

Determinazione quantitativa del D-Dimero nel plasma. Metodo turbidimetrico al lattice.

REF TB2095 R1: 1x30 mL + R2: 1x10 mL ITB2095 R1: 2x15 mL + R2: 1x10 mL ITAB2095 R1: 1x30 mL + R2: 1x10 mL

PRINCIPIO DEL METODO

D-Dimer Turbidimetric è un kit per il dosaggio quantitativo del D-Dimero nel plasma umano. Le particelle di latex, rivestite con anticorpi monoclonali contro il D-Dimero, vengono agglutinate quando reagiscono con campioni che contengono D-Dimeri dando luogo ad un incremento della torbidità. La quantità di agglutinazione (torbidità) che si produce è direttamente proporzionale alla concentrazione del D-Dimero nel campione in esame ed è misurabile fotometricamente. Allestendo una curva di calibrazione a più concentrazioni è possibile determinare il valore di campioni incogniti.

SIGNIFICATO CLINICO

Il D-dimero è un prodotto di degradazione della fibrina, una proteina responsabile della formazione di coaguli (trombi) nei vasi sanguigni.

La determinazione del D-dimero nel sangue si inserisce nell'iter diagnostico della trombosi venosa profonda e dell'embolia polmonare. Quest'esame è dunque particolarmente utile nello studio di patologie correlate all'eccessiva o inappropriata coagulazione.

Dopo essersi formato, il coagulo di fibrina deve necessariamente essere rimosso. Dal processo di dissoluzione di questo tappo (fibrinolisi) ad opera di varie sostanze, prime fra tutte la plasmina, originano i cosiddetti prodotti di degradazione della fibrina e del fibrinogeno (FDPs), a cui appartiene anche il D-Dimero. Questi elementi si formano ogni volta che la fibrina stabilizzata viene tagliata dagli appositi enzimi. Dal momento che la fibrina non è normalmente presente nel sangue come tale, ma sotto forma di fibrinogeno, la presenza in circolo di D-Dimeri e degli altri prodotti di degradazione della fibrina attivata, implica una precedente e sospetta attivazione della cascata coagulativa in assenza di visibili lesioni.

D-Dimeri e FDPs sono presenti e misurabili, seppur in bassissima concentrazione, anche in soggetti perfettamente sani, poiché i vari fattori pro-coagulanti e anti-coagulanti si trovano in una condizione di perfetto equilibrio omeostatico.

Purtroppo, in varie condizioni, patologiche e non, questo equilibrio viene perduto e si possono avere malattie trombotiche (eccessiva coagulabilità del sangue) o emorragiche (insufficiente coagulabilità del sangue). Nel primo caso l'organismo cerca di compensare il problema aumentando i fenomeni fibrinolitici (degradazione della fibrina), con conseguente aumento dei D-Dimeri presenti nel sangue. Il D-Dimero, quindi, rappresenta un marcatore laboratoristico di ipercoagulabilità.

La valutazione di tale parametro può essere utilizzata per la diagnosi di patologie che possono portare a un'eccessiva coagulazione o alla tendenza alla formazione inappropriata di coaguli. Il test è indicato, in regime d'urgenza, quando si sospettano patologie gravi legate a formazione di trombi, come Trombosi venosa profonda e Trombo-embolia polmonare.

La valutazione del D-Dimero è indicata quando il paziente presenta gravi sintomi riconducibili a un evento trombotico, quali dolore a una gamba, in un contesto che fa sospettare una trombosi venosa profonda (recente intervento ortopedico, neoplasie, allettamento ecc.), gonfiore e/o decolorazione agli arti inferiori, dispnea acuta, tosse, emottisi e dolore al petto. I livelli di D-dimero possono essere utilizzati anche come supporto alla diagnosi di coagulazione intravascolare disseminata (CID) e per monitorarne il trattamento terapeutico a intervalli regolari. Valori elevati del D-Dimero possono essere riscontrati anche in caso di gravidanza, tumori, recenti interventi chirurgici, traumi o infezioni.

COMPOSIZIONE DEI REAGENTI

Reagente 1:

Tampone Tris, pH 8.2 100 mmol/L

Reagente 2:

Particelle di lattice coattate con anticorpo monoclonale anti D-Dimero. Miscelare delicatamente prima dell'uso.

