

# SET na stanovenie D-Dimérov

---

## I. SÚHRN A POUŽITIE

D-dimér vzniká proteolytickým štiepením fibrinogénu. Zvýšené množstvo D-dimérov sa vyskytuje pri hlbokoj žilnej trombóze (DVT), pľúcnej embólii (PE) a diseminovanej intravaskulárnej koagulácii (DIC) (1-3). Hladina D-dimérov stúpa v priebehu tehotenstva, vysoké hladiny sa spájajú s komplikáciami (2).

Pri stanovení D-dimérov sa používa monoklonálna protilátka, ktorá je špecifická pre fibrinový D-dimér, nie však pre fibrinogén alebo fibrín (3). Na stanovenie D-dimérov sa môžu používať tiež vzorky sér, ktoré sú vhodné na stanovenie fibrinogén degradáčnych produktov (FDP).

V súčasnosti neexistuje žiaden medzinárodný štandard na stanovenie D-dimérov. Diagnostikum je určené pre profesionálne použitie in vitro.

## II. REAGENCIE

**A. D-dimér latexové diagnostikum**, fľaštička obsahuje suspenziu latexových častíc, pokrytých monoklonálnou protilátkou MA-8D3 namierenou proti D-diméru, a rozsuspendovaných v HEPES pufrí pH 8.2 s 0.2 g/l azidu sodného.

Uchovávanie pri +2 až +8°C.

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

Uchovávanie pri +2 až +8°C.

**Upozornenie:** D-dimér latexové diagnostikum a izotonický roztok NaCl obsahujú azid sodný. Azid sodný môže byť toxický pri požití, ďalej pri kontakte s olovom alebo meďou, v odpadovej inštalácii môžu vznikáť vysoko toxické a výbušné soli. K odstráneniu je potrebné použiť veľké množstvo oplachovej vody.

**C. Pozitívna (+) D-dimér kontrolná plazma**, lyofilizovaná ľudská plazma obohatená fibrinovými D-dimérmí

Uchovávanie pri +2 až +8°C.

**D. Negatívna (-) D-dimér kontrolná plazma**, lyofilizovaná ľudská plazma.

Uchovávanie pri +2 až 8°C.

**Upozornenie:** Všetky materiály, ktoré boli použité pri výrobe D-dimér pozitívnej a D-dimér negatívnej kontrolnej plazmy boli vyšetrené na neprítomnosť HBsAg a anti-HIV podľa doporučených metód FDA. Všetky produkty vyrábané z ľudskej krvi však musia byť považované za potenciálne infekčné a pri manipulácii s nimi je potrebné zachovávať predpísané podmienky bezpečnosti práce.

## III. VZOROVÝ ODBER

Doporučuje sa citrátový antikoagulačný roztok. Môže sa tiež použiť plazma s heparínom alebo EDTA. Sérum sa musí odoberať v prítomnosti fibrinolytického inhibítora (FDP skúmavky). Vzorky citrátových plaziem sa uchovávajú pri +2 až +8°C a testujú sa do 4 hodín, alebo sa uchovávajú pri -20°C a testujú sa do 1 mesiaca po odbere.

Pre EDTA plazmu viz poznámka 4.

## IV. POSTUP

**A. Materiál** - na 80 stanovení

1. D-dimér latexové diagnostikum, 1 fľaštička 1.7 ml
2. D-dimér pozitívna kontrolná plazma, 2 fľaštičky 0.2 ml
3. D-dimér negatívna kontrolná plazma, 2 fľaštičky 0.2 ml
4. Pufovaný roztok NaCl, pH 7.3, 2 fľaštičky 8 ml
5. Tyčinky na miešanie, 50 tyčiniek, ktoré sa pred použitím rozpolia
6. Testovacie karty, 16 testovacích kariet, každá pre 6 vzoriek

## B. Ďalšie požadované materiály

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

## C. Postup

1. Fľaštičky je potrebné pred použitím zahriať na izbovú teplotu, najmenej 10 minút.
2. Ku každej fľaštičke s pozitívnou a negatívnou plazmou sa pridá 0.2 izotonického roztoku NaCl. Rozpustené kontrolné plazmy sa uchovávajú 30 dní pri 4°C alebo -20°C.  
Nezamrazovať viac ako jedenkrát. Viz poznámka 6.
3. Fľaštička s latexom sa tesne pred použitím zamieša opakovaným prevrátením po dobu 5 sekúnd. Viz poznámka 6.

