

## **SET pro stanovení D-Dimerů**

### **I. SOUHRN A POUŽITÍ**

D-dimer vzniká proteolytickým štěpením fibrinogenu. Zvýšené množství D-dimerů se vyskytuje při hluboké žilní tromboze (DVT), plicní embolii (PE) a diseminované intravaskulární koagulaci (DIC) (1-3). Hladina D-dimerů stoupá v průběhu těhotenství a vysoké hladiny jsou spojeny s komplikacemi (2).

Při stanovení D-dimerů se používá monoklonální protilátka, která je specifická pro fibrinový D-dimer, ale ne pro fibrinogen nebo fibrin (3). Pro stanovení D-dimerů se mohou používat také vzorky sér, které jsou vhodné pro stanovení fibrinogen degradačních produktů (FDP).

V současnosti neexistuje žádná mezinárodní standarda pro stanovení D-dimerů. Diagnostikum je určeno pro profesionální použití in vitro.

### **II. REAGENCIE**

**A. D-dimer latexové diagnostikum**, lahvička obsahuje suspenzi latexových částic, které jsou potažené monoklonální protilátkou MA-8D3 namířenou proti D-dimeru, a suspendované v HEPES pufru pH 8.2 s 0.2 g/l azidu sodného.

Uchovávání při +2 až +8°C.

**B. Roztok NaCl, pH 7.3**, pufovaný izotonický roztok NaCl obsahuje jako antiseptikum azid sodný 0.2 g/l.

Uchovávání při +2 až +8°C.

**Upozornění:** D-dimer latexové diagnostikum a izotonický roztok NaCl obsahují azid sodný. Azid sodný může být toxický při požití, dále při kontaktu s olovem nebo mědí v odpadové instalaci mohou vznikat vysoce toxické a výbušné soli. K odstranění je nutno použít velké množství oplachové vody.

**C. Pozitivní (+) D-dimer kontrolní plazma**, lyofilizovaná lidská plazma obohacená fibrinovými D-dimery

Uchovávání při +2 až +8°C.

**D. Negativní (-) D-dimer kontrolní plazma**, lyofilizovaná lidská plazma.

Uchovávání při +2 až +8°C.

**Upozornění:** Všechny materiály, které byly použity při výrobě D-dimer pozitivní a D-dimer negativní kontrolní plazmy byly vyšetřeny na nepřítomnost HBsAg a anti-HIV dle doporučených metod FDA. Nicméně všechny produkty vyráběné z lidské krve musí být považovány za potenciálně infekční a při manipulaci s nimi je nutno zachovávat předepsané podmínky bezpečnosti práce.

### **III. VZOROVÝ ODBĚR**

Doporučuje se citrátový antikoagulační roztok. Může se také použít plazma s heparinem nebo EDTA. Sérum se musí odebrat v přítomnosti fibrinolytického inhibitoru (FDP zkumavky). Vzorky citrátových plazem se uchovávají při +2 až +8°C a testují se do 4 hodin nebo se uchovávají při -20°C a testují se do 1 měsíce po odběru.

Pro EDTA plazmu viz poznámka 4.

### **IV. POSTUP**

**A. Materiál** - na 80 stanovení

1. D-dimer latexové diagnostikum, 1 lahvička 1.7 ml
2. D-dimer pozitivní kontrolní plazma, 2 lahvičky á 0.2 ml
3. D-dimer negativní kontrolní plazma, 2 lahvičky á 0.2 ml
4. Pufovaný roztok NaCl, pH 7.3, 2 lahvičky á 8 ml
5. Tyčinky na míchání, 50 tyčinek, které se před použitím rozpůlí
6. Testovací karty, 16 testovacích karet, každá pro 6 vzorků

**B. Další požadované materiály**

1. Pipety o objemu 20 ul, 100 ul a 200 ul
2. Špičky
3. Zkumavky o objemu 3 ml
4. Stopky

### C. Postup

1. Lahvičky se před použitím zahřejí na obyčejnou teplotu, nejméně 10 minut.
2. Ke každé lahvičce s pozitivní a negativní plazmou se přidá 0.2 izotonického roztoku NaCl. Rozpuštěné kontrolní plazmy se uchovávají 30 dnů při 4°C nebo -20°C.  
Nemrazit více než jednou. Viz poznámka 6.
3. Lahvička s latexem se těsně před použitím zamíchá opakovaným převrácením po dobu 5 sekund. Viz poznámka 6.

