

HEMOSTAT D-DIMER

MÉTODO

Imunoturbidimetria

FINALIDADE

Imunoensaio otimizado de micro-partículas para a determinação quantitativa de d-dímero em plasma humano citratado. Para uso com o equipamento Humaclo Junior ou Humaclo Duo Plus. Somente para diagnóstico *in vitro*.

FUNDAMENTO

Hemostat D-Dímero consiste de partículas de poliestireno ligadas com anticorpos monoclonais específicos para d-dímero. Quando o plasma contendo d-dímero é misturado às partículas de poliestireno e tampão de reação, as partículas se aglutinam, dando aumento à elevação da luz dispersa. Quando exposto ao comprimento de onda de 405 nm, o aumento da turbidez é medido, o qual é proporcional à quantidade de d-dímero na amostra.

SIGNIFICADO CLÍNICO

Fragmentos de fibrina contendo antígenos de d-dímero estão sempre presentes como resultado de degradação de plasmina de fibrina entrelaçada (cross-linked). Depois de um machucado ou quando o paciente sofre de condições associadas com aumento de atividade hemostática, há um aumento da concentração de d-dímero. Níveis elevados de d-dímero são encontrados em condições clínicas, como trombose venosa profunda (DVT – sigla em Inglês), coagulação intravascular disseminada (DIC – sigla em Inglês) e trauma¹⁻⁴. Os níveis de d-dímero aumentam durante a gravidez normal, mas níveis muito altos estão associados a complicações⁵. Os níveis também aumentam com a idade⁶. Um teste negativo, resultado de um paciente com suspeita de desordem trombótica tem um valor preditivo negativo alto.

IDENTIFICAÇÃO E ARMAZENAMENTO

Conservar entre 2 e 8°C.

RG1 – Reagente Látex D-Dímero

Partículas de poliestireno cobertas com anticorpos monoclonais (rato)	
Tampão Hepes	10 mmol/L
Soro de albumina bovina, surfactante	
Azida sódica	0,05%

BUF – Tampão de reação

Tampão Hepes	100 mmol/L
NaCl	400 mmol/L
Azida sódica	0,05%

CAL – Calibrador Liofilizado

Plasma humano adicionado com d-dímero	
Tampão Hepes	33 mmol/L
Ver a indicação da concentração exata no frasco do reagente.	

DIL – Diluente

Tampão fosfato	20 mmol/L
Azida sódica	<0,1%

PREPARO DOS REAGENTES

RG1, BUF e DIL estão prontos para uso. Antes de usar, deixar o RG1 no instrumento para equilibrar sua temperatura para a temperatura de trabalho. Girar o frasco gentilmente para garantir uma suspensão homogênea. Reconstituir o CAL com exatamente 1 mL de água deionizada (ver Precauções). Recolocar a tampa no frasco e deixá-lo entre 15 e 25 °C por 15 – 30 minutos. Antes de usar, girar o frasco gentilmente ou invertê-lo para homogeneizar.

ESTABILIDADE

Os reagentes fechados são estáveis até a data de validade impressa nos rótulos, quando armazenados entre 2 e 8°C. Depois de abertos, RG1, BUF e DIL são estáveis por 2 semanas entre 8 e 25°C ou 4 semanas entre 2 e 8°C. O CAL reconstituído é estável por 12 horas entre 4 e 25°C. Quando armazenado entre 2 e 8°C a estabilidade do CAL é de uma semana. Quando armazenado a -20°C a estabilidade é de 6 meses. Evitar contaminação dos frascos abertos.

TRANSPORTE

O transporte deve ser realizado em temperaturas entre 2 e 8°C, conforme condições de conservação do produto.

