

D-dimer

Instructions For Use REF 5250

**D-dimer
Fiche technique**

**D-dimer
Anleitung**

**D-dimer
Istruzioni per l'uso**

**D-dimer
Instrucciones de uso**

Contents

English	1
Français	6
Deutsch	12
Italiano	17
Español	22



Latex Agglutination Test for Fibrin D-dimer.**Reagents for 80 determinations****For in vitro diagnostic use only.****I. INTENDED USE**

Helena D-dimer is a latex agglutination test for semi-quantitative determination of fibrin D-dimer.

II. PRINCIPLE

D-dimer containing moieties are formed by plasmin degradation of Factor XIIIa cross-linked fibrin. Elevated levels of D-dimer are found in clinical conditions such as deep vein thrombosis (DVT), pulmonary embolism (PE) and disseminated intravascular coagulation (DIC)^{1,3}. D-dimer levels rise during pregnancy and high levels are associated with complications². Helena D-dimer utilizes a monoclonal antibody reacting with fibrin D-dimer or fragment D of fibrin but not with intact fibrinogen⁶, allowing D-dimer determination in human plasma. Serum samples suited for FDP analysis can also be used.

No international standard for D-dimer exists at present. For numerical values Helena has aligned the Helena D-dimer with commercially available enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) tests.

III. REAGENTS**A. Reagent description****1. Helena D-dimer Latex**

1 vial containing 1.7 ml suspension of latex beads. Beads are coated with anti D-dimer monoclonal antibody.

2. Saline Solution

2 vials containing 8 ml each of buffered saline, pH 7.3. Contains 0.2 g/L sodium azide.

3. Positive Control Plasma

1 vial containing 1.0 ml lyophilized human plasma enriched with fibrin D-dimer.

4. Negative Control Plasma

1 vial containing 1.0 ml lyophilized human plasma.

B. Reagent preparation

1. Allow all vials to warm to room temperature before use, minimum 10 minutes.
2. Add 1.0 ml (1000 μ l) Saline Solution to each of the negative and positive control plasma vials. Control plasma may be stored at 2...6°C for one month. See XIII. Notes point 3.
3. Agitate the latex by repeatedly inverting the vial for 5 seconds immediately before use. If latex mass collects at the neck of the vial or is visible in the latex suspension, vortex vial for 10 seconds, to ensure any settled material is resuspended.

IV. WARNINGS AND PRECAUTIONS

POTENTIAL BIOHAZARD MATERIAL. Negative and Positive Control Plasma are of human origin. Each donor unit of source plasma used in these products has been tested and found negative for Hepatitis B antigens, HIV I and II antibodies, Hepatitis C antibodies, syphilis antibodies and H.T.L.V. I/II antibodies by FDA approved methods. Because no test method can offer complete assurance that no infectious agents are present, these plasmas should be treated at the Biosafety Level 2 as recommended for any potentially infectious human serum or blood specimen in the Centers for Disease Control/National Institutes of Health manual, "Biosafety in Microbiological and Biomedical

Laboratories", 1984. All wastes containing biological material should be properly labelled and stored separately from other wastes. Dispose of all waste materials according to prescribed international, national and local regulations.

SODIUM AZIDE. Both the Saline Solution and the D-dimer Latex contain sodium azide, which may react with lead and copper plumbing to form highly explosive metal azides. Materials discarded into a sink should be flushed with a large volume of water to prevent azide build-up.

The test should be used in conjunction with clinical observations and results of other laboratory tests.

V. STORAGE AND STABILITY

The reagents should be stored at 2...8°C and used prior to the expiration date recorded on the box. Control plasmas, once reconstituted may be stored at 2...6°C for one month.

VI. SAMPLE COLLECTION

Plasma anticoagulated with citrate is recommended. Collect samples in nine volumes of blood and one volume of 3.2% buffered sodium citrate (0.105 M). Centrifuge at 3000 x g for 10 minutes. Citrated plasma samples may be stored at room temperature for 2 hours or at 2...8° C for 18 hours. A single freeze-thaw cycle does not affect the assay response. Refer to NCCLS H21-A2 for specific sample collection guidelines.

VII. PROCEDURE

A. Materials provided

- 1 x Helena D-dimer Latex
- 2 x Saline Solution
- 1 x Positive Control Plasma
- 1 x Negative Control Plasma
- 50 Mixing sticks
- 16 Test cards for 6 samples each.

B. Materials required but not provided

- Pipettes for 20, 100 and 1000 μ l volumes
- Pipette tips
- 3 ml test tubes
- Timer

C. Qualitative method

1. Place 20 μ l of sample, positive and negative control plasmas in circles on a test card.
2. Place 20 μ l of latex suspension in a nearby area of each circle.
3. Quickly mix the sample and latex using clean mixing sticks for each sample. Start the timer.
4. Rock the test card gently and read agglutination between 180 and 200 seconds. Positive (+) or negative (-) agglutination are compared to results obtained using the controls. The positive control is merely qualitative and should not be further diluted. Non-agglutinated latex means the sample is normal and no further testing is required.

D. Semi-quantitative method

Performed only on samples tested positive:

1. Serially dilute 100 μ l of sample 1:2, 1:4 and 1:8 with 100 μ l Saline Solution using small test tubes.
2. Mark the positions of sample dilutions on the test card and mix with latex suspension as per VII.
 - C. The D-dimer concentration may be determined from the table in IX. EXPECTED VALUES.

VIII. QUALITY CONTROL

The positive and negative controls provided should be used for quality control of each kit. It is recommended that both positive and negative controls are tested each time the kit is used. If either positive or negative control fails to elicit the appropriate response, patient results obtained on that occasion should not be used and the kit should be discarded or returned to Helena.

IX. EXPECTED VALUES

Agglutination occurs within 180 to 200 seconds for samples containing more than 250 ng/ml D-dimer. By testing serially diluted plasmas, semi-quantitative results can be obtained.

D-dimer Level (ng/ml)

(ng/ml)	Undiluted	1:2	1:4	1:8
< 250	-	-	-	-
250-500	+	-	-	-
500-1000	+	+	-	-
1000-2000	+	+	+	-
> 2000	+	+	+	+

Agglutination may be more pronounced and appears more rapidly at higher D-dimer concentrations. If you wish to express the results in fibrinogen equivalent units (FEU) multiply the D-dimer levels in the table above by 2, e. g. <250 ng/ml becomes <500 FEU. As discussed in several reports⁴, some commercial latex test do not have the claimed sensitivity when compared to commercial ELISA.

X. INTERPRETATION OF RESULTS

Agglutination occurs within 180-200 seconds for samples containing more than 250 ng/ml D-dimer. The mean level of D-dimer in a healthy population is between about 8 and 135 ng/ml, and neat plasma from normal, healthy individuals should not agglutinate. The negative predictive value of the Helena D-dimer for thrombosis is high⁵. The circulatory half-life of D-dimer is about 12 hours. Elevated D-dimer levels can therefore persist for some time after the active process has ceased.

In clinical studies on normal subjects, patients with phlebographically confirmed DVT, patients with DIC and patients with pre-eclampsia (Pre-EC) the following results were obtained:

Helena D-dimer results†

Samples	η	-	1:1	1:2	1:4	≥1:8
Normal	101	100	1*	-	-	-
DVT	48	3	10*	7*	14*	14*
DIC	29	0	3	3	4	19
Pre-EC	6	2	1	3	-	-

† The symbols η and - denote the number of patients and a negative Helena D-dimer result, respectively. Titters indicate the highest dilution at which the sample shows agglutination.

* The agglutination was inhibited by addition of the D-dimer specific antibody (0.2 mg/ml) MA-8D3 but not with a non-related antibody PAM-1.

XI. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

A. Specificity

The monoclonal antibody used in this device, MA 8D3, is specific for D-dimer by virtue of the screening method used for hybridoma selection³. A hybridoma, secreting antibodies which reacted positively with purified D-dimer but not with whole fibrinogen or fragment D of fibrinogen, was selected. No cross-reactivity with fibrinogen or des-AA-fibrinogen was observed when either analyte was substituted for plasma in this assay. Plasma from 16 patients with rheumatoid arthritis were assayed and 14 of these were found to be non-agglutinating with the Helena D-dimer test. The two agglutinations could be inhibited by addition of the D dimer specific monoclonal antibody MA-8D3 but not with addition of a monoclonal of the same subgroup, IgG1k (PAM 1). This suggests that the Helena D-dimer is insensitive to rheumatoid factor disturbances.

