



V rutinní laboratorní praxi jsou pro detekci D-dimerů dostupné testy zahrnující latexovou aglutinaci, imunoturbidimetrii a enzymatický imunosorbentní test (ELISA). Negativní výsledek vyšetření D-dimerů (koncentrace nižší nebo rovna hraniční hodnotě) prakticky vylučuje hlubokou žilní trombózu a plicní embolii. Naopak pozitivní výsledek už není pro trombózu tak specifický. Nový typ POCT analyzátoru cobas h 232 je přístroj pro kvantitativní vyhodnocení imunotestů pro kardiovaskulární (tropoin T, CK-MB, myoglobin, NT-proBNP) nebo tromboembolické markery (D-dimer) s použitím techniky značení zlatem. Přístroj představuje nový způsob používání a byl vyzkoušen v ambulancích Trombotického centra ÚLBDL VFN a 1. LF UK v Praze pro detekci hladin D-dimerů. V porovnání s daty získanými na několika dalších analyzátořech využívaných v rutinní klinické praxi byly zjištěny vysoké hodnoty koeficientů R2 regresní analýzy (0,851–0,989), což ukazuje na velmi dobrou porovnatelnost s referenčním analyzátořem a je důležitým kritériem pro zařazení nového analyzátořu do laboratorní praxe.

Srovnání naměřených výsledků D-dimerů POCT přístrojem cobas h 232 s výsledky získanými z laboratorních analyzátořů

doc. MUDr. TOMÁŠ KVASNIČKA, CSc., Mgr. IVANA MALÍKOVÁ,
Bc. PETRA LINHARTOVÁ

Trombotické centrum, Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky (ÚLBDL), Všeobecná fakultní nemocnice (VFN) a 1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy (1. LF UK), Praha

Úvod

D-dimer je fragment proteinu, který vzniká, když enzym plazmin odbourává fibrinovou sraženinu stabilizovanou příčnými vazbami (vytvořenými působením faktoru XIII). Tento proces se nazývá fibrinolýza a opakovaným působením plazminu se vysokomolekulární polymery fibrinu štěpí na fibrinové fragmenty různé velikosti (fibrin degradační produkty). Konečný produkt odbourávání D-dimer je složen z jedné proteinové podjednotky E a ze dvou D podjednotek spojených příčnou vazbou (plazmin neštěpí tyto příčné vazby). Právě kvůli obsahu dvou D podjednotek se označuje produkt jako D-dimer. D-dimery jsou detekovány imunotesty pomocí monoklonálních protilátek specifických pro zesíťovanou doménu D-dimeru ve fibrinogenu. Komerčně dostupné testy

zahrnují latexovou aglutinaci, imunoturbidimetrii a enzymatický imunosorbentní test (ELISA), avšak jednotlivé testy nejsou navzájem komparabilní a snahy o standardizaci výsledků nebyly dosud úspěšné. V praxi nejčastěji používanými metodami jsou latexová imunoturbidimetrie nebo enzyme-linked immunofluorescence assay (ELFA), vhodné i v případě akutních stavů. Všechny používané techniky (ELISA, ELFA i latexová imunoturbidimetrie) vykazují vysokou senzitivitu, avšak na úkor nízké specifity. Tato skutečnost vede k velkému množství „nadbytečných“ ultrazvukových vyšetření (US) či CT angiografií (CTA). Negativní prediktivní hodnota testů – vyloučení přítomnosti hluboké žilní trombózy (DVT) / plicní embolie (PE) – je vysoká, avšak pozitivní prediktivní hodnota je naopak nízká. Hladinu D-dimeru zvyšuje nejen přítomnost PE či DVT, ale i zvýšení jeho prekursoru – fibrinogenu, který plní v organismu mnoho zásadních funkcí. Nejznámější je jeho role v hemokoagulaci a fibrinolýze. Zároveň tato molekula slouží při vzájemné interakci buněk a pojivové tkáně v průběhu hojení ran a procesu neoplazie. Fibrinogen reaguje s fibronektinem, heparinem nebo s endoteliálními kadheriny, čímž podporuje tvorbu kapilár a angiogenezi. Stejně tak interaguje s imunitními buňkami, které stimuluje v průběhu zánětlivé reakce.



