

**Aplicação Prevista**

O HemosIL D-Dimer HS é um imunoenensaio melhorado com latex e automatizado para a determinação quantitativa do D-Dímero no plasma humano citratado no ACL TOPTM para utilização, em associação com um modelo de avaliação da probabilidade clínica pré-teste (PTP) para exclusão de tromboembolismo venoso (TEV) em doentes em ambulatório com suspeita de trombose venosa profunda (TVP) e tromboembolismo pulmonar (TEP)

**Resumo e Princípio**

A degradação da fibrina estabilizada pelo Factor XIIIa, por plasmina, cria uma série de derivados solúveis que contêm D-Dímero (XDP).<sup>1</sup> Quando a plasmina, uma protease sérica, não está em presença de inibidores, digere a fibrina entrelaçada criando uma grande variedade de derivados solúveis cujos pesos moleculares dependem da extensão da digestão. Estes produtos solúveis da degradação contêm um neo-antígeno (domínio D-Dímero) que não está presente na molécula original de fibrinogénio, nos seus produtos de degradação, nem na fibrina solúvel.<sup>2,3</sup> A determinação de D-Dímero é cada vez mais utilizada para o diagnóstico de trombose e para a monitorização de terapêuticas trombolíticas.<sup>4</sup> Algumas são a trombose venosa profunda (TVP), o embolismo pulmonar (EP) e a coagulação intravascular disseminada (CID).<sup>5</sup> Durante uma gravidez normal os níveis de D-Dímero aumentam, mas muito menos do que numa gravidez associada a complicações.<sup>6</sup>

Um resultado de D-Dímero negativo, associado a uma avaliação clínica de baixa probabilidade pré-teste, demonstrou ter um valor preditivo negativo elevado para TVP ou EP.<sup>7-13</sup>

O Reagente Látex D-Dímero HS é uma suspensão de partículas de látex de poliestireno de tamanho uniforme, às quais se juntou o fragmento F(ab)<sub>2</sub> de um anticorpo monoclonal altamente específico contra o domínio D-Dímero contido nos derivados solúveis da fibrina. A utilização do fragmento F(ab)<sub>2</sub> permite uma detecção mais específica do D-Dímero evitando a interferência de alguns factores endógenos, tal como o Factor Reumatóide. Quando se mistura um plasma, que contenha D-Dímero, com o Reagente Látex e o Tampão de Reacção, as partículas aglutinam. O grau de aglutinação é directamente proporcional à concentração de D-Dímero presente no plasma. Os agregados provocam uma descida da luz transmitida (imunoenensaio turbidimétrico).<sup>14</sup>

**Composição**

O kit D-Dimer HS (D-Dímero HS) é composto por:

- [R] Latex Reagent** (Núm. Cat.0020007720): recipientes 3 x 2 mL de uma suspensão de partículas de látex de poliestireno, às quais se juntou o fragmento F(ab)<sub>2</sub> de um anticorpo monoclonal (MA-8D3) específico contra o D-Dímero. Apresenta-se liofilizado. Contém albumina de soro bovino, tampão, estabilizadores e conservante.
- [B] Reaction Buffer** (Núm. Cat.0020007721): recipientes 3 x 8 mL de um tampão fosfato que contém albumina de soro bovino, estabilizadores e conservante.
- [C] D-Dimer Calibrator** (Núm. Cat.0020007722): recipientes 2 x 1 mL de uma dissolução de D-Dímero parcialmente purificado a partir de fibrina humana digerida com plasmina. Apresenta-se liofilizado. Contém albumina de soro bovino, conservante e estabilizadores.

**AVISOS E PRECAUÇÕES:**

O material utilizado neste produto foi analisado com testes aprovados pela FDA e verificou-se a ausência de reacção ao Antígeno de Superfície da Hepatite B (HBsAg), aos anticorpos anti-HCV e anti-HIV 1/2. No entanto, deve-se manipular com precaução, como potencialmente infeccioso.<sup>15</sup>

O Tampão de Reacção contém azida sódica (0,1%), que pode provocar reacções com os tubos metálicos, dando lugar a azidas altamente explosivas. Tomar as devidas precauções quando se proceder à sua eliminação.

