



Noviembre 2009

Español 6

1/ UTILIZACIÓN DE LOS KITS

Los kits **STA® - Staclot® dRVV Screen** y **STA® - Staclot® dRVV Confirm** se utilizan para la detección en el plasma de los anticoagulantes lúpicos (AL) mediante el tiempo de veneno de víbora Russell diluido (1) obtenido en los aparatos de la línea STA® compatibles con estos reactivos.

2/ SUMARIO

Los anticoagulantes lúpicos son anticuerpos dirigidos contra los complejos fosfolípidos/proteínas (4). Presentan la capacidad de alargar los tiempos de coagulación de las pruebas dependientes de los fosfolípidos. Los anticoagulantes lúpicos se asocian a numerosos estados clínicos: enfermedades autoinmunes (lupus eritematoso disseminado) (2), trombosis (5), abortos espontáneos de repetición (1), infecciones (4). Su presencia puede ser persistente o transitoria (4).

3/ PRINCIPIO DEL TEST

Presente en los reactivos STA® - Staclot® dRVV Screen y STA® - Staclot® dRVV Confirm, el veneno de víbora Russell, activador del factor X en presencia de calcio, desencadena la coagulación a este nivel y elimina la interacción de los factores situados en etapas anteriores (1). Por tanto, esta prueba es independiente de las anomalías de la fase de contacto y de las que afectan a los factores VIII y IX (déficits o inhibidores).

El test STA® - Staclot® dRVV Screen se realiza en presencia de una concentración baja de fosfolípidos lo que, en presencia de AL, alarga el tiempo de coagulación.

El STA® - Staclot® dRVV Confirm contiene una concentración mayor de fosfolípidos que neutralizan los AL presentes en el plasma a analizar. En consecuencia, el tiempo de coagulación observado con el STA® - Staclot® dRVV Confirm será más corto que el encontrado con el STA® - Staclot® dRVV Screen.

4/ COMPOSICIÓN DE LOS KITS

Los reactivos STA® - Staclot® dRVV Screen y STA® - Staclot® dRVV Confirm contienen veneno de víbora Russell, fosfolípidos, calcio y un inhibidor de la heparina (HNF). Se presentan en forma liofilizada.

Estos reactivos contienen azida sódica (< 1 g/l) como conservante. Es preciso eliminar con precaución los reactivos que contienen azida sódica. Si estas soluciones se vierten en el desagüe del lavabo, enjuagar con abundante agua para evitar la formación de azidas metálicas que, si están concentradas, pueden provocar explosiones.

Estos reactivos contienen productos de origen humano y/o animal. Cuando se ha utilizado plasma humano en la preparación de estos reactivos, se excluye previamente la presencia del antígeno HBs, de los anticuerpos anti-HCV, anti-HIV 1 y anti-HIV 2 con los correspondientes análisis. Sin embargo, ningún test puede garantizar de manera absoluta la ausencia de agentes infecciosos. Por eso, estos reactivos de origen biológico han de ser manipulados con las precauciones habituales, ya que se trata de productos potencialmente infecciosos.

5/ PRECAUCIONES

Los estuches sin abrir se deben conservar a 2-8 °C. Estos reactivos se destinan exclusivamente a un uso *in vitro* y deben ser manipulados por personal de laboratorio. Los residuos se eliminarán con arreglo a la reglamentación local vigente.

Los kits STA® - Staclot® dRVV se han de utilizar en los aparatos de la línea STA® compatibles con estos reactivos. Antes de su utilización, leer atentamente el "Manual del operador" del instrumento utilizado. Tener cuidado en el manejo de estos reactivos y las muestras.

6/ OBTENCIÓN Y TRATAMIENTO DE LA MUESTRA

La obtención de la muestra debe ajustarse a las recomendaciones para los exámenes de hemostasis.

- Obtención de sangre sobre solución de citrato trisódico 0,109 M: 1 vol. de citrato por 9 vol. de sangre. Utilizar tubos de extracción de plástico o de vidrio siliconado.
- Centrifugación: se recomienda eliminar las plaquetas del plasma. Realizar una primera centrifugación durante 15 minutos a 2000-2500 g. Separar el sobrenadante plasmático y centrifugarlo una segunda vez durante 15 minutos a 2000-2500 g. El número de plaquetas residuales debe ser inferior a 10.10⁹/l (< 10 000/mm³) (3).
- Cuando se respetan estas condiciones en el tratamiento de la muestra, el plasma se puede conservar: 4 horas a 20 ± 5 °C 1 mes a -20 °C. Atemperar la muestra a 37 °C el tiempo necesario y suficiente para que la descongelación sea completa.