PRECAUÇÕES

- Cada unidade doadora de sangue humano utilizado no preparo do CAL foi testada e se encontrou não-reativa para HBsAg, negativa para antígeno e anticorpos HIV-1/2 e anticorpos HCV. Apesar de terem sido utilizados testes validados com alto grau de confiabilidade, nenhum deles pode assegurar que produtos que contenham derivados de fluidos humanos sejam incapazes de provocar doenças. Portanto, os cuidados habituais de biossegurança devem ser aplicados na manipulação desse produto. Para o descarte seguro dos reagentes e materiais biológicos, sugere-se utilizar as regulamentações normativas locais, estaduais ou federais para a preservação ambiental.
- Os cuidados habituais de segurança devem ser aplicados na manipulação dos reagentes. RG1, BUF e DIL contêm azida sódica como conservante. Não ingerir ou aspirar. Evitar contato com a pele e mucosa.
- A água destilada utilizada para reconstituição do CAL deve estar isenta de conservantes, bactérias ou outras contaminações. Qualidade inadequada da água pode levar a resultados não confiáveis e reduzir a estabilidade.
- É essencial para a confiabilidade e precisão de resultados que o RG1 seja bem homogeneizado depois de adicionado. Aspirar e dispensar o reagente 15 vezes na cuveta. Evitar bolhas de ar.
- Se cuvetas duplas forem utilizadas para o Humaclo Duo Plus, não tocar na cuveta durante a medição. O uso de cuvetas únicas é indicado.

- Uma nova curva de calibração deve ser estabelecida cada vez que um novo lote de reagentes for utilizado ou quando os plasmas-controle estiverem fora da faixa. É recomendada a recalibração pelo menos trimestralmente.
- Os resultados de d-dímero devem ser usados sempre em conjunto com outras informações clínicas e diagnósticas, para fornecer um diagnóstico para monitoramento do paciente.
- Alguns fabricantes expressam resultados de D-dímero em FEU (Unidades equivalentes de fibrinogênio). A equivalência entre as duas unidades é aproximadamente 1 ng/mL D-dímero = 1,74 ng/mL FEU (1,000 ng/mL D-dímero = 1,74 mg/L FEU).
- Os riscos residuais do kit, de acordo com critérios pré-determinados, são aceitáveis em comparação aos benefícios proporcionados pelo uso. A análise de risco foi realizada de acordo com a ISO 14971, relacionada à data final e levando em consideração a atual informação de registro.

AMOSTRA BIOLÓGICA

Coleta da amostra: Deve-se obter a amostra através de punção venosa. **Anticoagulante:** Citrato de Sódio tamponado 3,2% (0,109M). Imediatamente após a obtenção da amostra, misturar 1 parte de anticoagulante com 9 partes de amostra. Evitar formação de espuma.

Processamento da amostra: Centrifugar por 10 minutos a 3.000 g ou por 15 minutos a 1.500 g. Remover o plasma usando uma pipeta plástica e armazenar em tubo plástico.

Estabilidade: Amostras de plasma podem ser mantidas entre 15 e 25°C por até 8 horas. Se as amostras não puderem ser testadas dentro de 8 horas, devem ser armazenadas a pelo menos -20°C.

MATERIAIS NECESSÁRIOS E NÃO FORNECIDOS

Ponteiras;
Pipetas;
Tubos;
Hemostat D-Dimer Control High/Low – Cat. 36012

PROCEDIMENTO (PARA HUMACLOT JÚNIOR / HUMACLOT DUO PLUS)

Curva de calibração:

	Concentração (ng/mL) DDU	CAL	DIL
Cal. 1	3,200*	200 µL	0
Cal. 2	1.600*	200 µL	200 µL
Cal. 3	1	-	-

Medir o Cal. 1 e Cal. 2 em duplicata, calcular a média e entrar com os dados no instrumento.
Cal. 3 não é medido mas o ponto zero é inserido como 1 ng/mL (Humaclo Junior: 1 mE; Humaclo Duo Plus: 0,001E)

* Usar o valor específico do lote para especificar a concentração exata em cada diluição.

