

**UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO**

Ucman Vesna

**PRIMERJAVA DVEH IMUNOKEMIČNIH METOD ZA
MERJENJE KONCENTRACIJE D-DIMERA V PLAZMI**

DIPLOMSKA NALOGA

**VISOKOŠOLSKI STROKOVNI PROGRAM LABORATORIJSKE
BIOMEDICINE**

Ljubljana, 2008

Diplomsko nalogo sem opravljala v Diagnostičnem laboratoriju Splošne bolnišnice Novo mesto.

ZAHVALA

Zahvaljujem se vsem, ki so mi pomagali pri izvedbi diplomske naloge. Posebna zahvala velja prof. dr. Jana Lukač Bajalo, univ. dipl. kem., spec. med. biokem. za strokovno pomoč ter asis. mag. Danijela Furlan, univ. dipl. kem., spec. med. biokem. za praktične nasvete in strokovno pomoč.

IZJAVA

Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelala pod vodstvom mentorice prof. dr. Jana Lukač Bajalo, spec. med. biokem. ter somentorstvom asis. mag. Danijela Furlan, spec. med. biokem.

Ucman Vesna

Podpis:

Predsednik diplomske komisije: izr. prof. dr. Vojko Kmetec, mag. farm

Član diplomske komisije: asis. dr. Mitja Kos, mag. farm

Novo mesto, april 2008

VSEBINA

POVZETEKI

SEZNAM OKRAJŠAV.....III

1. UVOD	7
1.1. D-DIMER	7
1.2. FIZIOLOGIJA HEMOSTAZE	8
1.2.1. FIBRINOLITIČNI SISTEM	8
1.2.2. RAZGRADNI PRODUKTI FIBRINOGENA IN FIBRINA.....	9
1.3. D-DIMER IN Z NJIM POVEZANA BOLEZENSKA STANJA.....	9
1.3.1. VENSKA TROMBOZA.....	10
1.3.2. PLJUČNA EMBOLIJA	11
1.3.3. DISEMINIRANA INTRAVASKULARNA KOAGULACIJA	11
1.4. D-DIMER V LABORATORIJSKI DIAGNOSTIKI	12
1.4.1. AGLUTINACIJSKA METODA Z DELCI LATEKSA.....	13
1.4.2. ENCIMSKO IMUNOADSORPCIJSKA METODA – ELISA	13
1.4.3. IMUNOTURBIDIMETRIČNA METODA.....	14
2. NAMEN DELA	16
3. MATERIALI IN METODE	17
3.1. ODVZEM KRVI	17
3.2. MERJENJE KONCENTRACIJE D-DIMERA NA ANALIZATORJU BCS XP..	17
3.2.1. REAGENTI	17
3.2.2. PRINCIP MERJENJA	19
3.3. MERJENJE KONCENTRACIJE D-DIMERA NA ANALIZATORJU HITACHI	
912.....	22
3.3.1. REAGENTI	22
3.3.2. PRINCIP MERJENJA	23
4. REZULTATI IN RAZPRAVA	25
4.1. OCENA KAKOVOSTI KONTROLNIH VZORCEV NA ANALIZATORJU BCS	
XP	25
4.2. OCENA KAKOVOSTI KONTROLNIH VZORCEV NA ANALIZATORJU	
HITACHI 912	26
4.3. VZORCI	28
5. ZAKLJUČEK	53
6. LITERATURA	54

POVZETEK

D-dimer je najmanjši razgradni produkt, ki nastane iz fibrina. Fibrin razpade po delovanju plazmina, pri tem pa nastane končni produkt, to je D-dimer. D-dimer je pokazatelj številnih bolezni. Negativi rezultati D-dimera skoraj zagotovo izključujejo vensko trombozo, medtem ko jo pozitivni rezultati ne potrjujejo. Zvišana koncentracija D-dimera je značilna za številna bolezenska stanja kot so:

- venska tromboza,
- pljučna embolija,
- diseminirana intravaskularna koagulacija,
- malignomi.

Koncentracija D-dimera je zvišana tudi pri nosečnicah, po obsežnih poškodbah ali operacijah.

Namen naloge je bil ugotoviti ali lahko z izbiro bolj občutljivega reagenta zmanjšamo interference, ki motijo reakcijo in se izognemo lažno negativnim rezultatom. Ugotavljali pa smo tudi, kako vpliva temperatura in različni pogoji shranjevanja vzorcev na koncentracijo D-dimera v plazmi. Obravnavali smo vzorce 140 bolnikov. Vsakemu vzorcu citratne plazme smo paralelno izmerili koncentracijo D-dimera na biokemičnem analizatorju HITACHI 912, proizvajalca ROCHE ter na analizatorju BCS XP, proizvajalca DADE BEHRING. Diagnoza pri izbiri vzorcev ni bila pomembna. Pri tem pa smo na obeh analizatorjih uporabljali imunoturbidimetrično metodo merjenja. Nato smo si izmed vseh vzorcev izbrali 20 naključnih vzorcev, ki smo jih hranili 4 ure na sobni temperaturi, 20 vzorcev, ki smo jih hranili 4 ure v hladilniku (+ 4 °C) ter 20 vzorcev, ki smo jih shranjevali mesec dni v zamrzovalniku (- 20 °C). Tem vzorcem smo nato ponovno izmerili koncentracijo D-dimera v plazmi na obeh analizatorjih.

Ugotovili smo, da pri vseh 140 bolnikih metodi dobro kolerirata, saj je korelacijski koeficient dober ($r = 0,9833$). Koncentracije D-dimera na analizatorju BCS XP so statistično značilno višje kot na analizatorju HITACHI 912 ($p < 0,05$). Dokazali smo, da z izbiro bolj občutljivega reagenta ne dobimo lažno negativnih rezultatov. To trditev smo potrdili s tem, da so bile pri 18 pacientih koncentracije D-dimera na analizatorju HITACHI 912 negativne, na analizatorju BCS XP pa pozitivne.

Razlike v koncentracijah D-dimera v vzorcih, ki so bili 4 ure na sobni temperaturi so bile statistično neznačilne od koncentracije izmerjene v prvotnih vzorcih. Ugotovili smo, da sobna temperatura ne vpliva bistveno na koncentracijo D-dimera v plazmi. To velja za oba analizatorja. Ravno tako smo ugotovili, da shranjevanje vzorcev v hladilniku ne vpliva bistveno na koncentracijo D-dimera, saj rezultati niso bili statistično značilno različni ($p > 0,05$) od koncentracije izmerjene v prvih vzorcih. Tudi to velja za oba uporabljena analizatorja.

V zamrznjenih vzorcih je bila koncentracija D-dimera v večini primerov višja, kot pred zamrznitvijo, vendar razlika ni bila statistično značilna.

Zaključimo lahko, da temperatura, čas in način hranjenja vzorcev ne vplivajo na koncentracijo D-dimera statistično značilno. Izbira občutljivejšega reagenta pa je pravilna odločitev, saj se izognemo lažno negativnim rezultatom.

SEZNAM OKRAJŠAV

VT – venska tromboza

DIC – diseminirana intravaskularna koagulacija

XIII – faktor, ki stabilizira fibrin

FDP – razgradni produkti fibrinogena oziroma fibrina (fibrin / fibrinogen degradation products)

\bar{x} – aritmetična sredina

KV – koeficient variacije

SD – standardni odklon

1. UVOD

1.1. D-DIMER

D-dimer je protein in je najmanjši razgradni produkt, ki nastane po delovanju plazmina na prečno vezani fibrin (1). D-dimer je specifičen za razgradnjo fibrina. Prvi ga je opisal Gaffney leta 1972 (2), kasnejše raziskave pa so potrdile prisotnost zvišanih plazemskih vrednosti D-dimera pri številnih stanjih in boleznih. Koncentracija D-dimera je zvišana predvsem pri venski trombozi (VT), pljučni emboliji, diseminirani intravaskularni koagulaciji (DIC), malignomih, po obsežnih operativnih posegih in poškodbah ter v nosečnosti. Koncentracija D-dimera pri zdravih ljudeh je manjša od 0,5 mg/L.

Zvišana koncentracija D-dimera je pokazatelj:

- prisotnosti trombina, ki deluje na fibrinogen, ta pa se pretvarja v fibrinske monomere, ki se prepletajo med seboj,
- prisotnosti plazmina, ki lizira fibrin (3).

Nizke vrednosti D-dimera dokaj zanesljivo izključujejo VT.



Slika 1: Zgradba D-dimera

Trombin spremeni fibrinogen v topen fibrin s cepitvijo fibrinopeptidov A in B. Fibrinski monomeri spontano polimerizirajo. Aktivni faktor XIII veže 2 D-področji in tvori trden fibrinski strdek. Tvori se nova antigenska determinanta, ki je odpornejša na plazmin (D-dimer). Fragmenti, ki vsebujejo D-dimer se tvorijo med razgradnjo fibrinskega strdka s plazminom. Velik del fibrinskega razgradnega produkta je sestavljen iz visoko molekularnih X-oligomerov (4).

1.2. FIZIOLOGIJA HEMOSTAZE

Hemostaza je skupek procesov med trombociti, koagulacijskimi in fibrinolitičnimi beljakovinami, inhibitorji in žilno steno. Normalna hemostaza se sproži ob poškodbi žilne stene in prepreči večjo krvavitev. Hemostaza se prične s skrčenjem žilne stene, prilepljanjem trombocitov in nastankom trombocitnega strdka. Govorimo o primarni hemostazi. Temu sledi sekundarna hemostaza, pri kateri nastaja fibrin na mestu poškodbe in je posledica reakcij v koagulacijskem sistemu. Fibrinska vlakna tako učvrstijo trombocitni strdek in krvavitev se zaustavi. Primarna in sekundarna hemostaza potekata hkrati in povezano (5, 6).

1.2.1. FIBRINOLITIČNI SISTEM

Fibrinoliza je pomemben fiziološki mehanizem, ki ima v procesu hemostaze dve nalogi:

- razgradnja fibrinskih strdkov,
- omejevanje širjenja fibrinskih strdkov po tem, ko so opravili svojo fiziološko vlogo (7).

Fibrinolitični sistem se aktivira sočasno s koagulacijo. Endotelijske celice sprostijo tkivni aktivator plazminogena, ki aktivira plazminogen v plazmin. Ta pa hidrolizira fibrin v topne produkte razgradnje. Fibrin s prečnimi povezavami (po delovanju faktorja XIII) je sestavljen iz velikega števila polimerov, posamezne podenote pa so kovalentno povezane. Plazmin naključno cepi vezi med posameznimi podenotami, tako da nastanejo različno

veliki deli molekule fibrina. Ti so naprej razgrajeni v D-dimere in produkte E. Tako se strdek raztaplja in zmanjšuje (5).

1.2.2. RAZGRADNI PRODUKTI FIBRINOGENA IN FIBRINA

Razgradni produkti fibrinogena ali fibrina (FDP) nastajajo, kadar plazmin razgrajuje fibrinogen oziroma fibrin. Različni fibrinski razgradni produkti nastanejo v odvisnosti od tega ali plazmin cepi prečno povezani fibrin ali pa cepi fibrin, ki ni prečno povezan, z aktivnim faktorjem XIIIa (8). Zvišani FDP so neposreden dokaz povečanja fibrinolitične aktivnosti (hiperfibrinolize). Fibrin, ki nastaja na žilni steni, premreži faktor XIIIa. Ob razgradnji premreženega fibrina nastaja med drugimi razgradnimi produkti tudi D-dimer, ki je značilen za premreženi fibrin.

Na podlagi določanja razgradnih produktov fibrinogena oziroma fibrina ločimo:

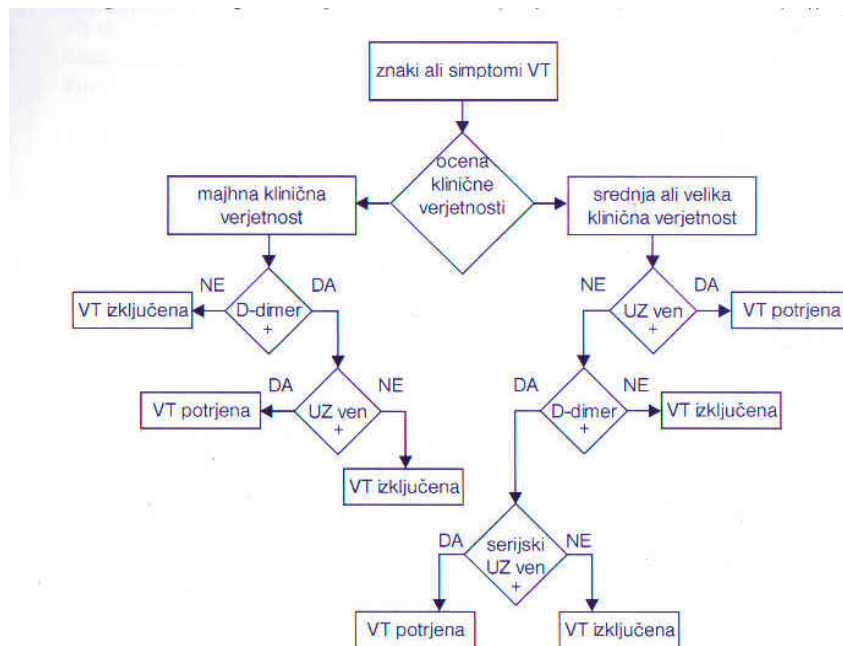
- primarno fibrinolizo brez aktiviranja koagulacije, za katero je značilna prisotnost razgradnih produktov fibrinogena,
- sekundarno ali reaktivno hiperfibrinolizo, ki je posledica nastajanja strdka, zanjo pa je značilna prisotnost D-dimera .