Z toho vyplývá, že existují stavy vedoucí k trvalému zvýšení hladiny D-dimeru. Jedná se například o věk vyšší než 70 let, cévní aneuryzmata, maligní nádory, vrozené cévní malformace, systémová onemocnění pojiva, jaterní cirhózu či nefrotický syndrom a chronické renální selhání. Ke stavům spojeným s přechodným zvýšením hladin D-dimerů patří DVT, PE a tromboflebitida, ale také disseminovaná intravaskulární koagulopatie (DIC), operace provedená v posledních 4 týdnech, traumata i větší hematomy, aortální disekce, přítomnost infekce či nádorového onemocnění v organismu, akutní stavy, jako je infarkt myokardu, cévní mozková příhoda nebo končetinová ischemie a další. Koncentrace D-dimerů se udává v DDU jednotkách (z anglického D-dimer units, D-dimer jednotky) ng/ml DDU nebo mg/l DDU, označení DDU se obvykle vynechává). Nebo se používají FEU jednotky (fibrinogen ekvivalentní jednotky, ng/ml FEU nebo mg/l FEU, označení FEU se musí uvádět). Použití jednotek závisí na druhu diagnostické soupravy.

Význam monitoringu D-dimerů v klinické praxi

Výsledek testu se považuje za negativní, pokud je koncentrace D-dimerů nižší než 0,25 mg/l nebo 0,5 mg/l FEU. Tyto hraniční hodnoty může doporučit výrobce testu nebo si je mírně upraví sama laboratoř podle místních podmínek. Negativní výsledek vyšetření D-dimerů (koncentrace nižší nebo rovna hraniční hodnotě) prakticky vylučuje hlubokou žilní trombózu a plicní embolii. Negativní výsledek znamená, že v těle se

ve zvýšené míře nevytváří a neodbourávají krevní sraženiny. Naopak pozitivní výsledek už není pro trombózu tak specifický. Stavy spojené s trvalým nebo přechodným zvýšením byly uvedeny výše. Vyšetření D-dimerů pak jen přispívá k potvrzení diagnózy těchto onemocnění. Pozitivní výsledek znamená, že se vytvořily významné fibrinové sraženiny a ty se nyní odbourávají. Už ale není jasné, kde se vytvořily a co bylo příčinou. Pro klinické použití hladin D-dimeru je nutno znát přesnou anamnézu pacienta. K tomuto slouží Pre-Wellsovo skórování amnestických údajů popisující nebezpečí DVT. Zahrnuje stavy zvyšující riziko (například aktivní nádorové či infekční onemocnění, imobilizace, operace, edémy na končetinách) a klasifikuje pravděpodobnost postižení pacienta trombózou. V případě plicní embolie je možnost využít Ženevské skóre nebo Wellsova kritéria. Všechny tyto skórovací systémy rozděluje pacienty do tří skupin podle pravděpodobnosti DVT/PE – nepravděpodobná (LCP), pravděpodobná (ICP) a vysoce pravděpodobná (HCP).

Nový typ POCT analyzátoru **cobas h 232** je přístroj pro kvantitativní vyhodnocení imunotestů pro kardiovaskulární (troponin T, CK-MB, myoglobin, NT-proBNP) nebo tromboembolické markery (D-dimer) s použitím techniky značení zlatem. Přístroj představuje nový způsob používání a byl vyzkoušen v ambulancích Trombotického centra ÚLBDL VFN a 1. LF UK v Praze pro detekci hladin D-dimerů v průběhu roku 2019. Cílem sledování bylo získat výsledky od pacientů z analyzátoru **cobas h 232** a porovnat je s daty získanými na několika dalších

analyzátořech využívaných v rutinní klinické praxi.

Metody

Standardizace je u stanovení D-dimerů velmi obtížná, proto jsme museli mezi přístrojově porovnávat nejen prosté hodnoty, ale i principy stanovení, jednotky a také cutt-off hodnoty.

cobas h 232

Přístroj pro kvantitativní vyhodnocení D-dimeru pomocí imunotestu s použitím techniky značení zlatem. Hodnocení lze provést přímo na místě odběru vzorků krve. Přístroj **cobas h 232** má snadné a rychlé ovládání, vkládá se do něj diagnostický proužek a nanáší vzorek plné krve odebrané do zkumavky s anti-koagulačním přípravkem – natrium nebo lithium heparin.