B. Reproducibility

Three plasma samples were selected to test reproducibility of the assay. Each sample was tested 10 times on each of three different days. In each case, where as positive result was obtained, the sample was titrated. The results in D-dimer (ng/ml):

Sample	D-dimer level	Result
Normal	<250 ng/ml	negative
Intermediate	3000 ng/ml	titer 1:8
High	> 16,000 ng/ml	titer 1:64

C. Accuracy

The Helena D-dimer kit was compared to another commercially available D-dimer latex. Both products gave a negative reaction when tested on 25 normal specimens. When 30 patient plasma samples were tested with ELISA and Helena D-dimer, all samples with ELISA values above 225ng/ml showed agglutination with Helena D-dimer.

XII.LIMITATIONS OF TEST

1. A negative D-dimer test does not completely rule out thrombosis. A negative predictive value for patients with suspected DVT has been found to be 94% with the Helena D-dimer kit⁵. Detection of elevated levels of D-dimer should be used with other clinical information in forming a diagnosis.
2. Agglutination with samples containing normal D-dimer levels may occasionally occur due to non-specificity.
3. A small number of samples, when mixed with the latex, may exhibit white flakes which should not be confused with agglutination.

XIII.NOTES

1. The results may be reported either in D-dimer units or in fibrinogen equivalent units (FEU); 1 ng/ml of D-dimer is equivalent to approximately 2 ng/ml of FEU.
2. Agglutination will be more pronounced and appears more rapidly at higher D-dimer concentrations.
3. The rubber stopper in the control vials may be discarded after vial opening.

XIV.REFERENCES

1. Elms, M.J. et al.: Rapid detection of cross-linked fibrin degradation products in plasma using monoclonal antibody-coated latex particles. *J. Clin. Path.* 35, 360-364, 1986.
2. Ballegeer, V. et al.: Fibrinolytic response to venous occlusion and fibrin fragment D-dimer levels in normal and complicated pregnancy. *Thromb. Haemostas.* 58, 1030-1032, 1987.
3. Declerck, P.V. et al.: Fibrinolytic response and fibrin fragment D dimer in patients with deep vein thrombosis. *Thromb. Haemostas.* 58, 1025-1029, 1987.
4. Bounameaux, H. et al.: Measurement of plasma D-dimer for diagnosis of deep venous thrombosis. *Am. J Clin. Path.* 91, 82-85, 1989.
5. Hansson P.O. et al.: Can laboratory testing improve screening strategies for deep vein thrombosis at an emergency unit? *J. Intern. Med.* 235, 143-151, 1994.
6. Holovet P et al.: Binding properties of monoclonal antibodies against human fragment D-dimer of cross-linked fibrin to human plasma clots in an in vivo model in rabbits. *Thrombosis and Haemostasis* 61(2), 307-313, 1989.

Essai quantitatif d'agglutination au latex pour les D-dimères de fibrine.

Réactifs pour 80 analyses

Exclusivement pour usage diagnostique in vitro.

I. USAGE PRÉVU

Helena D-dimer est un essai d'agglutination au latex pour analyse semi-quantitative des D-dimères de fibrine.

II. PRINCIPE

Les fragments contenant des D-dimères résultent de la dégradation par la plasmine de la fibrine croisée avec le facteur XIIIa. On trouve des concentrations élevées de D-dimères dans le cadre de pathologies cliniques du type thrombose veineuse profonde (TVP), embolie pulmonaire (EP) et coagulation intravasculaire disséminée (CIVD)^{1,2}. Les taux de D-dimères augmentent pendant la grossesse et des taux élevés sont également observés en cas de complications². Helena D-dimer exploite l'effet d'un anticorps monoclonal qui rentre en réaction avec les D-dimères ou fragments D de la fibrine mais pas avec le fibrinogène intact⁶, permettant ainsi d'analyser les D-dimères dans le plasma humain. On peut également utiliser des échantillons de sérum appropriés pour analyse PDF.

Aucune norme internationale n'existe actuellement pour les D-dimères. Pour obtenir des valeurs numériques, Helena a aligné la méthode Helena D-dimer sur la technique de dosage immunoenzymatique commercialisée (ELISA).

III. RÉACTIFS

A. Description des réactifs

1. Méthode de test Helena D-dimer au latex : 1 fiole contenant 1,7 ml de suspension de particules de latex. Les particules sont enduites d'anticorps monoclonaux.
2. **Solution saline**
2 fioles contenant chacune 8 ml de tampon salin de pH 7,3. Contient 0,2 g/l d'azide de sodium.
3. **Plasma de contrôle positif**
1 fiole contenant 1,0 ml de plasma humain lyophilisé enrichi en D-dimères.
4. **Plasma de contrôle négatif**
1 fiole contenant 1,0 ml de plasma humain lyophilisé.

B. Préparation du réactif

1. Attendez que toutes les fioles se réchauffent à température ambiante au moins 10 minutes avant de les utiliser.
2. Ajoutez 1,0 ml (1000 µl) de solution saline à chacune des fioles de plasma de contrôle positif et négatif. Le plasma contrôle peut être conservé à 2...6°C pendant un mois. Voir XIII. Remarques point 3.
3. Agitez le latex en renversant plusieurs fois la fiole pendant 3 secondes immédiatement avant utilisation.

Si des amas de latex s'amoncellent dans le cou du flacon ou sont présents dans la suspension de latex, vortexer le flacon pendant 10 secondes pour s'assurer que le dépôt est remis en suspension.

IV. AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS

MATÉRIEL BIOLOGIQUE POTENTIELLEMENT DANGEREUX. Les contrôles négatifs et positifs contiennent du plasma d'origine humaine. Chaque unité donneuse de plasma source utilisée dans ces produits a été testée suivant des méthodes approuvées par la FDA avec résultat négatif pour le dépistage des antigènes de l'hépatite B, des anticorps du VIH I et II, des anticorps de l'hépatite C, et ceux de la syphilis et du HTLV I/II. Aucune méthode d'analyse ne pouvant garantir de façon absolue l'absence d'agents infectieux, ces plasmas doivent être manipulés selon le niveau 2 de sécurité biologique, conformément aux recommandations en matière de sérums et spécimens sanguins humains potentiellement infectieux dans le manuel "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", 1984, Centers for Disease Control/National Institutes of Health. Tous les déchets contenant des substances biologiques doivent être étiquetés en conséquence et ne doivent pas être stockés avec les déchets d'autre type. Éliminez tous les déchets conformément aux règlements internationaux, nationaux et locaux.

AZIDE DE SODIUM. La solution saline et le réactif au latex contiennent tous deux de l'azide de sodium qui peut réagir au contact avec le plomb et le cuivre des tuyauteries d'évacuation en formant des azotures hautement explosifs. En cas d'évacuation dans un évier, rincez à grande eau pour prévenir la formation de dépôts d'azide.

L'analyse doit être menée en association avec les observations cliniques et d'autres analyses de laboratoire.

V. CONSERVATION ET STABILITÉ

Les réactifs doivent être conservés à 2...8°C et utilisés avant la date de péremption mentionnée sur la boîte. Le plasma témoin reconstitué se conserve un mois à 2...6°C.

VI. PRÉLÈVEMENT DES ÉCHANTILLONS

L'utilisation du citrate pour le plasma anticoagulé est recommandée. Rassemblez les échantillons en neuf mesures de sang et une mesure de solution tampon de citrate de sodium à 3,2 % (0,105 M). Centrifugez à 3000 x g pendant 10 minutes. Les échantillons de plasma sous citrate se conservent 2 heures à température ambiante et 18 heures à 2...8°C. Une congélation unique n'affectera pas la réaction à l'analyse. Vous pouvez vous référer au NCCLS H21-A2 pour des instructions spécifiques relatives au prélèvement des échantillons.

VII. PROCÉDURE

A. Matériel fourni

- 1 x Helena D-dimer au latex
- 2 x solution saline
- 1 x plasma de contrôle positif
- 1 x plasma de contrôle négatif
- 50 bâtonnets pour mélanger
- 16 cartes d'essai par lot de 6 échantillons

B. Matériaux requis mais non fournis

Pipettes à 20, 100 et 1000 μ l

Pointes de pipette

Tubes de dosage de 3 ml

Minuterie

C. Méthode qualitative

1. Placez 20 μ l d'échantillon et de plasmas contrôles positifs et négatifs en cercles sur une carte d'essai.
2. Placez 20 μ l de latex en suspension à proximité de chacun des cercles formés.
3. Mélangez rapidement l'échantillon et le latex avec un bâtonnet propre pour chaque échantillon. Mettez la minuterie en marche.
4. Agitez doucement la carte d'essai et mesurez l'agglutination au bout de 180-200 secondes. Comparez les résultats positifs (+) et négatifs (-) avec les contrôles. Le contrôle positif est d'ordre purement qualitatif et une dilution supplémentaire est donc inutile. En l'absence d'agglutination du latex, l'échantillon est jugé normal et n'a donc pas besoin d'être testé de nouveau.