Kot produkt razgradnje fibrinogena nastajata fragment D in fragment E. Zaradi delovanja trombina nastajajo topni fibrinski monomeri, ki jih stabilizira faktor XIIIa. Tako nastane stabilen, premrežen fibrin. Pri razgradnji takega fibrina nastane končni razgradni produkt D-dimer. Zvišana koncentracija D-dimera je znak, da je prišlo do nastajanja fibrina in do sekundarnega aktiviranja fibrinolize, lahko pa ga povežemo tudi s številnimi bolezenskimi stanji, kot so tromboza, diseminirana intravaskularna koagulacija (DIC), pljučna embolija (8, 9).

1.3. D-DIMER IN Z NJIM POVEZANA BOLEZENSKA STANJA

1.3.1. VENSKA TROMBOZA

Venska tromboza je delna ali popolna zamašitev ene ali več ven s strdkom. Glede na mesto tromboze ločimo površinski tromboflebitis, pri katerem gre za trombozo površinske vene, in vensko trombozo, pri kateri je s strdkom zamašena globoka vena. Nastopi lahko v vseh življenjskih obdobjih, najpogostejša pa je v starosti. Izrazi se z nespecifičnimi kliničnimi znaki. Klinična slika VT ima širok razpon – od popolne odsotnosti kliničnih znakov in simptomov bolezni, do jasno prepoznavnih oblik z obsežno oteklino prizadetega uda. Na VT posumimo pri novo nastali bolečini ali oteklini uda. Pri sumu, da gre za VT, je pomembna ocena prisotnosti dejavnikov nevarnosti nastanka VT (nedavna večja operacija ali poškodba, družinsko pojavljanje VT, debelost, ...) (10). Klinična diagnoza VT je nezanesljiva, zato moramo bolezen vedno objektivno potrditi. VT objektivno potrdimo z eno od dragih in zamudnih preiskav, kot so venografija, ultrazvok ali pletizmografija (1). Zelo primerna preiskava pa je tudi določanje koncentracije D-dimera v plazmi bolnikov s sumom na VT, predvsem zato ker so rezultati dobljeni zelo hitro. Negativne vrednosti D-dimera dokaj zanesljivo izključujejo VT, pozitivne pa je ne potrjujejo, ker je koncentracija D-dimera zvišana pri številnih drugih bolezenskih stanjih. Po trenutno veljavnih priporočilih morajo biti bolniki s sumom na VT, ki imajo zvišano vrednost D-dimera, z ultrazvokom pa VT ne ugotovimo, ponovno ultrazvočno pregledani (slika 2) (1).



Slika 2: Shema diagnoze venske tromboze

1.3.2. PLJUČNA EMBOLIJA

Pojem pljučna embolija opredeljuje vsako delno ali popolno zaporo pljučne arterije ali arterij s strdki. Poglavitni vzrok pljučne embolije je venska tromboza spodnjih okončin. Kot dejstvo, da se venska kri vrača v srce, lahko pride do odcepitve strdka s stene vene in tako se strdek prenese v desno stran srca in od tam v pljuča. Dejavniki tveganja za nastanek venske tromboze so torej tudi dejavniki tveganja razvoja pljučnih embolij. Klinična slika pljučne embolije je zelo raznolika, zato moramo bolezen ob vsakem sumu potrditi ali izključiti z dodatnimi preiskavami. Mednje spadajo plinska analiza arterijske krvi, elektrokardiogram, scintigrafija pljuč in pljučni funkcijski testi. Izvida, ki bi lahko potrdil ali izključil pljučno embolijo, ni. Pri bolnikih s pljučno embolijo sorazmerno pogosto ugotovimo zvišane vrednosti razgradnih produktov fibrina (11).

1.3.3. DISEMINIRANA INTRAVASKULARNA KOAGULACIJA

Diseminirana intravaskularna koagulacija (DIC) je zaplet v poteku številnih bolezni. Za DIC so značilne tromboze v področju malih žil, moten pretok krvi v predelu mikrocirkulacije, okvara tkiv in organov. Neprestano nastajanje fibrina in fibrinoliza vodita do krvavitev zaradi porabe koagulacijskih beljakovin in trombocitov ter antikoagulacijskega učinka FDP. Klinična slika DIC je pestra in se spreminja glede na stanje in obseg DIC-a. Znaki DIC se prepletajo z znaki bolezni, ki je sprožila DIC. Vzrok za nastajanje strdkov v malih žilah je aktivacija trombocitov in koagulacije. Porabljajo se trombociti in nekatere koagulacijske beljakovine. Sočasno je aktivirana tudi fibrinoliza (12, 13). Normalno obstaja ravnotežje med faktorji, ki stimulirajo in faktorji, ki inhibirajo koagulacijo krvi in hemostazo. Motnja tega ravnotežja vodi do pojava DIC (14). Bolezni pri katerih nastane DIC so številne. Najpogostejše so šok, opekline, jetrne bolezni, pri zapletih nosečnosti (prezgodnje odlučenje posteljice, zadrževanje mrtvega ploda v maternici), sepsa, metastazirajoče rakaste bolezni in obsežne poškodbe. Po poteku in znakih ločimo:

- akutno DIC (nastane zaradi nenadne in hitre aktivacije koagulacije pri stanjih, kjer gre za sprostitvev tkivnega faktorja ali direktno aktivacijo koagulacije),
- kronično DIC (bolniki imajo dolgo časa znake DIC-a ali pa ugotovimo le spremembe v krvi z laboratorijskim preiskovanjem),
- lokalizirano DIC (lahko se pojavi v zavrtnjenem presadku ledvice, v velikih hemangiomih) (12).

1.4. D-DIMER V LABORATORIJSKI DIAGNOSTIKI

Koncentracijo D-dimera merimo najpogosteje kot pomoč pri izključevanju venske tromboze. Razvoj metod za merjenje koncentracije D-dimera je šel od encimskih imunoabsorpcijskih metod (ELISA), preko hitrih aglutinacijskih metod do avtomatiziranih imunoturbidimetričnih metod (1).

Z odkritjem monoklonskih protiteles, specifičnih za molekulo D-dimera, je bil omogočen razvoj laboratorijskih metod za merjenje koncentracije D-dimera v krvi.

Danes so uveljavljene naslednje metode, med katerimi so najpomembnejše zadnje tri:

- aglutinacijska z avtolognimi eritrociti,
- aglutinacijska z delci lateksa,

- encimsko imunoabsorpcijska metoda (ELISA),
- imunoturbidimetrična (4).

1.4.1. AGLUTINACIJSKA METODA Z DELCI LATEKSA

Tako FDP kot D-dimer lahko določamo z aglutinacijsko metodo z delci lateksa. Vendar pa s to metodo ne moremo razlikovati ali gre za razgradne produkte fibrina ali fibrinogena.

PRINCIP MERJENJA:

Delci lateksa so prekriti s poliklonskimi protitelesi proti fragmentom D in E. Nato dodamo vzorec in če so v vzorcu prisotni FDP, pride do aglutinacije delcev lateksa (slika 3) (15).



Slika 3: Hitri lateks test za določanje D-dimera in FDP

1.4.2. ENCIMSKO IMUNOADSORPCIJSKA METODA – ELISA

Obe vrsti razgradnih produktov (fibrinogena ali fibrina) lahko določamo tudi z encimimunokemijskimi metodami.

PRINCIP MERJENJA:

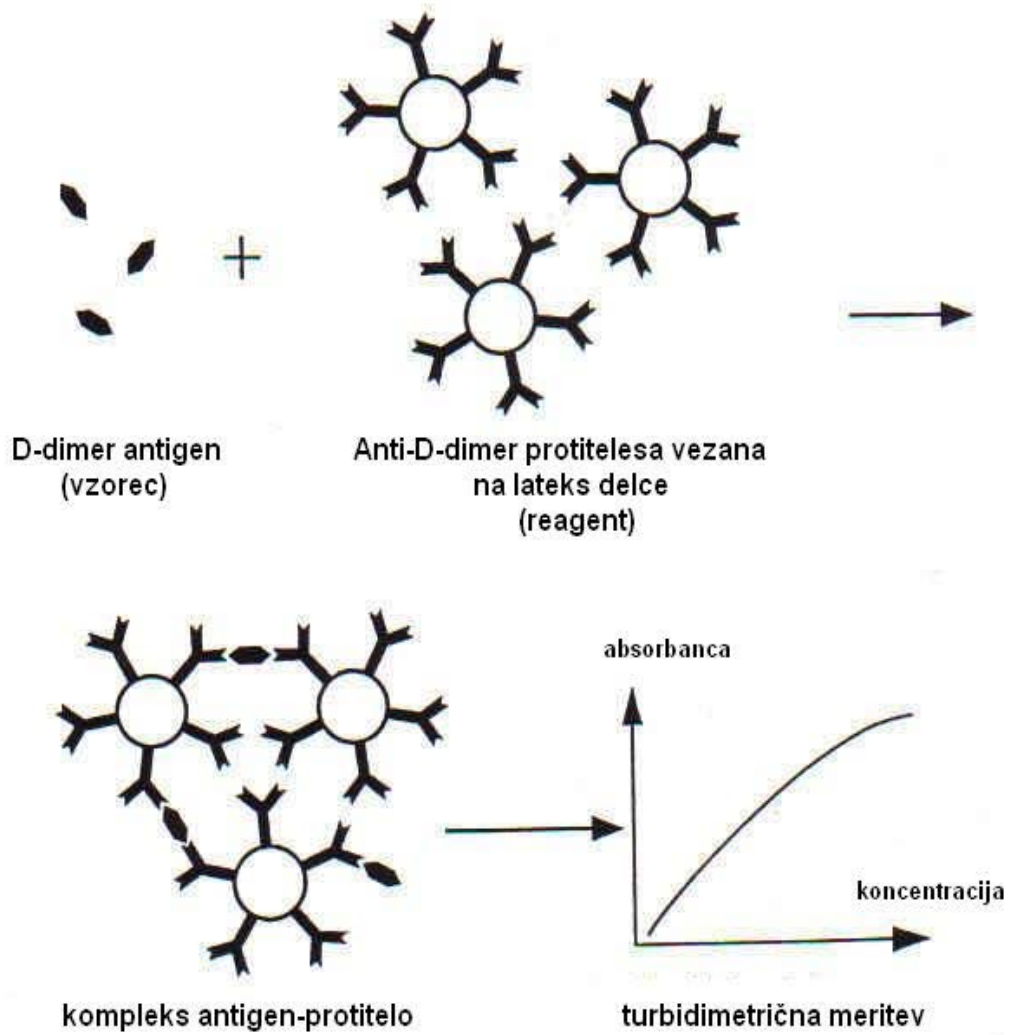
Pri ELISA testih je površina mikrotitrskih ploščic prekrita z monoklonskimi protitelesi, ki so usmerjeni proti specifičnim epitopom FDP ali D-dimera (primarna protitelesa). Po inkubaciji mikrotitrskih ploščic z vzorcem, se FDP ali D-dimer vežeta s sekundarnimi protitelesi, ki imajo na svoji površini vezan encim. Ta encim je specifičen za FDP ali D-dimer. Nato dodamo kromogen substrat za ta encim, ki povzroči spremembo barve nastalega produkta. Ta produkt nato merimo.

Metoda ELISA je odvisna od specifičnosti protiteles, ki so uporabljena. Pri nekaterih metodah določamo tako fibrinske kot fibrinogenske razgradne produkte, medtem ko pri drugih merimo ali fibrinske ali pa fibrinogenske razgradne produkte (15).

1.4.3. IMUNOTURBIDIMETRIČNA METODA

Zaradi pomena D-dimera pri izključevanju VT obstajajo tudi hitre in občutljive imunoturbidimetrične metode. Turbidimetrija temelji na merjenju prepuščene svetlobe skozi vzorec, iz katere sledi izračun absorbance. Bolj kot je vzorec moten manj svetlobe bo prepuščene in večja bo absorbanca ter obratno.

Lateks delci enakih velikosti so prevlečeni z monoklonskimi protitelesi usmerjenimi na D-dimerni epitop. Po dodatku vzorca z D-dimerom nastanejo kompleksi antigen-protitelo, ki vodijo k povečani motnosti reaktantov. Sprememba absorbance s časom je odvisna od koncentracije epitopov D-dimera v vzorcu (slika 4) (4).



