



Aplicación

Los ensayos Hemosil, dRVVT Screen y Hemosil, dRVVT Confirm son productos de diagnóstico in-vitro cualitativos utilizados para la detección de anticoagulantes lúpicos en plasma humano obtenido mediante el método de Veneno de Víbora de Russell Diluido en los Sistemas de Coagulación de L. Los ensayos Hemosil, dRVVT Screen y Hemosil, dRVVT Confirm se usan para evaluar pacientes con resultados prolongados de TTPA que no tienen diagnóstico. Los ensayos Hemosil, dRVVT Screen y Hemosil, dRVVT Confirm pueden ser utilizados simultáneamente como un test integrado para la detección de Anticoagulantes Lúpicos.

Principio

Los Anticoagulantes Lúpicos (AL) pertenecen al grupo de anticoagulantes antitrombóticos que van dirigidos contra fibrinógenos de carga negativa o contra compuestos fibrinóticos fibrina y fibrinógeno (beta 2-glicoproteína) o factores de la coagulación como la Protrombina. Cuando estos anticoagulantes se detectan por su capacidad de prolongar el tiempo de coagulación en tests fibrinógeno-dependientes (TTPA, SCT, dRVVT), se denominan AL. Los pacientes con AL presentan un mayor riesgo de sufrir complicaciones clínicas como tromboembolismos y abortos de repetición.^{1, 2, 3, 4} Las presentaciones dRVVT Screen y dRVVT Confirm son reactivos de dRVVT perfeccionados que pretenden simplificar y estandarizar la detección de AL en evaluaciones clínicas.^{1, 2} El reactivo dRVVT Screen es positivo en fibrinógenos, lo que le hace sensible al AL. La cantidad adicional de fibrinógeno (fibrina) presente en dRVVT Confirm neutraliza al AL, dando tiempos de coagulación más cortos.

El Veneno de Víbora de Russell en presencia de calcio activa directamente el Factor X de la muestra. Los tests dRVVT Screen y dRVVT Confirm ensayan no se van, por lo tanto, afectados por anomalías de los factores de la fase de contacto, o deficiencias o inhibidores de los factores VII, VIII y IX. Las interferencias con Heparina son neutralizadas por polímeros base concentrados de 1 U/mL. En conclusión, dRVVT Screen y dRVVT Confirm son tests más específicos para la evaluación del AL que el TTPA.^{3, 5}

Los ensayos dRVVT Screen y Confirm se usan como test integrado para la detección del Anticoagulante Lúpico tal y como se describe en las recomendaciones de control de la ISTH del 2009.

Composición

Cada kit de dRVVT Screen consta de:
B dRVVT Screen (Cat. No. 0020301510): 10 x 2 mL viales de una preparación liofilizada que contiene Veneno de Víbora de Russell, fibrinógenos, calcio, polímeros, estabilizantes, colorantes y conservantes.

Cada kit de dRVVT Confirm consta de:
C dRVVT Confirm (Cat. No. 0020301610): 10 x 2 mL viales de una preparación liofilizada que contiene Veneno de Víbora de Russell, fibrinógenos, calcio, polímeros, estabilizantes, colorantes y conservantes.

PRECAUCIÓN:
 Los reactivos dRVVT Screen y dRVVT Confirm contienen material bovino. Todos los animales donantes provienen de resacas libres de BSE. El ganado fue sometido a una inspección de salud pre y post mortem por un veterinario, y aparentemente estaba libre de material infeccioso y contagioso. Sin embargo, el material debería tratarse como potencialmente infeccioso.

dRVVT Screen y dRVVT Confirm contienen Extracto Crudo de Veneno de Víbora de Russell.
 dRVVT Screen y dRVVT Confirm no están clasificados como peligrosos.

- Indicaciones de Peligro: ninguna
 - Fases de Riesgo: ninguna
 - Fases de Seguridad: ninguna
- Este producto es para Diagnóstico in vitro.

Preparación

Revisar el contenido de cada vial con 2 mL de agua CLH tipo CLSI o equivalente.⁶ Contar el vial y homogeneizar suavemente. Comprobar la completa reconstitución del producto. Mantener el reactivo a 15-25°C durante 30 minutos y mezclar por inversión antes de utilizar. No agitar.

Conservación y estabilidad de los reactivos

Los reactivos que no se hayan abierto son estables hasta la fecha de caducidad indicada en el vial si se mantienen a 2-8°C. Estabilidad después de la reconstitución: 15 días a 2-8°C en los viales originales tapados, 3 días a 15°C en un analizador de la Familia ACL TOP®, 24 horas a 15-25°C en viales originales en el ACL ELITE/ELITE PRO/9/10000, 48 horas a 15°C en los viales originales en el ACL Advance y 24 horas a 15°C en los Sistemas ACL Clásicos (100-7000). Para obtener una estabilidad óptima de los reactivos, sujetarlos que acabado el trabajo conserve los reactivos en su vial original cerrado y en nevera entre 2 y 8°C. No congelar.