Evitar o contacto com a pele e os olhos (S 24/25). Não deitar os resíduos no esgoto (S 29). Usar vestuário de protecção adequado (S 36).

Para uso em diagnóstico *in vitro*.

**Preparação**

**Latex Reagent:** Dissolver o conteúdo do recipiente com 2 mL de água tipo CLRW segundo o CLSI (anteriormente NCCLS) ou equivalente.<sup>16</sup> Tapar o recipiente e homogeneizar suavemente. Verificar se o produto fica completamente dissolvido. Conservar o reagente entre 15-25°C durante 30 minutos. Misturar invertendo suavemente o recipiente antes de utilizar. Não agitar.

**Reaction Buffer:** Misturar invertendo suavemente o recipiente. O reagente está pronto a ser utilizado. Não agitar.

**D-Dimer Calibrator:** Dissolver o conteúdo do recipiente com 1 mL de água tipo CLRW segundo o CLSI (anteriormente NCCLS) ou equivalente.<sup>16</sup> Tapar o recipiente e homogeneizar suavemente. Verificar se o produto fica completamente dissolvido. Conservar o reagente entre 15-25°C durante 30 minutos. Misturar invertendo suavemente o recipiente antes de utilizar. Não agitar.

Nota: Evitar a formação de espuma quando proceder à homogeneização dos reagentes e do calibrador reconstituídos. Bolhas no cimo do líquido, podem interferir com os sensores de líquido do aparelho.

**Conservação e estabilidade dos reagentes**

Os reagentes fechados, que ainda não foram utilizados, são estáveis até ao final do prazo de validade, que consta no rótulo, desde que conservados entre 2-8°C.

**Latex Reagent** - Estabilidade após reconstituição: 1 mês a 2-8°C no recipiente original ou 4 dias a 15°C no ACL TOP. Não congelar

**Reaction Buffer** - O reagente aberto é estável durante 1 mês a 2-8°C no recipiente original ou 4 dias a 15°C no ACL TOP.

**D-Dimer Calibrator** - Estabilidade após reconstituição: 3 dias a 15-25°C, 1 mês a 2-8°C ou 2 meses a -20°C no recipiente original. O calibrador pode ser descongelado a 37°C. Homogeneizar suavemente antes de utilizar. Não voltar a congelar.

Para obter uma estabilidade óptima retire os reagentes do aparelho e conserve-o entre 2-8°C, nos recipientes originais.

**Método de ensaio**

Seguir as instruções da técnica de acordo com o Manual do Operador e/ou com o Manual de Aplicações dos Instrumentos IL.

**Recolha e preparação da amostra**

Adicionar nove partes de sangue extraído recentemente por punção venosa a uma parte de citrato trissódico. Para efectuar a recolha, o manuseamento é a conservação da amostra devem seguir-se as recomendações referidas no documento H21-A4 da CLSI.<sup>17</sup>

Caso as amostras tenham sido congeladas, deverão ser descongeladas rapidamente a 37°C e deverão ser centrifugadas antes de serem analisadas. O ensaio deverá ser efectuado antes de terem passado 2 horas da sua descongelação e centrifugação.

**Reagentes adicionais e plasmas de controlo**

Este kit não inclui os produtos abaixo mencionados, pelo que deverão ser pedidos em separado:

Controlos de D-Dímero Núm. Cat. 0020008610

Diluinte de factores Núm. Cat. 0009757600

**Controlo de Qualidade**

Para realizar um programa completo de Controlo de Qualidade, recomenda-se a utilização de dois níveis de controlo.<sup>18</sup> Os controlos adequados para este programa são D-Dímero Controlos Baixo e Alto. Cada laboratório deve estabelecer a sua própria média e desvio padrão e deve efectuar um programa de controlo de qualidade para monitorizar os seus resultados. Os controlos devem ser analisados uma vez em cada turno de 8 horas, de acordo com a norma vigente no Laboratório. Ver Manual do Operador para mais informações. Consultar a publicação de Westgard e col. para identificar e solucionar situações anormais do Controlo de Qualidade.<sup>19</sup>

