



american diagnostica® ActiScreen™XL-FDP latex

BEOGGD GEBRUIK

De ActiScreen™ XL-FDP latex test is bedoeld voor een snelle kwalitatieve of semi-kwantitatieve evaluatie van circulerende derivaten van gecrosslinkte fibrineafbraakproducten (XL-FDP) in humaan plasma.

SAMENVATTING EN UITLEG VAN DE TEST

Als bloed stolt, wordt fibrinogeen door trombine omgezet in fibrine. De fibrinemonomeren die daarbij ontstaan, polymeriseren waardoor een oplosbare gel van fibrine zonder dwarsverbindingen wordt gevormd. Die fibrinegel wordt dan door factor XIII na activatie door trombine omgezet in gecrosslinkte fibrine, waardoor een onoplosbaar fibrinestolsel ontstaat. Bij de vorming van een fibrinestolsel wordt ook de productie van plasmine, het belangrijkste fibrinolytische enzym, gestimuleerd.

Fibrinogeen en fibrine worden beide door het fibrinolytische plasmine gesplitst met vorming van afbraakproducten, maar alleen afbraakproducten van gecrosslinkte fibrine bevatten D-dimeren¹⁻³. Gecrosslinkte fibrineafbraakproducten (XL-FDP) zijn dan een ook een specifieke merker van fibrinolyse.

PRINCIPE VAN DE TEST

De ActiScreen™ XL-FDP latex is een snelle agglutinatietest, waarbij gebruik wordt gemaakt van latexkorreltjes waarop een monoklonale antistof zit die specifiek gericht is tegen D-dimeren. De XL-FDP in een plasmamonster binden aan de beklede latexkorreltjes, wat resulteert in een zichtbare agglutinatie wanneer de concentratie van D-dimeren hoger is dan de detectiedrempel van de test.

REAGENTIA

Samenstelling

- ActiScreen™ XL-FDP latex - reagens: een 0,83 % suspensie van latexpartikels die bekleed zijn met een muriene monoklonale antistof tegen D-dimeren, 10 mg/ml BSA en 0,1% natriumazide.
- ActiScreen™ XL-FDP - positieve controle: een oplossing van gezuiverde humane D-dimeerfragmenten, 5 mg/ml BSA en 0,1% natriumazide.
- ActiScreen™ XL-FDP - negatieve controle: een bufferoplossing bestaande uit 5 mg/ml BSA en 0,1% natriumazide.
- ActiScreen™ XL-FDP - buffer: een bufferoplossing van 10 mM fosfaat en 0,1% natriumazide.

Waarschuwingen en voorzorgen

- Alleen bedoeld voor in-vitro-diagnostiek.
- Schadelijk bij opname door de mond (R22). Aanraking met de ogen en de huid vermijden (S24/25). Afval niet in de gootstenen werpen (S29). Draag geschikte beschermende kleding (S36).
- OPGELET: Alle reagentia van ActiScreen™ XL-FDP latex bevatten natriumazide (0,1%) als conserveermiddel. Niet inslikken en niet in contact laten komen met huid of slijmvliezen. Natriumazide kan explosieve aziden vormen in metalen afvoerbuizen. Pas geschikte verwijderingsprocedures toe.
- OPGELET: De positieve controle van de ActiScreen™ XL-FDP latex bevat bestanddelen van menselijke oorsprong. Elke individuele bloeddonatie die bestemd is voor de productie van het reagens, wordt getest op HBsAg, anti-HCV, anti-HIV1 en anti-HIV2. Enkel donaties die negatief blijken te zijn, worden gebruikt. Volledige afwezigheid van infectieuze organismen kan echter nooit worden gegarandeerd. Derhalve moet alle materiaal dat afgeleid is van menselijk bloed, worden behandeld als zijnde mogelijk infectieus en moeten de voorzorgsmaatregelen worden nageleefd die worden aanbevolen voor het omgaan met gevaarlijk biologisch materiaal.

Bewaring en houdbaarheid

Bewaring: Bewaren bij 2 °C tot 8 °C. NIET INVRIEZEN.

Houdbaarheid: De vervaldatum staat vermeld op de verpakking en het etiket op het flesje.