D. Méthode semi-quantitative effectuée sur les seuls échantillons au résultat positif.

1. Utilisez 100 μ l d'échantillon pour effectuer une dilution en série de 1:2, 1:4 et 1:8 avec 100 μ l de solution saline dans de petits tubes de dosage.
2. Marquez la position des dilutions sur la carte d'essai et mélangez avec le latex en suspension comme indiqué au point VII. C. La concentration en D-dimères pourra être établie par référence au tableau IX. VALEURS ATTENDUES.

VIII. CONTRÔLE DE QUALITÉ

Les contrôles positifs et négatifs fournis doivent être utilisés pour contrôle de la qualité de chaque trousse. Il est recommandé de tester les contrôles positifs et négatifs à chaque nouvelle utilisation de la trousse. Si l'un des contrôles (positif ou négatif) ne fournit pas la réponse attendue, les résultats obtenus pour ce test ne doivent pas être exploités et la trousse utilisée doit être délaissée ou renvoyée à Helena.

IX. VALEURS ATTENDUES

L'agglutination intervient dans les 180-200 secondes pour les échantillons contenant plus de 250 ng/ml de D-dimères. Une dilution du plasma en série permet d'obtenir des résultats semi-quantitatifs.

Taux de D-dimères (ng/ml)

(ng/ml)	Non dilué	1:2	1:4	1:8
< 250	-	-	-	-
250-500	+	-	-	-
500-1000	+	+	-	-
1000-2000	+	+	+	-
> 2000	+	+	+	+

L'agglutination peut être plus prononcée et plus rapide pour des concentrations de D-dimères assez élevées. Si vous souhaitez exprimer les résultats en unités équivalent fibrinogène (UEF), multipliez par 2 les taux de D-dimères du tableau ci-dessus : par exemple, <250 ng/ml devient <500 UEF. Différents rapports⁴ ont montré que certaines analyses commerciales au latex n'ont pas la sensibilité alléguée par rapport à la technique ELISA commercialisée.

X. INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

L'agglutination intervient dans les 180-200 secondes pour les échantillons contenant plus de 250 ng/ml de D-dimères. Le taux moyen de D-dimères dans une population saine va de 8 à 135 ng/ml et le plasma pur provenant d'individus sains ne devrait donc pas s'agglutiner. Helena D-dimer a une valeur prédictive négative élevée pour la thrombose⁵. La demi-vie des D-dimères dans le sang circulant est de 12 heures environ. Des taux élevés de D-dimères peuvent donc persister pendant un certain temps après cessation du processus actif.

Des études cliniques portant sur des sujets sains, des patients avec un diagnostic de thrombose veineuse profonde confirmé par phlébographie, des patients avec CIVD et des patients avec pré-éclampsie (Pré-EC) ont mis en évidence les résultats suivants :

Helena Résultat D-dimères†

Échantillons	η	-	1:1	1:2	1:4	≥1:8
Normal	101	100	1*	-	-	-
TVP	48	3	10*	7*	14*	14*
CIVD	29	0	3	3	4	19
Pre-EC	6	2	1	3	-	-

† Les symboles η et - désignent respectivement le nombre de patients et un résultat négatif au test Helena D-dimer. Les titres correspondent au taux le plus élevé de dilution auquel l'échantillon démontre des signes d'agglutination.

* L'agglutination a été inhibée par addition d'anticorps MA-8D3 spécifiquement dirigés contre les D-dimères (0,2 mg/ml), mais l'ajout de l'anticorps PAM-1 indépendant est resté sans effet.

XI. CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE

A. Spécificité

L'anticorps monoclonal utilisé dans cet appareil, MA-8D3, est spécifiquement dirigé contre les D-dimères en raison de la méthode de dépistage exploitée pour la sélection d'hybridomes³. Un hybridome sécrétant des anticorps réagissant positivement aux D-dimères purifiés mais non au fibrinogène intègre ou au fragment D du fibrinogène a été sélectionné. Aucune forme de réactivité croisée avec le fibrinogène ou le monomère de fibrine de type I n'a été observée lorsque l'un ou l'autre des échantillons à analyser a été substitué au plasma dans cet essai. Le plasma de 16 patients atteints de polyarthrite rhumatoïde a été analysé et 14 de ces échantillons n'ont montré aucun signe d'agglutination avec le test Helena D-dimer. Les deux cas d'agglutination ont pu être inhibés par addition de l'anticorps monoclonal MA-8D3 spécifiquement dirigé contre les D-dimères, mais l'ajout d'un monoclonal du même sous-groupe, l'IgG1κ (PAM-1) est resté sans effet. Ce résultat laisse à penser que Helena D-dimer n'est pas sensible aux troubles liés au facteur rhumatoïde.

B. Reproductibilité

Trois échantillons de plasma ont été sélectionnés pour un test de reproductibilité. Chaque échantillon a été testé 10 fois par jour sur trois jours. Dans chaque cas, en cas de résultat positif, l'échantillon a été titré. Voici les résultats en D-dimères (ng/ml) :

Echantillon	aux de D-dimères	Résultat
Normal	<250 ng/ml	négatif
Intermédiaire	3000 ng/ml	titre 1:8
Haut	>16,000 ng/ml	titre 1:64

C. Exactitude

La trousse Helena D-dimer a été comparée à une autre méthode d'analyse des D-dimères au latex parmi celles disponibles en commerce. Les deux produits ont donné une réaction négative suite à l'analyse de 25 spécimens normaux. Lors de l'analyse de 30 échantillons de plasma de patients avec ELISA et le test Helena D-dimer, tous les échantillons dépassant les 225 ng/ml avec ELISA ont montré des signes d'agglutination avec Helena D-dimer.

XII. LIMITES DU TEST

1. Un test négatif en D-dimères n'élimine pas totalement l'hypothèse de thrombose. La trousse d'analyse Helena D-dimer a donné une valeur prédictive négative de 94 % pour des patients avec suspicion de thrombose veineuse profonde. La détection de taux élevés de D dimères doit donc être confirmée par d'autres données cliniques pour arriver à un diagnostic.
2. Un phénomène d'agglutination des échantillons contenant des taux normaux de D-dimères peut occasionnellement être observé en raison de la non-spécificité de la réaction.
3. Un petit nombre d'échantillons peuvent, après mélange avec le latex, présenter des flocons blancs qui ne doivent toutefois pas être confondus avec un phénomène d'agglutination.

XIII. REMARQUES

1. Les résultats peuvent être exprimés soit en D-dimères, soit en unités équivalent fibrinogène (UEF); 1 ng/ml de D-dimères équivaut à environ 2 ng/ml de UEF.
2. L'agglutination peut être plus prononcée et plus rapide pour des concentrations de D-dimères assez élevées.
3. Le bouchon en caoutchouc dans les fioles de contrôle doit être jeté après ouverture de la fiole.

XIV. RÉFÉRENCES

1. Elms, M.J. et al.: Rapid detection of cross-linked fibrin degradation products in plasma using monoclonal antibody-coated latex particles. J. Clin. Path. 85, 360-364, 1986.
2. Ballegeer, V. et al.: Fibrinolytic response to venous occlusion and fibrin fragment D-dimer levels in normal and complicated pregnancy. Thromb. Haemostas. 58, 1030-1032, 1987.
3. Declerck, P.V. et al.: Fibrinolytic response and fibrin fragment D-dimer in patients with deep vein thrombosis. Thromb. Haemostas. 58, 1025-1029, 1987.
4. Bounameaux, H. et al.: Measurement of plasma D-dimer for diagnosis of deep venous thrombosis. Am. J Clin. Path. 91, 82-85, 1989.
5. Hansson P.O. et al.: Can laboratory testing improve screening strategies for deep vein thrombosis at an emergency unit? J. Intern. Med. 235, 143-151, 1994.

6. Holovet P et al.: Binding properties of monoclonal antibodies against human fragment D-dimer of cross-linked fibrin to human plasma clots in an in vivo model in rabbits. *Thrombosis and Haemostasis* 61(2), 307-313, 1989.

Latex-Agglutinationstest für den Nachweis von Fibrin D-Dimeren.

Reagenzien für 80 Tests

Nur zur In-vitro-Diagnose.

I. VERWENDUNGSZWECK

Helena D-Dimer ist ein Latex-Agglutinationstest für den semiquantitativen Nachweis von Fibrin D-Dimeren.