Métodos de ensayo

Se recomienda procesar conjuntamente dRVVT Screen y dRVVT Confirm.
 Por favor, consulte el correspondiente Manual del Operador del Instrumento de L para obtener instrucciones completas del procedimiento del ensayo.

Recolección, preparación y manipulación de las muestras

Para obtener más información acerca de la recolección, manejo y almacenamiento de muestras, refiérase al Documento H21-A6 de CLSI.⁷ Las guías de la ISTH para la detección del Anticoagulante Lúpico⁸ recomiendan que cada mL de muestra de plasma debe ser sobre en pipetas. Para afinar las pipetas, antes del análisis o antes de congelar el plasma, se recomienda doble centrifugación o filtrar el plasma a través de un filtro de baja unión a proteínas de 0,2 micras. Los ensayos dRVVT Screen y dRVVT Confirm pueden realizarse en muestras frescas o congeladas.

Reactivos adicionales y plasmas control

Las siguientes materias no se suministran con el kit y deben adquirirse por separado.
 N° Cat.
 Control AL Positivo 0020012500
 Control AL Negativo 0020012600
 Agente de Limpieza 0009832700

Control de calidad

Para realizar un programa completo de control de calidad, se recomienda el uso de controles normales y anormales.⁹ Los controles adecuados para este programa son el Hemosil, Control AL Negativo y Hemosil, Control AL Positivo. Cada laboratorio deberá establecer su propia media y desviación estándar, y debe establecer un programa de control de calidad para monitorizar sus resultados. Los controles deberán ser analizados al menos una vez por cada turno de 8 horas, de acuerdo con la normalidad de Buenas Prácticas de Laboratorio. Consulte la publicación de Wedgard y col. para la identificación y resolución de situaciones anormales del control de calidad.⁹

Resultados

Para calcular los Ratios del dRVVT Screen y dRVVT Confirm se aconseja el método siguiente:
 1. Para cada lote de dRVVT Screen y dRVVT Confirm debería determinarse un nuevo Rango de Normalidad de acuerdo con el documento C83-A3¹⁰ de CLSI.
 2. Calcular la Media de cada Rango de Normalidad en segundos.
 3. La media del Rango de Normalidad se utilizará como denominador constante en el cálculo de los ratios.

dRVVT Screen
 1. El resultado en segundos del paciente se divide por la Media del Rango de Normalidad del dRVVT Screen.
 Ratio dRVVT Screen = $\frac{\text{Resultado del Paciente para dRVVT Screen (en segundos)}}{\text{Media del Rango de Normalidad del dRVVT Screen (en segundos)}}$

dRVVT Confirm
 1. El resultado en segundos del paciente se divide por la Media del Rango de Normalidad del dRVVT Confirm.
 Ratio dRVVT Confirm = $\frac{\text{Resultado del Paciente para dRVVT Confirm (en segundos)}}{\text{Media del Rango de Normalidad del dRVVT Confirm (en segundos)}}$

2. Se divide el ratio de dRVVT Screen por el ratio de dRVVT Confirm.
 Ratio Normalizado dRVVT = $\frac{\text{Ratio dRVVT Screen}}{\text{Ratio dRVVT Confirm}}$

Los ensayos dRVVT Screen y Confirm pueden usarse en paralelo como test integrado o por separado en combinación con el procedimiento descrito para calcular el Ratio Normalizado.

Interpretación

1. El resultado final se expresa como el Ratio Normalizado de dRVVT: RN.
2. Si los tiempos de coagulación de dRVVT Screen y Confirm están prolongados, se recomienda realizar estudios de mezcla para investigar defectos o inhibidores de factores. Si el estudio de mezcla altera, deberían realizarse estudios adicionales para determinar la interferencia de el inhibidor específico a los factores de coagulación, o la posible interferencia en combinación con AL.
3. Los ratios dRVVT Screen y Confirm cuando se usan juntos, cumplen con los requisitos de Test Integrado definidos en las Recomendaciones para los ensayos de Anticoagulantes Lúpico.⁸

Limitaciones/Interferencias

Los estudios de Referencias se llevaron a cabo en un analizador de las Familias de Coagímetros de L que aparecen en la siguiente lista. Diferentes concentraciones de productos interferentes se añadieron a un pool de plasma normal, a un plasma con AL, diabético positivo y a un plasma con AL positivo alto. Los resultados demuestran que los resultados de los ensayos dRVVT Screen y dRVVT Confirm no se afectan por las siguientes concentraciones de materiales interferentes:

	Hemoglobina	Bilirrubina	Triglicéridos	Heparina NF	Heparina BPM
Familia ACL TOP	Hasta 300 mg/dL	Hasta 10 mg/dL	Hasta 500 mg/dL	Hasta 1 U/mL	Hasta 1 U/mL
ACL ELITE/ELITE PRO 9/10000	Hasta 300 mg/dL	Hasta 10 mg/dL	Hasta 500 mg/dL	Hasta 1 U/mL	Hasta 0,8 U/mL
ACL Advance	Hasta 400 mg/dL	Hasta 10 mg/dL	Hasta 300 mg/dL	Hasta 1 U/mL	Hasta 1 U/mL
ACL Clásicos (100-7000)	Hasta 200 mg/dL	Hasta 10 mg/dL	Hasta 100 mg/dL	Hasta 1 U/mL	Hasta 0,8 U/mL

En las muestras de plasma siguientes se encontró un Ratio Normalizado de dRVVT más alto que el cut-off obtenido en un estudio interno (RN > 1,2):

	ACL TOP	ACL TOP 500CTS
AL Positivos Conocidos	100% (35/35)	100% (35/35)
Templa Anticoagulante Oral	40% (2/5)	40% (2/5)
Heparina NF	20% (1/5)	0% (0/5)
Heparina BPM	0% (0/5)	0% (0/5)
CD	0% (0/5)	0% (0/5)
Deficiencia de factores	0% (0/6)	0% (0/6)

Los ensayos de detección de AL basados en diferentes métodos parecen ser más o menos sensibles a ciertos subgrupos de anticoagulante lúpico. Por lo tanto, al menos dos ensayos, basados en diferentes métodos, se deben realizar antes de la posibilidad de acudir la presencia de AL.^{3, 11} Los ratios dRVVT pueden estar aumentados en pacientes que están en tratamiento con anti-vitamina K. Otras pruebas de confirmación antes de diagnosticar o repetir las pruebas dRVVT están indicadas cuando el paciente está sin tratamiento con anti-vitamina K.¹²

Valores esperados

Un estudio interno para definir el Rango Normalidad (n = 123) se llevó a cabo según CLSI C83-A3¹⁰, usando dRVVT Screen y dRVVT Confirm en analizadores de la Familia ACL TOP, ACL ELITE/ELITE PRO/9/10000, ACL Advance y Sistemas ACL Clásicos (100-7000) con los resultados siguientes:

Sistema	RN Intervalo de Referencia	Limite Bajo	Limite Alto
ACL TOP		0,82 (0,91-0,93)	1,11 (1,10-1,15)
ACL TOP 500 CTS		0,91 (0,89-0,92)	1,13 (1,11-1,16)
ACL ELITE/ELITE PRO/9/10000		0,91 (0,88-0,92)	1,14 (1,11-1,18)
ACL Advance		0,91 (0,90-0,93)	1,13 (1,11-1,15)
ACL Clásicos (100-7000)		0,91 (0,75-0,93)	1,14 (1,11-1,24)

Cut - Off

El Cut-Off del Ratio Normalizado se determinó utilizando 40 muestras normales y calculando la media + 3DS obteniendo los resultados siguientes:

Sistema	Cut-off Ratio Normalizado dRVVT*
ACL TOP	>1,2
ACL TOP 500 CTS	>1,2
ACL ELITE/ELITE PRO/9/10000	>1,2
ACL Advance	>1,2
ACL Clásicos (100-7000)	>1,2

Los resultados se obtuvieron usando un lote específico de reactivo. Debido a las variaciones que pueden afectar los resultados, cada laboratorio debería establecer su propio cut-off del Ratio Normalizado.

*Cuando se considere que una muestra es Positiva para AL.

Características Técnicas

Precisión:
 La precisión fue evaluada utilizando 3 lotes de reactivos en 3 analizadores representativos de la Familia ACL TOP (ACL TOP y ACL TOP 500 CTS) por tres usuarios independientes. La precisión se evaluó de acuerdo con CLSI EP05-A2¹³, durante 20 días, con dos series cada día y 2 repeticiones por serie para cada nivel de muestra (n = 8), con los siguientes resultados a partir de un lote y sistema representativos:

ACL TOP	Media (Ratio Normalizado dRVVT)	Intra-serie (%CV)			Inter-serie (%CV)			Total (%CV)		
Control AL Negativo	1,00	1,2	2,0	0,8	1,7	2,8	1,9	2,3	3,4	2,1
AL Positivo débil	1,35	1,1	0,9	0,6	2,7	2,1	2,0	3,0	2,6	2,2
Control AL Positivo	1,77	1,5	0,9	1,1	4,4	3,4	2,5	5,0	3,5	3,0