Aanwijzing voor verslechtering van het reagens

Het reagens is niet meer goed als het latexreagens geen agglutinatie geeft met de positieve controle, als het agglutinatie geeft met de negatieve controle of als er aanwijzingen voor microbiële contaminatie zijn.

AFNAME EN VOORBEREIDING VAN HET SPECIMEN

Het verdient aanbeveling plasma te nemen van volledig bloed dat onstolbaar werd gemaakt met natriumcitraat. Het gebruik van EDTA en heparine resulteert in een toename van het aantal fout-positieve reacties. Na scheiding van het plasma door centrifugatie (1500 g gedurende 15 minuten bij 4 °C - 10 °C) kunnen de specimens rechtstreeks op aanwezigheid van XL-FDP worden getest. Defibrinerang van het plasma wordt niet aangeraden.

Bewaring/houdbaarheid van het plasma: - 20 °C: 2 weken

Ingevoren specimens snel ontdoaien bij 37 °C en centrifugeren vooraleer te testen. Meer instructies voor de afname, de verwerking en de bewaring van specimens vindt u in de NCCLS-publicatie H21-A3.

PROCEDURE

Geleverd materiaal

REF	800DB - ActiScreen™ XL-FDP latex, Kit
-----	---------------------------------------

Latexreagens 1 x 2,0 ml: witte dop **Negatieve controle** 1 x 0,6 ml: zwarte dop

Positieve controle 1 x 0,6 ml: gele dop **Buffer** 1 x 20,0 ml

Testkaarten x 10: 8 putjes, voor agglutinatiereactie

Roerders x 60: om te mengen

Gebruiksaanwijzing

REF	800DB-LX - ActiScreen™ XL-FDP latex, Flesje
-----	---

Latexreagens 1 x 2,0 ml: witte dop

Gebruiksaanwijzing

Vereist materiaal dat niet wordt meegeleverd

Precisiepipetten en tippen - 20 µl en 100 µl

Plastic proefbuisjes en rek

Stopwacht of chronometer

Wegwerphandschoenen

Doekjes (om het uiteinde van het druppelflesje af te vegen)

REVISION 2008-06

Belangrijk!

- Laat de reagentia voor gebruik op kamertemperatuur (20 °C tot 25 °C) komen.
- Het latexreagens moet meteen voor gebruik worden gemengd door inversie.
- Voor elk gebruik moet het uiteinde van de druppelflesjes met een doekje worden droog geveegd.
- De druppelflesjes moeten verticaal worden gehouden bij het druppelen van reagens.



Kwalitatieve methode

- Merk (of noteer) posities op het testglaasje voor specimens en, zo nodig, voor positieve en negatieve controles.
- Hou het druppelflesje met het latexreagens verticaal en doe een druppel van het reagens in een putje op een testkaart. Het oppervlak van de testkaart niet aanraken.
- Pipetteer nauwkeurig 20 µl onverdund plasma of doe een druppel van de controleoplossing terug naast de druppel van het latexreagens.
- Meng het latexreagens en het monster met een roerder tot de latex gelijkmatig verspreid is.
- Schud de testkaart voorzichtig gedurende precies 3 minuten.
- Kijk na precies 3 minuten onder een sterke lichtbron of er agglutinatie is. Merk op: Als de test later dan na 3 minuten wordt afgelezen, kan de latexsuspensie uitdrogen, wat een pseudo-agglutinatiepatroon geeft. Bij vermoeden van pseudo-agglutinatie moet het specimen opnieuw worden getest.
- Gooi de testkaart en de roerder weg in een container voor biologisch afval - niet hergebruiken.

Semi-kwantitatieve methode

- Bereid seriële verdunningen van het testplasma met buffer als volgt:
 - 1:2 verdunning 100 µl plasma plus 100 µl bufferoplossing
 - 1:4 verdunning 100 µl 1:2 verdunning plus 100 µl bufferoplossing
 - 1:8 verdunning 100 µl 1:4 verdunning plus 100 µl bufferoplossing
- Test elke verdunning zoals beschreven in de kwalitatieve methode.