II. PRINZIP

Beim Plasmin-Abbau von Fibrin, das durch den Faktor XIIIa quervernetzt ist, entstehen D-dimer enthaltende Spaltprodukte. Erhöhte Konzentrationen von D-dimer werden bei klinischen Zuständen wie tiefer Venenthrombose (TVT), Pulmonalembolie (PE) und disseminierter intravasaler Koagulation (DIC) beobachtet. D-dimer Werte steigen während der Schwangerschaft an; hohe Werte weisen auf Komplikationen hin². Helena D-dimer bedient sich eines monoklonalen Antikörpers, der mit dem Fibrin D-Dimer oder dem Fibrin Fragment D, nicht aber mit intaktem Fibrinogen interagiert⁶, und dadurch den Nachweis des D-dimers im Humanplasma ermöglicht. Es können auch für die FDP-Analyse geeignete Serum-Proben herangezogen werden.

Gegenwärtig gibt es keinen internationalen Standard für D-dimere. Für numerische Werte hat Helena das Helena D-dimer an im Handel erhältliche erhältliche Enzyme Linked immunosorbent Assay (ELISA)-Tests angeglichen.

III. REAGENZIEN

A. Beschreibung der Reagenzien

1. Helena D-dimer Latex

1 Fläschchen enthält 1,7 ml Suspension aus Latexbeads. Die Beads sind mit dem Anti-D-dimer monoklonalen Antikörper.

2. Kochsalzlösung

2 Fläschchen enthalten jeweils 8 ml gepufferte Kochsalzlösung mit einem pH von 7,3. Enthält 0,2g/L Natriumazid.

3. Positives Kontroll-Plasma

1 Fläschchen enthält 1,0 ml lyophilisiertes, mit dem Fibrin D-dimer angereichertes Humanplasma.

4. Negatives Kontroll-Plasma

1 Fläschchen enthält 1,0 ml lyophilisiertes Humanplasma.

B. Vorbereitung der Reagenzien

1. Lassen Sie alle Fläschchen, vor dem Gebrauch für mindestens 10 Minuten auf Raumtemperatur kommen.
2. Fügen Sie jeweils 1,0 ml (1000 µl) Kochsalzlösung zu jedem Fläschchen mit negativem und positivem Kontrollplasma. Das Kontrollplasma kann bei 2...6°C für einen Monat gelagert werden. Siehe XIII. Anmerkungen Punkt 3.
3. Mischen Sie das Latex, indem Sie das Fläschchen unmittelbar vor dem Gebrauch wiederholt für jeweils 5 Sekunden umdrehen.
Falls sich die Latexmasse an dem Fläschchenhals ansammelt oder in der Latexsuspension sichtbar ist, das Fläschchen 10 Sekunden mit dem Vortexmischer mischen, um zu gewährleisten, dass alles absetzte Material resuspendiert ist.

IV. WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

POTENZIELLE BIOLOGISCHE GEFAHRENSTOFFE. Das negative und positive Kontrollplasma sind menschlichen Ursprungs. Jede in diesen Produkten verwendete Plasmaspendeeinheit wurde nach von der FDA anerkannten Methoden getestet und als negativ auf Hepatitis B-Antigene, HIV I- und II-Antikörper, Hepatitis C-Antikörper, Syphilis-Antikörper und HTLV-Antikörper befunden. Da jedoch kein Test Krankheitserreger 100% ausschließen kann, sollten diese Plasmen gemäß der Biosicherheitsstufe 2 behandelt werden wie für potentiell infektiöses Humanserum oder Blutproben im Handbuch "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories" des Center for Disease Control/National Institutes of Health von 1984 spezifiziert.. Alle Abfälle, die biologisches Material enthalten, müssen ordnungsgemäß gekennzeichnet und von anderem Abfall getrennt gelagert werden Entsorgen Sie alle Abfälle unter Beachtung der vorgeschriebenen internationalen, nationalen und örtlichen Bestimmungen.

NATRIUMAZID. Sowohl die KochKochsalzlösung als auch das D-dimer Latex enthalten Natriumazid, welches mit Blei und Kupferrohren hochexplosive Metallazide bilden kann. Wenn Sie die Materialien in den Ausguss entsorgen, spülen Sie mit großen Mengen Wasser nach, um eine Bildung hoher Azidkonzentrationen zu vermeiden
Der Test muss in Zusammenhang mit klinischen Beobachtungen und den Ergebnissen anderer Labortests betrachtet werden.

V. LAGERUNG UND STABILITÄT

Die Reagenzien sollten bei 2...8°C gelagert und vor Ablauf des aufgedruckten Verfallsdatums verbraucht werden. Einmal rekonstituiertes Kontrollplasma kann bei 2...6°C für einen Monat gelagert werden.

VI. PROBENENTNAHME

Es wird mit Zitrat antikoaguliertes Plasma empfohlen. Entnehmen Sie die Proben in neun Volumina Blut und einem Volumen 3,2% gepuffertem Natriumzitrat (0,105 M). Zentrifugieren Sie für 10 Minuten bei 3000 x g. Die mit Zitrat versetzten Plasmaproben können bei Raumtemperatur für 2 Stunden oder bei 2...8° C für 18 Stunden gelagert werden. Einmaliges Einfrieren und Wiederauftauen beeinflusst die Testreaktion nicht. Spezielle Richtlinien zur Probensammlung finden Sie in dem Dokument NCCLS H21-A2.

VII. VERFAHREN**A. Geliefertes Material**

- 1 x Helena D-dimer Latex:
- 2 x Kochsalzlösung
- 1 x Positives Kontrollplasma
- 1 x Negatives Kontrollplasma
- 50 Mischstäbchen
- 16 Testkärtchen für jeweils 6 Proben.

B. Benötigte, aber nicht enthaltene Materialien

Pipetten für 20, 100 und 1000 μ l Volumina
Pipettenspitzen
3 ml Reagenzgläser
Timer

C. Qualitative Methode

1. Tragen Sie jeweils 20 μ l der Probe sowie der positiven und negativen Kontrollplasmen kreisförmig auf ein Testkärtchen auf.
2. Tragen Sie unmittelbar neben jeden Kreis jeweils 20 μ l der Latex-Suspension auf.
3. Vermischen Sie Proben und Latex rasch mit sauberen Mischstäbchen für jede Probe. Starten Sie den Timer.
4. Schütteln Sie die Testkärtchen vorsichtig und lesen Sie die Agglutination zwischen 180 und 200 Sekunden ab. Positive (+) oder negative (-) Agglutination wird mit den Ergebnissen der Kontrollen verglichen. Die Positivkontrolle hat ausschließlich qualitativen Charakter und sollte nicht weiter verdünnt werden. Nicht-agglutiniertes Latex bedeutet, dass eine normale Probe vorliegt. Es ist kein weiterer Test erforderlich.

D. Semi-quantitative Methode wird nur an positiv getesteten Proben ausgeführt.

1. Verdünnen Sie 100 μ l der Probe seriell 1:2, 1:4 und 1:8 mit 100 μ l Kochsalzlösung in kleinen Reagenzgläsern.
2. Markieren Sie die Positionen der Probenverdünnungen auf dem Testkärtchen und mischen Sie mit der Latex-Suspension wie unter VII. C. Die D-Dimer Konzentration kann aus der Tabelle in Kapitel IX bestimmt werden. ERWARTETE WERTE.

VIII. QUALITÄTSKONTROLLE

Die mitgelieferten Positiv- und Negativkontrollen sollten für die Qualitätskontrolle jedes Kits herangezogen werden. Es wird empfohlen, dass sowohl die Positiv- als auch die Negativkontrollen bei jeder Anwendung des Kits getestet werden. Wenn entweder die Positiv- oder Negativkontrolle keine entsprechende Reaktion zeigen, sollten die aus dieser Testreihe erhaltenen Patientenbefunde nicht verwendet und der Kit entsorgt oder an Helena zurückgegeben werden.

IX. ERWARTETE WERTE

Bei Proben mit mehr als 250 ng/ml D-dimer tritt die Agglutination innerhalb von 180 bis 200 Sekunden ein. Beim Testen von seriell verdünnten Plasmen können semi-quantitative Ergebnisse erzielt werden.

D-Dimer Wert (ng/ml)

(ng/ml)	Unverdünnt	1:2	1:4	1:8
< 250	-	-	-	-
250-500	+	-	-	-
500-1000	+	+	-	-
1000-2000	+	+	+	-
> 2000	+	+	+	+

Bei höheren D-dimer Konzentrationen tritt die Agglutination deutlicher hervor und setzt schneller ein. Falls Sie die Resultate in Fibrinogen Equivalent Units (FEU) angeben wollen, verdoppeln Sie die D-dimer Werte aus der Tabelle oben, z. B. <250 ng/ml wird zu <500 FEU. Wie aus mehreren Berichten ersichtlich, weisen eine Reihe handelsüblicher Latex-Tests im Vergleich zu handelsüblichen ELISA nicht die entsprechende Sensitivität auf.

X. INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

Bei Proben mit mehr als 250 ng/ml D-dimer tritt die Agglutination innerhalb von 180 - 200 Sekunden ein. In einer gesunden Bevölkerung liegt der Mittelwert von D-dimeren zwischen 8 und 135 ng/ml, und sauberes Plasma von normalen, gesunden Individuen sollte nicht agglutinieren. Der negative Prognosewert des Helena D-dimers für eine Thrombose ist hoch⁵. The Halbwertszeit des D-dimer im Blutkreislauf beträgt etwa 12 Stunden. Erhöhte D-dimer Werte können deshalb noch einige Zeit nach Abklingen der aktiven Prozesse bestehen bleiben.

In klinischen Studien mit normalen Testpersonen, Patienten mit phlebografisch bestätigter DVT, Patienten mit DIC und Patienten mit Prä-Eklampsie (Pre-EC) wurden folgende Ergebnisse erhalten:

Helena D-Dimer Ergebnisse†

Proben	1:1	-	1:1	1:2	1:4	≥1:8
Normal	101	100	1*	-	-	-
DVT	48	3	10*	7*	14*	14*
DIC	29	0	3	3	4	19
Pre-EC	6	2	1	3	-	-

† Die Symbole 1:1 und - kennzeichnen Patientenzahlen bzw. negative Helena D-dimer Resultate. Die Titer bezeichnen die höchste Verdünnungsstufe bei der die Probe eine Agglutination auslöst.

* Die Agglutination wurde durch die Zugabe eines D-dimer spezifischen Antikörpers (0,2 mg/ml) MA-8D3 gehemmt, jedoch nicht durch den nicht-verwandten Antikörper PAM-1.

XI. LEISTUNGSDATEN

A. Spezifität

Der in diesem Gerät verwendete monoklonale Antikörper MA-8D3 ist spezifisch für das D-dimer durch die Wirksamkeit der für die Hybridomauswahl verwendeten Screeningmethode³. Es wurde ein Hybridom ausgewählt, welches positiv mit gereinigtem D-dimer reagierende, aber nicht mit dem Gesamt-Fibrinogen oder dessen Fragment D reagierende Antikörper absondert.. Es konnten weder Kreuzreaktivität mit Fibrinogen noch mit Des-AA-Fibrinogen in substituiertem Plasma beobachtet werden. Plasma von 16 Patienten mit chronischer Polyarthrits wurde getestet. Bei 14 dieser Patienten konnte mit dem Helena D-dimer Test keine Agglutination festgestellt werden. Die beiden Agglutinationen konnten durch die Zugabe des D-dimer spezifischen Antikörpers MA-8D3 gehemmt werden - nicht aber durch Zugabe eines monoklonalen Antikörpers der gleichen Untergruppe IgG1k (PAM-1). Diese Befunde deuten darauf hin, dass das Helena D-dimer insensitiv auf Störungen durch Rheumafaktoren ist.

B. Reproduzierbarkeit

Für den Test auf Reproduzierbarkeit des Assays wurden drei Plasmaproben ausgewählt. Jede der Proben wurde an drei verschiedenen Tagen jeweils 10 mal getestet. Bei jedem Fall eines positiven Ergebnisses wurde die Probe titriert. Die Ergebnisse in D-dimer (ng/ml):

Probe	D-Dimer Wert	Ergebnis
Normal	<250 ng/ml	negativ
Mäßig	3000 ng/ml	Titer 1:8
Hoch	>16,000 ng/ml	Titer 1:64

C. Genauigkeit

Der Helena D-dimer Kit wurde mit einem anderen handelsüblichen erhältlichen D-dimer Latex verglichen. Beide Produkte ergaben eine negative Reaktion im Test bei 25 normalen Proben. Beim Testen von Plasmaproben von 30 Patienten mittels ELISA und Helena D-dimer zeigten alle Proben mit ELISA Werten über 225 ng/ml eine Agglutination mit dem Helena D-dimer.

XII.EINSCHRÄNKUNGEN DES TESTS

1. Ein negativer D-dimer Test schließt Thrombosen nicht vollständig aus. Für den Helena D-dimer Kit wurde ein negativer Prognosewert für Patienten mit Verdacht auf DVT von 94% bestimmt. Der Nachweis erhöhter D-dimer Werte sollte im Zusammenhang mit anderen klinischen Informationen bei der Diagnosestellung betrachtet werden..
2. Eine Agglutination von Proben mit normalen D-dimer Werten kann fallweise aufgrund von Nicht-Spezifität auftreten.
3. Bei einigen wenigen Proben kann es beim Mischen mit Latex zu weißen Ausflockungen kommen, die nicht mit einer Agglutination verwechselt werden sollten.

XIII.ANMERKUNGEN

1. Die Ergebnisse können entweder in D-dimer Einheiten oder als Fibrinogen Equivalent Units (FEU) angegeben werden; 1 ng/ml D-dimer entspricht in etwa 2 ng/ml FEU.
2. Bei höheren D-Dimer Konzentrationen tritt die Agglutination deutlicher hervor und setzt schneller ein.
3. Den Gummipfropfen der Kontroll-Fläschchen nach dem Öffnen entsorgen.

XIV.LITERATUR

1. Elms, M.J. et al.: Rapid detection of cross-linked fibrin degradation products in plasma using monoclonal antibody-coated latex particles. J. Clin. Path. 85, 360-364, 1986.
2. Ballegeer, V. et al.: Fibrinolytic response to venous occlusion and fibrin fragment D-dimer levels in normal and complicated pregnancy. Thromb. Haemostas. 58, 1030-1032, 1987.
3. Declerck, P.V. et al.: Fibrinolytic response and fibrin fragment D-dimer in patients with deep vein thrombosis. Thromb. Haemostas. 58, 1025-1029, 1987.
4. Bounameaux, H. et al.: Measurement of plasma D-dimer for diagnosis of deep venous thrombosis. Am. J Clin. Path. 91, 82-85, 1989.
5. Hansson P.O. et al.: Can laboratory testing improve screening strategies for deep vein thrombosis at an emergency unit? J. Intern. Med.235, 143-151, 1994.
6. Holovet P et al.: Binding properties of monoclonal antibodies against human fragment D-dimer of cross-linked fibrin to human plasma clots in an in vivo model in rabbits. Thrombosis and Haemostasis 61(2), 307-313, 1989.

Test di agglutinazione del lattice per il D-dimero della fibrina.**Reagenti per 80 determinazioni****Solo per uso diagnostico in vitro****I. CAMPO DI UTILIZZO**

Helena D-dimer è un test di agglutinazione del lattice per la determinazione semiquantitativa del D-dimero della fibrina.

II. PRINCIPIO

Le frazioni contenenti il D-dimero si formano in seguito alla degradazione, da parte della plasmina, della fibrina stabilizzata dal fattore XIIIa. Livelli elevati di D-dimero sono stati riscontrati in condizioni cliniche quali la trombosi venosa profonda (DVT), l'embolia polmonare (PE) e la coagulazione intravascolare disseminata (DIC)^{1,3}. I livelli di D-dimero aumentano durante la gravidanza e livelli molto elevati sono associati a complicazioni². Helena Ddimer utilizza un anticorpo monoclonale che reagisce con il D-dimero della fibrina o con il frammento D della fibrina ma non con il fibrinogeno⁶ intatto, consentendo in questo modo la determinazione del D-dimero nel plasma umano. È possibile utilizzare anche campioni di siero adatti all'analisi FDP.

Non esistono attualmente standard internazionali per il D-dimero. Per i valori numerici Helena ha allineato Helena D-dimer a test con immunosorbente legato all'enzima (ELISA) disponibili in commercio.

III. REAGENTI**A. Descrizione dei reagenti****1. Lattice Helena D-dimer**

1 vial contenente 1,7 ml di sospensione di sfere di lattice. Le sfere sono ricoperte di anticorpo monoclonale.

2. Soluzione salina

2 vial contenenti ciascuna 8 ml di soluzione tampone a pH 7,3. Contiene 0,2 g/l di sodio azide.

3. Plasma di controllo positivo

1 vial contenente 1,0 ml di plasma umano liofilizzato arricchito con D-dimero della fibrina.

4. Plasma di controllo negativo

1 vial contenente 1,0 ml di plasma umano liofilizzato.

