	INSTRUCTIVO PARAMETRIZADO	VERSION: 6
		CODIGO: IT-HE-02
Anticoagulante lupico		FECHA: 20/Sep/2024

1. Objeto

Dar a conocer la forma correcta de procesar la prueba de anticoagulante lúpico.

2. Alcance

Bacteriólogos de la sede Tesoro que procesan en el área de hematología y coagulación.

3. Propósito del análisis

Se conoce con el nombre de anticoagulante lúpico a un grupo heterogéneo de anticuerpos que van dirigidos contra fosfolípidos de carga negativa o contra complejos formados entre fosfolípidos y proteínas (Beta 2 -glicoproteína 1 o factores de coagulación como la protrombina) estos anticoagulantes interfieren con las pruebas de coagulación en las que participan los fosfolípidos tales como el TTPa, el test de veneno de víbora de Russell diluido y el test de Silica Clotting Time.

Pacientes con anticoagulante lúpico tienen un mayor riesgo de sufrir manifestaciones tromboticas y abortos a repetición.

De acuerdo con la guía ISTH 2020 "Guidance from the Scientific and Standardization Committee for lupus anticoagulant/antiphospholipid antibodies of the International Society on Thrombosis and Haemostasis", la prueba esta indicada bajo las siguientes condiciones:

- . Pacientes con trombosis venosa y/o arterial espontanea antes de los 50 años sin causa conocida (no provocado)
- . Pacientes con trombosis en sitios inusuales
- . Pacientes < 50 años con isquemia cerebral o trombosis arterial.
- . Trombosis recurrente no explicada por anticoagulación subterapéutica, no adherencia al tratamiento, malignidad
- . Morbilidad en el embarazo
- . Trombosis o complicaciones obstétricas en pacientes con enfermedades autoinmunes (LES, artritis reumatoide, trombocitopenia autoinmune , anemia hemolítica autoinmune)
- . Pacientes con TTPa prolongado como hallazgo incidental
- . Pacientes > 50 años sin manifestaciones clínicas y criterios no incluidos como enfermedad valvular y evidencia de enfermedad autoinmune sistémica.
- . Pacientes < 50 años tromboembolismo Venoso provocado por factor ambiental leve.

Debe realizarse por dos técnicas que evalúen vías distintas de la coagulación.

Ensayo: Coagulométrico

Temperatura de Reactivos (A bordo): 12 °C - 15 °C

Temperatura de Reacción: 37 °C ± 1 °C

4. Principio

Las pruebas dRVVT (Veneno de víbora de Russell) y silica clotting time son productos de diagnóstico in-vitro cualitativos utilizados para la detección de anticoagulantes Lúpicos en plasma humano citratado.

. Veneno de víbora de Russell (dRVVT)

Ensayo: Coagulométrico

Temperatura de Reactivos (A bordo): 12 °C - 15 °C

Temperatura de Reacción: 37 °C ± 1 °C

Composición del reactivo: El reactivo dRVVT Screen es pobre en fosfolípidos, lo que le hace sensible al anticoagulante lúpico. La cantidad adicional de fosfolípidos presente en el dRVVT Confirm neutraliza al anticoagulante lúpico dando tiempos de coagulación mas cortos. El veneno de víbora de Russell en presencia de calcio activa directamente al factor X por esto no se ve afectada por deficiencias de factores como VII, VIII y IX.

dRVVT Screen y Confirm: está compuesto por veneno de víbora de Russell, fosfolípidos, calcio, polibrene, estabilizantes, colorantes y conservantes.

. Silica Clotting Time (SCT)

Ensayo: Coagulométrico

Temperatura de Reactivos (A bordo): 12 °C - 15 °C

Temperatura de Reacción: 37 °C ± 1 °C

El reactivo SCT Screen es pobre en fosfolípidos, lo que le hace sensible al anticoagulante lúpico. La cantidad adicional de fosfolípidos presente en el SCT Confirm neutraliza al anticoagulante lúpico dando tiempos de coagulación más cortos. SCT en presencia de calcio activa directamente la vía intrínseca de la coagulación por ello no se ve afectada por deficiencias de factores como VII.

SCT Screen: está compuesto por sílica coloidal, tampón con conservantes.

SCT Confirm: está compuesto por sílica coloidal, fosfolípidos sintéticos, tampón con conservantes.