Kwaliteitscontrole

Het verdient aanbeveling bij elke reeks tests zowel een positieve als een negatieve controle uit te voeren om na te gaan of het systeem goed werkt. De controleoplossingen moeten op dezelfde manier worden getest als de monsters van de patiënten. Met de kwaliteits screeningprocedure kan een positief resultaat (agglutinatie) worden verkregen door het plasma in stappen 3-6 te vervangen door de ActiScreen™ XL-FDP - positieve controle. Omgekeerd kan een negatief resultaat (geen agglutinatie) worden verkregen door het plasma in stappen 3-6 te vervangen door de ActiScreen™ XL-FDP - negatieve controle. Bij het uitvoeren van de semi-kwantitatieve procedure wordt aanbevolen seriële verdunningen van de positieve controle uit te testen. De ActiScreen™ XL-FDP latex - positieve controle bestaat uit een oplossing van humane D-dimeren in een concentratie van ongeveer 0,80 mg/l (800 ng/ml).

RESULTATEN

A. Kwalitatieve test

Met de kwalitatieve methode zouden de volgende resultaten moeten worden behaald:

Onverdund plasma	Concentratie van D-dimeren (XL-FDP)				
Negatief	Minder dan 0,20 mg/l (200 ng/ml)				
Positief	Meer dan 0,20 mg/l (200 ng/ml)				
Merk op: Alle waarden in mg/l (ng/ml) zijn approximatief					

B. Semi-kwantitatieve test

Approximatieve concentraties van XL-FDP, die het D-dimeerdomein bevatten, bij dilutie van het specimen worden weergegeven in Tabel 1. Zoals met alle semi-kwantitatieve tests is een zekere variabiliteit van de dosisrespons te verwachten.

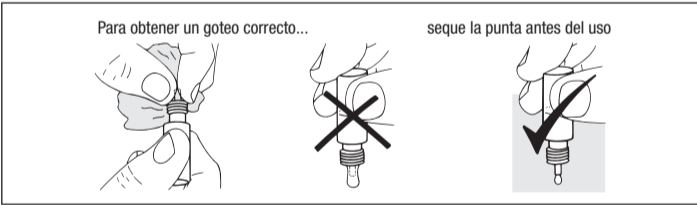
Tabel 1					
Approximatieve spreiding D-dimeren (XL- FDP) mg/l (ng/ml)		Dilutie van het monster			
		Onverdund	1:2	1:4	1:8
<0,20	(<200)	-	-	-	-
0,20 - 0,40	(200 - 400)	+	-	-	-
0,40 - 0,80	(400 - 800)	+	+	-	-
0,80 - 1,60	(800 - 1600)	+	+	+	-
1,60 - 3,20*	(1600 - 3200*)	+	+	+	+

*+ = agglutinatie, "- " = geen agglutinatie

* Concentraties van XL-FDP van meer dan 3,20 mg/l (3200 ng/ml) kunnen worden geraamd door een sterkere verdunning dan 1:8.

Importante!

- Llevar los reactivos a temperatura ambiente (20°C a 25°C) antes del uso.
- El reactivo al látex debe ser mezclado mediante inversión inmediatamente antes del uso.
- Antes de cada uso, se debe limpiar la punta del cuentagotas con una gasa.
- Se debe sujetar el cuentagotas verticalmente mientras se vierten las gotas del reactivo.



Método Cualitativo

- Haga una marca (o tome nota) de las posiciones en la placa de prueba para muestras y, de ser necesario, en las placas para los controles positivo y negativo.
- Sujete el cuentagotas del Reactivo al Látex verticalmente y vierta una gota del reactivo dentro de un pocillo de la placa de prueba. EVITE tocar la superficie de la placa de prueba.
- Pipetee exactamente 20 µl de plasma no diluido o agregue una gota de la solución control dentro del mismo pocillo al lado de la gota del reactivo al látex.
- Mezcle el reactivo al látex y la muestra con un agitador hasta que el látex esté uniformemente distribuido.
- Balancee suave y manualmente la placa de prueba durante exactamente 3 minutos.
- A los 3 minutos exactamente, verifique si existe agglutinación bajo una fuente luminosa potente. Nota: Si la lectura de la prueba se realiza pasados los 3 minutos, la suspensión del látex puede secarse dando un falso patrón de aglutinación. En caso de duda, se debe recomenzar la prueba.
- Deseche la placa de prueba y el agitador en un contenedor para residuos biológicos - no los reutilice.