#### 4. Kvalitativní metoda

- 4.1. Do kroužků testovací karty se napipetuje po 20 ul vzorku, pozitivní a negativní kontroly.
- 4.2. Vedle každého kroužku se napipetuje po 20 ul latexové suspenze.
- 4.3. Vzorek s latexem se rychle zamíchá tyčinkou a začne se měřit čas.
- 4.4. Aglutinace se odečítá mezi 180 a 200 sekundou za kývavého pohybu kartou. Pozitivní (+) nebo negativní (-) aglutinace se porovnává s výsledky, které dávají kontroly. Pozitivní kontrola je pouze kvalitativní a neměla by se dále ředit. Neaglutinovaný latex znamená, že vzorek je negativní a další testování se již nevyžaduje.

#### 5. Semikvantitativní metoda (provádí se pouze u pozitivních vzorků)

- 5.1. Ve třech zkumavkách se připraví 100 ul vzorku naředěného pufovaným roztokem NaCl v poměrech 1:2, 1:4 a 1:8.
- 5.2. Na testovací kartě se označí umístění každého ředění, vzorky se smichají s latexovou suspenzí dle bodu 4.3. Koncentrace D-dimerů se odečte z tabulky uvedené ve výsledcích.

### V. VÝSLEDKY

Aglutinace, která se objeví mezi 180 a 200 sekundou, znamená, že vzorky obsahují více než 0.25 ug/ml D-dimerů. Testováním série ředění plazmy se získají semikvantitativní výsledky.

#### Množství D-dimerů (ug/ml)

ug/ml	neředěný	1:2	1:4	1:8
<0.25	-	-	-	-
0.25 - 0.5	+	-	-	-
0.5 - 1.0	+	+	-	-
1.0 - 2.0	+	+	+	-
>2.0	+	+	+	+

Musí se připravit další ředění a testovat do té doby, než se získá negativní výsledek.

Při vyšší koncentraci D-dimerů je aglutinace více zřetelná a objeví se rychleji. Jestliže se výsledky vyjadřují v jednotkách odpovídajících jednotkám fibrinogenu (FEU) násobí se množství D-dimerů v tabulce dvěma (tj. <0.25 ug/ml D-dimerů dává <0.5 ug/ml FEU). Jak se diskutuje v jednotlivých článcích (4), některé komerční latexové testy nemají požadovanou citlivost, pokud se srovnávají s komerčním ELISA testem.

### VI. VÝKLAD VÝSLEDKŮ

U vzorků obsahujících 0.25 ug/ml D-dimerů a více se aglutinace objeví mezi 180 až 200 sekundou. Průměrné množství D-dimerů u zdravé populace je 0.008 - 0.135 ug/ml a neředěné plazmy zdravých jedinců nevykazují aglutinaci.

Když se neobjeví aglutinace, je výskyt trombozy nepravděpodobný. Negativní prediktivní hodnota stanovení D-dimerů pro trombosu je vysoká (5). Poločas rozpadu v krevním oběhu je asi 12 hodin. Zvýšená hladina D-dimerů může proto přetrvávat nějakou dobu i po skončení aktivního procesu.

Během klinických studií zdravých jedinců, pacientů s flebograficky potvrzenou hlubokou žilní trombozou (DVT), pacientů s diseminovanou intravaskulární koagulací (DIC) a pacientů s pre-eklampsii (Pre-EC) byly získány tyto výsledky.

Viz poznámka 2.

## Výsledky stanovení D-dimerů<sup>+</sup>

Vzorky	n	-	1:1	1:2	1:4	>1:8
normální	101	100	1*	-	-	-
DVT	48	3	10*	7*	14*	14*
DIC	29	0	3	3	4	19
Pre-EC	6	2	1	3	-	-

<sup>+</sup> symboly **n** a - označují počet pacientů a negativní D-dimery

Titry udávají stupeň ředění, ve kterém vzorky vykazují aglutinaci.