Slika 4: Princip turbidimetričnega določanja D-dimera

2. NAMEN DELA

V zadnjih letih je razvoj občutljivejših metod močno povečal zanesljivost odkrivanja in potrjevanja bolezni srca in ožilja z laboratorijskimi metodami.

Razvoj metod za merjenje koncentracije D-dimera v plazmi je temeljil na odkritju monoklonskih protiteles, ki so specifična za molekulo D-dimera. D-dimer je eden glavnih pokazateljev s katerimi dokaj zanesljivo izključimo vensko trombozo, ne pa potrdimo, ker se pojavlja tudi pri drugih bolezenskih stanjih.

Namen diplomske naloge je ugotoviti, ali lahko potrdimo, da z izbiro bolj občutljivega reagenta, ki vsebuje liofilizirana protitelesa, zmanjšamo interference in se izognemo lažno negativnim rezultatom. Vzoredno bomo primerjali rezultate dobljene na dveh različnih analizatorjih, pri tem pa bomo na obeh analizatorjih uporabljali imunokemično metodo za merjenje koncentracije D-dimera v plazmi.

Koncentracijo D-dimera v plazmi bomo merili na analizatorju HITACHI 912, proizvajalca ROCHE ter na analizatorju BCS XP, proizvajalca DADE BEHRING.

V diplomsko delo bomo vključili vzorce bolnikov, ki jih ne bomo izbirali selektivno glede na simptome, temveč naključno. Pri bolnikih ne bomo spremljali povezave med diagnozo in rezultatom, spremljali bomo le primerjavo enakih metod na dveh različnih analizatorjih različnih proizvajalcev z različnimi reagenti.

V vzorcu plazme bomo izmerili koncentracijo D-dimera v roku ene ure po odvzemu vzorca. Te iste vzorce pa bomo nato shranili pod različnimi pogoji (4 ure na sobni temperaturi, 4 ure v hladilniku pri + 4 °C ter v zamrzovalniku pri – 20 °C), da preverimo vpliv pogojev shranjevanja na koncentracijo D-dimera v plazmi.

Dobljene rezultate bomo statistično obdelali z računalniškim programom Microsoft Excel for Windows 2000 (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, ZDA) in programom MedCalc.

3. MATERIALI IN METODE

3.1. ODVZEM KRVI

Bolniku je bila odvzeta venska kri v vakuumske epruvete z 0,109 M natrijevim citratom kot antikoagulantnim sredstvom, firme Becton Dickinson (slika 5). Po prejemu vzorca v laboratorij smo vzorce centrifugirali 10 minut na 3500 obratih/minuto. Tako smo ločili plazmo od celic. Plazmo smo nato uporabili za nadaljnje merjenje koncentracije D-dimera. Koncentracijo D-dimera smo izmerili takoj oziroma v roku ene ure po odvzemu vzorca.



Slika 5: Vakuumska epruveta z natrijevim citratom

3.2. MERJENJE KONCENTRACIJE D-DIMERA NA ANALIZATORJU BCS XP

3.2.1. REAGENTI

Za merjenje koncentracije D-dimera smo uporabljali tovarniško pripravljene reagente Innovance* D-dimer, proizvajalca Dade Behring, in sicer:

- R1: Innovance* D-dimer reagent, liofiliziran, ki vsebuje polistirenske delce prekrivane z mišjimi monoklonskimi protitelesi, v puferni raztopini katera vsebuje humani

albumin, dodana pa sta tudi amfotericin B (0,625 mg/L) in gentamicin (6,25 mg/L),

- R2: Innovance* D-dimer pufer, alkalna raztopina, ki vsebuje razkužilo in polimerne ogljikove hidrate (natrijev azid < 1 g/L),
- R3: Innovance* D-dimer suplement, alkalna puferna raztopina s proteini, ki vsebuje heterofilni zaviralni reagent (natrijev azid <1 g/L),
- R4: Innovance* D-dimer diluent, alkalna puferna raztopina ki vsebuje razkužilo (natrijev azid < 1 g/L).

Reagent R1 pred uporabo raztopimo v 4,0 ml destilirane vode, trikrat rahlo premešamo in ga pustimo vsaj 15 minut pri temperaturi 15 – 25 °C. Preden ga vstavimo v analizator ga ponovno trikrat rahlo premešamo, pri čemer pazimo da se reagent ne speni ter odstranimo morebitne mehurčke.

Reagent R1, R2 in R3 pa so že pripravljene za uporabo. Pazljivi moramo biti, da reagenti niso spenjani in ni prisotnih mehurčkov zraka.

Tako pripravljene reagente vstavimo v ohlajeni del analizatorja.

Prednost in novost je reagent R3, ki vsebuje heterofilna protitelesa, ki vežejo interference, ki bi lahko vplivale na lažno pozitivne rezultate.

Po navodilih proizvajalca so reagenti stabilni štiri tedne, če jih hranimo pri temperaturi 2 – 8 °C. Če pa jih hranimo pri temperaturi ≤ -18 °C pa so stabilni osem tednov. Pred uporabo reagent segrevamo 10 minut na 37 °C, nato pa ga hranimo pri 2 – 8 °C. Odmrznjen reagent ne smemo ponovno zamrzniti (16).

3.2.2. PRINCIP MERJENJA

Za merjenje koncentracije D-dimera smo uporabljali biokemični analizator BCS XP, proizvajalca DADE BEHRING (slika 6).



Slika 6: Analizator BCS XP

Behring coagulation system je avtomatski koagulacijski sistem, ki je namenjen za delo s koagulacijskimi, kolorimetričnimi in imunološkimi testi. Sistem je sestavljen iz analizatorja in računalnika.

Glavne enote analizatorja so (17):

- **Dispenzirna enota**, ki je sestavljena iz dilutorja za reagente in iz dilutorja za vzorce. Dilutor je sestavljen iz gonila z motornim pogonom, dispenzirne brizge in menjalnega ventila. Dilutor za reagente (1000 μ l) krmili pipetiranje količine reagenta, dilutor za vzorce (250 μ l) pa krmili pipetiranje vzorcev, kontrol, standardov in dodatnih reagentov.
- **Pipetorski roki in spiralna postaja**: Pipetor za vzorce transportira vzorce, kontrole, standarde in dodatne reagente v reakcijske kivete merilnih rotorjev. Pipetor za reagente pa transportira reagente iz vseh linij z nosilci v reakcijske kivete merilnega rotorja. Pipetor je temperiran in lahko segreje ohlajene reagente na reakcijsko temperaturo (37 °C).
- **Postaja z nosilci**: V področje za nosilce z različnimi nosilci naložimo v analizator reagente, kontrole, standarde, dodatne reagente in vzorce. S pomočjo čitalca črtnih kod sistem prepozna reagente in vzorce. Na analizatorju so prve štiri steze hlajene pozicije za reagente, steza 5-pozicija za reagente pri sobni temperaturi, ostale steze pa so namenjene za kontrole, standarde, dodatne reagente in vzorce.
- **Merilna enota**, ki jo sestavljajo transportna roka za merilne rotorje, dve komori za zalogo merilnih rotorjev, pipetirna pozicija, merilna pozicija in mehanizem za odpad merilnih rotorjev. Celotna merilno reakcijska enota je zaščiten s pokrovom, ki zagotavlja konstantno temperaturo 37 °C. Transportna roka za merilne rotorje transportira rotorje na ustrezne pozicije merilne enote. Na mestu za pipetiranje analizator s pipetorji doda ustrezne reagente in vzorce, nato pa se po končani inkubaciji izmeri analit na mestu za merjenje.
- **Merilni rotorji** so sestavljeni iz 20 merilnih reakcijskih kivet. Reakcijsko kiveto sestavlja pipetirna komora, dilucijska komora in merilna komora. Celotna merilna kiveta sega od sredine rotorja vse do zunanega dela rotorja. S pregradami je ločena v tri predele oziroma komore. Skozi te pregrade s centrifugalno silo med vrtenjem stečejo vzorci in reagenti proti merilni komori na zunanjem delu rotorja.

Med potovanjem tekočin proti zunanemu delu se premešajo in hkrati poteče tudi koagulacijska reakcija, ki se v zadnjem delu nato izmeri.

- **Optični sistem:** BCS optika omogoča fotometrično, turbidimetrično in imunološko merjenje. Fotometer je sestavljen iz izvora svetlobe (ksenonska svetilka), filtrov različnih valovnih dolžin (340 nm, 405 nm, 570 nm, 2 prosti mesti), vodnikov svetlobe, referenčnega kanala in merilnega detektorja.

Pred zagonom analizatorja je potrebno preveriti stanje BCS analizatorja. Preverimo posodo z destilirano vodo in z dezinfekcijskim sredstvom in ju po potrebi napolnimo, ter posodo z odpadno tekočino, ki jo po potrebi izpraznimo. Potrebno je preveriti tudi tekočino za spiranje pipetorjev, ki jo po potrebi dodamo. Izpraznimo tudi odpad za merilne rotorje in zapremo pokrov (17).

Koncentracijo D-dimera smo v vzorcu izmerili s turbidimetrično metodo. Vzorce, ki smo jih centrifugirali, smo vstavili v nosilce, ki smo jih nato namestili na eno izmed pozicij za nosilce. Pri tem pazimo, da je črtna koda obrnjena v levo, da jo čitalec kod lahko prebere. Na računalniku smo izbrali zeleno analizo, v našem primeru D-dimer, in analizator je pričel z delom. Pipetor za vzorce je vsrkal predpisano količino citratne plazme in jo prenesel v merilno celico, drugi pipetor pa je dodal reagent. Ko je inkubacija potekla, se je pričelo turbidimetrično merjenje. Osnova turbidimetričnega merjenja je detekcija motnosti. Več kot ima vzorec merjenega analita, bolj motna bo raztopina in manj svetlobe bo prepuščene. Temu primerna pa bo tudi absorbanca, ki je premosorazmerna koncentraciji analita v vzorcu. Rezultat se je izpisal na ekranu računalnika. Po končanem merjenju sta se oba pipetorja spirala.

Referenčna vrednost oziroma mejna vrednost za koncentracijo D-dimera je 0,5 mg/L.

3.3. MERJENJE KONCENTRACIJE D-DIMERA NA ANALIZATORJU HITACHI 912

3.3.1. REAGENTI

Za merjenje koncentracije D-dimera smo uporabljali tovarniško pripravljen reagent Tina-quant D-dimer, proizvajalca Roche, ki je sestavljen iz:

- R1: pufer (TRIS / HCl pufer * : 370 mmol / L, pH = 8.2, NaCl : 267 mmol / L)
- R2: Anti D-dimer lateksova raztopina (0,15 % ; TRIS / HCl pufer * : 10 mmol / L)
Lateks delci prevlečeni z monoklonskimi anti-humanimi D-dimer protitelesi (mišja).

* TRIS = Tris (hidroksimetil) aminometan

Reagent R1 in R2 pred uporabo segrejemo na 37 °C v vodni kopeli in pustimo na sobni temperaturi 30 minut. Vsaj 30 minut pred uporabo ga dobro premešamo, nato pa postavimo v ohlajen del aparata. Reagent je po odprtju stabilen 28 dni, če ga imamo v ohlajenem delu aparata (18)

3.3.2. PRINCIP MERJENJA

Za merjenje koncentracije D-dimera smo uporabljali biokemični analizator HITACHI 912, proizvajalca ROCHE (slika 7).



Slika 7: Spektrofotometer HITACHI 912

Ta analizator je spektrofotometer, ki omogoča merjenje absorbance pri 12 valovnih dolžinah, in sicer med 340 nm in 800 nm. Za merjenje se uporabljajo tekoči reagenti, ki so že tovarniško pripravljene in takoj uporabne za delo. Spektrofotometrično lahko določamo številne analite, ki dajejo v končni reakciji obarvan produkt. Absorbanco tega obarvanega produkta merimo s fotometrom pri določeni valovni dolžini. Intenzivnost barve je sorazmerna količini merjenega analita v vzorcu. Z analizatorjem HITACHI 912 pa je možna tudi detekcija motnosti, ki je osnova turbidimetričnih metod oziroma reakcij. Večja kot je motnost, manj svetlobe je prepuščene, izmerjena absorbanca pa je premosorazmerna koncentraciji analita v vzorcu.

Analizator ima dve ohlajeni mesti za skladiščenje reagentov, termostatisirano vodno kopel pri 37 °C in krožnik za odlaganje vzorcev, ki ima 20 urgentnih in 50 rutinskih položajev za kivete z vzorci. Analizator sprejema naše ukaze preko računalnika, na katerem lahko izberemo kalibracijo, kontrolo, proces vzdrževanja ali pa vrsto preiskave.

Koncentracijo D-dimera v vzorcu smo izmerili s turbidimetrično metodo. Vzorce v kivetah smo vstavili na krožnik, na računalniku pa smo izbrali preiskavo D-dimer in pričeli z analizo. Pipetor je vsrkal predpisano količino citratne plazme in jo prenesel v merilno celico, drugi pipetor je dodal reagent. Po določenem času inkubacije je poteklo turbidimetrično merjenje. Po koncu preiskave se je rezultat izpisal na ekran računalnika ter na list. Po končanem delu smo analizator spirali z natrijevim hidroksidom.