Método Semicuantitativo

- Prepare diluciones seriadas de plasma a analizar, con la sustancia Tampón como se describe a continuación:
 - Dilución 1/2 : 100 µl de plasma más 100 µl de solución Tampón (Buffer)
 - Dilución 1/4 : 100 µl de la dilución 1/2 más 100 µl de solución Tampón
 - Dilución 1/8 : 100 µl de la dilución 1/4 más 100 µl de solución Tampón
- Examine cada dilución como se ha descrito en el método cualitativo.

Control de Calidad

Se recomienda realizar los controles tanto positivo como negativo en cada lote de pruebas para asegurarse que el sistema funciona correctamente. Las soluciones control deben ser examinadas mediante el mismo tipo de procedimiento que las muestras de los pacientes. Para el método cualitativo, se puede obtener un resultado positivo (aglutinación) reemplazando el plasma por el Control Positivo ActiScreen™ XL-FDP en las etapas 3-6. A la inversa, se puede obtener un resultado negativo (ausencia de aglutinación) reemplazando el plasma por el Control Negativo ActiScreen™ XL-FDP en las etapas 3-6. Cuando se lleva a cabo el procedimiento semicuantitativo, se recomienda examinar una serie de diluciones progresivas del Control Positivo. El Control Positivo de la prueba al látex ActiScreen™ XL-FDP está compuesto de una solución de dímero D humano a una concentración de aproximadamente 0,80 mg/l (800ng/ml).

RESULTADOS

A. Análisis Cualitativo

En el protocolo de análisis cualitativo, se deben obtener los siguientes resultados:

Plasma no diluido	Concentración de dímeros D (XL-FDP)				
Negativo	Menos de 0,20 mg/l (200ng/ml)				
Positivo	Más de 0,20 mg/l (200ng/ml)				
Nota: Todos los valores en mg/l (ng/ml) son aproximativos					

B. Análisis Semicuantitativo

El Cuadro 1 muestra las concentraciones aproximadas de XL-FDP que contienen dímeros D, según las diferentes diluciones de las muestras. Como ocurre con todas las pruebas semicuantitativas, puede existir una cierta variabilidad en la relación dosis-respuesta.

Cuadro 1					
Intervalo aproximado Dímeros D (XL- FDP) mg/l (ng/ml)		Dilución de las muestras			
		No diluidas	1/2	1/4	1/8
<0,20	(<200)	-	-	-	-
0,20 - 0,40	(200 - 400)	+	-	-	-
0,40 - 0,80	(400 - 800)	+	+	-	-
0,80 - 1,60	(800 - 1600)	+	+	+	-
1,60 - 3,20*	(1600 - 3200*)	+	+	+	+

*+ = aglutinación, "- " = ausencia de aglutinación

* Los niveles de concentración de XL-FDP superiores a 3,20 mg/l (3200 ng/ml) pueden ser calculados mediante diluciones superiores más allá de 1:8.

BEPERKINGEN VAN DE PROCEDURE

De klinische diagnose mag niet worden gebaseerd op het resultaat van een ActiScreen™ XL-FDP latex alleen. Bij de diagnostische beslissing moet ook rekening worden gehouden met klinische tekenen en relevante informatie van andere onderzoeken.

VERWACHTE WAARDEN

De ActiScreen™ XL-FDP latex zou een positief resultaat moeten geven, wat getuigt van actieve fibrinolyse, als de concentratie van XL-FDP (D-dimeren) gelijk is aan of hoger dan ongeveer 0,20 mg/l (200 ng/ml). Plasmaspecimens van normale personen zouden negatieve resultaten moeten geven omdat hun plasma-XL-FDP-concentraties typisch lager zijn dan 0,20 mg/l (200 ng/ml). Doordat vele variabelen een invloed kunnen hebben op de resultaten, moet elk laboratorium zijn eigen normale waarden bepalen.

Verhoogde spiegels van XL-FDP (die het D-dimeerdomein bevatten) werden aangetoond bij patiënten met een combinatie van immunoprecipitatie en gelelektroforesetechnieken ^{1-3,5,6}. Met monoklonale antistoffen kan specifiek het D-dimeerdomein worden opgespoord⁷. D-dimeertests op basis van monoklonale antistoffen hebben een diagnostische waarde bij diffuse intravasale stolling (DIC) en acute vaatziekten zoals longembolie (LE) en diepe veneuze trombose (DVT), aandoeningen die moeilijk op betrouwbaar wijze kunnen worden gediagnosticeerd met een klinisch onderzoek^{8,9}.