5. Especificaciones de desempeño

Precisión:

Se realizó bajo condiciones de repetibilidad utilizando el mismo lote de reactivo y precisión intermedia cambiando algunas de estas variables, se utilizaron dos niveles de controles. Como meta analítica se empleó el error establecido por casa matriz.

NIVEL	REPETIBILIDAD	PRESICION INTERMEDIA
Verificación dRVVRT Screen ACL TOP		
Nivel 1	X: 1,07 DS: 0,02 CV: 1,78	X: 1,08 DS: 0,05 CV: 4,68
Nivel 2	X: 2,22 DS: 0,07 CV: 2,97	X: 2,27 DS: 0,12 CV: 5,13
Validación del proveedor Dímero D HS 500A ACL TOP		
Nivel 1	X: 1,01 CV: 0,8	CV: 0,9
Nivel 2	X: 1,67 CV: 0,8	CV: 1,2

NIVEL	REPETIBILIDAD	PRESICION INTERMEDIA
Verificación dRVVRT Confirm ACL TOP		
Nivel 1	X: 1,08 DS: 0,02 CV: 1,95	X: 1,14 DS: 0,07 CV: 6,45
Nivel 2	X: 2,15 DS: 0,07 CV: 3,08	X: 2,24 DS: 0,16 CV: 7,07
Validación del proveedor Dímero D HS 500A ACL TOP		
Nivel 1	X: 1,01 CV: 0,8	CV: 0,9
Nivel 2	X: 1,67 CV: 0,8	CV: 1,2

NIVEL	REPETIBILIDAD	PRESICION INTERMEDIA
Verificación SCT Screen ACL TOP		
Nivel 1	X: 1,12 DS: 0,02 CV: 1,75	X: 1,07 DS: 0,03 CV: 2,69
Nivel 2	X: 3,21 DS: 0,10 CV: 3,12	X: 3,25 DS: 0,18 CV: 5,63
Validación del proveedor Dímero D HS 500A ACL TOP		
Nivel 1	X: 1,8 CV: 3,6	CV: 4,7
Nivel 2	X: 2,2 CV: 3,4	CV: 5,4

NIVEL	REPETIBILIDAD	PRESICION INTERMEDIA
Verificación SCT Confirm ACL TOP		
Nivel 1	X: 0,95 DS: 0,02 CV: 2,27	X: 0,95 DS: 0,03 CV: 3,56
Nivel 2	X: 2,69 DS: 0,08 CV: 3,1	X: 2,65 DS: 0,19 CV: 7,21
Validación del proveedor Dímero D HS 500A ACL TOP		
Nivel 1	X: 1,8 CV: 3,6	CV: 4,7
Nivel 2	X: 2,2 CV: 3,4	CV: 5,4

6. Tubos utilizados

Recoja la muestra utilizando los procedimientos estándar:

. Plasma Citratado: mezclar el anticoagulante con la muestra suavemente por inversión de 3 a 5 veces, antes de centrifugar se debe revisar la muestra para observar la presencia de coágulos.

7. Muestra utilizada

Obtener del paciente a estudiar plasma con citrato de sodio, centrifugar 15 min a 3000 RPM separar inmediatamente el plasma con pipeta plástica nueva y volver a centrifugar 15 min a 3000 RPM, separar con pipeta nueva y congelar en la gradilla destinada para guardar anticoagulante lúpico.

Las muestras que presenten hemólisis, ictericia o lipemia, excesivas no deberán ser utilizadas ya que pueden dar falsos resultados.

Las muestras pueden permanecer a temperatura ambiente durante máximo 4 h, si durante este tiempo no se procesa se debe separar el plasma y almacenar en congelación a -20 °C donde es estable por tres meses, o a -70 °C por seis meses.

Para el procesamiento de las muestras se deben descongelar por choque térmico a 37 °C por 5 minutos y realizar el montaje de inmediato.

8. Equipos y reactivos requeridos

Instrumento de medición: ACL Elite pro en la sede centro y ACL TOP en la sede Tesoro.

Reactivo: dRVVT Screen y Confirm, Silica Clotting Time Screen y Confirm.

*Ver composición en el numeral 4

Preparación del reactivo: Temperar 10 min a temperatura ambiente (entre 15 °C y 25 °C), pasado este tiempo, disolver el contenido de cada vial con 2 mL de agua destilada tipo CLR de acuerdo a CLSI (de ampolla de presentación 5 mL), cerrar el vial e invertir suavemente para asegurar la completa disolución del producto. Mantener el reactivo en reposo a temperatura ambiente (entre 15 °C y 25 °C) durante 30 min. Mezclar por inversión del vial antes de su uso. No agitar.