B. Preparazione dei reagenti

1. Prima dell'uso attendere per almeno 10 minuti che tutte le vial raggiungano la temperatura ambiente.
2. Aggiungere 1,0 ml (1000 μ l) di soluzione salina ad ogni vial di plasma di controllo positivo e negativo. Il plasma di controllo può essere conservato a 2...6°C per un mese. Vedere il punto 3 del paragrafo XIII Note.
3. Immediatamente prima dell'uso, agitare il lattice per 5 secondi capovolgendo ripetutamente il vial. Se la massa di lattice si raccoglie intorno al collo della fiala oppure è visibile nella sospensione, agitare la fiala su vortex per 10 secondi per assicurarsi che nessun materiale sia risospeso.

IV. AVVERTIMENTI E PRECAUZIONI

POTENZIALE INQUINANTE BIOLOGICO. I plasma di controllo positivo e negativo sono di origine umana. Ogni unità di plasma proveniente da donatore utilizzata in questi prodotti è stata controllata con metodi approvati dalla FDA ed è risultata negativa in relazione alla presenza di antigeni dell'epatite B, anticorpi HIV I e II, anticorpi dell'epatite C, anticorpi della sifilide ed anticorpi H.T.L.V. I/II. Poiché nessun metodo può garantire l'assenza di agenti infettivi, questi plasma devono essere manipolati secondo quanto previsto dal livello 2 delle norme di biosicurezza e considerati come qualsiasi campione di siero o sangue umano potenzialmente infettivo nel manuale "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories" del Centers for Disease Control/National Institutes of Health pubblicato nel 1984. Tutti i rifiuti contenenti materiale biologico devono essere etichettati in modo appropriato e conservati separatamente da tutti gli altri rifiuti. Smaltire tutti i rifiuti secondo le norme internazionali, nazionali e locali.

SODIO AZIDE. Sia la soluzione salina che il lattice D-dimero contengono sodio azide, che può reagire con le tubature in piombo o rame formando azidi di metalli altamente esplosive. Dopo aver scaricato i materiali scaricati nel lavandino è necessario far scorrere a lungo l'acqua per evitare l'accumulo di azide.

Il test deve essere utilizzato in abbinamento alle osservazioni cliniche ed ai risultati di altri test di laboratorio.

V. CONSERVAZIONE E STABILITÀ

I reagenti devono essere conservati a una temperatura compresa tra 2...8°C ed utilizzati prima della data di scadenza riportata sulla confezione. Una volta ricostituiti, i plasma di controllo possono essere conservati a 2...6°C per un mese.

VI. CAMPIONAMENTO

Si consiglia di aggiungere ai plasma del citrato come anticoagulante. Raccogliere i campioni con nove volumi di sangue ed un volume di tampone sodio citrato al 3,2% (0,105 M). Centrifugare a 3000 x g per 10 minuti. I campioni di plasma in citrato possono essere conservati a temperatura ambiente per 2 ore oppure a una temperatura compresa tra 2...8°C per 18 ore. Un singolo ciclo di congelamento-scongelo non influisce sul risultato del test. Per le linee guida specifiche sulla raccolta dei campioni fare riferimento alla NCCLS H21 -A2.

VII. PROCEDURA

A. Materiale fornito

- 1 x lattice Helena D-dimer
- 2 x soluzione salina
- 1 x plasma di controllo positivo
- 1 x plasma di controllo negativo
- 50 bastoncini
- 16 schede di test da 6 campioni ciascuna

B. Materiale richiesto non fornito

Pipette da 20, 100 e 1000 μ l
 Puntali per pipette
 Provette da 3 ml
 Cronometro

C. Metodo qualitativo

1. Mettere su una scheda di test 20 μ l di plasma di controllo positivo e negativo campione formando dei cerchi.
2. Mettere 20 μ l di sospensione di lattice in una zona adiacente di ciascun cerchio.
3. Miscelare velocemente il campione ed il lattice utilizzando un bastoncino pulito per ciascun campione. Far partire il cronometro.
4. Ruotare delicatamente la test card e leggere l'agglutinazione dopo 180-200 secondi. L'agglutinazione positiva (+) o negativa (-) viene confrontata con i risultati ottenuti utilizzando i controlli. Il controllo positivo è puramente qualitativo e non deve essere diluito ulteriormente. Un lattice non agglutinato indica che il campione è normale e non sono necessarie ulteriori analisi.

D. Metodo semiquantitativo eseguito solo sui campioni risultati positivi

1. Diluire in serie 100 μ l di campione 1:2, 1:4 e 1:8 con 100 μ l di soluzione salina utilizzando provette piccole.
2. Segnare sulla scheda di test le posizioni dei campioni diluiti e miscelare con la sospensione di lattice come indicato nel paragrafo VII. C. La concentrazione del D-dimero può essere determinata in base alla tabella riportata nel paragrafo IX. VALORI ATTESI

VIII. CONTROLLO QUALITÀ

I controlli positivo e negativo forniti devono essere utilizzati per il controllo qualità di ciascun kit. Si consiglia di testare entrambi i controlli ogni volta che si utilizza il kit. Se il controllo positivo o negativo non fornisce la risposta appropriata, non utilizzare i risultati ottenuti in tale occasione e gettare o restituire il kit alla Helena.

IX. VALORI ATTESI

L'agglutinazione avviene entro 180-200 secondi per i campioni che contengono più di 250 ng/ml di D-dimero. È possibile ottenere risultati semiquantitativi analizzando una serie di diluizioni del plasma.

Livello di D-dimero (ng/ml)

(ng/ml)	Non diluito	1:2	1:4	1:8
< 250	-	-	-	-
250-500	+	-	-	-
500-1000	+	+	-	-
1000-2000	+	+	+	-
> 2000	+	+	+	+

L'agglutinazione può essere più pronunciata ed apparire più rapidamente con concentrazioni di D-dimero più elevate. Per esprimere i risultati in unità equivalenti di fibrinogeno (FEU), moltiplicare per 2 i livelli di D-dimero riportati nella tabella precedente; ad esempio <250 ng/g diventerà <500 FEU. Come discusso in diversi rapporti⁴, per alcuni test basati su lattice attualmente in commercio non viene dichiarata la sensibilità rispetto ai test ELISA ugualmente disponibili in commercio.

X. INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

L'agglutinazione avviene entro 180-200 secondi per i campioni che contengono più di 250 ng/ml di D-dimero. Il livello medio di D-dimero nella popolazione sana è compreso tra 8 e 135 ng/ml ed il plasma tal quale di individui normali e sani non deve dare agglutinazione. Il valore predittivo negativo del test Helena D-dimer per le trombosi è elevato⁵. L'emivita circolatoria del D-dimero è di circa 12 ore. Livelli elevati di D-dimero possono pertanto persistere per un certo tempo dopo il termine del processo attivo.

In studi clinici effettuati su soggetti normali, pazienti con DVT confermato flebograficamente, pazienti con DIC e pazienti con pre-eclampsia (Pre-EC), sono stati ottenuti i seguenti risultati:

Helena Risultati D-dimero†

Campioni	η	-	1:1	1:2	1:4	≥1:8
Normale	101	100	1*	-	-	-
DVT	48	3	10*	7*	14*	14*
DIC	29	0	3	3	4	19
Pre-EC	6	2	1	3	-	-

† I simboli η e - indicano rispettivamente il numero di pazienti ed un risultato negativo di Helena D-dimer. I titoli indicano la diluizione massima a cui il campione mostra agglutinazione.

* L'agglutinazione è stata inibita aggiungendo l'anticorpo specifico del D-dimero (0,2 mg/ml) MA-8D3 ma non un anticorpo non correlato PAM-1.

XI. PRESTAZIONI

A. Specificità

L'anticorpo monoclonale MA-8D3 utilizzato in questo dispositivo è specifico per il D-dimero in virtù del metodo di screening utilizzato per la selezione dell'ibridoma⁷. È stato selezionato un ibridoma che secreta anticorpi che reagiscono con il D-dimero purificato ma non con l'intero fibrinogeno o con il frammento D del fibrinogeno. Non è stata osservata nessuna cross-reattività con il fibrinogeno o il des-AA-fibrinogeno sostituendo nel test il plasma con uno degli analiti. Testando plasma provenienti da 16 pazienti con artrite reumatoide, 14 di questi sono risultati non agglutinanti con il test Helena D-dimer. È possibile inibire le due agglutinazioni aggiungendo l'anticorpo monoclonale MA-8D3 specifico del D-dimero ma non un monoclonale dello stesso sottogruppo, IgG1k (PAM-1). Ciò suggerisce che il Helena D-dimer non è sensibile ai disturbi provocati dal fattore reumatoide.