Referenčna vrednost oziroma mejna vrednost za koncentracijo D-dimera je 0,5 mg/L.

4. REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1. OCENA KAKOVOSTI KONTROLNIH VZORCEV NA ANALIZATORJU BCS XP

Kakovost reagentov smo preverjali s tovarniško pripravljenimi kontrolnimi vzorci Innovance* D-dimer kontrola (1 in 2), ki temeljijo na liofilizirani humani plazmi. Uporabljali smo dve kontroli, in sicer eno v referenčnem intervalu 0,31 – 0,47 mg/L (\bar{x} = 0,39 mg/L) ter drugo v referenčnem intervalu 2,30 – 3,46 mg/L (\bar{x} = 2,88 mg/L). Kontroli za merjenje koncentracije D-dimera smo pripravili tako, da smo ju raztopili v 1,0 ml destilirane vode, nato smo ju pazljivo premešali, da se nam nista spenili in ju pustili pri temperaturi 15 – 25 °C vsaj 15 minut. Preden smo ju namestili v analizator smo ju ponovno rahlo premešali. Tako pripravljene kontrolni vzorci so pri temperaturi 15 – 25 °C stabilni 4 ure (16).

Vsak dan smo pred začetkom dela naredili kontrolo reagenta enkrat dnevno. Rezultati za kontrolne vzorce na analizatorju BCS XP proizvajalca DADE BEHRING so zbrani v preglednici I.

Preglednica I: Rezultati kontrolnih vzorcev na analizatorju BCS XP

ZAPOREDNA ŠTEVILKA	Innovance* D-dimer control 1 (mg/L) 0,31 – 0,47 mg/L	Innovance* D-dimer control 2 (mg/L) 2,30 – 3,46 mg/L
1	0,40	2,69
2	0,38	2,55
3	0,38	2,68
4	0,39	2,72
5	0,40	2,87
6	0,40	2,80
7	0,41	2,83
8	0,41	2,65

9	0,40	2,58
10	0,40	2,55
11	0,35	2,55
12	0,35	2,74
13	0,38	2,37
14	0,37	2,56
15	0,37	2,74

Za vsako izmed kontrol pa smo nato izračunali aritmetično sredino (\bar{x}), standardni odklon (SD) in koeficient variacije (KV%). Rezultati so zbrani v preglednici II.

Preglednica II: Rezultati \bar{x} , SD in KV za Innovance* D-dimer control 1 in 2

	Innovance* D-dimer control 1	Innovance* D-dimer control 2
PRIPOROČENE VREDNOSTI	0,31 – 0,47 mg/L	2,30 – 3,46 mg/L
N	15	15
\bar{x}	0,39	2,65
SD	0,019	0,133
KV (%)	4,9	5,0

Koeficient variacije za Innovance* D-dimer control 1 je 4,9%, za Innovance D-dimer control 2 pa 5,0%, kar pomeni, da je kakovost reagenta dobra.

4.2. OCENA KAKOVOSTI KONTROLNIH VZORCEV NA ANALIZATORJU HITACHI 912

Kakovost reagentov smo preverjali s predpisanimi referenčnimi kontrolnimi vzorci. Uporabljali smo D-dimer Control I, ki ima referenčni interval 0,64 – 1,03 mg/L

(\bar{x} = 0,84 mg/L) in D-dimer Control II, ki ima referenčni interval 3,33 – 4,07 mg/L (\bar{x} = 3,70 mg/L). Pripravljene kontrole D-dimera so stabilizirane raztopine delcev, ki vsebujejo D-dimer v humanem serumu. Kontrolni vzorci za merjenje koncentracije D-dimera so pripravili tako, da smo liofiliziranemu vzorcu dodali 0,5 ml destilirane vode. Nato smo jih pustili stati na sobni temperaturi 30 minut. Pred uporabo smo jih rahlo premešali. Tako pripravljene kontrolni vzorci so na temperaturi 2 do 8 °C obstojni 14 dni (18).

Vsak dan smo pred začetkom dela najprej naredili kontrolo reagenta enkrat dnevno. Rezultati za kontrolne vzorce na analizatorju HITACHI 912 proizvajalca ROCHE so zbrani v preglednici III.

Preglednica III: Rezultati kontrolnih vzorcev na analizatorju HITACHI 912

ZAPOREDNA ŠTEVILKA	D-dimer Control I (mg/L) 0,64 – 1,03 mg/L	D-dimer Control II (mg/L) 3,33 – 4,07mg/L
1	0,73	3,60
2	0,75	3,64
3	0,73	3,64
4	0,72	3,34
5	0,71	3,47
6	0,87	3,43
7	0,88	3,54
8	0,87	3,62
9	0,87	3,59
10	0,88	3,59

Za obe kontroli D-dimera smo izračunali aritmetično sredino (\bar{x}), standardni odklon (SD) in koeficient variacije (KV %). Rezultati so zbrani v preglednici IV.

Preglednica IV: Rezultati \bar{x} , SD in KV za D-dimer Control I in D-dimer Control II

	D-dimer Control I	D-dimer Control II
PRIPOROČENE VREDNOSTI	0,76 - 1,03 mg/L	3,33 - 4,05 mg/L
N	10	10
\bar{x}	0,801	3,546
SD	0,0776	0,1009
KV (%)	9,7	2,8

KV za D-dimer Control I je 9,7 %, za D-dimer Control II pa je KV 2,8%, kar pomeni, da je kakovost reagenta dobra. Očitno pa je D-dimer Control I manj stabilna. Zgornja meja pod katero še lahko trdimo, da je kakovost reagenta dobra, je 10%.

4.3. VZORCI

Na vsakem analizatorju smo izmerili koncentracijo D-dimera v 140 vzorcih citratne plazme. Vzorci so bili poslani v laboratorij iz vseh oddelkov oziroma ambulant Splošne bolnišnice Novo mesto. Pri tem nismo spremljali povezave med diagnozo bolnika in rezultatom meritve. Vsakemu vzorcu smo izmerili koncentracijo D-dimera paralelno na obeh analizatorjih, pri tem pa smo primerjali rezultate meritev enakih metod na dveh različnih analizatorjih. Rezultati meritev vseh 140 vzorcev so zbrani v preglednici V.

Preglednica V: Rezultati meritev koncentracije D-dimera v plazmi

ZAPOREDNA ŠTEVILKA	HITACHI 912 (mg/L)	BCS XP (mg/L)
1	0,28	0,48
2	1,20	2,84

3	0,25	0,62
4	0,11	0,25
5	4,41	4,99
6	2,72	2,84
7	1,40	2,33
8	6,78	8,46
9	1,46	2,37
10	0,43	0,63
11	0,15	0,38
12	2,37	3,34
13	0,07	0,29
14	0,58	1,02
15	0,35	0,52
16	0,61	0,83
17	1,99	2,98
18	0,27	0,44
19	0,48	0,79
20	0,04	0,18
21	4,40	5,18
22	0,35	0,69
23	0,36	0,96
24	0,42	1,09
25	1,78	3,28
26	0,56	0,90
27	1,85	3,19
28	0,15	0,29
29	0,38	0,59
30	1,03	0,13
31	0,28	0,53
32	2,75	3,33
33	1,60	2,88
34	2,20	1,65
35	1,11	1,60
36	3,80	5,87
37	3,73	4,44
38	2,90	3,81
39	0,26	0,46
40	3,78	4,70
41	3,35	4,17
42	2,67	3,36
43	1,49	1,87
44	3,67	4,96
45	1,48	1,62
46	0,99	1,72
47	1,96	2,71
48	4,58	5,03
49	3,48	3,95

50	0,63	1,01
51	0,15	0,26
52	0,67	0,85
53	0,55	1,04
54	0,04	0,15
55	2,16	2,96
56	2,79	4,46
57	1,33	1,98
58	2,07	3,08
59	3,06	4,15
60	0,06	0,19
61	2,53	3,36
62	0,22	0,17
63	0,14	0,40
64	1,73	2,08
65	0,51	0,59
66	0,66	0,13
67	0,12	0,21
68	1,09	1,53
69	0,23	0,48
70	0,21	0,24
71	0,04	0,15
72	1,10	1,56
73	1,94	2,99
74	2,94	3,48
75	5,56	6,79
76	0,97	1,36
77	1,48	2,12
78	2,05	3,13
79	0,80	0,50
80	0,41	0,70
81	1,52	1,96
82	0,15	0,28
83	0,44	0,70
84	0,77	1,33
85	0,33	0,82
86	0,69	1,05
87	0,26	0,15
88	1,82	3,19
89	1,03	1,86
90	1,60	3,02
91	1,35	1,61
92	5,69	7,12
93	1,47	2,40
94	1,98	2,98
95	8,80	11,20
96	3,87	4,72

97	4,41	5,10
98	1,47	2,02
99	5,34	6,41
100	0,68	0,85
101	2,25	3,35
102	1,97	2,87
103	0,05	0,17
104	1,12	1,54
105	5,20	5,84
106	3,93	4,38
107	0,03	0,20
108	0,49	0,83
109	0,19	1,13
110	3,85	4,11
111	1,23	1,59
112	1,76	2,61
113	0,56	0,92
114	4,70	6,44
115	0,83	1,41
116	7,12	9,59
117	0,85	1,44
118	2,37	3,84
119	1,18	1,69
120	0,67	0,42
121	0,63	0,86
122	0,35	0,69
123	0,35	0,69
124	0,96	2,09
125	3,59	4,56
126	5,37	7,34
127	1,79	1,82
128	0,46	0,68
129	3,51	4,38
130	5,23	6,33
131	1,72	2,63
132	5,03	6,20
133	13,31	15,4
134	2,16	3,43
135	2,45	3,13
136	0,19	0,41
137	1,45	0,18
138	0,17	0,49
139	5,72	8,18
140	0,38	0,59
n = 140	1,86 ± 1,99	2,48 ± 2,44

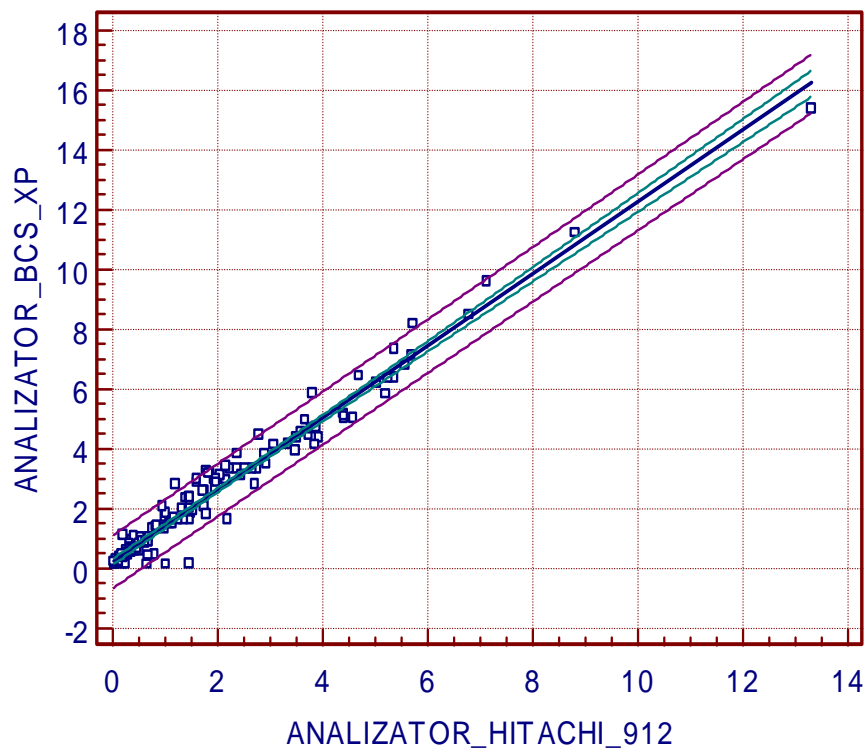
Za vsako skupino rezultatov smo izračunali povprečno vrednost koncentracije D-dimera v plazmi. Povprečna koncentracija D-dimera v plazmi znaša za vzorce, ki so bili izmerjeni na analizatorju HITACHI 912 1,86 mg/L, za vzorce izmerjene na analizatorju BCS XP pa 2,48 mg/L.

Najnižja izmerjena koncentracija D-dimera na analizatorju HITACHI 912 je bila 0,03 mg/L, najvišja pa 13,31 mg/L (slika 9).

Najnižja izmerjena koncentracija D-dimera na analizatorju BCS XP je bila 0,13 mg/L, najvišja pa 15,4 mg/L (slika 9).