Conservación y Estabilidad del reactivo:

dRVVT Screen y Confirm:

. Estabilidad antes de ser reconstituídos: el reactivo es estable hasta la fecha de caducidad indicada en el vial, si se mantienen entre 2 °C-8 °C.

. Estabilidad después de la reconstitución:

- * 15 días a 2 °C-8 °C
- * 3 días a 15 °C en los sistemas ACL.
- * NO congelar

Silica Clotting Time Screen y Confirm

Estabilidad antes de ser reconstituídos: el reactivo es estable hasta la fecha de caducidad indicada en el vial, si se mantienen entre 2 °C-8 °C.

. Estabilidad después de la reconstitución:

- * 20 días a 2 °C-8 °C
- * NO congelar

. **Calibración de la prueba:** esta prueba no requiere calibración.

. **Manejo de los controles de calidad:**

Se utilizan 2 controles uno positivo y otro negativo.

Para preparar el control de calidad, se deben retirar de la nevera los viales, se dejan a temperatura ambiente (entre 15 °C - 25 °C) por 10 minutos antes de reconstituir; reconstituir con 1mL de agua destilada tipo CLR de acuerdo a CLSI (de ampolla de presentación 5 mL), cerrar el vial e invertir suavemente para asegurar la completa disolución del producto. Dejar en reposo 30 min a temperatura ambiente (entre 15 °C - 25 °C), invertir los viales 2 veces y dejar en reposo a temperatura ambiente (entre 15 °C - 25 °C) 15 minutos antes de su uso.



. Revisión de resultados:

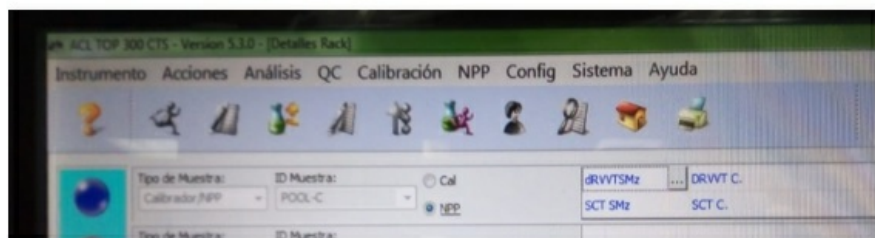
Los resultados de control de calidad se revisan por el Icono QC, en la opción gráfico y estadísticas se visualiza el gráfico Levey-Jennings, se puede visualizar también el listado de resultados.

Los resultados del control se deben analizar del mismo modo que las muestras de los pacientes. Si los resultados del control de calidad están fuera del intervalo aceptable, investigar las causas antes de decidir si informar o no los resultados de los pacientes.

Digitar los datos obtenidos en el programa Unity Real time, en este sistema se debe verificar el desempeño en las gráficas integradas de control de calidad (Levey-Jennings y Error total) tomar medidas si es necesario. Para la valoración de la dispersión se emplea el método más clásico (Levey Jennings), se establece una media y una desviación estándar y coeficiente de variación. En coagulación se admiten ± 2 desviaciones estándar de la media. El coeficiente de variación para el Fibrinógeno ≤ 20 %, se establecen límites de desempeño de acuerdo al estándar de CLIA.

Control de plasma normal para realizar las mezclas.

Se dispensan 300 μ L de plasma control normal en una copilla y se programan las siguientes pruebas:



Para aceptar el control debe cumplir con estos criterios:

- Los valores con el reactivo de vibora de Russell deben estar cercanos a los 38 s y con Silica Clotting Time a los 40s en la prueba Screen.
- En el dRVVTSM se espera que este de 2 a 4 segundos por encima del dRVVTC.
- El SCT SMz y el SCT C se espera que den valores similares

Conservación y Estabilidad del Control:

- Estabilidad antes de ser reconstituidos: el reactivo es estable hasta la fecha de caducidad indicada en el vial, si se mantienen entre 2 °C-8 °C.
- Estabilidad después de la reconstitución: 24 horas de 2 °C-8 °C en el vial original.

9. Interpretación

De acuerdo a las ultimas recomendaciones internacionales se deben realizar Dos test basados en diferentes principios uno sería el dRVVT como primer test considerado y el segundo test debe ser TTPa sensible (Apropiada composición y baja concentración de fosfolípidos) y se prefiere la sílica como activador, por esta razón se utiliza la SCT como segunda prueba.