**Rastreabilidade dos calibradores e materiais de controlo**

Os valores referidos foram determinados através de diversas análises efectuadas nos Sistemas de Coagulação da IL, utilizando um lote específico de reagente e comparando com um Padrão interno da IL. Como o Padrão Internacional D-Dímero (D-Dimer International Standard), não se encontra actualmente disponível, este padrão do Laboratório foi atribuído de acordo com o critério de harmonização proposto por W. Niewenhuizen.<sup>20,21</sup>

**Resultados**

Os resultados de D-Dímero são expressos em ng/mL. Para mais informações consultar o Manual do Utilizador.

Nota: Devido à inexistência de um Padrão Internacional de Referência, alguns fabricantes expressam os resultados do D-Dímero em FEU (Fibrinogen Equivalent Unit). A equivalência entre estas 2 unidades de medição é de aproximadamente 2 FEU = 1 ng/mL.<sup>22</sup>

**Limitações/interferências**

Concentrações de hemoglobina até 500 mg/dL, de bilirrubina até 18 mg/dL, de triglicéridos até 1327 mg/dL e de factor reumatóide até 1400 UI/mL não afectam os resultados de D-Dímero no ACL TOP.

O anticorpo monoclonal (MA-8D3) utilizado no Reagente Látex D-Dímer HS, tem especificidade principalmente pelo domínio D-Dímero dos produtos de degradação da fibrina entrelaçada. Observou-se uma ligeira reacção-cruzada com produtos de degradação do fibrinogénio em amostras de plasma, às quais se juntou mais de 10 µg/mL dos fragmentos purificados D e E.

As amostras de doentes a quem foram administradas preparações com anticorpos monoclonais de origem murina, para diagnóstico ou terapêutica, podem conter anticorpos humanos antimurino (human anti-mouse antibody-HAMA). A presença de HAMA pode causar uma sobre-estimação dos resultados em imunoenensaio que utilizam anticorpos monoclonais murinos. O HemosIL D-Dimer HS Reaction Buffer contém um agente bloqueante contra HAMA para minimizar esta interferência nos resultados do ensaio.



**Valores Esperados**

Efectuou-se um estudo do limite de normalidade utilizando 234 amostras individuais de dadores do banco de sangue.

Sistema	N	Limite Superior do Intervalo (unidades)
ACL TOP	234	243 (ng/mL)

Devido a várias variáveis que podem afectar os resultados (incluindo a idade da população),<sup>23-24</sup> cada laboratório deve estabelecer os seus intervalos de valores normais. Para estabelecer um diagnóstico, os resultados da análise devem ser utilizados em conjunto com a restante informação, incluindo a história clínica.

**Características técnicas**

**Precisão:**

A precisão foi avaliada, intra e na totalidade (de análise para análise e de dia para dia), ao longo de vários ensaios.

ACL TOP	Média (ng/mL)	CV% (Intra-ensaio)	CV% (Total)
Pool de plasmas D-Dímero	180	8,3%	11,0%
Controlo D-Dímero Baixo	314	3,7%	7,0%
Controlo D-Dímero Alto	677	2,0%	7,0%

**Correlação:<sup>21</sup>**

Sistema	declive	intersecção	r	Método de referência
ACL TOP	0,95	-50,3	0,973	HemosIL D-Dimer em ACL TOP

Num estudo clínico adicional, comparou-se este kit D-Dimer com o kit HemosIL D-Dimer, já disponível no mercado. Foram analisadas amostras de 166 doentes (17 normais, 32 com CID, 11 com TVP, 17 com EP e 89 com diversos estados patológicos). Obteve-se uma correlação (r) de 0,961 no ACL TOP (n=166). Foram encontrados níveis elevados de D-Dímero em doentes com um diagnóstico clínico de TVP, de PE e de CID.

Foi realizado um estudo de resultados com 300 amostras congeladas de doentes consecutivamente admitidos numa unidade de urgência, com suspeita de EP ou TVP (frequência de doença de tromboembolismo venoso: 26%). Das 300 amostras, 78 foram confirmadas como TEV positivas (47 EP e 31 TVP) por testes padrão objectivos e as restantes 222 foram confirmadas como negativas.

