegurarse de la completa disolución del producto. Mantener el reactivo entre 15-25°C durante 30 minutos. Mezclar suavemente por inversión del vial antes de su uso. No agitar.

Reaction Buffer: Mezclar suavemente por inversión del vial. El reactivo está listo para su uso. No agitar.

D-Dimer Calibrator: Disolver el contenido del vial con 1 mL de agua Tipo CLRW según CLSI o equivalente.¹⁵ Tapar el vial y homogeneizar suavemente. Asegurarse de la completa disolución del producto. Mantener el reactivo entre 15-25°C durante 30 minutos. Mezclar suavemente por inversión del vial antes de su uso. No agitar.

Nota: Evitar la formación de espuma al homogeneizar los reactivos y el calibrator reconstituídos. Las burbujas en la superficie del líquido 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 la etiqueta.

Látex Reagent - Estabilidad una vez reconstituído: 1 mes a 2-8°C en el vial original o 4 días a 15°C en la familia ACL TOP. No congelar.

Reaction Buffer - El reactivo abierto es estable durante 1 mes a 2-8°C en el vial original o 4 días a 15°C en la familia ACL TOP.

NOTA: El Reactivo Látex y el Tampón de Reacción tienen las mismas características de estabilidad y deben utilizarse aparajados 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 reconstituído: 3 días a 15-25°C, 1 mes a 2-8°C o 2 meses a -20°C en el vial original. El calibrator se puede descongelar a 37°C. Homogeneizar suavemente antes de su uso. No congelar.

Para una óptima estabilidad sacar los reactivos de los instrumentos y conservarlos a 2-8°C en sus viales originales bien tapados.

⚠ 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 nuevas partes de sangre recién coagulada por punción venosa sobre una paja 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 reactivos y controles no se suministran con el kit y deberán pedirse por separado.
Controles de Dímero-D Núm. Cat. 0020008610
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, controles de Dímero-D Bajo y Alto.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 anómalas del control de calidad.¹⁹

Trazabilidad de los calibradores y controles

Los valores indicados fueron obtenidos a través de múltiples determinaciones en los sistemas de coagulación de IL usando lotes específicos de reactivos y un Estándar Interno. Como no hay Estándar Internacional de Dímero-D disponible, el valor de este Estándar Interno ha sido asignado siguiendo el criterio de armonización propuesto por W. Nieuwenhuizen.^{20,21}

Resultados

Los resultados de Dímero-D se informan en ng/mL que corresponden a Unidades de Dímero-D (U.D.-D). Consultar el Manual del Usuario para información adicional.

Nota: Debido a la falta de Estándar Internacional de Dímero-D algunos fabricantes expresan los resultados de Dímero-D un UEF (Unidades Equivalentes de Fibrinógeno). La equivalencia aproximada entre los dos tipos de unidades es 2 ng/mL UEF = 1 ng/mL U.D.-D.²²

Limitaciones/interferencias

Concentraciones de hemoglobina hasta 500 mg/dL, de bilirrubina hasta 18 mg/dL, de triglicéridos hasta 1287 mg/dL y de factor reumatoide hasta 1400 UI/mL no afectan a los resultados de Dímero-D en la familia ACL TOP.

El anticuerpo monoclonal (MA-8D3) utilizado en el Reactivo Látex Dímero-D HS 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 en 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-látex (HAMA). La presencia de HAMA puede causar una sobreevaluación de los resultados en inmunoensayos que utilicen anticuerpos monoclonales de látex. El Hemosil D-Dimer HS Reaction Buffer 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 234 muestras individuales de donantes de banco de sangre.

Sistema	N	Límite Superior del Rango (unidades)
Familia ACL TOP	234	243 (ng/mL)

Debido a las muchas variables que pueden afectar a los resultados (incluida la edad de la población),^{23,24} 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 intraserial y total (serie a serie y día a día) fue realizado en diferentes series.

Familia ACL TOP	Media (ng/mL)	CV% (Intraserial)	CV% (Total)
Pool Plasma Dímero-D	180	8,3%	11,0%
Control Dímero-D Bajo	314	3,7%	7,0%
Control Dímero-D Alto	677	2,0%	7,0%

Correlación:²⁵

Se realizó un estudio interno con 300 muestras congeladas no seleccionadas de pacientes admitidos en una unidad de emergencia por sospecha de TEP o TVP (frecuencia de enfermedad tromboembólica venosa: 26%). De las 300 muestras, 78 se confirmaron como TEV positivas (47 TEP y 31 TVP) con tests "objetivos" estándares y las 222 restantes se confirmaron como negativas. Los resultados resumidos a continuación se basan en un cut-off de 230 ng/mL.