Para fijar el valor del cutt off normal propio se realiza el siguiente análisis:

Para Sílica Clotting Time

Donante	aPTT segundos	Sílica s segundos	Sílica s ratio	Sílica c segundos	Sílica c ratio
Ambulatorio 1	28,3	36,7	1,04	33,7	1,08
Yessenia	28,5	39,8	1,12	32,8	1,05
Ambulatorio 3	28,0	37,0	1,05	32,4	1,04
Ambulatorio 6	28,3	37,8	1,07	32,4	1,04
11214002705	27,0	36,4	1,03	31,6	1,01
11214003805	23,6	31,2	0,88	32,7	1,04
11214014105	27,8	35,5	1,00	31,5	1,01
11215043005	30,0	38,2	1,08	36,6	1,17
11215042105	30,6	40,9	1,16	35,3	1,13
11215023505	26,3	31,5	0,89	30,4	0,97
1121501105	26,3	30,1	0,85	30,0	0,96
1121200405	24,2	29,7	0,84	28,7	0,92
11210008505	24,0	29,6	0,84	29,3	0,94
Elizabeth	30,2	39,6	1,12	35,1	1,12
Juan Dueñas	30,0	35,5	1,00	35,7	1,14
11216001805	30,7	36,7	1,04	35,2	1,12
PROMEDIO	27,74	35,39	0,52	32,71	0,54
DS	2,35	3,78	0,51	2,41	0,53
Percentil 99	30,69	40,74	1,15	36,47	1,16

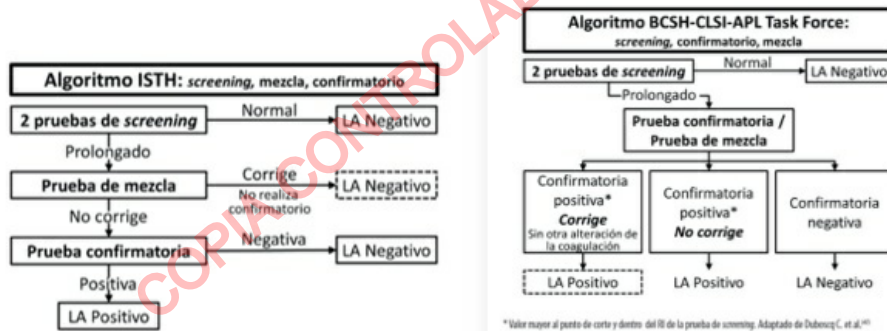
Para dRVVT

Donante	aPTT segundos	dRVVt s segundos	dRVVt s ratio	dRVVt c segundos	dRVVt c ratio
Ambulatorio 1	28,3	35,3	0,96	28,8	0,95
Deisy	30,5	37,8	1,02	29,1	0,96
Juan Dueñas	30,0	36,3	0,98	27,9	0,92
Kathe Granado	33,0	36,7	0,99	29,9	0,99
Luisa secre	29,6	38,0	1,03	29,5	0,97
Ambulatorio 7	32,6	37,3	1,01	27,5	0,91
Ambulatorio 3	28,0	37,6	1,02	26,9	0,89
Ambulatorio 4	31,8	37,8	1,02	28,6	0,94
Ambulatorio 5	33,8	37,7	1,02	28,5	0,94
Ambulatorio 8	34,1	36,4	0,99	29,5	0,97
11214002705	27,0	35,0	0,95	27,4	0,90
11214003805	23,6	38,5	1,04	30,6	1,01
11214014105	27,8	38,1	1,03	30,0	0,99
11214023305	30,4	37,1	1,01	26,2	0,86
11215023505	26,3	33,8	0,92	27,3	0,90
11215001005	30,1	37,1	1,01	30,8	1,02
PROMEDIO	29,81	36,91	0,52	28,66	0,49
DS	2,89	1,28	0,51	1,36	0,48
Percentil 99	34,06	38,44	1,04	30,77	1,01

La prueba se programa en el instrumento ACL TOP como dRVVT screen y SCT screen el equipo esta programado para realizar las pruebas complementarias de acuerdo a este esquema:

Como plasma pool se utilizará control Normal.