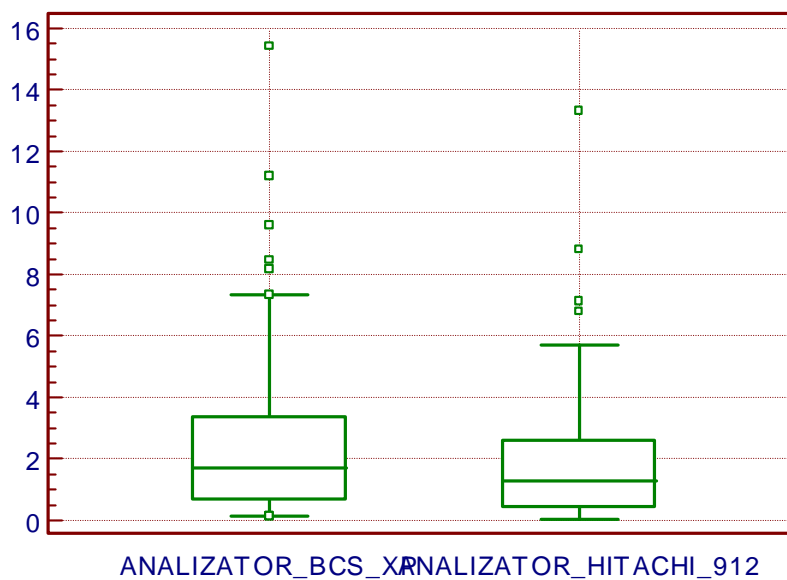
$$\text{Enačba premice: } y = 0,2415 + 1,2022 x$$

Korelacijski koeficient: $r = 0,9833$



Slika 8: Regresijska premica in 95% napovedna vrednost ter 95% meja zaupanja za vse meritve

Korelacija metod na obeh analizatorjih je dobra, saj je korelacijski koeficient $r = 0,9833$.



Slika 9: Primerjava koncentracij D-dimera na obeh analizatorjih

Ugotovili smo, da so pri vseh 140 vzorcih bolnikov rezultati statistično značilno različni ($p < 0,05$). Koncentracija D-dimera je na analizatorju BCS XP višja od koncentracije D-dimera na analizatorju HITACHI 912. Iz tega lahko sklepamo, da izboljššan reagent za analizator BCS XP odstrani vpliv heterofilnih protiteles.

Značilnost reagenta 3. generacije za analizator BCS XP je po zagotovilih proizvajalca in njihovih izvedenih študijah (19) 100% negativna napovedna vrednost, kar pomeni, da ob rezultatu, ki pade v območje referenčnih vrednosti, zagotovo izključi vensko trombozo in pljučno embolijo. Zgornja meja območja referenčnih vrednosti je za oba analizatorja 0,5 mg/L. Da bi podkrepili trditev proizvajalca, smo med vsemi meritvami izbrali le tiste rezultate, ki so na analizatorju HITACHI 912 padli v območje od 0 do 0,5 mg/L ozirom v normalno referenčno območje (preglednica VI).

Preglednica VI: Rezultati meritev v območju od 0,00 mg/L do 0,50 mg/L

ZAPOREDNA ŠTEVILKA	ANALIZATOR HITACHI 912 mg/L	ANALIZATOR BCS XP mg/L
1	0,28	0,48
2	0,25	0,62
3	0,11	0,25
4	0,43	0,63
5	0,15	0,38
6	0,07	0,29
7	0,35	0,52
8	0,27	0,44
9	0,48	0,79
10	0,04	0,18
11	0,35	0,69
12	0,36	0,96
13	0,42	1,09
14	0,15	0,29
15	0,38	0,59
16	0,28	0,53
17	0,12	0,21
18	0,23	0,48
19	0,21	0,24
20	0,04	0,15
21	0,41	0,7
22	0,15	0,28
23	0,44	0,7
24	0,33	0,82
25	0,26	0,15
26	0,26	0,46
27	0,15	0,26
28	0,04	0,15
29	0,06	0,19
30	0,22	0,17
31	0,14	0,4

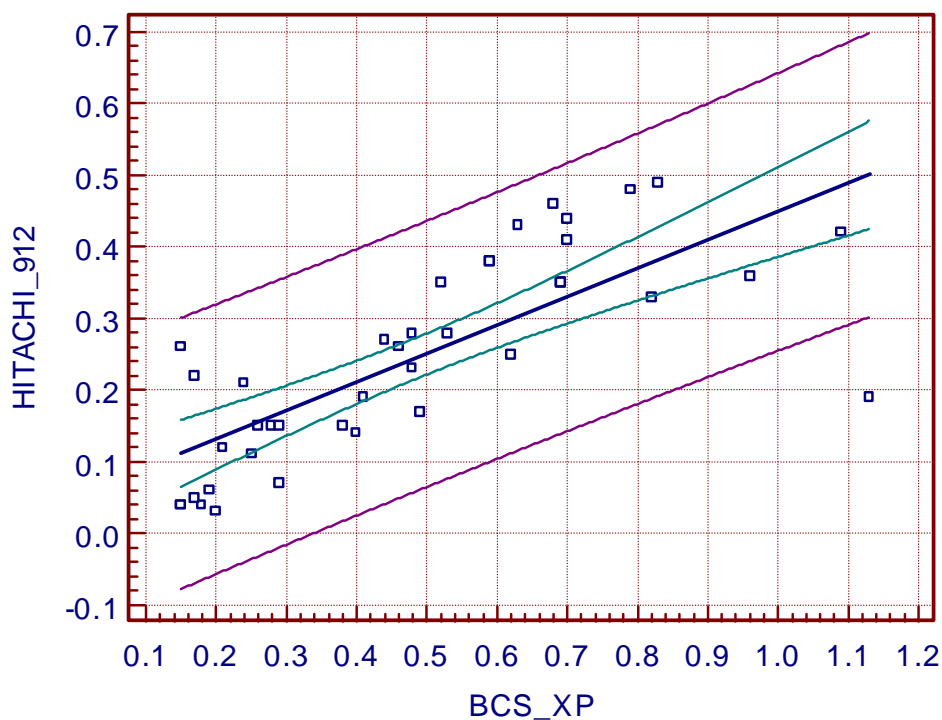
32	0,05	0,17
33	0,03	0,2
34	0,49	0,83
35	0,19	1,13
36	0,35	0,69
37	0,35	0,69
38	0,46	0,68
39	0,19	0,41
40	0,17	0,49
41	0,38	0,59
n = 41	0,25 ± 0,14	0,49 ± 0,27

S temi rezultati smo dokazali, da je reagent na analizatorju BCS XP bolj občutljiv kot reagent na analizatorju HITACHI 912, saj smo pri 18 bolnikih (44%) na analizatorju BCS XP potrdili zvišano koncentracijo D-dimera, ki pa je bila na analizatorju HITACHI 912 v območju referenčnih vrednosti. Pri 23 vzorcih (56%) pa smo določili negativne vrednosti na obeh analizatorjih.

Lahko torej zaključimo, da je 18 bolnikov imelo lažno negativne rezultate, če bi upoštevali samo meritve na analizatorju HITACHI 912.

Korelacija meritev na obeh analizatorjih ni dobra, saj je korelacijski koeficient $r = 0,7626$ (slika 10). Lahko bi rekli, da je korelacija meritev dobra, če bi bil korelacijski koeficient vsaj $r = 0,9000$.

Statistični izračun je pokazal, da so med analizatorjema meritve statistično značilno različne ($p < 0,05$) za to območje, kar smo potrdili tudi s parnim t-testom ($p < 0,0001$).



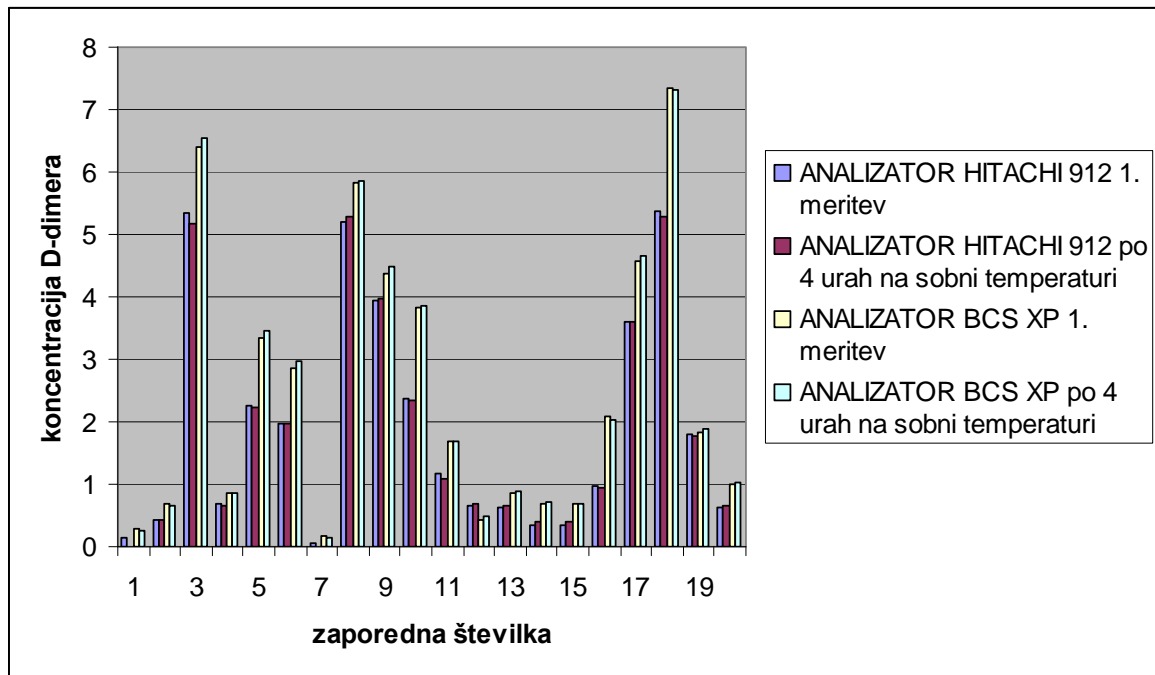
Slika 10: Regresijska premica in 95% napovedna vrednost ter 95% meja zaupanja za meritve v območju referenčnih vrednosti

Zanimala nas je ponovljivost rezultatov D-dimera ob različnih pogojih hranjenja plazemskih vzorcev (temperatura in čas).

To smo izvedli tako, da smo si izbrali 20 naključnih vzorcev, ki smo jim najprej izmerili koncentracijo D-dimera takoj po prejemu vzorca v laboratorij, nato pa še po 4 urah hranjenja na sobni temperaturi. Rezultati so zbrani v preglednici VII, grafični prikaz pa je na sliki 11.

Preglednica VII: Izmerjena koncentracija D-dimera v vzorcih takoj po prejemu ter po 4 urah na sobni temperaturi

	ANALIZATOR HITACHI 912	ANALIZATOR HITACHI 912	ANALIZATOR BCS XP	ANALIZATOR BCS XP
ZAPOREDNA ŠTEVILKA	1. meritev	po 4 urah na sobni temperaturi	1. meritev	po 4 urah na sobni temperaturi
1	0,15	0	0,28	0,27
2	0,44	0,44	0,7	0,67
3	5,34	5,18	6,41	6,55
4	0,68	0,66	0,85	0,87
5	2,25	2,24	3,35	3,45
6	1,97	1,96	2,87	2,96
7	0,05	0	0,17	0,15
8	5,2	5,29	5,84	5,87
9	3,93	3,98	4,38	4,48
10	2,37	2,34	3,84	3,85
11	1,18	1,09	1,69	1,68
12	0,67	0,68	0,42	0,5
13	0,63	0,65	0,86	0,88
14	0,35	0,39	0,69	0,71
15	0,35	0,39	0,69	0,7
16	0,96	0,94	2,09	2,04
17	3,59	3,59	4,56	4,67
18	5,37	5,3	7,34	7,32
19	1,79	1,77	1,82	1,88
20	0,63	0,65	1,01	1,04
n = 20	1,89 ± 1,82	1,87 ± 1,82	2,49 ± 2,22	2,53 ± 2,24



Slika 11: Koncentracija D-dimera takoj po prejemu vzorca in po 4 urah na sobni temperaturi

Pri 11 bolnikih (55 %) je bila koncentracija D-dimera na analizatorju HITACHI 912 po 4 urah na sobni temperaturi nižja kot pri prvi meritvi. Pri 2 bolnikih (10 %) je koncentracija D-dimera ostala enaka tudi po štirih urah na sobni temperaturi. Pri 7 bolnikih (35 %) je koncentracija D-dimera po 4 urah na sobni temperaturi višja kot po prvi meritvi.