Os resultados a seguir resumidos, baseiam-se num cut-off de 230 ng/mL:

Aparelho Sistema	N	Sensibilidade (95% C.I.)	Especificidade (95% C.I.)	Valor Preditivo Negativo (95% C.I.)
ACL TOP	300	100%	46,8%	100%
		(95,4% - 100%)	(40,1% - 53,6%)	(96,5% - 100%)

O desempenho clínico na avaliação de doentes em ambulatório com suspeita de trombose venosa profunda (TVP) e tromboembolismo pulmonar (TEP) com o HemosIL D-Dimer HS em associação com o valor da probabilidade clínica pré-teste do doente (PTP) para exclusão de tromboembolismo venoso (VTE).

A prevalência geral de TVP na população total de amostras foi de 20.2%(62/307). A prevalência geral de TEP na população total de amostras foi de 16.1%. Quanto ao seguimento de 3 meses, nenhum dos doentes que tiveram resultados negativos com teste do D-Dímero desenvolveram TVP ou TEP.

Foi realizado um estudo multicêntrico de gestão em em 4 hospitais com 668 amostras de doentes admitidos consecutivamente na urgência com suspeita de TVP ou TEP. 307 doentes tinham suspeita de TVP e 381 doentes tinham suspeita de EP. Como parte do estudo, os doentes efectuaram uma avaliação PTP (probabilidade pré-teste) com o modelo Wells e foram classificados como tendo uma probabilidade elevada, moderada ou baixa de TVP ou EP. Os doentes com um resultado negativo no teste D-Dímero e um valor baixo de PTP não realizaram mais testes de diagnóstico e foram monitorizados após 3 meses, para desenvolvimento de TVP ou EP. Para um doente com um resultado negativo de D-Dímero e um PTP moderado, o médico decidia se devia efectuar a monitorização aos 3 meses ou se o doente devia realizar testes imagiológicos. Os doentes com um teste de D-Dímero positivo ou um valor elevado de PTP realizaram testes imagiológicos.

A prevalência geral de TVP na população total de amostras foi de 20.2% (62/307). A prevalência geral de EP na população total de amostras foi de 16.1% (58/361). Do grupo de doentes monitorizado aos 3 meses, nenhum dos que tiveram um teste D-Dímero negativo, desenvolveram TVP e/ou TEP.

A sensibilidade, especificidade e valor preditivo negativo (NPV) do HemosIL D-Dimer HS para TVP ou EP com o cut-off clínico previamente estabelecido de 230 ng/mL está resumido a seguir, com os correspondentes intervalos de confiança a 95% (IC):

Desempenho TVP	Todas as amostras	PTP elevado	PTP Baixa + moderada
<b>n</b>	307	54	253
<b>Sensibilidade</b>	100,0% (62/62) (94,2%-100,0%)	100,0% (28/28) (87,7%-100,0%)	100,0% (34/34) (89,7%-100,0%)
<b>Especificidade</b>	38,4% (94/245) (32,2%-44,8%)	34,6% (9/26) (17,2%-55,7%)	38,8% (85/219) (32,3%-45,6%)
<b>Valor preditivo negativo</b>	100,0% (94/94) (96,2%-100,0%)	100,0% (9/9) (66,4%-100,0%)	100,0% (85/85) (95,8%-100,0)

Desempenho EP	Todas as amostras	PTP elevado	PTP Baixa + moderada
<b>n</b>	361	28	333
<b>Sensibilidade</b>	100,0% (58/58) (93,8%-100,0%)	100,0% (10/10) (69,2%-100,0%)	100,0% (48/48) (92,6%-100,0%)
<b>Especificidade</b>	35,6% (108/303) (30,2%-41,3%)	16,7% (3/18) (3,6%-41,4%)	36,8% (105/285) (31,2%-42,7%)
<b>Valor preditivo negativo</b>	100,0% (108/108) (96,6%-100,0%)	100,0% (3/3) (29,2%-100,0%)	100,0% (105/105) (96,5%-100,0%)

Estes resultados de precisão e de correlação foram obtidos utilizando lotes específicos, de reagente e de controlo.