### 4. Kvalitatívna metóda

- 4.1. Do krúžku testovacej karty sa napipetuje po 20 ul vzorky, pozitívnej a negatívnej kontroly.
- 4.2. Vedľa každého krúžku sa napipetuje po 20 ul latexovej suspenzie.
- 4.3. Vzorka s latexom sa tyčinkou rýchlo zamieša a začne sa merať čas.
- 4.4. Aglutinácia sa odčíta medzi 180 a 200 sekundou počas kývavého pohybu kartou. Pozitívna (+) alebo negatívna (-) aglutinácia sa porovnáva s výsledkami, ktoré dávajú kontroly. Pozitívna kontrola je iba kvalitatívna a nemala by sa ďalej riediť. Neaglutinovaný latex znamená, že vzorka je negatívna a ďalšie testovanie sa už nevyžaduje.

### 5. Semikvantitatívna metóda (robí sa iba u pozitívnych vzoriek)

- 5.1. V troch skúmavkách sa pripraví 100 ul vzorky nariadenej pufrovaným roztokom NaCl v pomeroch 1:2, 1:4 a 1:8.
- 5.2. Na testovacej karte sa označí umiestnenie každého riedenia, vzorky sa zmiešajú s latexovou suspenziou podľa bodu 4.3.

Koncentrácia D-dimérov sa odčíta z tabuľky uvedenej vo výsledkoch.

## V. VÝSLEDKY

Agglutinácia, ktorá sa objaví medzi 180 a 200 sekundou, znamená, že vzorky obsahujú viac než 0.25 ug/ml D-dimérov. Testovaním série riedení plazmy sa získajú semikvantitatívne výsledky.

**Množstvo D-dimérov (ug/ml)**

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

Musí sa pripraviť ďalšie riedenie a testovať do tej doby, než sa získa negatívny výsledok.

Pri vyššej koncentrácii D-dimérov je aglutinácia viac zreteľná a objaví sa rýchlejšie. Ak sa výsledky vyjadrujú v jednotkách zodpovedajúcich jednotkám fibrinogénu (FEU) násobí sa množstvo D-dimérov v tabuľke dvomi (tj. <0.25 ug/ml D-dimérov dáva <0.5 ug/ml FEU). Ako sa diskutuje v jednotlivých článkoch (4), niektoré komerčné latexové testy nemajú požadovanú citlivosť, pokiaľ sa porovnávajú s komerčným ELISA testom.

## VI. VÝKLAD VÝSLEDKOV

U vzoriek obsahujúcich 0.25 ug/ml D-dimérov a viac sa aglutinácia objaví medzi 180 až 200 sekundou. Priemerné množstvo D-dimérov u zdravej populácie je 0.008 - 0.135 ug/ml a neriedené plazmy zdravých jedincov nevykazujú aglutináciu.

Keď sa neobjaví aglutinácia, je výskyt trombózy nepravdepodobný. Negatívna prediktívna hodnota stanovenia D-dimérov pre trombózu je vysoká (5). Počas rozpadu v krvnom obeh je asi 12 hodín. Zvýšená hladina D-dimérov môže preto pretrvávajúť nejakú dobu i po skončení aktívneho procesu.

Počas klinických štúdií zdravých jedincov, pacientov s flebograficky potvrdenou hlbokou žilnou trombózou (DVT), pacientov s diseminovanou intravaskulárnou koaguláciou (DIC) a pacientov s pre-eklampsiou (Pre-EC) boli získané tieto výsledky.

Viz poznámka 2.

### Výsledky stanovenia D-dimérov<sup>+</sup>

Vzorky	n	-	1:1	1:2	1:4	>1:8
zdraví	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 - označujú počet pacientov a negatívne D-diméry

Titry udávajú stupeň riedení, v ktorom vzorky vykazujú aglutináciu.

\* aglutinácia bola inhibovaná pridaním špecifickej protilátky (0.2 mg/ml) MA-8D3 ale nebola inhibovaná nepríbuznou protilátkou PAM-1.

### VII. VLASTNOSTI

**1. Špecificita.** Monoklonálna protilátka MA-8D3 použitá v tejto metóde je špecifická pre D-dimér a bola vybraná na základe výsledkov screeningových metód pri selekcii hybridómov. Hybridóm produkuje protilátku, ktorá reaguje s purifikovaným D-dimérom, ale nereaguje s celým fibrinogénom alebo D fragmentom fibrinogénu. V prípade, ak je plazma v tomto teste nahradená iným analytikom, žiadna krížová reakcia s fibrinogénom alebo des-AA-fibrinogénom nebola popísaná. Tak isto bola testovaná plazma 16 pacientov s reumatoidnou artritídou, pričom 14 z nich reagovalo negatívne pri stanovení D-dimérov. Po pridaní D-dimér špecifickej monoklonálnej protilátky MA-8D3 boli inhibované dve aglutinácie, nie však po pridaní nepríbuznej monoklonálnej protilátky IgG<sub>1k</sub> (PAM-1). Z toho vyplýva, že stanovenie D-dimérov nie je citlivé k reumatoidnému faktoru.