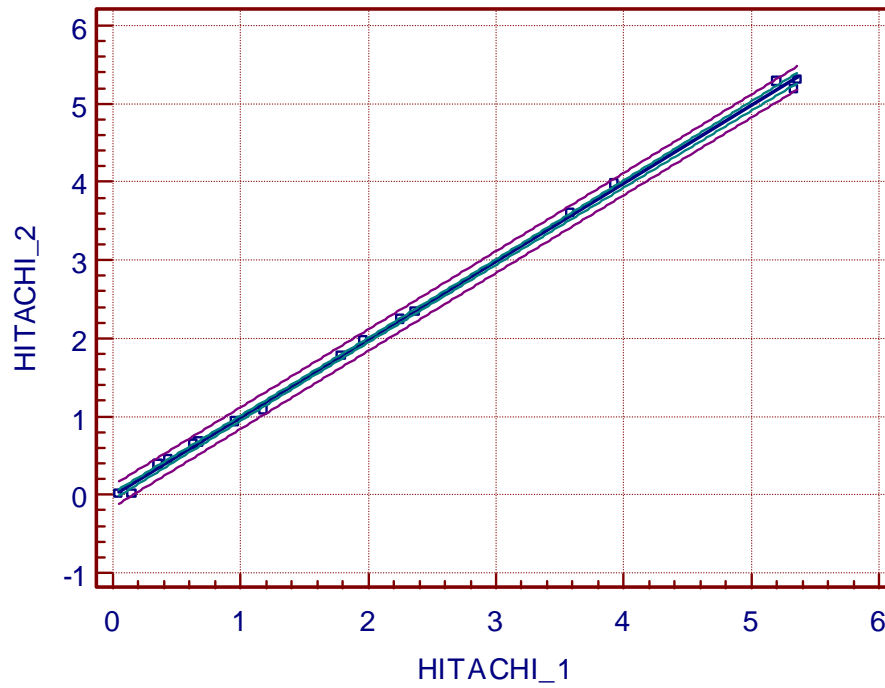
Pri 6 bolnikih (30 %) je bila koncentracija D-dimera na analizatorju BCS XP po 4 urah na sobni temperaturi nižja kot pri prvi meritvi. Pri 14 bolnikih (70 %) je bila koncentracija D-dimera višja kot po prvi meritvi.

Povprečna koncentracija D-dimera na analizatorju HITACHI 912, ki je bila izmerjena takoj po prejemu vzorca je 1,89 mg/L, po 4 urah hranjenja na sobni temperaturi pa 1,87 mg/L. Povprečna koncentracija D-dimera na analizatorju BCS XP, ki je bila izmerjena takoj po prejemu vzorca je 2,49 mg/L, po 4 urah na sobni temperaturi pa je znašala 2,53 mg/L.

Vrednosti izmerjene na analizatorju HITACHI 912 po 4 urah hranjenja vzorcev na sobni temperaturi niso statistično značilno različne ($p > 0,05$) od meritev, izmerjenih takoj po prejemu vzorca (slika 12).

$$\text{Enačba premice: } y = -0,0139 + 0,9978 x$$

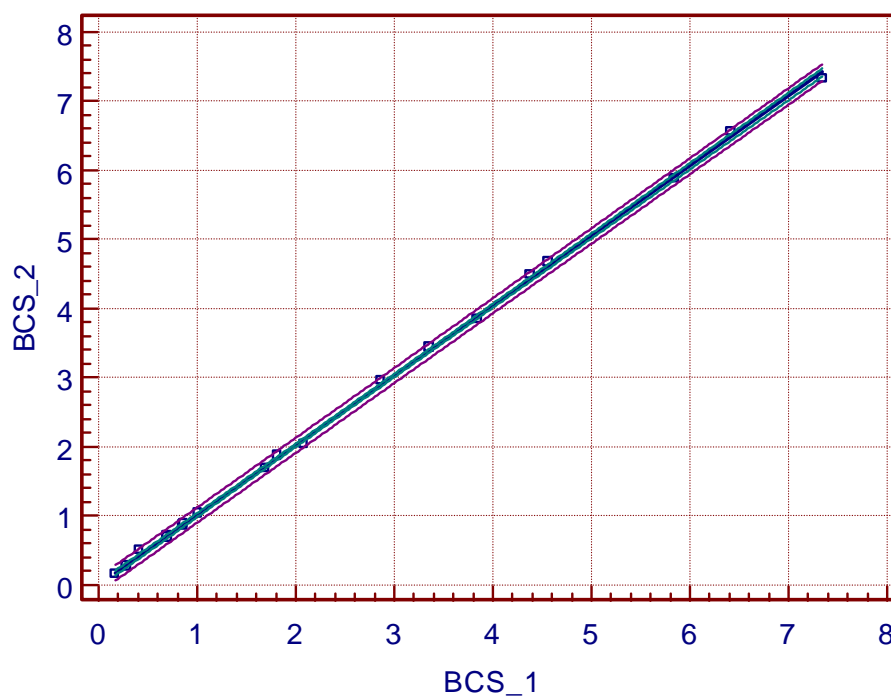
Korelacijski koeficient: $r = 0,9994$



Slika 12: Regresijska premica in 95% napovedna vrednost ter 95% meja zaupanja po 4 urah na sobni temperaturi na analizatorju HITACHI 912

Enačba premice: $y = 0,0106 + 1,0094 x$

Korelacijski koeficient: $r = 0,9998$



Slika 13: Regresijska premica in 95% napovedna vrednost ter 95% meja zaupanja po 4 urah na sobni temperaturi na analizatorju BCS XP

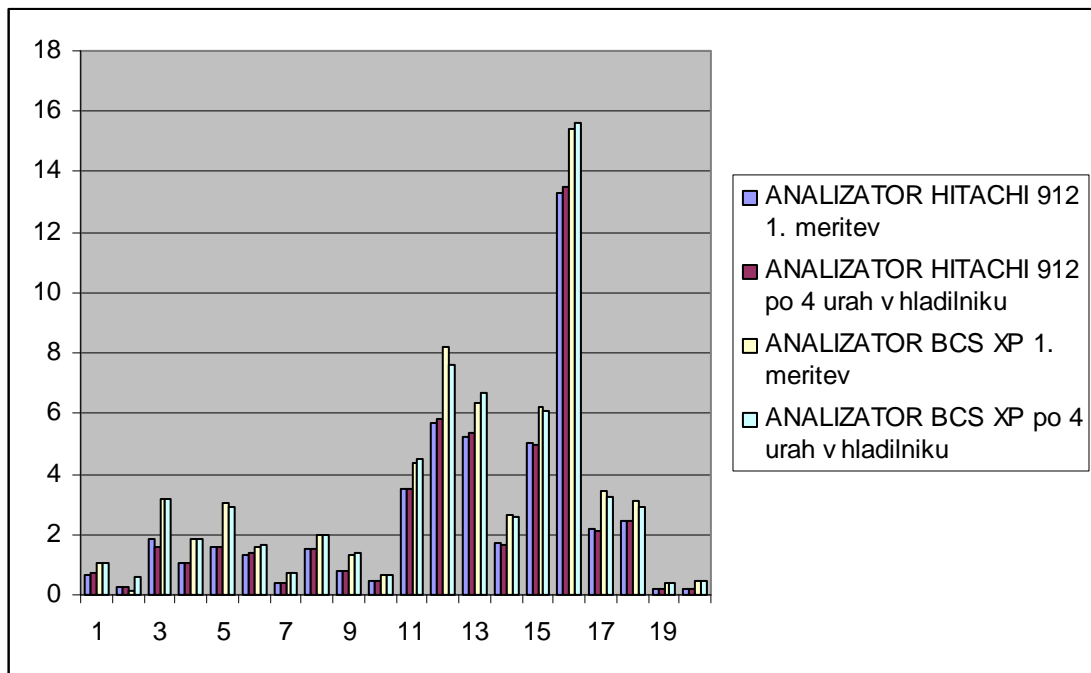
Vrednosti, ki so bile izmerjene po 4 urah hranjenja vzorcev na sobni temperaturi, na analizatorju BCS XP ravno tako niso statistično značilno različne ($p > 0,05$) od začetnih vrednosti (slika 13).

Za oba analizatorja torej velja, da temperatura hranjenja (sobna temperatura) in čas izvedbe analize ne vplivata na rezultate meritev, če pravilno ločimo celice od plazme v predpisanem času (1 ura po odvzemu vzorca polne krvi).

Naslednja primerjava je zajela 20 naključnih vzorcev, ki smo jim izmerili koncentracijo D-dimera takoj po prejemu, nato pa še po štirih urah hranjenja vzorca v hladilniku. Rezultati so zbrani v preglednici VIII, grafično razporeditev rezultatov prikazuje slika 14.

Preglednica VIII: Izmerjena koncentracija D-dimera v vzorcih takoj in po 4 urah v hladilniku

	ANALIZATOR HITACHI 912	ANALIZATOR HITACHI 912	ANALIZATOR BCS XP	ANALIZATOR BCS XP
ZAPOREDNA ŠTEVILKA	1. meritev	po 4 urah v hladilniku	1. meritev	po 4 urah v hladilniku
1	0,69	0,7	1,05	1,04
2	0,26	0,25	0,15	0,26
3	1,82	1,6	3,19	3,19
4	1,03	1,03	1,86	1,84
5	1,6	1,57	3,02	2,89
6	1,35	1,38	1,61	1,65
7	0,41	0,43	0,7	0,71
8	1,52	1,53	1,96	1,99
9	0,77	0,78	1,33	1,37
10	0,46	0,47	0,68	0,68
11	3,51	3,51	4,38	4,48
12	5,72	5,85	8,18	7,6
13	5,23	5,36	6,33	6,69
14	1,72	1,68	2,63	2,59
15	5,06	4,96	6,2	6,08
16	13,31	13,49	15,4	15,64
17	2,16	2,1	3,43	3,25
18	2,45	2,45	3,13	2,91
19	0,19	0,19	0,41	0,38
20	0,17	0,21	0,49	0,46
n = 20	2,47 ± 3,07	2,48 ± 3,11	3,31 ± 3,59	3,30 ± 2,59



Slika 14: Koncentracija D-dimera po 4 urah v hladilniku

Pri 10 bolnikih (50 %) je bila koncentracija D-dimera na analizatorju HITACHI 912 po 4 urah v hladilniku višja kot po prvi meritvi. Pri 4 bolnikih (20 %) je bila koncentracija D-dimera enaka kot pri prvi meritvi. Pri 6 bolnikih (30 %) je bila koncentracija D-dimera po 4 urah v hladilniku nižja kot pri prvi meritvi.

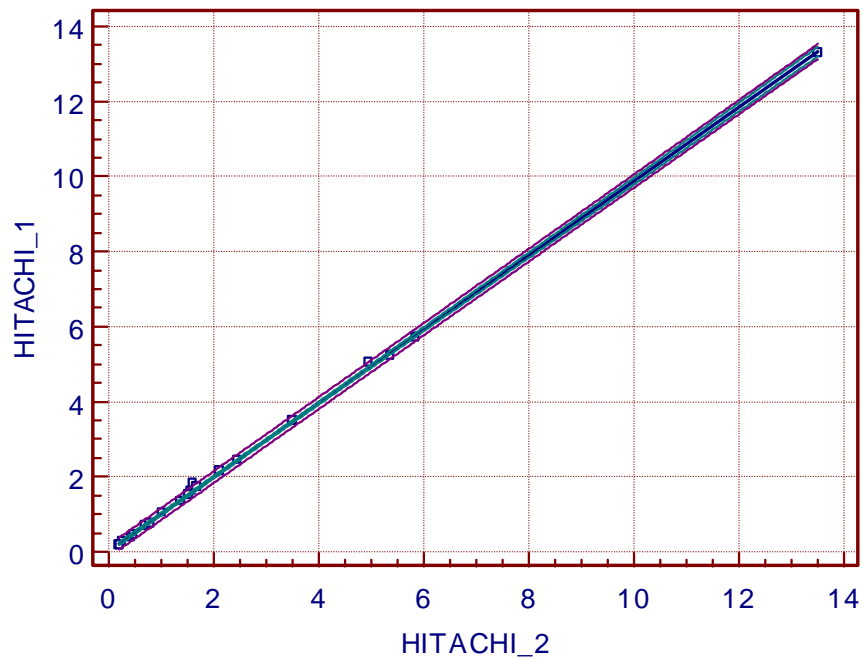
Na analizatorju BCS XP je bila koncentracija D-dimera pri 9 bolnikih (45 %) nižja kot po prvi meritvi. Pri 2 bolnikih (10 %) je bila koncentracija enaka kot po prvi meritvi. Pri 9 bolnikih (45 %) pa je bila koncentracija D-dimera višja kot pri prvi meritvi.

Povprečna koncentracija D-dimera na analizatorju HITACHI 912, ki je bila izmerjena takoj po prejemu vzorca je 2,47 mg/L, po 4 urah v hladilniku pa 2,48 mg/L. Povprečna koncentracija D-dimera na analizatorju BCS XP izmerjena takoj po prejemu vzorca je 3,31 mg/L, po 4 urah v hladilniku pa je 3,30 mg/L.

Slika 15 prikazuje primerjavo rezultatov, ki so bili izmerjeni na analizatorju HITACHI 912 takoj po prejemu in po 4 urah skladiščenja vzorca v hladilniku in niso statistično značilno različni ($p > 0,05$).