▲ Obr. 1: Přístroj **cobas h 232** umístěný v Trombotickém centru VFN Praha

Název analyzátoru	cobas h 232	cobas t 511	miniVidas	Sysmex CS 5100	BCS XP
Princip měření	imunologický	imunoturbidimetrický	imunofluorescenční	imunologický	imunoturbidimetrický
Vlnová délka (nm)	*	800	450	800	405
Jednotky	µg FEU/l	µg FEU/l	µg FEU/l	µg/l	µg/l
Cut-off	500	500	500	190	190

▲ Tab. 1: Základní charakteristiky přístrojů

* skenování intenzity signální linie



cobas t 511

Automatický koagulometr, který používá kazetový systém reagentů, přičemž jsou reagentie rekonstituovány přímo v analyzátoru. D-dimery se stanovují pomocí latexových částic, které jsou potažené monoklonální protilátkou proti epitopu D-dimeru. Po přidání vzorku obsahujícího D-dimery se vytváří komplexy antigen–protilátka, což vede k nárůstu zákalu reaktantů. Změna absorbance v čase je závislá na koncentraci epitopů D-dimeru ve vzorku.

miniVidas

Analyzátor s fluorescenční detekcí, kde stanovení D-dimerů spočívá v kombinaci dvoukrokové sendvičové enzymatické

imunoanalýzy se závěrečnou detekcí pomocí fluorescence (ELFA). Základem testu je pevná fáze, tj. špička s navázanými protilátkami proti epitopu D-dimeru. Ve špičce je vzorek inkubován a pomocí ní pipetován mezi jednotlivými sekcemi stripu. V poslední jamce je na konci testu změřen fluorescenční signál a ten je následně přepočítán na koncentraci.

Sysmex CS 5100

Automatický koagulometr, který používá pro měření jednotlivé reakční kyvety. D-dimery se stanovují pomocí mikrolatexových částic, které jsou potažené monoklonální protilátkou proti epitopu D-dimeru. Imunologická reakce se projeví změnou propustnosti světla.

BCS XP

Automatický koagulometr, který používá pro měření reakční rotory. D-dimery se stanovují stejně jako u předchozího analyzátoru pomocí mikrolatexových částic. V měřicí kyvetce rotoru vznikne při imunologické reakci zákal, jehož intenzita se proměňuje turbidimetricky.

Charakteristika souboru

Pro měření byly použity vzorky heparinové krve u přístroje **cobas h 232** a citrátové plazmy u ostatních přístrojů (**cobas t 511**, **miniVidas**, **Sysmex CS 5100** a **BCS XP**).



▲ Obr. 2: Koagulometr **cobas t 511** umístěný v Centrální hematologické laboratoři (CHL) VFN



▲ Obr. 3: Analyzátor **miniVidas**



▲ Obr. 4: Koagulometr **Sysmex CS 5100**



▲ Obr. 5: Koagulometr **BCS XP**



Počet	Muži	Ženy	Průměrný věk	Negativní z hlediska tromboembolismu	Pacienti s tromboembolismem
45	5	40	45 let	35	10

▲ Tab. 2: Charakteristika sledovaného souboru

Výsledky

• Mezipřístrojové porovnání I

V Trombotickém centru jsou umístěny dva stejné přístroje **cobas h 232**, proto jsme se v první fázi zaměřili na mezipřístrojové porovnání u 33 vzorků přímo v ambulanci. Výsledky jsme vyhodnotili pomocí vícenásobné regresní analýzy v programu Statistica 12. Výsledný R2 koeficient 0,992 svědčí pro velmi dobrou porovnatelnost.

• Mezipřístrojové porovnání II

Všechny vzorky ze sledovaného souboru byly změřeny na přístroji **cobas h 232** a zároveň na dalších čtyřech výše uvedených analyzátoch. Pro grafické znázornění a větší přehlednost

byly hodnoty z analyzátorů BCS XP a Sysmex CS 5100 upraveny pomocí koeficientu vztaženého ke cut-off.