PREPARAZIONE E STABILITÀ DEI REAGENTI

Reagenti liquidi e pronti all'uso, stabili fino alla data di scadenza riportata, se conservati come riportato in etichetta e si evitano contaminazione, evaporazioni ed esposizione prolungata alla luce diretta. Non congelare i reagenti. Scartare il reagente se appaiono segni di deterioramento come presenza di particelle e torbidità oppure mancato recupero dei valori di sieri di controllo certificati. Dopo l'apertura dei flaconi, si consiglia di prelevare il volume necessario, di richiudere immediatamente i flaconi e di riporli in frigo al fine di evitare contaminazione, degradazione da luce diretta ed evaporazione.

CAMPIONI

Plasma da Citrato di Sodio al 3,2%

Evitare campioni emolisati o lipemici. Separare il plasma dalla massa eritrocitaria rapidamente. Se il campione presenta dei precipitati, centrifugare prima dell'uso. Evitare inquinamento. Stabilità: 4 giorni a 2-8° C e 3 mesi a -20° C (congelare e scongelare solo una volta).

PROCEDURA

Lunghezza d'onda: 570 nm +/-20 nm

Temperatura: +37°C

Azzeramento: acqua distillata

Pipettare come segue :

Reagente (R1) 300 µL

Campione / Calibratore 16 µL

Miscelare e dopo 60 secondi aggiungere:

Reagente (R2) 100 µL

Miscelare, leggere l'Assorbanza (Abs1). Dopo altri 300 secondi leggere ancora l'Assorbanza (Abs 2).

Calcolare Δ Abs (Abs2-Abs1) per calibratore, campioni e controlli.

CALIBRAZIONE

I risultati dipendono dalla accuratezza della calibrazione, dal corretto settaggio del test sullo strumento, dal giusto rapporto volumetrico reagente/campione e dalla corretta temperatura di analisi.

Utilizzare un set di calibrazione multipunto, liquido e pronto all'uso (flaconi pronti, nessuna diluizione) (concentrazione in etichetta).

D-DIMER CALIBRATION SET REF TUC1110 (5 x 1 mL)

CALCOLO

Calcolare per ogni campione in esame e per ogni calibratore il Δ Abs (Abs2-Abs1). Costruire una curva di calibrazione dose/risposta e su di essa riportare i valori del Δ Abs dei campioni in esame per ricavarne le concentrazioni incognite. Per calcoli computerizzati, il metodo di calcolo consigliato è la Curva SPLINE ma altri metodi possono essere utilizzati (Punto-Punto, Logit-Log 4P, etc.).

CONTROLLO QUALITA'

Plasmi di controllo normali e patologici a concentrazione nota, devono essere analizzati regolarmente in ogni seduta analitica.

Il range dei valori dei controlli deve essere valutato come una linea guida potendo esso essere determinato dall'applicazione del metodo o dalla manualità dell'utente o da altri fattori. I valori ottenuti devono essere utilizzati ai fini della valutazione della Precisione del metodo (Ripetibilità). Per la valutazione della Accuratezza del metodo (Riproducibilità) è necessario aderire ad un programma di Valutazione Esterna Qualità (VEQ) gestito da enti certificati.

VALORI DI RIFERIMENTO BIBLIOGRAFICI

Adulti: fino a 0,5 mg/L

Ogni laboratorio dovrebbe stabilire un range di valori attesi in base alla propria popolazione di pazienti e, se necessario, determinare il proprio intervallo di riferimento. A fini diagnostici, i risultati devono sempre essere valutati insieme alla storia medica del paziente, all'esame clinico e ad altri risultati.