Enačba premice: $y = -0,0287 + 1,0138 x$

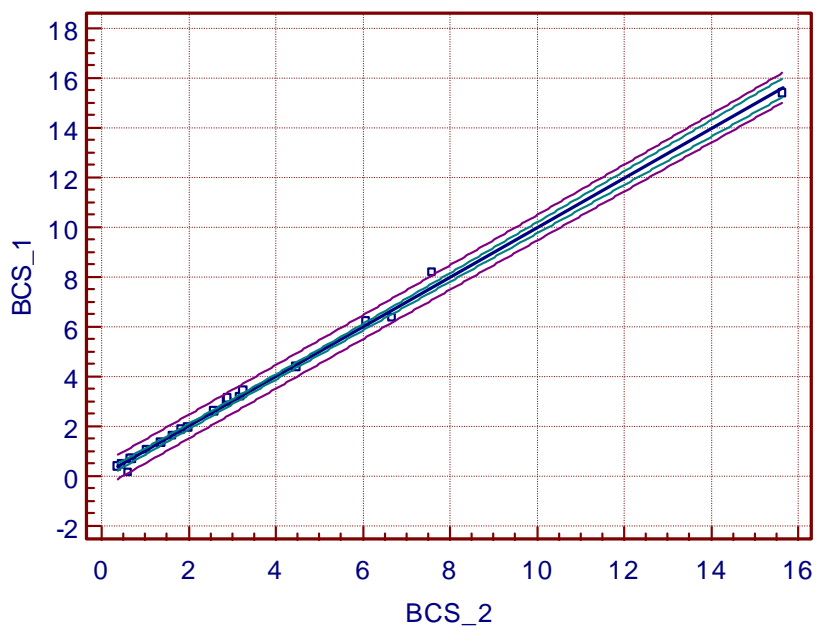
Korelacijski koeficient: $r = 0,9997$



Slika 15: Regresijska premica in 95% napovedna vrednost ter 95% meja zaupanja meritev po 4 urah skladiščenja v hladilniku za analizator HITACHI 912

Enačba premice: $y = 0,0028 + 0,9981 x$

Korelacijski koeficient: $r = 0,9982$



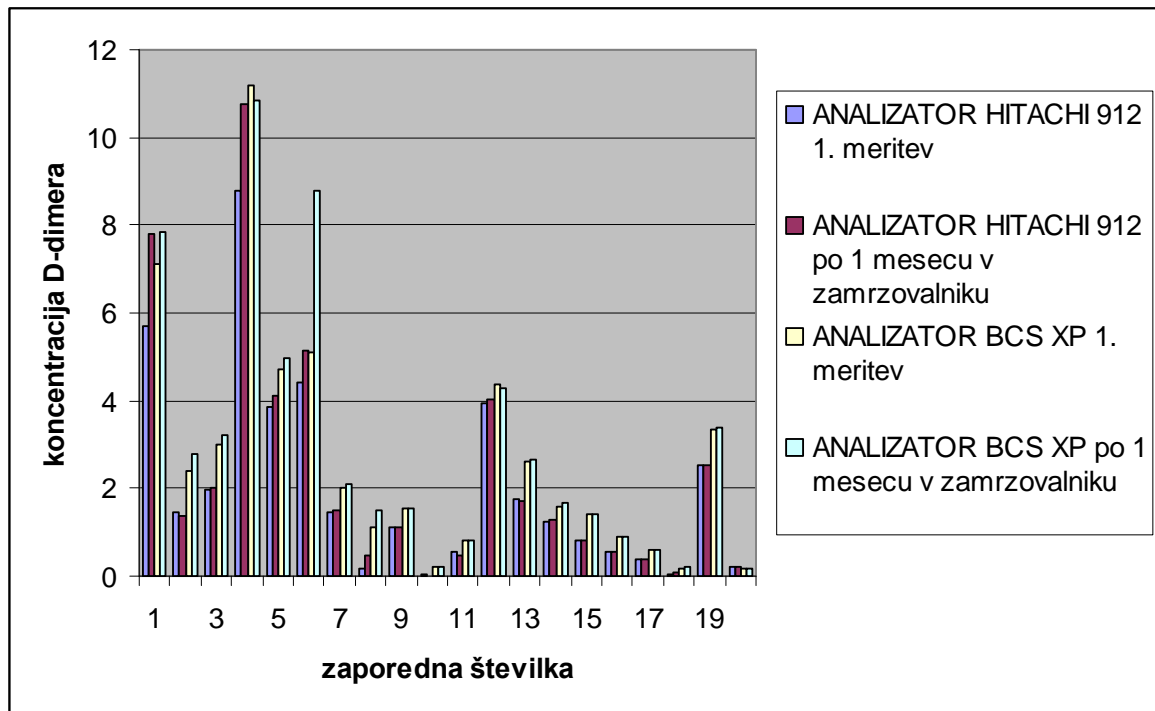
Slika 16: Regresijska premica in 95% napovedna vrednost ter 95% meja zaupanja meritev po 4 urah hranjenja v hladilniku za analizator BCS XP

Rezultati, ki so bili izmerjeni na analizatorju BCS XP po 4 urah hranjenja plazme v hladilniku niso statistično značilno različni ($p > 0,05$) od rezultatov meritev izvedenih takoj po prejemu vzorca (slika16).

Spremljali smo tudi, kako vpliva hranjenje vzorcev pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ na koncentracijo D-dimera v plazmi. 20 naključnim vzorcem, ki so prispeli v laboratorij smo izmerili koncentracijo D-dimera takoj po prejemu vzorca, nato pa smo plazmo shranili za mesec dni v zamrzovalnik. Po enem mesecu smo vzorce odmrznili in jim ponovno izmerili koncentracijo D-dimera. Rezultati so prikazani v preglednici IX in na sliki 17.

Preglednica IX: Meritve vzorcev, ki so bili shranjeni 1 mesec v zamrzovalniku in meritve izvedene takoj po prejemu za oba analizatorja

	ANALIZATOR HITACHI 912	ANALIZATOR HITACHI 912	ANALIZATOR BCS XP	ANALIZATOR BCS XP
ZAPOREDNA ŠTEVILKA	1. meritev	po 1 mesecu v zamrzovalniku	1. meritev	po 1 mesecu v zamrzovalniku
1	5,69	7,78	7,12	7,86
2	1,47	1,37	2,4	2,77
3	1,98	2,01	2,98	3,22
4	8,8	10,76	11,2	10,86
5	3,87	4,11	4,72	4,96
6	4,41	5,13	5,1	8,78
7	1,47	1,48	2,02	2,1
8	0,19	0,46	1,13	1,49
9	1,12	1,13	1,54	1,56
10	0,03	0,02	0,2	0,23
11	0,55	0,49	0,8	0,83
12	3,93	4,04	4,38	4,3
13	1,76	1,73	2,61	2,65
14	1,23	1,3	1,59	1,67
15	0,83	0,81	1,41	1,42
16	0,56	0,57	0,92	0,91
17	0,38	0,38	0,59	0,6
18	0,06	0,1	0,19	0,21
19	2,53	2,54	3,36	3,38
20	0,22	0,23	0,17	0,17
n = 20	2,05 ± 2,26	2,32 ± 2,81	2,72 ± 2,73	3,00 ± 3,01



Slika 17: Primerjava izmerjenih koncentracij D-dimera, ki je bila izmerjena takoj in po 1 mesecu hranjenja v zamrzovalniku

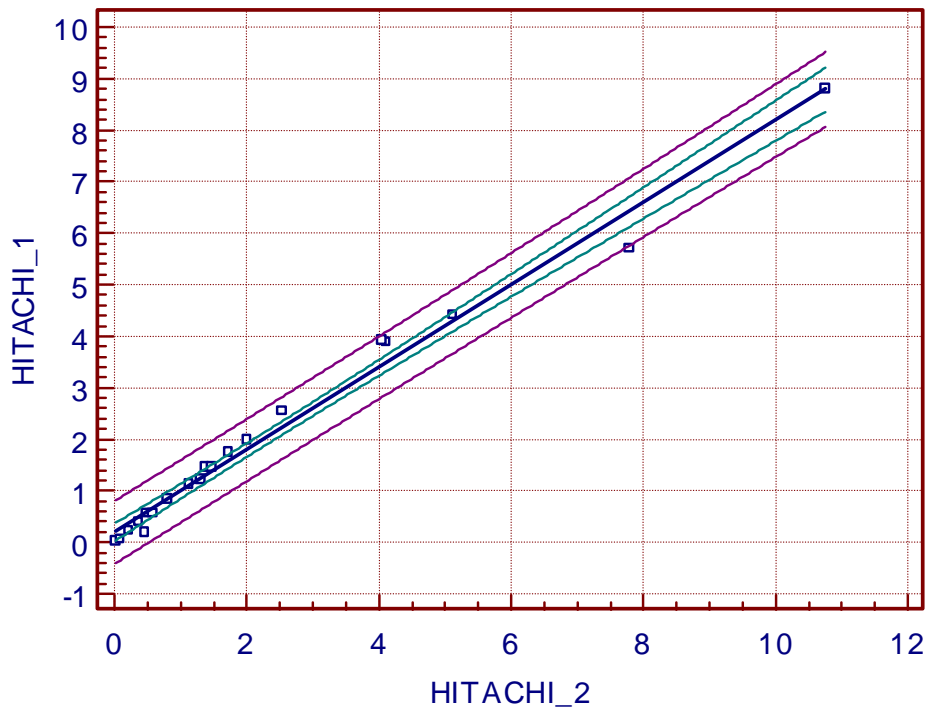
Pri 14 bolnikih (70 %) je bila koncentracija D-dimera na analizatorju HITACHI 912 višja kot po prvi meritvi. Pri 1 bolniku (5 %) je bila koncentracija D-dimera enaka kot pri prvi meritvi. Pri 5 bolnikih (25 %) pa je bila koncentracija D-dimera nižja kot pri prvi meritvi. Pri 16 bolnikih (80 %) je bila koncentracija D-dimera na analizatorju BCS XP višja kot pri prvi meritvi. Pri 3 bolnikih (15 %) je bila koncentracija D-dimera nižja kot pri prvi meritvi. Pri 1 bolniku (5 %) pa je bila koncentracija D-dimera enaka kot pri prvi meritvi.

Povprečna koncentracija D-dimera na analizatorju HITACHI 912, ki je bila izmerjena takoj po prejemu vzorca je 2,05 mg/L, po enem mesecu v zamrzovalniku pa 2,32 mg/L. Povprečna koncentracija D-dimera na analizatorju BCS XP izmerjena takoj po prejemu vzorca je 2,72 mg/L, po enem mesecu v zamrzovalniku pa je 3,00 mg/L.

Rezultati kažejo, da vrednosti izmerjene po 1 mesecu shranjevanja v zamrzovalniku, na analizatorju HITACHI 912 niso statistično značilno različne ($p > 0,05$) od meritev, narejenih takoj po prejemu vzorca (slika 18).

$$\text{Enačba premice: } y = -0,2104 + 1,2329 x$$

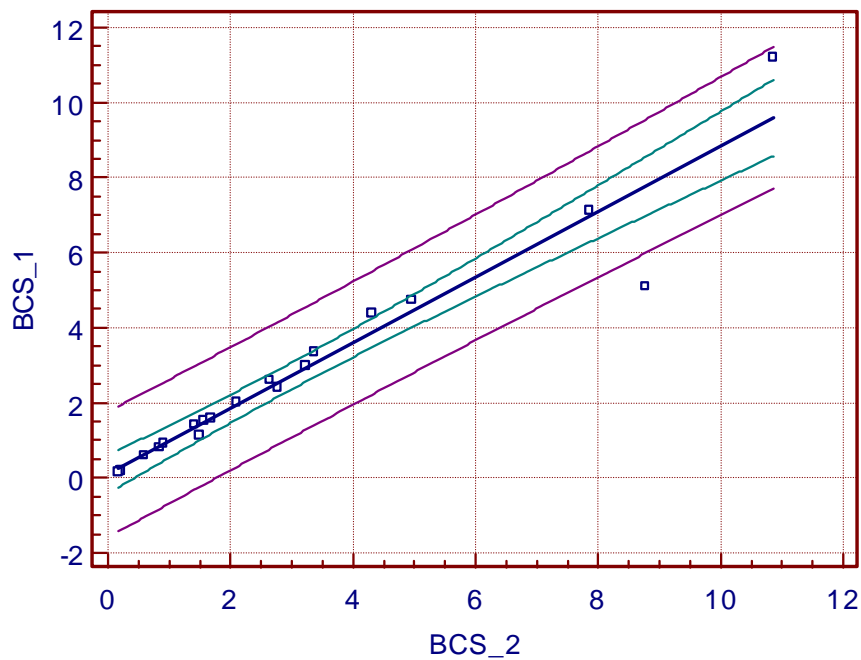
Korelacijski koeficient: $r = 0,9927$



Slika 18: Regresijska premica in 95% napovedna vrednost ter 95% meja zaupanja meritev izmerjenih takoj in po 1 mesecu hranjenja na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ na analizatorju HITACHI 912

Enačba premice: $y = 0,1149 + 1,0595 x$

Korelacijski koeficient: $r = 0,9629$



Slika 19: Regresijska premica in 95% napovedna vrednost in 95% meja zaupanja po 1 mesecu v zamrzovalniku na analizatorju BCS XP

Rezultati kažejo, da vrednosti izmerjene na vzorcih plazme po 1 mesecu shranjevanja v zamrzovalniku, na analizatorju BCS XP niso statistično značilno različne ($p > 0,05$) od prvotnih meritev (slika 19).