Se evaluó la precisión con 3 lotes de reactivo en 3 miembros representativos de los sistemas ACL ELITE/ELITE PRO/9/1000, ACL Advance y ACL Clásicos (100-7000). La precisión se evaluó con CLSI EP05-A2¹³, durante 20 días, con 2 sesiones por día y 2 replicados para cada nivel de muestra (n = 8), con los siguientes resultados a partir de un lote y sistema representativos:

ACL ELITE/ELITE PRO 9/10000	Media (Ratio Normalizado dRVVT)	Intra-serie (%CV)	Inter-serie (%CV)	Total (%CV)
Control AL Negativo	1,00	1,4	1,8	2,7
AL Positivo Débil	1,50	0,9	2,0	2,2
Control AL Positivo	1,76	1,2	3,3	3,7
ACL Advance	Media (Ratio Normalizado dRVVT)	Intra-serie (%CV)	Inter-serie (%CV)	Total (%CV)
Control AL Negativo	1,00	1,5	1,1	2,1
AL Positivo Débil	1,36	1,3	2,4	2,8
Control AL Positivo	1,73	2,5	2,2	4,3
ACL Clásico (100-7000)	Media (Ratio Normalizado dRVVT)	Intra-serie (%CV)	Inter-serie (%CV)	Total (%CV)
Control AL Negativo	1,00	1,2	1,8	2,7
AL Positivo Débil	1,44	1,6	2,2	2,9
Control AL Positivo	1,70	0,7	3,0	4,0

Método de Comparación

La comparación de métodos y estudios analíticos de Hemosil, dRVVT Screen y dRVVT Confirm se realizaron utilizando analizadores de la Familia ACL TOP y controles Hemosil, LA, muestras de plasma normales y anormales.

Se realizó un método de comparación interno entre Hemosil, dRVVT y Hemosil, LAC se según EP05-A2¹⁴ con 115 muestras (80 Normales / 35 AL Positivos) en un analizador de la Familia ACL TOP (ACL TOP y ACL TOP CTS 500). El Porcentaje de Concordancia Positiva (PPV) y el Porcentaje de Concordancia Negativa (NPV) fueron los siguientes:

Cut-Off (Media-3SD)	LAC NR	dRVVT NR	PPA	CI 95%	NPA	CI 95%	Global	Referencia
ACL TOP	>1,2	>1,2	100,0% (35/35)	90,1-100,0%	100,0% (80/80)	95,4-100,0%	100%	ACL Screen/Confirm
ACL TOP 500 CTS	>1,2	>1,2	100,0% (35/35)	90,1-100,0%	100,0% (80/80)	95,4-100,0%	100%	Confirm

Los resultados fueron validados posteriormente en tres centros de EE. UU. Cada centro estableció su propio cut-off, y se validó con 100 muestras +, con los resultados siguientes:

Cut-Off (Media-3SD)	LAC NR	dRVVT NR	PPA	CI 95%	NPA	CI 95%	Total	Referencia
Silo 1	>1,2	>1,2	82,7% (38/41)	80,8-87,9%	98,0% (81/82)	94,1-99,8%	97%	LAC Screen/Confirm
Silo 2	>1,3	>1,3	90,2% (46/51)	70,0-95,7%	98,0% (100/102)	94,1-99,8%	95,8%	Confirm
Silo 3	>1,3	>1,2	95,1% (52/53)	90,1-99,7%	100,0% (80/80)	95,4-100,0%	99,2%	Confirm

Se realizó un método de comparación interno de acuerdo a EP05-A2¹⁴, con 115 muestras (80 Normales/35 AL Positivos), en un analizador ACL ELITE/ELITE PRO/9/10000, un ACL Advance y un ACL Clásico (100-7000). Cada uno se comparó vs. la Familia ACL TOP (RN dRVVT con un cut-off >1,2) utilizando el mismo lote de Hemosil, dRVVT.

Se calculó el Porcentaje de Acuerdo en Valores Positivos (Positive Percent Agreement, PPA) y el Porcentaje de Acuerdo en Valores Negativos (NPV), y dieron los siguientes resultados:

Cut-Off (Media-3SD)	dRVVT NR	PPA	CI 95%	NPA	CI 95%	Global	Referencia
ACL ELITE/ELITE PRO/9/10000	>1,2	100,0% (35/35)	90,1-100,0%	100,0% (80/80)	95,4-100,0%	100%	dRVVT Screen/Confirm
ACL Advance	>1,2	100,0% (35/35)	90,1-100,0%	100,0% (80/80)	95,4-100,0%	100%	análizador de la familia ACL TOP
ACL Clásicos (100-7000)	>1,2	100,0% (35/35)	90,1-100,0%	100,0% (80/80)	95,4-100,0%	100%	Confirm