Introduzir no equipamento os dados obtidos da curva, informando os valores das concentrações dos calibradores e seus valores respectivos em mE para o Humaclo Junior e E para o Humaclo Duo Plus.

PROCEDIMENTO (PARA HUMACLOT JÚNIOR – Modelo HC1)

Curva de calibração:

	Concentração (ng/mL) DDU	CAL	DIL
Cal. 1	2,600*	260 µL	40 µL
Cal. 2	1.600*	160 µL	140 µL
Cal. 3	800*	80 µL	220 µL
Cal. 4	400*	40 µL	260 µL
Cal. 5	220*	22 µL	278 µL

* Usar o valor específico do lote para especificar a concentração exata em cada diluição.

É necessário executar uma calibração de 5 pontos com pontos fixos do calibrador. Como a concentração original de CAL é sempre superior a 2600 ng/mL, o calibrador precisa ser diluído com DIL de acordo com cada etapa de calibração (cal. 1-5). A seguinte fórmula pode ser aplicada:

$$\text{Volume CAL } (\mu\text{L}) = \frac{\text{Ponto do calibrador concentração alvo}}{\text{Concentração de CAL específica do lote}} = 300 \mu\text{L}$$
$$\text{Volume DIL } (\mu\text{L}) = 300 \mu\text{L} - \text{Volume CAL } (\mu\text{L})$$

Teste

Testar as amostras e controle em duplicata.

	HUMACLOT JÚNIOR / HUMACLOT DUO PLUS	HUMACLOT JÚNIOR (HC1)
Pipetar amostra, CAL ou controle na cuveta	25 µL	50 µL
Adicionar BUF	100 µL	80 µL
Pré-aquecer o RG1	2, no máximo 10 minutos	150 seg
Transferir a cuveta para a posição de medição e ativar o ótico		
Adicionar RG1 pré-aquecido	50 µL	40 µL
Homogeneizar bem	15x aspirando e dispensando o reagente com a pipeta	homogeneizar na cuveta
O resultado será mostrado	E e ng/mL.	mE/min e ng/mL

RESULTADOS

Os resultados são relatados em unidades de Dímero D em ng/mL (DDU). Consulte o manual do usuário do instrumento e a folha de aplicação específica do

instrumento para obter detalhes. Para converter resultados em FEU (unidade equivalente de fibrinogênio), multiplique os resultados DDU por 2,5.

VALORES DE REFERÊNCIA

Os resultados são expressos em ng/mL D-dímero. Amostras com resultados acima da faixa reportável (> 5000 ou xxx) devem ser diluídas com o DIL 1+3, e testadas novamente. Multiplicar o novo resultado por 4.

O nível de D-dímero normalmente é < 200 ng/mL^{4,5}. Entretanto, como não há padrões estabelecidos internacionalmente, as concentrações podem diferir quando se utiliza reagente de diferentes fabricantes. É recomendado que cada laboratório estabeleça sua própria faixa de modo que ela reflita sua população de pacientes.

AUTOMAÇÃO

O teste pode ser realizado totalmente automatizado no HumaClot Pro. Seguir as instruções do fabricante do equipamento.

INTERFERÊNCIAS

Hemostat D-dímero não sofre interferência de hemoglobina (até 4 g/L); bilirrubina (até 0,1 g/L); triglicérides (até 2,5 g/L); heparina não fracionada e de baixo peso molecular (até 100 U/mL). Como bilirrubina e hemoglobina tem um alto pico de absorvância em 405 nm, o comprimento de onda em que os equipamentos Humaclot Júnior e Humaclot Duo Plus estão operando, plasmas com alta concentração de bilirrubina e hemoglobina têm uma baixa transmissão de luz. Isso resulta numa redução da precisão com tais amostras. Amostras fortemente lipêmicas devem ser diluídas com DIL e testadas novamente, já que níveis elevados de triglicérides podem abaixar os resultados de D-dímero. A presença de fatores reumatóides ou HAMA (anticorpos humanos anti-rato) pode causar superestimação dos resultados do D-dímero.