\* aglutinace byla inhibována přidáním specifické protilátky (0.2 mg/ml) MA-8D3 ale nebyla inhibována nepřibuznou protilátkou PAM-1.

## VII. VLASTNOSTI

**1. Specifita.** Monoklonální protilátka MA-8D3 použitá v této metodě je specifická pro D-dimer a byla vybrána na základě výsledků screeningových metod při selekci hybridomů. Hybridom produkuje protilátku, která reaguje s purifikovaným D-dimerem, ale nereaguje s celým fibrinogemem nebo D fragmentem fibrinogenu. Nahradila-li se plazma v tomto testu jiným analytikem, nebyla popsána žádná křížová reakce s fibrinogemem nebo des-AA-fibrinogemem. Také byla testována plazma 16 pacientů s revmatoidní artritidou a 14 z nich reagovalo negativně při stanovení D-dimerů. Dvě aglutinace byly inhibovány po přidání D-dimer specifické monoklonální protilátky MA-8D3, ale ne po přidání nepřibuzné monoklonální protilátky IgG<sub>1k</sub> (PAM-1). Z toho vyplývá, že stanovení D-dimerů není citlivé k revmatoidnímu faktoru.

**2. Reprodukovatelnost.** Pro otestování reprodukovatelnosti metody byly vybrány 3 vzorky plazem. Každý vzorek byl otestován 10 x během 3 dnů. V případě, že vzorky vykazovaly pozitivní reakci, byly titrovány. Výsledky shrnuje následující tabulka:

Vzorek	Množství D-dimerů	Výsledek
normální	<0.25 ug/ml	všechny zkoušky negativní
střední	3.0 ug/ml	titr vždy 1:8
vysoké	>16.0 ug/ml	vždy 1:64

**3. Přesnost.** Stanovení D-dimerů bylo srovnáno s jiným komerčně vyráběným vhodným D-dimer latexovým testem. Při testování 25 normálních vzorků dávaly oba výrobky negativní výsledky. Při testování 30 plazem pacientů ELISA testem a latexovým testem vykazovaly aglutinaci v latexovém testu všechny vzorky, které měly v ELISA testu hladiny D-dimerů vyšší než 0.225 ug/ml.

## VIII. OMEZENÍ

Negativní výsledek stanovení D-dimerů nevylučuje zcela trombozu. Negativní prediktivní hodnota pro pacienty se suspektní hlubokou žilní trombozou (DVT) činila u D-dimer setu Thromboscreen 94%. Pro stanovení diagnózy by se měla detekce zvýšeného množství D-dimerů použít s ostatními klinickými informacemi.

Agglutinace u vzorků obsahujících normální množství D-dimerů může být důsledkem nespecifity.

## IX. KONROLA KVALITY

Pozitivní a negativní kontrolní plazmy by se měly použít pro kontrolu každého setu. Doporučuje se, aby jak pozitivní, tak negativní plazma se testovaly vždy při použití setu. Jestliže pozitivní nebo negativní kontrolní plazma nedávají očekávané výsledky, získané výsledky vzorků pacientů se nemohou použít.

## X. POZNÁMKY

1. Výsledky se udávají jednak v D-dimerových jednotkách nebo v jednotkách ekvivalentních fibrinogenu (FEU), 0.001 ug/ml D-dimerů odpovídá asi 0.002 ug/ml FEU.
2. Některé komerční latexové testy mají nižší senzitivitu než je požadováno. Při stanovení D-dimerů D-dimer setem Thromboscreen je u nemocných s hlubokou venozní trombozou 60-70% vzorků pozitivních, na rozdíl od jiných latexových testů kde je frekvence pozitivních výsledků nižší (5).

3. Malý počet vzorků po smíchání s latexem dává bílé skrvny, které se nesmí zaměnit s aglutinací.
4. Když se EDTA vzorky skladují při pokojové teplotě více než 4 hodiny před testováním, mohou vykazovat nespecifické reakce.
5. U vzorků s vysokou koncentrací D-dimerů je aglutinace výraznější a objeví se velmi rychle.
6. Pryžové zátky od lahvíček s latexem a kontrolními plazmami by se po otevření lahvíček měly vyhodit do odpadu.