7/ CONSERVACIÓN Y PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

- Preparación**
Reconstituir cada vial de:
 - STA® - Staclot® dRVV Screen ② (REF 00339) con 2 ml de agua destilada
 - STA® - Staclot® dRVV Screen ⑤ (REF 00333) con 5 ml de agua destilada
 - STA® - Staclot® dRVV Confirm (REF 00334) con 2 ml de agua destilada.
 Dejar que la solución se estabilice durante 30 minutos a temperatura ambiente (18-25 °C). Agitar para obtener una suspensión homogénea. Posteriormente, poner un STA® - mini Reducer nuevo (REF 00797) y la cápsula operculada.
- Conservación**
Liofilizados: a 2-8 °C, hasta la fecha de caducidad indicada en el estuche. Reconstituídos: 72 horas con STA® - mini Reducer y cápsula operculada en STA Compact® y STA-R®.

8/ REACTIVOS Y MATERIAL AUXILIARES

- STA® - Control LA 1 + 2** (REF 00201): controles negativo y positivo en AL.
- STA® - mini Reducer (REF 00797).
- Instrumento de la línea STA® que puede utilizar estos reactivos.
- Equipamiento habitual en los laboratorios de análisis clínicos (centrifugadora, agua destilada...).

9/ PROCEDIMIENTO

- Determinación de los intervalos de referencia**
En cada nuevo lote de STA® - Staclot® dRVV Screen y de STA® - Staclot® dRVV Confirm, determinar los intervalos de referencia utilizando un mínimo de 20 plasmas humanos normales (6). En cada serie se incluirá un pool de plasmas humanos normales (pool control), cuyo resultado deberá situarse dentro de este intervalo; este pool se utiliza para el cálculo de los ratios (6).
- Plasmas a analizar**
Los plasmas a analizar se utilizan sin diluir. Se cargan en el instrumento (ver el "Manual del operador" del aparato utilizado). Seleccionar la(s) prueba(s) a efectuar en los plasmas de los pacientes.
- Controles**
Los controles son necesarios para comprobar la exactitud y la reproducibilidad de los resultados. Utilizar los STA® - Control LA 1 y 2. Preparar estos controles y transferir al instrumento las informaciones contenidas en los códigos de barras de la hoja. Estos controles se utilizan sin diluir.
- Determinación del tiempo de coagulación**
Para la determinación del tiempo de coagulación, consultar el protocolo descrito en los "Standardized Operating Procedures" del instrumento. La determinación del tiempo de coagulación de los plasmas a analizar se realiza automáticamente por el aparato según se van cargando las muestras.

10/ RESULTADOS

El tiempo de coagulación de las muestras analizadas se muestra como tiempo real en la unidad elegida por el operador en el panel de control del instrumento (ver el "Manual del operador").

Si el aparato señala que los resultados obtenidos para los controles se sitúan fuera de los intervalos indicados en la hoja incluida en el kit STA® - Control LA 1 + 2, asegurarse del buen funcionamiento de todo el sistema: condiciones operativas, reactivos, flamas a analizar, etc. Si es necesario, repetir las muestras.

10.1. STA® - Staclot® dRVV Screen

El resultado final se expresa en ratio Screen:

$$\text{Ratio Screen} = \frac{\text{tiempo de coagulación Screen (s) del plasma a analizar}}{\text{tiempo de coagulación Screen (s) del pool control}}$$

Si el ratio Screen del paciente es superior a 1,20 el resultado no es normal y se sospecha la presencia de AL.

10.2. STA® - Staclot® dRVV Confirm

El resultado final se expresa en ratio normalizado:

$$\text{Ratio Confirm} = \frac{\text{tiempo de coagulación Confirm (s) del plasma a analizar}}{\text{tiempo de coagulación Confirm (s) del pool control}}$$

$$\text{Ratio normalizado} = \frac{\text{ratio Screen}}{\text{ratio Confirm}}$$

10.3. Interpretación de los resultados

La presencia de AL en la muestra se confirma cuando el valor del ratio normalizado es superior o igual a 1,20. En el síndrome Antifosfolípido (SAF), el carácter persistente del AL se debe confirmar en una segunda muestra extraída al menos 12 semanas después (7). El resultado debe interpretarse en función del estado clínico y biológico del paciente.

Para establecer la presencia de AL en un paciente, se recomienda seguir las recomendaciones del Comité Científico y de Estandarización de los AL (3).

En caso de un ratio Screen superior a 1,20, se pueden efectuar pruebas en una mezcla compuesta por plasma paciente + pool control para diferenciar un déficit en uno o varios factores de la coagulación (3, 6) o un tratamiento con antivitaminas K (6) de un anticoagulante circulante.

Si el ratio normalizado es superior o igual a 1,20, la prueba STA® - Staclot® dRVV Confirm permite confirmar la naturaleza antifosfolípida del anticoagulante circulante (3, 6).