10. Algoritmos



Estos son los posibles algoritmos que se presentan en la literatura para la interpretación de la prueba, en nuestra institución llevamos a cabo la interpretación basándonos en el algoritmo ISTH 2022, y las recomendaciones de la guía y BSH 2024.

Se debe cumplir con 3 criterios que indican la positividad

- 1 - Prolongación de una prueba de coagulación dependiente de fosfolípidos. (Prueba Screen positiva por cualquiera de las dos metodologías)
- 2- Demostración de la presencia de un inhibidor mediante pruebas de mezcla. (Prueba de mezclas positiva)
- 3- Demostración de la dependencia de los fosfolípidos del inhibidor. (prueba confirm positiva)

En ese orden de ideas procedemos a realizar la prueba en cadena las metodologías se realizan de manera independiente y un resultado positivo por cualquiera de las dos se considera positiva así:

- dRVVTs > 1.2 realizar dRVVT sm si este es >1.2 realizar dRVVTc y dRVVTcm
- SCTs > 1.16 realizar SCT sm si este es >1.16 realizar SCTc y SCTcm

Tendremos los siguientes escenarios:

- dRVVTs < 1.2 y SCTs < 0.16 : Negativo para anticoagulante lúpico
- dRVVTs > 1.2, dRVVTsm <1.2 y/o SCTs > 0.16 SCTsm < 0.16 : Negativo para anticoagulante lúpico
- dRVVTs > 1.2, dRVVTsm > 1.2, dRVVTc > 1.2 dRVVTcm < 1.2 y/o SCTs > 0.16 SCTsm > 0.16, SCTc >1.16, SCTcm <1.16 : Positivo en plasma puro y negativo en estudios de mezcla; no se puede excluir un anticoagulante lúpico débil debido a un posible efecto de dilución.
- dRVVTs > 1.2, dRVVTsm > 1.2, dRVVTc > 1.2 dRVVTcm > 1.2 y/o SCTs > 0.16 SCTsm > 0.16, SCTc >1.16, SCTcm >1.16 : Positivo para

anticoagulante lúpico

- dRVVTs > 1.2, dRVVTsm > 1.2, dRVVTc < 1.2 dRVVTcm > 1.2 y/o SCTs > 0.16 SCTsm > 0.16, SCTc < 1.16, SCTcm > 1.16: Positivo para anticoagulante lúpico, se sospecha un inhibidor de alta potencia lo que da lugar a un efecto prozona en la prueba.

. Siempre debemos colocar en el reporte todas las notas precodificadas que están en la plantilla.

11. Limitaciones/Interferencias

Los estudios de interferencias se llevaron a cabo en un analizador de las Familias de Coagulómetros de IL que aparecen en la siguiente lista. Diferentes concentraciones de productos interferentes se añadieron a un pool de plasmas normal, a un plasma con AL débilmente positivo y a un plasma con AL positivo alto.

Los resultados demostraron que los resultados de los ensayos dRVVT Screen y dRVVT Confirm no se afectaban por las siguientes concentraciones de materiales interferentes:

Hemoglobina Hasta 200 mg/dL Bilirrubina Hasta 10 mg/dL Triglicéridos Hasta 500 mg/dL Heparina NF Hasta 1 U/mL Heparina BPM Hasta 1 U/mL en la Familia ACL TOP.

Los resultados demostraron que los resultados de los ensayos SCT Screen y SCT Confirm no se afectaban por las siguientes concentraciones de materiales interferentes:

Bilirrubina Hasta 30 mg/dL Triglicéridos Hasta 850 mg/dL

Falsos positivos	Falsos negativos
Un aumento de Proteína C reactiva (PCR) puede tener interferencia con el resultado del anticoagulante lúpico, ya que tiene afinidad por los fosfolípidos presentes en el reactivo.	Cuando se realiza una toma de muestra en la fase aguda posterior a un evento trombótico o un proceso infeccioso genera un aumento de factor VIII lo que puede acortar el TTPa, y por ende el resultado de AL.
La terapia anticoagulante con heparinas tanto no fraccionada (HNF), como heparinas de bajo peso molecular (HBPM) cuando los niveles de anti-Xa son supra terapéuticos, los resultados positivos de LA deben interpretarse con cuidado.	El efecto de la congelación y descongelación de la muestra puede dar lugar a deterioro de los anticuerpos.
Uso de antagonistas de la vitamina K (AVK).	La hemólisis, la ictericia y la lipemia afectan principalmente al TTPa, lo que da como resultado un TTPa falsamente normal en las muestras hemolizada, y por ende el resultado de AL.
Uso de anticoagulantes orales directos o DOAC.	La dilución (1: 1) del plasma de prueba en plasma normal combinado reducirá en un 50 % la potencia del AL en el plasma del paciente. Por lo tanto, es posible que un AL débil se pierda en el momento del diagnóstico cuando se utiliza únicamente una prueba de mezcla.