De hoeveelheid XL-FDP in een specimen hangt in vivo af van meerdere onderling samenhangende factoren zoals de ernst van de trombose, de mate van vorming van gecrosslinkte fibrine en de tijd die is verlopen tussen het trombotische evenement en de bloedname.

Verhoogde XL-FDP-concentraties als aanwijzing voor reactieve fibrinolyse werden waargenomen bij chirurgie, trauma, sikkelcelziekte, leverziekte, ernstige infectie, sepsis, ontsteking en kanker^{(6),11}. De D-dimeerspiegels stijgen ook tijdens een normale zwangerschap, maar zeer hoge concentraties zijn geassocieerd met compliceringen¹².

ActiScreen™ XL-FDP latex reageert niet met fibrinogeen, met factor XIIIa gecrosslinkt fibrinogeen¹³ en fibrinogeenafbraakproducten⁸.

SPECIFIEKE KENMERKEN

Plasma van honderdzeventig (170) ogenschijnlijk gezonde vrijwillige bloeddonoren werd getest met ActiScreen™ XL-FDP latex. Honderdtweeënzestig (162) monsters gaven een negatief resultaat. De specificiteit bedraagt dus 95,3% (162/170).

Honderdvijfenvertig (145) plasmamonsters van patiënten die (met een hoge waarschijnlijkheid) leden aan een trombose, werden getest met ActiScreen™ XL-FDP latex en een andere agglutinatiereferentiemethode. De correlatiecoëfficiënt bedroeg r = 0,94 en de regressievergelijking was y = 1,19x.

De reproduceerbaarheid binnen een zelfde test werd bepaald op 10 kopieën van 3 plasmamonsters die verschillende XL-FDP-concentraties bevatten. De resultaten waren equivalent voor alle kopieën.

De reproduceerbaarheid tussen verschillende tests werd bepaald op 10 plasmamonsters met XL-FDP-titers van 1 tot 16. Bij 10 tests varieerden de kopieën van die specimens met niet meer dan een titer.

In een anticoagulansstudie van 50 parallelle plasmamonsters (citraat, EDTA en heparine) bedreog de correlatie tussen de titers verkregen met de ActiScreen™ XL-FDP latex en de verwachte titers (gebaseerd op ELISA-XL-FDP-waarden) r = 0,91 voor de citraatmonsters, r = 0,73 voor de EDTA-monsters en r = 0,78 voor de heparinemonsters. Citraat is het beste anticoagulans.

In een studie van monsters van patiënten met reumatoïde artritis bleken er 17 te agglutineren met ActiScreen™ XL-FDP latex. In alle 17 monsters kon de agglutinatie worden geïnhibeerd door toevoeging van DD3B6/22, een specifieke monoklonale antistof tegen D-dimeren, maar niet door een specifieke monoklonale antistof van dezelfde subgroep IgG₃. Dat suggereert dat ActiScreen™ XL-FDP latex niet gevoelig is voor interfererende door reumafactor.

Er werd geen interferentie met ActiScreen™ XL-FDP latex aangetoond met experimentele monsters die potentiële interfererende stoffen bevatten in de volgende concentraties:

Bilirubine	0,2 mg/ml	Hemoglobine	5,0 mg/ml
Lipiden (triglyceriden)	30 mg/ml	Eiwit (gammaglobuline)	0,06 g/ml

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

El diagnóstico clínico no debe basarse exclusivamente en el resultado de la prueba al látex ActiScreen™ XL-FDP. La decisión diagnóstica deberá tener en cuenta los signos clínicos y la información aportada por los otros análisis complementarios relevantes.

VALORES ESPERADOS

Un resultado positivo, que indica fibrinolisis activa, se observa con la prueba al látex ActiScreen™ XL-FDP cuando los niveles de concentración de XL-FDP (dímeros D) son iguales o superiores a 0,20 mg/l (200 ng/ml), aproximadamente. Se considera que las muestras de plasma pertenecientes a sujetos normales darán resultados negativos porque sus concentraciones plasmáticas de XL-FDP son generalmente inferiores a 0,20 mg/l (200 ng/ml). Dado las numerosas variables que pueden alterar estos resultados, cada laboratorio de análisis debe establecer sus propios valores normales.