V obeh primerih to pomeni, da skladiščenje vzorcev na -20 °C ne vpliva na spremembo rezultata, kar potrjuje navedbe proizvajalca, ki trdi, da se koncentracija D-dimera po enem mesecu shranjevanja vzorca citratne plazme ne spremeni, spremeni pa se koncentracija D-dimera v vzorcu heparinizirane plazme (19).

Tehnološki razvoj laboratorijske opreme in vse bolj občutljivih laboratorijskih diagnostičnih metod zelo dobro sledi razvoju drugih diagnostičnih pripomočkov za odkrivanje različnih bolezenskih stanj, ki so danes v nenehnem porastu.

Imunološke tehnike z uporabo visoko specifičnih protiteles, usmerjenih le na določen odsek molekule, ki se v zvišanih koncentracijah pojavijo v krvnem obtoku pri določeni bolezni, omogočajo hitro, učinkovito in zanesljivo odkrivanje patološkega dogajanja v telesu. Zdravnikom je tovrstna laboratorijska diagnostika v veliko pomoč pri prepoznavanju in zdravljenju bolezni.

Tudi pri naši nalogi smo uporabljali eno izmed sodobnih imunokemičnih laboratorijskih metod za merjenje koncentracije D-dimera v plazmi z uporabo občutljivejših reagentov.

V nalogi je bilo zajetih 140 bolnikov, katerih vzorce smo prejeli v laboratorij iz naključnih oddelkov in ambulant Splošne bolnišnice Novo mesto. Pri tem pa nismo spremljali povezave med diagnozo bolnika in koncentracijo D-dimera v plazmi, ampak smo primerjali rezultate meritev dobljenih na dveh različnih analizatorjih, ki uporabljata enako metodo. Vsak vzorec, ki smo ga prejeli v laboratorij z namenom, da izmerimo koncentracijo D-dimera, smo analizirali paralelno na analizatorju HITACHI 912, proizvajalca ROCHE ter na analizatorju BCS XP, proizvajalca DADE BEHRING.

Rezultati meritev koncentracije D-dimera so pokazali, da je bila koncentracija na analizatorju BCS XP skoraj vedno višja kot na analizatorju HITACHI 912. Razlika je bila statistično značilna ($p < 0,05$). Iz tega lahko sklepamo, da je reagent, ki ga uporabljamo na analizatorju BCS XP bolj občutljiv za molekulo D-dimer, oziroma odstrani interference, ki lahko motijo reakcijo.

Da bi dokazali značilnost testa nove generacije za analizator BCS XP, ki po zagotovilih proizvajalca ob negativnem rezultatu zagotovo izključi vensko trombozo in pljučno embolijo, smo zbrali vse rezultate meritev na analizatorju HITACHI 912, ki so bili v območju referenčnih vrednosti, torej pod vrednostjo 0,5 mg/L. Pri 18 bolnikih smo dobili na analizatorju BCS XP že pozitivne vrednosti in s tem smo potrdili, da je reagent bolj občutljiv. Pri ostalih 23 bolnikih pa smo izmerili negativne vrednosti koncentracije D-dimera na obeh analizatorjih. Torej so bili rezultati 18 bolnikov na analizatorju HITACHI 912 lažno negativni (zaradi premalo občutljivega reagenta).

Spremljali pa smo tudi različne vplive shranjevanja vzorcev ter vpliv temperature na koncentracijo D-dimera v plazmi.

Dvajsetim vzorcem, ki smo jih izbrali naključno, smo izmerili koncentracijo D-dimera takoj po prejemu, nato pa smo jih pustili stati 4 ure na sobni temperaturi ter ponovno izmerili koncentracijo D-dimera. Ugotovili smo, da se koncentracije na posameznem analizatorju ne spremenijo bistveno. Iz tega lahko sklepamo, da sta oba analizatorja zanesljiva, vrednosti D-dimera pa ponovljivi. To pomeni, da se koncentracija D-dimera po 4 urah na sobni temperaturi skoraj ne spremeni, torej čas in sobna temperatura ne vplivata na rezultat. Med prvimi in drugimi meritvami za posamezen analizator ni bilo statistično značilnih razlik ($p > 0,05$). So pa izmerjene koncentracije na analizatorju BCS XP vedno višje kot na analizatorju HITACHI 912. Iz teh rezultatov sklepamo, da analizator BCS XP ne daje lažno negativnih rezultatov, kar pa je posledica izboljšane reagenta.

Ravno tako smo 20 naključno izbranim vzorcem izmerili koncentracijo D-dimera takoj po prejemu vzorca, nato pa smo vzorce pustili stati 4 ure v hladilniku. Ugotovili smo, da so koncentracije D-dimera na posameznem analizatorju zelo podobne. To pomeni, da sta analizatorja zanesljiva in imata dobro ponovljivost. Temperatura ne vpliva na rezultat. Meritve na posameznem analizatorju niso statistično značilno različne ($p > 0,05$).

Če primerjamo med sabo meritve po 4 urah v hladilniku na obeh analizatorjih, so koncentracije D-dimera višje na analizatorju BCS XP.

Dvajsetim vzorcem pa smo določili koncentracijo D-dimera na obeh analizatorjih po hranjenju plazme za mesec dni v zamrzovalniku. Ugotovili smo, da se koncentracija D-dimera po 1 mesecu zamrzovanja večini vzorcev nekoliko spremeni, vendar razlike niso statistično značilno različne. Ravno tako smo tudi tu potrdili, da analizator BCS XP prej zazna molekule D-dimera v plazmi, kot analizator HITACHI 912, zato so vrednosti višje.

Rezultati vseh teh meritev kažejo, da je izboljššan liofiliziran reagent, ki vsebuje heterofilna protitelesa za odstranitev interferenc, ki bi lahko vplivale na reakcijo, na analizatorju BCS XP zanesljivo bolj občutljiv za molekulo D-dimera kot reagent, ki se uporablja na analizatorju HITACHI 912. Dokazali smo tudi, da hranjenje vzorca dalj časa pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, ne daje popolnoma ponovljive rezultate, vendar pa razlike niso statistično značilne.

Shranjevanje vzorcev na sobni temperaturi ali v hladilniku za krajši čas, daje bolj ponovljive rezultate meritev koncentracij D-dimera na obeh uporabljenih analizatorjih.

Zaključimo lahko, da je bila izbira občutljivejšega reagenta pravilna odločitev, saj se z odstranitvijo interferenc izognemo lažno negativnim rezultatom in pripomoremo k izključitvi prisotnosti venske tromboze in pljučne embolije.

5. ZAKLJUČEK

Namen naše naloge je bil ugotoviti, ali se lahko z izbiro bolj občutljivega reagenta izognemo lažno negativnim rezultatom. Koncentracijo D-dimera smo izmerili paralelno na analizatorju HITACHI 912 ter na analizatorju BCS XP, ki uporabljata enako imunokemično metodo z merjenjem turbidimetrije.

- 140 vzorcem smo izmerili koncentracijo D-dimera na obeh analizatorjih
- Ugotovili smo, da so bile koncentracije D-dimera na analizatorju BCS XP višje kot na analizatorju HITACHI 912 in so statistično značilno različne ($p < 0,05$)
- 18 bolnikov je imelo na analizatorju HITACHI 912 koncentracijo D-dimera v območju referenčnih vrednosti, medtem ko so bile na analizatorju BCS XP vrednosti zvišane in statistično značilne ($p < 0,05$)
- Dokazali smo, da se z izbiro reagenta za odstranitev vpliva heterofilnih protiteles zmanjša možnost za detekcijo lažno negativnih rezultatov

Ugotoviti smo želeli tudi ali vpliva temperatura in pogoji shranjevanja na koncentracijo D-dimera v plazmi. Izmed vseh 140 vzorcev smo izbrali 20 naključnih vzorcev, ki smo jih pustili 4 ure na sobni temperaturi, 20 vzorcev, ki smo jih pustili 4 ure v hladilniku (+ 4 °C) ter 20 vzorcev, ki smo jih za mesec dni hranili v zamrzovalniku (- 20 °C).

- Ugotovili smo, da se koncentracija po 4 urah na sobni temperaturi ne spremeni statistično značilno (velja za oba analizatorja) ($p > 0,05$)
- Ravno tako smo dokazali, da se koncentracija po 4 urah v hladilniku pri + 4 °C ne spremeni statistično značilno ($p > 0,05$)
- Koncentracija D-dimera je bila po 1 mesecu v zamrzovalniku višja kot pri prvi meritvi, ki pa ni statistično značilna ($p > 0,05$)
- Koncentracija D-dimera je bila v vseh meritvah na analizatorju BCS XP višja kot na analizatorju HITACHI 912, kar je bila posledica bolj občutljivega reagenta
- Izbira občutljivejšega reagenta z heterofilnimi zaviralnimi avtoprotitelesi je primerna, saj zmanjša lažno negativne rezultate in pripomore k izključitvi venske tromboze in pljučne embolije

6. LITERATURA

1. Farmaceutski vestnik: URL:http://www.sfd.si/pdf/Farmaceutski_vestnik_2004_st.3.pdf (dostop: 15. 12. 2007)
2. Gaffney PJ. Fibrin degradation products. *Lancet* 1972; 2: 1422.
3. Zavod republike Slovenije za transfuzijsko medicino: URL:[http:// www. ztm. si / res / publication / 1042. pdf](http://www.ztm.si/res/publication/1042.pdf) (dostop: 15.12. 2007)
4. Drčar V. D-dimer pri akutnem koronarnem sindromu. Univerza v Ljubljani, Ljubljana 2005, 8 – 10.
5. Andoljšek D, Hemostaza v: Kocijančič A, Mrevlje F. *Interna medicina*. Državna založba Slovenije, Ljubljana 1993, 1009 – 1015.
6. Stegnar M. Prepoznavanje motenj hemostaze z laboratorijskimi metodami. Klinični oddelek za žilne bolezni, Interna klinika, Klinični center Ljubljana, Ljubljana 2005, 9 – 11.
7. Stegnar M. Prepoznavanje motenj hemostaze z laboratorijskimi metodami. Klinični oddelek za žilne bolezni, Interna klinika, Klinični center Ljubljana, Ljubljana 2005, 25 – 30.
8. Müller – Berghaus G, Hemostasis: regulation and dysregulation in: Lothar T. *Clinical Laboratory Diagnostics*. TH – Books, Frankfurt 1998, 556 – 558.
9. Stegnar M. Prepoznavanje motenj hemostaze z laboratorijskimi metodami. Klinični oddelek za žilne bolezni, Interna klinika, Klinični center Ljubljana, Ljubljana 2005, 107 – 110.
10. Peternel P. Venska tromboza v: Kocijančič A, Mrevlje F. *Interna medicina*. Državna založba Slovenije, Ljubljana 1993, 229 – 231.

11. Voga G, Žuran I. Pljučna embolija in akutno pljučno srce v: Kocijančič A, Mrevlje F. Interna medicina. Državna založba Slovenije, Ljubljana 1993, 214 – 218.
12. Andoljšek D, Hemostaza v : Kocijančič A, Mrevlje F. Interna medicina. Državna založba Slovenije, Ljubljana 1993, 1025 – 1027.
13. Stegnar M. Prepoznavanje motenj hemostaze z laboratorijskimi metodami. Klinični oddelek za žilne bolezni, Interna klinika, Klinični center Ljubljana, Ljubljana 2005, 41 – 42.
14. Wikipedia: URL: [http://sr.wikipedia.org/sr-el/disminovana intravaskularna koagulacija](http://sr.wikipedia.org/sr-el/disminovana_intravaskularna_koagulacija) (dostop: 25. 12. 2007)
15. Kraus M, Fibrin (ogen) degradation products, D-dime in: Lothar T. Clinical Laboratory Diagnostics. TH – Books, Frankfurt 1998, 633 – 635.
16. Priložena navodila proizvajalcev: Innovance* D-dimer. Dade Behring; 2007
17. Priložena navodila proizvajalcev: Navodila za delo z BCS® XP avtomatskim koagulacijskim analizatorjem. Dade Behring; 2007
18. Priložena navodila proizvajalcev: Tina quant D-dimer, Tina quant D-dimer Control I/II, PreciControl Cardiac. Roche Diagnostics; 2004
19. Peetz D, Eck S, Lackner K J. Long – term sample stability assessment with the new D-dimer assay. Johannes Gutenberg University Mainz, Institute of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Mainz, Germany 2007