**Limite de detecção:**

Sistema	Auto Rerun desligado	Auto Rerun ligado
ACL TOP	21 ng/mL	
ACL TOP	150 - 3680 ng/mL	150 - 69000 ng/mL

Quando a capacidade de "rerun" do aparelho é activada, o aparelho executa uma diluição "on-board" e corrige o resultado final para o factor de diluição, alargando o intervalo do teste a 69000 ng/mL. Se o resultado ainda exceder o intervalo expandido, i.e. a 69000 ng/mL, então as amostras devem ser diluídas manualmente a 1:100 com Diluente de Factores (20 µL de amostra + 1980 µL de Diluente) e reanalisadas no ensaio padrão. Os resultados obtidos devem ser multiplicados por 100 a fim de corrigir a diluição.

Este ensaio não demonstra efeito de prózona (i.e. excesso de antigénio) até 197000 ng/L.

**Symbols used / Verwendete Symbole / Símbolos utilizados / Symboles utilisés / Simboli impiegati / Símbolos utilizados**

IVD	LOT				CONTROL			EC REP
<i>In vitro</i> diagnostic medical device <i>In-vitro</i> Diagnostikum De uso diagnóstico <i>in vitro</i> Dispositif médical de diagnostic <i>in vitro</i> Per uso diagnóstico <i>in vitro</i> Dispositivo médico para utilização em diagnóstico <i>in vitro</i>	Batch code Chargen-Bezeichnung Identificación número de lote Désignation du lot Numero del lotto Número de lote	Use by Verwendbar bis Caducidad Utilisable jusqu'à Da utilizzare prima del Data limite de utilização	Temperature limitation Festgelegte Temperatur Temperatura de Almacenamiento Températures limites de conservation Limiti di temperatura Limite de temperatura	Consult instructions for use Beilage beachten Consultar la metódica Lire le mode d'emploi Vedere istruzioni per l'uso Consultar as instruções de utilização	Control Kontrollen Control Contrôle Controllo Controlo	Biological risks Biologisches Risiko Riesgo biológico Risque biologique Rischio biologico Risco biológico	Manufacturer Hergestellt von Fabricado por Fabricant Prodotto da Fabricado por	Authorised representative Bevollmächtigter Representante autorizado Mandataire Rappresentanza autorizzata Representante autorizado