11/ LIMITACIONES

- Las dos pruebas STA® - Staclot® dRVV Screen y STA® - Staclot® dRVV Confirm se deben realizar al mismo tiempo y en la misma muestra.
- Para el estudio de los anticoagulantes lúpicos no se recomienda utilizar muestras que contengan heparina (HNF y/o HBPM) (4). No obstante, el método propuesto ha resultado insensible a la heparina no fraccionada hasta concentraciones de 0,8 UI/ml.

12/ VALORES NORMALES

Los anticoagulantes lúpicos están ausentes en plasmas humanos normales.

A título de ejemplo, se han ensayado 27 plasmas normales con el STA® - Staclot® dRVV Screen. El ratio Screen de cada uno de estos plasmas resultó inferior o igual a 1,20 (la media de los tiempos de coagulación obtenidos en estos plasmas fue de 39,8 segundos con una desviación estándar de 3,0 segundos). No obstante, se recomienda que cada laboratorio determine sus propios valores normales.

13/ CARACTERÍSTICAS DEL MÉTODO

• Sensibilidad

El sistema STA® - Staclot® dRVV Screen y STA® - Staclot® dRVV Confirm muestra una buena sensibilidad frente a plasmas positivos en AL. 22 plasmas procedentes de pacientes conocidos en los que se ha confirmado previamente la presencia de AL, se analizan con los kits STA® - Staclot® dRVV. Los 22 plasmas resultan positivos (ratio normalizado ≥ 1,20).

• Reproducibilidad

Se realizan estudios de reproducibilidad intra- e inter-series en diferentes muestras con los reactivos STA® - Staclot® dRVV. Los resultados obtenidos con STA-R® se incluyen en la siguiente tabla:

Muestra	Reproducibilidad intra-serie			Reproducibilidad inter-serie		
	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 3	Muestra 4	Muestra 4
Test	Screen	Screen	Confirm	Screen	Screen	Confirm
n	21	21	21	10	10	10
X̄ (s)	42,5	94,7	45,4	35,4	97,5	47,0
DS (s)	0,2	0,3	0,3	0,8	2,9	1,9
CV (%)	0,5	0,4	0,6	2,2	3,0	4,1

• Estudios de correlación

Se compararon 90 plasmas en dos laboratorios con STA® - Staclot® dRVV Screen y Confirm y otro test de dRVV screen y confirm comercializado de forma oficial. La correlación global fue del 92 %.

BIBLIOGRAFÍA

- THIAGARAJAN P., PENGO V., SHAPIRO S.S.: "The use of the dilute Russell viper venom time for the diagnosis of lupus anticoagulants". Blood, **68**, 4, 869-874, 1986.
- TRIPLETT D.A., BARNA L.K., UNGER G.A.: "A hexagonal (II) phase phospholipid neutralization assay for lupus anticoagulant identification". Thromb. Haemostasis, **5**, 7, 787-793, 1993.
- BRANDT J.T., TRIPLETT D.A., ALVING B., SCHARRE I.: "Criteria for the diagnosis of lupus anticoagulants: an update". Thromb. Haemostasis, **74**, 4, 1185-1190, 1995.
- ARNOUX D., BOUTIERE B., SANMARCO M.: "Les anticorps "antiphospholipides" : intérêt clinique et diagnostic biologique". Ann. Biol. Clin., **58**, 5, 557-574, 2000.
- GALLI M., DLOTT J., NORBIS F., RUGGERI L., CLER L., TRIPLETT D.A., BARBUJ T.: "Lupus anticoagulants and thrombosis: clinical association of different coagulation and immunologic tests". Thromb. Haemostasis, **84**, 1012-1016, 2000.
- GREAVES M., COHEN H., MACHIN S.J., MACKIE I.: "Guidelines on the investigation and management of the antiphospholipid syndrome". Br. J. Haematology, **109**, 4, 704-715, 2000.
- MIYAKIS S., LOCKSHIN M.D., ATSUMI T., BRANCH D.W., BREY R.L., CERVERA R., DERKSEN R.H.W.M., DE GROOT P.G., KOIKE T., MERONI P.L., REBER G., SHOENFELD Y., TINCANI A., VLACHOYIANNPOULOS P.G., KRILIS S.A.: "International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS)". J. Thromb. Haemostasis, **4**, 295-306, 2006.

Los cambios significativos son indicados por las líneas punteadas en el margen.

DIAGNOSTICA STAGO S.A.S.
9 rue des Frères Chausson
92600 Asnières sur Seine (France)
+33 (0)1 46 88 20 20
stago@stago.fr



Las informaciones y/o las imágenes contenidas en este documento están protegidas por copyright y otros derechos de propiedad intelectual. © 2009, Diagnostica Stago, todos derechos reservados. Los logotipos y/o los nombres de los productos de Diagnostica Stago son marcas registradas. España!