B. Riproducibilità

Per verificare la riproducibilità del test, sono stati selezionati tre campioni di plasma. Ogni campione è stato testato 10 volte al giorno, per 3 giorni. In ciascun caso, quando è stato ottenuto un risultato positivo, il campione è stato titolato. Di seguito sono riportati i risultati in D-dimero (ng/ml):

Campione	Livello di D-dimero	Risultato
Normale	<250 ng/ml	Negativo
Intermedio	3000 ng/ml	Titolo 1:8
Superiore	> 16,000 ng/ml	Titolo 1:64

C. Accuratezza

Il kit Helena D-dimer è stato confrontato con un altro lattice D-dimero disponibile in commercio. Entrambi i prodotti hanno dato una reazione negativa quando testati su 25 campioni normali. Testando con ELISA e Helena D-dimer 30 campioni di plasma da paziente, tutti i campioni aventi valori ELISA maggiori di 225 ng/ml hanno mostrato agglutinazione con Helena D-dimer.

XII.LIMITI DEL TEST

1. Un test del D-dimero negativo non esclude completamente la trombosi. Il kit D-dimer⁵ consente di stabilire al 94% un valore predittivo negativo per pazienti con sospetto DVT. Utilizzare la rilevazione di livelli elevati di D-dimero unitamente ad altre informazioni cliniche per la formazione di una diagnosi.
2. L'agglutinazione può verificarsi occasionalmente con campioni contenenti livelli normali di D-dimero a causa di non-specificità.
3. In un numero ridotto di campioni, miscelati con il lattice, potrebbe verificarsi una flocculazione bianca che non deve essere confusa con l'agglutinazione.

XIII.NOTE

1. I risultati possono essere riportati in unità di D-dimero o in unità equivalenti di fibrinogeno (FEU); 1 ng/ml di D-dimero è equivalente a circa 2 ng/ml di FEU.
2. L'agglutinazione sarà più pronunciata ed apparirà più rapidamente con concentrazioni di D-dimero più elevate.
3. Il tappo di gomma dei vial dei controlli può essere gettato dopo l'apertura del vial.

XIV. BIBLIOGRAFIA

1. Elms, M.J. et al.: Rapid detection of cross-linked fibrin degradation products in plasma using monoclonal antibody-coated latex particles. *J. Clin. Path.* 85, 360-364, 1986.
2. Ballegeer, V. et al.: Fibrinolytic response to venous occlusion and fibrin fragment D-dimer levels in normal and complicated pregnancy. *Thromb. Haemostas.* 58, 1030-1032, 1987.
3. Declerck, P.V. et al.: Fibrinolytic response and fibrin fragment D-dimer in patients with deep vein thrombosis. *Thromb. Haemostas.* 58, 1025-1029, 1987.
4. Bounameaux, H. et al.: Measurement of plasma D-dimer for diagnosis of deep venous thrombosis. *Am. J Clin. Path.* 91, 82-85, 1989.
5. Hansson P.O. et al.: Can laboratory testing improve screening strategies for deep vein thrombosis at an emergency unit? *J. Intern. Med.* 235, 143-151, 1994.
6. Holovet P et al.: Binding properties of monoclonal antibodies against human fragment D-dimer of cross-linked fibrin to human plasma clots in an in vivo model in rabbits. *Thrombosis and Haemostasis* 61(2), 307-313, 1989.

Ensayo de aglutinación por látex para el dímero D de la fibrina.

Reactivos para 80 determinaciones

Exclusivamente para diagnóstico in vitro.

I. USO PREVISTO

Helena D-dimer es un ensayo de aglutinación por látex para la determinación semicuantitativa del dímero D de la fibrina.

II. PRINCIPIO

Los fragmentos que contienen dímero D se forman por la acción de la plasmina al degradar la fibrina estabilizada por el factor XIIIa. Niveles elevados de dímero D pueden observarse en patologías clínicas tales como la trombosis venosa profunda (DVT), el embolismo pulmonar (PE) y la coagulación intravascular diseminada (DIC)^{1,3}. Los niveles de dímero D aumentan durante el embarazo, estando asociados los niveles altos a complicaciones². En Helena D-dimer se utiliza un anticuerpo monoclonal que reacciona con el dímero D o el fragmento D de la fibrina pero no con el fibrinógeno⁶, lo que permite la determinación del dímero D en el plasma humano. También pueden utilizarse muestras de suero adecuadas para el análisis FDP.

Actualmente no existe un patrón internacional para el dímero D. En cuanto a los valores numéricos, Helena ha ajustado Helena D dimer a los ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA) disponibles en el mercado.

III. REACTIVOS

A. Descripción de los reactivos

1. Látex Helena D-dimer

1 vial con 1,7 ml de suspensión de perlas de látex. Las perlas están recubiertas con anticuerpo monoclonal anti-dímero-D.

2. Solución salina

2 viales que contienen 8 ml cada uno de solución salina tamponada, pH 7,3, con 0,2 g/l de azida sódica.

3. Plasma de control positivo

1 vial que contiene 1,0 ml de plasma humano liofilizado enriquecido con dímero D de fibrina.

4. Plasma de control negativo

1 vial con 1,0 ml de plasma humano liofilizado.

B. Preparación de los reactivos

1. Antes de su uso deberá esperarse a que los viales alcancen la temperatura ambiente (mín. 10 minutos).
2. Añadir 1,0 ml (1000 µl) de solución salina a cada uno de los viales de plasma de control negativo y control positivo. El plasma de control puede conservarse a 2...6°C durante 1 mes. Ver XIII, Notas, punto 3.
3. Agitar el látex invirtiendo repetidamente el vial durante 5 segundos justo antes de usarlo. Si la masa de látex se acumula en el cuello del vial o es visible en la suspensión de látex, agite el vial en vórtex durante 10 segundos para asegurarse de que ningún material sedimentario quede resuspendido.

IV. ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

MATERIAL BIOLÓGICO POTENCIALMENTE PELIGROSO. Los plasmas de control negativo y positivo son de origen humano. Las unidades de donantes del plasma original utilizadas en estos productos han sido analizadas mediante métodos aprobados por la FDA resultando negativas para los antígenos de la Hepatitis B, anticuerpos antiHIV I y II, anticuerpos antiHepatitis C, anticuerpos antisifilis y anticuerpos antiH.T.L.V. I/II. Dado que ningún método de ensayo garantiza la total ausencia de agentes infecciosos, estos plasmas deben ser tratados con un Nivel de Bioseguridad 2 tal y como se recomienda para cualquier suero humano o muestra de sangre potencialmente infecciosos en el manual "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories" (Bioseguridad en los Laboratorios Microbiológicos y Biomédicos) de los Centers for Disease Control/National Institutes of Health, 1984. Todos los residuos que contengan material biológico deben ser adecuadamente etiquetados y conservados y deben mantenerse separados de los demás residuos. Eliminar los residuos de acuerdo con las normativas internacionales, nacionales y locales.

AZIDA SÓDICA. Tanto la solución salina como el látex de dímero D contienen azida sódica, la cual puede reaccionar con las tuberías de plomo y cobre formando compuestos metálicos altamente explosivos. Cuando se eliminan productos por el desagüe deberá añadirse abundante agua para evitar la acumulación de azida en las tuberías.

El ensayo debe utilizarse conjuntamente con las observaciones clínicas y con los resultados de otros ensayos de laboratorio.

V. CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD

Los reactivos deben conservarse a una temperatura entre 2...8°C y ser utilizados antes de la fecha de caducidad que figura en el envase. Los plasmas de control, una vez reconstituídos, pueden conservarse a 2...6°C durante 1 mes.

VI. RECOGIDA DE LAS MUESTRAS

Se recomienda el uso de plasma anticoagulado con citrato. Extraer las muestras en nueve volúmenes de sangre y un volumen de tampón citrato sódico al 3,2% (0,105 M). Centrifugar a 3000 rpm durante 10 minutos. Las muestras de plasma con citrato pueden conservarse a temperatura ambiente durante 2 horas o a una temperatura entre 2...8°C durante 18 horas. Un ciclo único de congelación/descongelación no afecta a la respuesta de la determinación. Para las directrices de recogida de muestras específicas, véase NCCLS H21-A2.