**Bibliography / Literatur / Bibliografia / Bibliographie / Bibliografia / Bibliografia**

1. Gaffney PJ, et al. Monoclonal antibodies to crosslinked fibrin degradation products (XL-FDP) I. Characterization and preliminary evaluation in plasma, *British Journal of Haematology*. 1988; 68: 83-90.
2. Palareti G. Fibrinogen/fibrin Degradation Products: Pathophysiology and Clinical Application, *Fibrinolysis*. 1993; 7: 60-61.
3. Gaffney PJ. The Occurrence and Clinical Relevance of Fibrin Fragments in Blood, *Annals New York Academy of Sciences*. 1983; 408: 407-423.
4. Bounameaux H, et al. Plasma Measurement of D-Dimer as Diagnostic Aid in Suspected Venous Thromboembolism: An Overview, *Thrombosis and Haemostasis*. 1994; 71 (1): 1-6.
5. Gaffney PJ, et al. Monoclonal antibodies to crosslinked fibrin degradation products (XL-FDP) II. Evaluation in a variety of clinical conditions. *British Journal of Haematology*. 1988; 68: 91-96.
6. Nolan TE, et al. Maternal Plasma D-Dimer Levels in Normal and Complicated Pregnancies, *Obstetrics & Gynecology*. 1993; 81 (2): 235-238.
7. Anderson DR, and Wells PS. Improvements in the Diagnostic Approach for Patients with Suspected Deep Vein Thrombosis or Pulmonary Embolism, *Thrombosis and Haemostasis*. 1999; 82 (2): 878-886.
8. Kovacs MJ, MacKinnon KM, Anderson D, O'Rourke K, Keeney M, Kearon C, Ginsberg J, Wells PS. A comparison of three rapid D-dimer methods for the diagnosis of Venous Thromboembolism, *British J. Haematology*. 2001; 115 (1): 140-146.
9. Wells PS, Anderson DR, Rodger M, Forgie M, Kearon C, Dreyer J, Kovacs G, Mitchell M, Lewandowski B and Kovacs MJ. Evaluation of D-Dimer in the Diagnosis of Suspected Deep-Vein Thrombosis, *N. Engl. J. Med*. 2003; 349:1227-35.
10. Oswald CT, Menon V, Stouffer GA. The use of D-Dimer in emergency room patients with suspected deep vein thrombosis: a test whose time has come, *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 2003; 1: 635-636.
11. Anderson DR, Kovacs MJ, Kovacs G, Stiell I, Mitchell M, Khoury V, Dryer J, Ward J and Wells PS. Combined use of clinical assessment and D-Dimer to improve the management of patients presenting to the emergency department with suspected deep vein thrombosis (the EDITED study), *J Thromb Haemost*, 2003; 1: 645-651.
12. Curtin N, Highe G, Harris M, Braunstein A, Demattia F, Coss L. Extensive evaluation of the instrumentation laboratory IL test D-Dimer immunoturbidimetric assay on the ACL 9000 determines the D-Dimer cutoff value for reliable exclusion of venous thromboembolism, *Lab Hematol*. 2004;10 (2): 88-94.
13. Legnani C, Pancani C, Palareti G, Guazzaloca G, Coccheri S. Performance of a new, fast D-Dimer test (IL Test D-Dimer) for the management of outpatients with suspected deep vein thrombosis in emergency situations, *Fibrinolysis & Proteolysis* 1999. 13(3): 139-141.
14. Newman DJ, et al. Particle enhanced light scattering immunoassay, *Ann Clin Biochem*. 1992; 29: 22-42.
15. Richmond JY, McKinney RW eds. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, U.S. Dept. of Health and Human Services, Public Health Service, 4th Edition, 1999.
16. Clinical and Laboratory Standards Institute/NCCLS. Preparation and Testing of Reagent Water in the Clinical Laboratory, Fourth Edition, CLSI/NCCLS Document C3-A4; Vol. 26 No. 22.
17. Clinical and Laboratory Standards Institute/NCCLS. Collection, Transport, and Processing of Blood Specimens for Testing Plasma-Based Coagulation Assays, Fourth Edition, CLSI/NCCLS Document H21-A4; Vol. 23 No. 35.
18. Zucker S, Cathey MH, West B. Preparation of Quality Control Specimens for Coagulation, *Am. J. Clin. Pathol*. 1970; 53: 924-927.
19. Westgard JO, and Barry PL. Cost-Effective Quality Control: Managing the Quality and Productivity of Analytical Process, AACC Press 1986.
20. Tumanova I, Serra J. New quantitative assay for D-Dimer. Method comparison study: standardization difficulties. Communication presented at the XIII International Congress on Fibrinolysis and Thrombolysis, Barcelona, June 24-28, 1996.
21. Nieuwenhuizen W. A Reference Material for Harmonisation of D-Dimer Assays, *Thrombosis and Haemostasis*. 1997; 77 (5): 1031-1033.
22. Bos R, Laterveer-Vreeswijk GH, Lockwood D, Szewczyk K, Nieuwenhuizen W. A new enzyme immunoassay for soluble fibrin in plasma, with a high discriminating power for thrombotic disorders, *Thromb Haemost*. 1999; 81(1): 54-59.
23. Villa P, Ferrando F, Serra J, Faus H, Mira Y, Vaya A, Aznar J. Quantification of D-dimer using a new fully automated assay: its application for the diagnosis of deep vein thrombosis, *Haematologica*, 2000; 85(5): 520-4.
24. Bounameaux, H. Should the D-Dimer Cut-off Value Be Increased in Elderly Patients Suspected of Pulmonary Embolism? *Thrombosis and Haemostasis*. 2001; 85: 744.

ACL, ACL Futura and ACL TOP are trademarks of Instrumentation Laboratory.  
©2005 Instrumentation Laboratory.  
Issued October 2007