Sistema	Pendiente Intersección	r	Método de referencia
Familia ACL TOP	0,95	-0,3	0,973 Hemosil D-Dimer en Familia ACL TOP

En un estudio clínico adicional, se ha comparado este kit de Dímero-D con el kit Hemosil D-Dimer ya disponible comercialmente. Se analizaron muestras de 166 pacientes (17 normales, 32 con CID, 11 con TVP, 17 con TEP y 89 con diversos estados trombóticos). Se obtuvo una correlación (r) de 0,961 en el ACL TOP (n=166). A todos los pacientes con un diagnóstico clínico de TVP, TEP o CID se les asignó un nivel elevado de Dímero-D.

Instrumento:	N	Sensibilidad (95% IC)	Especificidad (95% IC)	Valor Predictivo Negativo (95% IC)
Familia ACL TOP	300	100% (95,4% - 100%)	46,8% (40,1% - 53,6%)	100% (96,5% - 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 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 multi-centro en 4 hospitales sobre 668 muestras de pacientes admitidos consecutivamente en la unidad de urgencias con sospecha clínica de TVP o TEP de los cuales 307 pacientes con sospecha de DVT y 361 pacientes con sospecha de TEP. Como parte del estudio, los pacientes fueron sometidos a una valoración de la probabilidad pretest (PTP) usando el modelo 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 examinados 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 moderada, quedó a criterio del facultativo la realización de 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 las muestras fue de un 20,2% (62/307). La prevalencia general de TEP en el total de las muestras fue de un 16,1% (58/361). 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 utilizando el cut-off previamente establecido de 230 ng/mL, con los correspondientes intervalos de confianza (CI) del 95%, se resumen a continuación:

TEV	Todas las muestras	PTP alta	PTP Baja + media
N	307	54	253
Sensibilidad	100,0% (62/62) (94,2%-100,0%)	100,0% (28/28) (87,7%-100,0%)	100,0% (34/34) (89,7%-100,0%)
Especificidad	38,4% (94/245) (32,2%-44,8%)	34,8% (9/26) (17,2%-55,7%)	38,8% (85/219) (32,3%-45,6%)
Valor Predictivo Negativo	100,0% (94/94) (96,2%-100,0%)	100,0% (9/9) (66,4%-100,0%)	100,0% (85/85) (95,8%-100,0%)
TEP	Todas las muestras	PTP alta	PTP Baja + media
n	361	28	333
Sensibilidad	100,0% (58/58) (93,8%-100,0%)	100,0% (10/10) (89,2%-100,0%)	100,0% (48/48) (92,6%-100,0%)
Especificidad	35,6% (108/303) (30,2%-41,3%)	16,7% (3/18) (3,6%-41,4%)	36,8% (105/285) (31,2%-42,7%)
Valor Predictivo Negativo	100,0% (108/108) (96,6% - 100,0%)	100,0% (3/3) (29,2% - 100,0%)	100,0% (105/105) (96,5% - 100,0%)

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

Límite de detección:

Sistema	21 ng/mL
Familia ACL TOP	21 ng/mL

Líneaalida:

Sistema	Sin Auto Roran	Con Auto Roran
Familia ACL TOP	150 - 3680 ng/mL	150 - 60000 ng/mL

Cuando el instrumento tiene activada la capacidad "oran", el instrumento realiza una dilución automática y corrige el resultado final por el factor de dilución, expandiendo el rango del test a 60000 ng/mL. Si el resultado todavía es superior al rango válido expandido, se dice las muestras que informan resultados por encima de 60000 ng/mL, deben diluirse manualmente 1:100 con el Diluyente de factores (20 µL de muestra + 1980 µL de Diluyente) y analizarse como si fuera una muestra normal. Los resultados deben corregirse multiplicando por 100, el factor de dilución. El ensayo no tiene efecto de prozona (es decir, inhibición por exceso de antígeno) hasta 107000 ng/mL.