**2. Reprodukovateľnosť.** Na otestovanie reprodukovateľnosti metódy boli vybrané 3 vzorky plaziem. Každá vzorka bola otestovaná 10 x počas 3 dní. V prípade, že vzorky vykazovali pozitívnu reakciu, boli titrované. Výsledky zhrňuje nasledujúca tabuľka:

Vzorka	Množstvo D-dimérov	Výsledok
Normálna	<0.25 ug/ml	všetky skúšky negatívne
Stredná	3.0 ug/ml	titer vždy 1:8
Vysoká	>16.0 ug/ml	vždy 1:64

**3. Presnosť.** Stanovenie D-dimérov bolo porovnané iným komerčne vyrábaným vhodným D-dimér latexovým testom. Pri testovaní 25 normálnych vzoriek dávali obidva výrobky negatívne výsledky. Pri testovaní 30 plaziem pacientov ELISA testom a latexovým testom vykazovali aglutináciu v latexovom teste všetky vzorky, ktoré mali v ELISA teste hladiny D-dimérov vyššie než 0.225 ug/ml.

### VIII. OBMEDZENIA

Negatívny výsledok stanovenia D-dimérov trombózu celkom nevyklučuje. Negatívna prediktívna hodnota pre pacientov so suspektou hlbokou žilnou trombózou (DVT) činila u D-dimér setov Thromboscreen 94%. Pre stanovenie diagnózy by sa mala detekcia zvýšeného množstva D-dimérov použiť spolu s ostatnými klinickými informáciami.












Agglutinácia u vzoriek obsahujúcich normálne množstvo D-dimérov môže byť dôsledkom nešpecificity.

### IX. KONROLA KVALITY

Pozitívne a negatívne kontrolné plazmy by sa mali použiť na kontrolu každého setu. Doporučuje sa, aby sa ako pozitívna, tak aj negatívna plazma testovali vždy pri použití setu. Ak však pozitívna alebo negatívna kontrolná plazma nedávajú očakávané výsledky, získané výsledky vzoriek pacientov sa nemôžu použiť.

## X. POZNÁMKY

1. Výsledky sa udávajú jednak v D-dimérových jednotkách alebo v jednotkách ekvivalentných fibrinogénu (FEU), 0.001 ug/ml D-diméru zodpovedá asi 0.002 ug/ml FEU.
2. Niektoré komerčné latexové testy majú nižšiu senzitivitu než je požadované. Pri stanovení D-dimérov D-dimér setom Thromboscreen je u chorých s hlbokou venóznou trombózou 60-70% vzoriek pozitívnych, na rozdiel od iných latexových testov kde je frekvencia pozitívnych výsledkov nižšia (5).
3. Malý počet vzoriek po zmiešaní s latexom dáva biele škvrny, ktoré sa nesmú zameniť s aglutináciou.
4. Keď sa EDTA vzorky skladujú pri izbovej teplote viac než 4 hodiny pred testovaním, môžu vykazovať nešpecifické reakcie.
5. U vzoriek s vysokou koncentráciou D-dimérov je aglutinácia výraznejšia a objavuje sa veľmi rýchlo.
6. Pryžové zátky od fľaštičiek s latexom a kontrolnými plazmami by sa po otvorení fľaštičiek mali vyhodiť do odpadu.

Symbols Key	Symboly	Symbols Key	Symboly
	Výroba		<i>In vitro</i> diagnostický zdravotnícky prostriedok
	Číslo šarže		Spotrebujte do
	Označenie CE		Obmedzenie teploty
	Katalógové číslo		Pozrite sa do návodu na použitie
	Dátum balenia		Autorizovaný zástupca v Európskom spoločenstve
	Upozornenie, pozrite sa do sprievodného listu		

Dovozca:



EXBIO Olomouc s.r.o.  
Ovesná 14  
779 00 Olomouc



MDCI Ltd.  
Arundel House  
1 Liverpool Gardens  
Worthing, West Sussex BN11 1SL  
UK



Fisher Diagnostics®  
8365 Valley Pike  
Middletown, VA 22645-0307, USA  
1-(800)-528-0494 jen USA