12. Precauciones de seguridad

Tome precauciones cuando manipule materiales y muestras de origen humano. Como ningún método de ensayo puede ofrecer una seguridad completa sobre la ausencia de agentes infecciosos, considere todas las muestras, controles y calibradores clínicos como potencialmente infecciosos. Manipule las muestras, los residuos sólidos y líquidos, así como los componentes del ensayo de acuerdo con las pautas de seguridad de riesgos biológicos.

13. Fuentes potenciales de variabilidad

La principal causa de variación en estos casos es la terapia anticoagulante en el paciente, de manera ideal no se debe realizar la prueba si el paciente está anticoagulado, pero en caso de que sea mandatorio realizar la prueba se debe realizar lo siguiente:

. **En caso de terapia con Warfarina:** se debe realizar entre la semana 1 y 2 luego de suspender el medicamento, se puede considerar migrar a la terapia con heparinas de bajo peso molecular.

. **En caso de terapia con heparina:** realizar la prueba después de 12 horas posterior a la última dosis de heparina.

. **Terapia con anticoagulantes orales o DOACS:** tomar la muestra a las 48 horas posterior a la última dosis.

"Siempre se debe informar la presencia de la terapia anticoagulante en el reporte"

También se puede dar interferencia si la prueba se realiza durante el embarazo por ello se debe confirmar a las 6 semanas post parto y luego a los 3 meses post parto.

14. Bibliografía

. Katrien M. J. Devreese, et all. Guidance from the Scientific and Standardization Committee for lupus anticoagulant/antiphospholipid antibodies of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. Update of the guidelines for lupus anticoagulant detection and interpretatio. First published: 29 October 2020. <https://doi.org/10.1111/jth.15047>

. Instrumentation Laboratory Company. HemosILT. Inserto dRVVT Scrr/ dRVVT Confirm.

. Instrumentation Laboratory Company. HemosILT. Inserto Silica Clotting Time.

Si este documento se encuentra impreso no se garantiza su vigencia, por lo tanto es copia NO CONTROLADA, la versión actual se encuentra en Isolución

VERSION	FECHA	RAZON DE LA ACTUALIZACION
01	28/Jul/2009	Se modifica cantidad a guardar en alicuotas y se borra dias de procesamiento.
02	24/Ago/2011	Se adiciona conservación del reactivo en el parrafo de preparación del reactivo.
02	30/Sep/2013	Se revisa el documento y no es necesario realizar cambios.
02	15/Ene/2015	Se revisa el documento y no es necesario modificarlo.
02	20/Ene/2016	Se revisa y no se modifica
02	19/Feb/2017	Se revisa y no se modifica.
02	13/Feb/2020	Se revisa y no se modifica.
03	25/Mar/2019	Se adiciona propósito del análisis y especificaciones de desempeño.
03	24/Nov/2020	Se revisa y no se modifica.
04	21/Ene/2022	Se ajusta too el documento por cambio en la metodología.
05	06/Oct/2022	Se adiciona el punto 10 interferencia, se cambia el titulo de interferencias por Limitaciones/interferencias y queda como punto 11. Se adiciona cuadro de falsos positivos y falsos negativos. Se retira flujograma de solicitud de prueba de anticoagulante lúpico.
05	16/Ene/2023	Se revisa y no se modifica.
05	04/Ene/2024	Se revisa y no se modifica
06	23/Sep/2024	Se modifica la interpretación de la prueba basada en la guia BSH 2024 Se cambia el titulo de interferencias por algoritmos, se adiciona interpretación de efecto prozona.
06	20/Ene/2025	Se revisa y no se modifica.



ELABORO	REVISO	APROBO
Nombre: Yulime Andrea Monsalve Martinez Cargo: Dirección de Calidad Fecha: 20/Sep/2024	Nombre: Xiomara Gutierrez Cargo: Bacteriólogo(a) de Hematología Tesoro Fecha: 20/Sep/2024	Nombre: Carlos Gonzalo Robledo Restrepo Cargo: Director General Fecha: 23/Sep/2024