CONTROLE DE QUALIDADE

É recomendado o uso do Hemostat D-dímero Control High/Low (cat. 36012) em intervalos regulares. Cada laboratório deve estabelecer uma faixa controle para determinar a variação permitida na performance do teste. Recalibração é sugerida quando os materiais de controle apresentam resultados fora da faixa aceitável.

REPETIBILIDADE E REPRODUTIBILIDADE

Para esta tese, duas amostras foram utilizadas. A primeira na faixa mais baixa e a outra na faixa mediana de medição do kit. Elas foram testadas em sete corridas, com 6 replicatas cada, por quatro dias diferentes.

	Amostra na faixa mais baixa de medição		Amostra na faixa mediana de medição	
	DP (ng/mL)	CV (%)	DP (ng/mL)	CV (%)
Intrabateria	26,2	9,4	56,4	3,5
Entre bateria	4,0	1,4	59,9	3,7

CARACTERÍSTICAS DE PERFORMANCE

Humaclot Junior e Humaclot Duo Plus possuem a faixa de medição entre 100 e 5.000 ng/mL. Efeitos prozona não foram observados nos níveis de D-dímero < 100.000 ng/dL.

Sensibilidade: 97%
Especificidade: 62%

Valor preditivo negativo: 99%
Valor preditivo positivo: 41%

APRESENTAÇÃO DO KIT:

Cat. Nº	Reagente	Volume	Nº Teste
36002	RGT	2 x 1 mL	40
	BUF	2 x 2,5 mL	
	CAL	1 x 1 mL	
	DIL	1 x 6 mL	

DEPARTAMENTO DE SERVIÇOS ASSOCIADOS

Para esclarecimentos de dúvidas do consumidor quanto ao produto:

Telefone: **31 3067-6400** e-mail: invitroms@invitro.com.br

N.º DO LOTE, DATA DE FABRICAÇÃO, DATA DE VALIDADE VIDE RÓTULO DO PRODUTO.

BIBLIOGRAFIA:

1. Heit, J.A. *et al.*; Arch Path Lab Med. **123**, 235-239 (1999)
2. Bounameaux H.J. *et al.*, Thromb Haemostas **71**, 1-6 (1994)
3. Pfitzner S.A. *et al.*, Thromb Haemostas **78**, 1069-1078 (1997)
4. Lindahl T.L. *et al.*, Scand J Lab Invest **58**, 307-316 (1998)
5. Gardiner C. *et al.*, Brit J Haematol **128**, 842-848 (2005)
6. Meissner, M.H., J. Trauma **54**, 224-231 (2003)
7. Ballegeer V. *et al.*, Thromb Haemostas **58**, 1030-1032 (1987)
8. Kario, K. *et al.*, Thromb Res, **62**, 501-508 (1991)
9. Edlund & Nilsson, Clin. Biochem. **39**, 137 - 142 (2006)

Fabricante: HUMAN GmbH, Max-Planck-Ring-21 D-65205, Wiesbaden, Alemanha.
Regularizado por In Vitro Diagnóstica Ltda. Rua Cromita, 278, Distrito Industrial, Itabira/MG. CEP: 35903-053. CNPJ: 42837716/0001-98.

Telefone: 31-3067-6400 e-mail: invitroms@invitro.com.br
Resp. Téc.: Patrícia C. C. Vilela - CRF 4463

ANVISA: 10303460337 Classe de Risco: III

SIGNIFICADO DOS SÍMBOLOS UTILIZADOS NOS RÓTULOS DO PRODUTO



O conteúdo é suficiente para <n> testes



Data limite de utilização



Limite de temperatura (conservar a)



Número do Catálogo



Consultar Instrução de Uso



Número do lote



Produto Diagnóstico In Vitro



Data de Fabricação