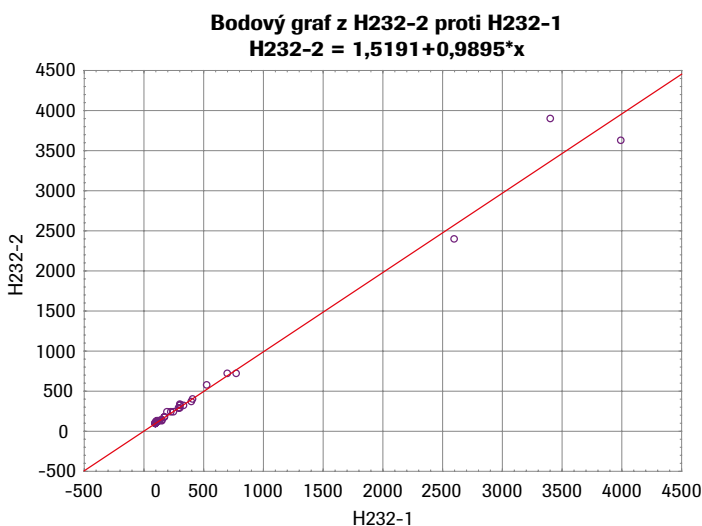
Závěr

Zjištěné vysoké hodnoty koeficientů R2 regresní analýzy (0,851–0,989) ukazují na velmi dobrou porovnatelnost s referenčním analyzátoem i jednotlivých analyzátorů mezi sebou. Porovnání s referenčním analyzátoem je důležitým kritériem pro zařazení nového analyzátoru do laboratorní praxe. Při porovnání vzorků pacientů s negativními hodnotami nebyly nalezeny významné rozdíly hodnot získaných z jednotlivých analyzátorů. Rovněž u pacientů s prokázanou

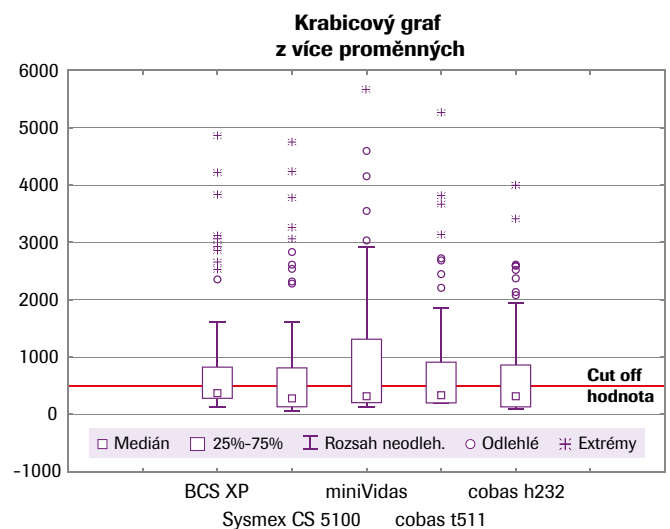
trombózou byly naměřeny vysoké hodnoty na všech přístrojích. Stanovení D-dimerů patří obecně k nejvíce problematickým stanovením v hemostáze a jen velmi těžko se jednotlivá měření porovnávají. Rozdíly ve stanovení mohou být způsobeny složením kitu, typem monoklonální protilátky navázané na latexových částicích, vlnovou délkou měření a typem analyzátoru. Je potřeba brát také v úvahu uváděné jednotky výsledku a normální rozmezí. Při výběru diagnostického testu je rovněž vhodné uvážit rychlost a podmínky stanovení a diagnostický přínos.

Přístroj **cobas h 232** je ideální pro použití na urgentních příjmech, jednotkách intenzivní péče, v odborných ambulancích (kardiologie, angiologie, interna) nebo u praktických lékařů.

Práce byla podpořena projektem RVO-VFN64165. Použitá literatura k dispozici u autora textu.



▲ Graf 1: Lineární regrese stanovení D-dimerů na **cobas h 232** (1 a 2)



▲ Graf 2: Krabicové grafy stanovení D-dimerů na všech analyzátoch



doc. MUDr. Tomáš Kvasnička, CSc.

Vedoucí Trombotického centra, Všeobecná fakultní nemocnice a 1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy, Karlovo nám. 32, Praha 2, www.vfn.cz

Kontakt: tomas.kvasnicka@vfn.cz