VII. PROCEDIMIENTO**A. Materiales suministrados**

- 1 Látex Helena D-dimer
- 2 soluciones salinas
- 1 plasma de control positivo
- 1 plasma de control negativo
- 50 palillos para mezclar
- 16 tarjetas de ensayo para 6 muestras cada una

B. Materiales necesarios pero no suministrados

Pipetas para 20, 100 y 1000 μ l

Puntas de pipeta

Tubos de ensayo de 3 ml

Temporizador

C. Método cualitativo

1. Aplicar en círculos 20 μ l de los plasmas de muestra, de control positivo y de control negativo sobre una tarjeta de ensayo.
2. Aplicar 20 μ l de la suspensión de látex en las proximidades de cada círculo.
3. Mezclar rápidamente la muestra y el látex utilizando un palillo de mezclar limpio para cada muestra. Poner en marcha el temporizador.
4. Balancear suavemente la tarjeta de ensayo y leer la aglutinación al cabo de 180 - 200 segundos. La aglutinación positiva (+) o negativa (-) se compara con los resultados obtenidos con los controles. El uso del control positivo es puramente cualitativo y no debe diluirse más. Un látex no aglutinado significa que la muestra es normal, por lo que no es necesario realizar más ensayos.

D. Método semicuantitativo para realizar únicamente en muestras que han dado positivo.

1. Realizar diluciones seriadas de 100 μ l de la muestra a 1:2, 1:4 y 1:8 con 100 μ l de solución salina utilizando tubos de ensayo pequeños.
2. Marcar las posiciones de las diluciones de la muestra en la tarjeta de ensayo y mezclar con suspensión de látex de acuerdo con el punto VII. C. La concentración de dímero D puede determinarse con la tabla de la sección IX. 'VALORES ESPERADOS'.

VIII. CONTROL DE CALIDAD

Para el control de calidad de cada kit se utilizarán los controles positivo y negativo suministrados. Se recomienda valorar tanto el control positivo como el negativo cada vez que se utiliza el kit. Si el control positivo o el negativo no proporciona una respuesta adecuada, deberán descartarse los resultados del paciente obtenidos en esa ocasión y el kit deberá ser eliminado o devuelto a Helena.

IX. VALORES ESPERADOS

La aglutinación se produce a los 180 - 200 segundos en aquellas muestras que contienen más de 250ng/ml de dímero D. Si se analizan plasmas diluidos en serie, pueden obtenerse resultados semicuantitativos.

Nivel de dímero D (ng/ml)

(ng/ml)	Sin diluir	1:2	1:4	1:8
< 250	-	-	-	-
250-500	+	-	-	-
500-1000	+	+	-	-
1000-2000	+	+	+	-
> 2000	+	+	+	+

La aglutinación puede ser más pronunciada y aparece más rápidamente con concentraciones mayores de dímero D. Si desea expresar los resultados en unidades equivalentes de fibrinógeno (FEU) deberá multiplicar por 2 los niveles de dímero D de la tabla anterior, p. ej., <250 ng/ml = <500 FEU. Como se ha debatido en varios informes⁴, algunos ensayos de látex comerciales no presentan la sensibilidad declarada cuando se comparan con el método ELISA comercial.

X. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

La aglutinación se produce al cabo de 180 - 200 segundos en aquellas muestras que contienen más de 250 ng/ml de dímero D. El nivel medio de dímero D en una población sana se encuentra entre 8 y 135ng/ml aprox. y el plasma puro de sujetos normales sanos no debe aglutinarse. El valor negativo predictivo de Helena D-dimer para la trombosis es elevado⁵. La semivida circulatoria del dímero D es de aproximadamente 12 horas. Por ello los niveles elevados de dímero D pueden persistir durante algún tiempo después de cesar el proceso activo.

En estudios clínicos con sujetos normales, pacientes con DVT confirmada flebográficamente, pacientes con DIC y pacientes con pre-eclampsia (Pre-EC) se obtuvieron los siguientes resultados:

Helena Resultados de dímero D†

Muestras	η	-	1:1	1:2	1:4	≥1:8
Normal	101	100	1*	-	-	-
DVT	48	3	10*	7*	14*	14*
DIC	29	0	3	3	4	19
Pre-EC	6	2	1	3	-	-

† Los símbolos η y - indican el número de pacientes y un resultado negativo con Helena D-dimer, respectivamente. Los títulos indican la máxima dilución a la cual la muestra presenta aglutinación.

* La aglutinación se vio inhibida por la adición del anticuerpo MA-8D3 específico del dímero D (0,2mg/ml) pero no por la de un anticuerpo PAM-I no relacionado.

XI. CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

A. Especificidad

El anticuerpo monoclonal utilizado en este ensayo, MA-8D3, es específico para el dímero D en virtud del método de criba utilizado para la selección de hibridomas. Se seleccionó un hibridoma que secreta anticuerpos que reaccionan positivamente con el dímero D purificado pero no así con el fibrinógeno completo o con el fragmento D del fibrinógeno. No se observó reactividad cruzada con el fibrinógeno o con el des-AA-fibrinógeno cuando en este ensayo se sustituyeron los analitos por plasma. Al analizar con el ensayo Helena D-dimer plasma de 16 pacientes con artritis reumatoide, 14 de ellos no presentaron aglutinación. Los dos casos de aglutinación pudieron ser inhibidos al añadir anticuerpo monoclonal MA-8D3 específico del dímero D pero no así al añadir el monoclonal IgG1k (PAM-I) del mismo subgrupo. Esto sugiere que el Helena D-dimer es insensible a los trastornos del factor reumatoide.

B. Reproducibilidad

Para valorar la reproducibilidad del ensayo se seleccionaron tres muestras de plasma. Cada muestra se analizó 10 veces en cada uno de los 3 días. Cada vez que se obtuvo un resultado positivo se tituló la muestra. Los resultados de dímero D (ng/ml) obtenidos son los siguientes:

Muestra	Nivel de dímero D	Resultado
Normal	<250 ng/ml	negativo
Intermedio	3000 ng/ml	título 1:8
Alto	> 16,000 ng/ml	título 1:64

C. Exactitud

El kit Helena D-dímer se comparó con otro látex de dímero D disponible en el mercado. Ambos productos dieron una reacción negativa cuando se utilizaron en 25 muestras normales. Cuando se analizaron con ELISA y Helena D-dímer 30 muestras de plasma de pacientes, todas las muestras con valores ELISA superiores a 225 ng/ml presentaron aglutinación con Helena D-dímer.

XII. LIMITACIONES DEL ENSAYO

1. Un resultado de dímero D negativo no excluye totalmente una trombosis. Con el kit Helena D-dímer el valor predictivo negativo para pacientes con sospecha de DVT obtenido ha sido del 94%. Para establecer un diagnóstico deberá tenerse en cuenta la detección de niveles elevados de dímero D junto con el resto de la información clínica.
2. A veces puede producirse una aglutinación en muestras que contienen niveles de dímero D normales causada por una inespecificidad.
3. Algunas muestras cuando son mezcladas con látex pueden presentar copos blancos que no deben confundirse con una aglutinación.

XIII. NOTAS

1. Los resultados pueden expresarse en unidades de dímero D o en unidades equivalentes de fibrinógeno (FEU). 1 ng/ml de dímero D equivale a aprox. 2 ng/ml de FEU.
2. La aglutinación puede ser más pronunciada y aparece más rápidamente con concentraciones mayores de dímero D.
3. Tras la apertura de los viales de control puede desecharse el tapón de caucho.

XIV. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Elms, M.J. et al.: Rapid detection of cross-linked fibrin degradation products in plasma using monoclonal antibody-coated latex particles. *J. Clin. Path.* 85, 360-364, 1986.
2. Ballegeer, V. et al.: Fibrinolytic response to venous occlusion and fibrin fragment D-dímer levels in normal and complicated pregnancy. *Thromb. Haemostas.* 58, 1030-1032, 1987.
3. Declerck, P.V. et al.: Fibrinolytic response and fibrin fragment D dímer in patients with deep vein thrombosis. *Thromb. Haemostas.* 58, 1025-1029, 1987.
4. Bounameaux, H. et al.: Measurement of plasma D-dímer for diagnosis of deep venous thrombosis. *Am. J Clin. Path.* 91, 82-85, 1989.
5. Hansson P.O. et al.: Can laboratory testing improve screening strategies for deep vein thrombosis at an emergency unit? *J. Intern. Med.* 235, 143-151, 1994.
6. Holvet P et al.: Binding properties of monoclonal antibodies against human fragment D-dímer of cross-linked fibrin to human plasma clots in an in vivo model in rabbits. *Thrombosis and Haemostasis* 61(2), 307-313, 1989.

Helena Biosciences Europe
Queensway South
Team Valley Trading Estate
Gateshead
Tyne and Wear
NE11 0SD

Tel: +44 (0) 191 482 8440
Fax: +44 (0) 191 482 8442
Email: info@helena-biosciences.com
www.helena-biosciences.com

HL-2-0554P 2009/01 (9)