PRESTAZIONI

PRECISIONE:

Livello basso: Campioni= 20; Media = 0,60; D.S. = 0,03; CV = 5,0%

Livello alto: Campioni= 20; Media = 5,88; D.S. = 0,08; CV = 1,4%

ACCURATEZZA (CORRELAZIONE): Una comparazione tra questo metodo (x) ed un metodo certificato del commercio (y) ha dato la seguente correlazione:

$$y = 0.979 x - 0.106 \quad r = 0.979$$

SENSIBILITA': 0,15 mg/L FEU

LINEARITA': da 0,15 a 25 mg/L FEU

NOTE

1. Non sono disponibili dati riguardanti soggetti pediatrici.
2. Lavare accuratamente lo strumento dopo l'esecuzione della reazione per evitare che le cuvette possano trattenere tracce del lattice di reazione.
3. Poiché si adopera un anticorpo monoclonale, è possibile che alcuni pazienti abbiano anticorpi anti-ratto nel loro siero (HAMA) capaci di dare interferenza.

INTERFERENZE E SPECIFICITA'

Non interferiscono: Bilirubina a 40 mg/dL, Emoglobina fino a 0,5 g/L, Trigliceridi fino a 1000 mg/dL, Fattore Reumatoide fino a 100 UI/mL, Acido Ascorbico fino a 176 mg/dL, Eparina fino a 1,5 UI/mL, HAMA fino a 490 ng/mL. Altre sostanze possono interferire

PRECAUZIONI

R1 contiene TRIS BUFFER 20 mmol/L – pH 8.2 - CAS 1185-53-1

H315: Provoca irritazione cutanea

H319: Provoca gravi irritazioni oculari

H335: Può irritare le vie respiratorie

L'anticorpo presente nel reagente 2 è monoclonale (di sintesi) e non è in grado di trasmettere malattie infettive all'uomo. Tuttavia, poiché non ci sono metodi per garantire la totale assenza di tali agenti infettivi o di altri microbi, questo prodotto deve essere maneggiato come se fosse rischioso e potenzialmente in grado di trasmettere malattie infettive di qualsiasi tipo, in conformità con gli standard della Buona Pratica di Laboratorio.

Il prodotto non contiene altre sostanze o miscele pericolose secondo la regolamentazione CE n° 1272/2008 ovvero le loro concentrazioni sono tali da non essere considerate persistenti, bioaccumulanti o tossiche (PBT). Il

prodotto è etichettato secondo le direttive CE o le corrispondenti normative nazionali. Sodio Azide inferiore a 0.1%.

Tuttavia, in osservanza alle normali norme di prudenza che ognuno deve osservare allorché maneggi qualunque sostanza chimica o reagente di laboratorio, in caso di contatto dei Reagenti con l'operatore, occorre applicare i seguenti interventi di primo soccorso:

S26 (P305 – P351 – P338): In caso di contatto con gli occhi, lavare immediatamente e abbondantemente con acqua e consultare il medico.

S28 (P302 – P352): In caso di contatto con la pelle, lavarsi immediatamente ed abbondantemente.

S36/37/39 (P280): Usare indumenti protettivi e guanti adatti e proteggersi gli occhi/la faccia.








S46 (P301 – P310): In caso d'ingestione consultare immediatamente il medico e mostrargli il contenitore o l'etichetta. Se la vittima è cosciente, lavare la bocca con acqua.

S56 (P273): Smaltire questo materiale e relativi contenitori in un punto di raccolta autorizzato per rifiuti pericolosi o speciali.

S63 (P304 – P340): In caso di incidente per inalazione, allontanare l'infortunato dalla zona contaminata e mantenerlo a riposo.

Tutti i campioni in esame, calibratori e controlli devono essere trattati come materiale potenzialmente infettivo capace di trasmettere HIV ed epatiti PER OGNI ALTRA INDICAZIONE, RICHIEDERE LA SCHEDA DI SICUREZZA AL PRODUTTORE.

SIMBOLOGIA

	Marchio CE (prodotto conforme ai requisiti della Dir. 98/79 CE)		
	Dispositivo medico diagnostico in vitro		Limiti temperatura di conservazione
	Consultare le istruzioni per l'uso		Dimensione / numero test
REF	Numero di catalogo		Scadenza
LOT	Numero di lotto		Fabbricante

BIBLIOGRAFIA

1. BJH Guideline. British Journal, 124, 15-25
2. Alan H, B. Wu. "Tietz Clinical Guide to Laboratory Tests" (2006) 328-329
3. Tripodi, A. et al. (2011) D-Dimer Testing in Laboratory Practice. Clinical Chemistry 57: 1256-1262