Se demostraron niveles de concentración aumentados de XL-FDP (que contienen dímeros D) en pacientes mediante una combinación de técnicas de inmunoprecipitación y electroforesis en medio gelatinoso^{1-3,5,6}. Los anticuerpos monoclonales permiten la detección específica de los dímeros D⁷. Los análisis de dímeros D basados en anticuerpos monoclonales presentan un valor diagnóstico en la coagulación intravascular diseminada (CID) y afecciones agudas vasculares, que incluyen embolia pulmonar (EP) y trombosis venosa profunda (TVP), patologías difíciles de diagnosticar mediante el examen clínico^{8,9}.

La cantidad de XL-FDP detectada en una muestra dependerá de varios factores interrelacionados in vivo, como ser la gravedad del cuadro tromبótico, la tasa de formación de la fibrina con enlaces cruzados, y el tiempo transcurrido entre el comienzo del episodio tromبótico y el momento de la extracción de sangre del paciente.

Se han informado niveles elevados de XL-FDP, indicativos de fibrinolisis reactiva, en cirugía, traumatismos, drepanocitosis, hepatopatías, infección severa, sepsis, inflamación, y cáncer^{(6),11}. Los niveles de dímeros D aumentan también durante el embarazo normal pero niveles realmente muy altos se observan en caso de complicaciones¹².

La prueba al látex ActiScreen™ XL-FDP no produce reacciones cruzadas con el fibrinógeno, factor XIIIa, fibrinógeno con enlaces cruzados¹³, o productos de degradación del fibrinógeno ⁸.

CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DE RENDIMIENTO

Se analizó el plasma de ciento setenta (170) donadores voluntarios en buena salud aparente, utilizando ActiScreen™ XL-FDP látex. Se obtuvo un resultado negativo en ciento sesenta y dos (162) muestras. Estos resultados representan una especificidad del 95,3% (162/170).

Ciento cuarenta y cinco (145) muestras de plasma provenientes de pacientes afectados de un episodio tromبótico - o con alta probabilidad de padecerlo -, fueron analizadas con ActiScreen™ XL-FDP látex y otro método de aglutinación de referencia. El coeficiente de correlación fue de r = 0,94 y la ecuación de regresión fue y = 1,19x.

La reproducibilidad intra-análisis (dentro de una misma serie de análisis) fue determinada mediante 10 réplicas de 3 muestras de plasma que contenían diferentes niveles de XL-FDP. Los resultados fueron equivalentes para todas las réplicas.

La reproducibilidad inter-análisis (entre las diferentes series de análisis) fue determinada utilizando 10 muestras de plasma con títulos de XL-FDP que variaban de 1 a 16. En 10 series, las réplicas de estas muestras no mostraron variaciones de más de un título.

En un estudio sobre anticoagulación de 50 muestras paralelas de plasma tratado con citrato de sodio, EDTA y heparina, la correlación entre los títulos obtenidos con ActiScreen™ XL-FDP látex y los títulos esperados (basados en los valores ELISA XL-FDP) fue de r = 0,91 para las muestras tratadas con citrato de sodio, r = 0,73 para las muestras tratadas con EDTA y r = 0,78 para las muestras tratadas con heparina. El citrato de sodio es el anticoagulante de elección.

En un estudio con muestras provenientes de pacientes con artritis reumatoidea, se halló que en 17 casos se produjo una aglutinación con ActiScreen™ XL-FDP látex. En cada una de las 17 muestras, la aglutinación pudo ser inhibida mediante el agregado de anticuerpo monoclonal específico de dímero D DD3B6/22, pero no con un anticuerpo monoclonal no específico del mismo subgrupo, IgG₃. Esto sugiere que no existe interacción entre ActiScreen™ XL-FDP látex y el factor reumatoideo.

No se constató interacción con ActiScreen™ XL-FDP látex en muestras a las que se les agregó sustancias potencialmente interferentes a las siguientes concentraciones:

Bilirubina	0,2 mg/ml	Hemoglobina	5,0 mg/ml
Lípidos (triglicéridos)	30 mg/ml	Proteína (gamaglobulina)	0,06 g/ml



