proLékaře.cz | 9.9.2025

Interference složek krevní plazmy při turbidimetrickém stanovení D-dimeru

Mareček F., Zemanová M., Mejtská J., Češpivová D., Malíková I., Hrachovinová I.
Ústav hematologie a krevní transfuze v Praze, Laboratoř pro poruchy hemostázy
Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky a 1. LF UK Praha, Centrální hematologická laboratoř

Transfuze Hematol. dnes, 21, 2015, No. 1, p. 30–34

SOUHRN

Práce ověřuje odolnost imunochemických souprav pro stanovení D-dimeru k působení interferujících složek lidské plazmy. Testované turbidimetrické soupravy Diagnostica Stago STA LIATEST DDi a její nová verze STA LIATEST DDi Plus byly použity pro stanovení koncentrace D-dimeru ve vzorcích s potvrzenou přítomností interferujících složek. Jako referenční metoda sloužila imunoanalýza na pevné fázi s promývacím krokem a fluorimetrickou detekcí VIDAS® D-Dimer ExclusionTM. Ve skupině 12 vzorků s interferujícími složkami testovaných soupravou STA LIATEST DDi se falešná pozitivita vyskytla 12krát, v paralelní skupině testované soupravou STA LIATEST DDi Plus se falešná pozitivita vyskytla 4krát. Byla stanovena korelace obou turbidimetrických LIA metod. V intervalu koncentrací D-dimeru 70–12 000 μg/l – FEU bylo dosaženo korelačního koeficientu R^2 = 0,9944. Pomocí kontrolních vzorků byla stanovena preciznost měření soupravy STA LIATEST DDi Plus v sérii i v čase. V sérii bylo dosaženo variačního koeficientu na normální hladině 7,38 % a na patologické hladině 1,61 %. Při testováním mezi sériemi bylo dosaženo variačního koeficientu na normální hladině 7,78 % a na patologické hladině 2,16 %. Soupravu je možno použít pro detekci D-dimeru až do 20 000 μg/l – FEU. STA LIATEST DDi Plus má prokazatelně vyšší odolnost proti vlivu interferujících složek než stávající souprava STA LIATEST DDi.

KLÍČOVÉ SLOVA

D-dimer, trombóza, matricový efekt, revmatoidní faktory, imunochemická diagnostika

SUMMARY

Mareček F., Zemanová M., Mejtská J., Češpivová D., Malíková I., Hrachovinová I.
Interference of blood plasma components in turbidimetric D-dimer estimation

Two immunoturbidimetric D-dimer assays were tested in terms of their resistance to plasma interferents. The Diagnostica Stago products STA LIATEST DDi and its new version STA LIATEST D-Di Plus were used to detect D-dimer concentrations in samples with confirmed presence of interferents. A solid phase immunoassay with fluorimetric detection VIDAS® D-Dimer ExclusionTM was used as the reference method. In the group of 12 samples containing interferents false positivity was detected in all 12 cases during testing with the STA LIATEST DDi kit. Results using the STA LIATEST DDi Plus kit were falsely positive in 4 cases. A correlation study on plasma samples with a range of 70–12000 μg/l – FEU was carried out. The coefficient of correlation between both assays was R^2 = 0.9944. Precision studies of STA LIATEST DDi Plus were performed with the control samples on normal and pathological level. Intra-assay precision (expressed as coefficient of variation) was 7.38% on normal and 1.61% on pathological D-dimer levels. Inter-assay coefficient of variation values were 7.78% on the normal and 2.16% on the pathological D-dimer levels. The working range of the D-dimer concentration of STA LIATEST DDi Plus is up to 20000 μg/l–FEU. An increased resistance of the STA LIATEST DDi Plus to interferents was demonstrated.

KEYWORDS

D-dimer, thrombosis, matrix effect, rheumatoid factor, immunochemical diagnostics

proLékaře.cz | 9.9.2025

ÚVOD

D-dimer (DDim) vzniká plazminolýzou stabilizovaného fibrinu. Přítomnost DDim v plazmě dokazuje probíhající fibrinolýzu, které předcházel vznik stabilizovaného fibrinu. Vysoká koncentrace DDim doprovází hyperkoagulační stavy. Nízká koncentrace DDim je diferenciálně diagnostickým znakem pro vyloučení hluboké žilní trombózy nebo plicní embolie. Znalost koncentrace DDim je důležitá i pro předcházení vzniku diseminované intravaskulární koagulopatie (DIC) a pro monitorování antikoagulační léčby. DDim je stanovován různými imunochemickými technikami. Mezinárodní standard DDim neexistuje. Výsledky jeho stanovení se nejčastěji vyjadřují koncentrací FEU (Fibrinogen Equivalent Units). FEU je definována jako dvojnásobek stanovené koncentrace DDim, protože jedna molekula DDim odpovídá dvěma molekulám fibrinogenu, ze kterých vznikla. Jako cut-off hodnota pro vyloučení diagnózy hluboké žilní trombózy a plicní embolie se uvádí koncentrace 500 µg/l – FEU.

Významným zdrojem analytických chyb imunochemických metod je výskyt interferujících složek („interferentů“) ve vzorku, tzv. matricový efekt [1–4]. Matricový efekt má charakter interakce složky plazmy nebo séra konkrétního pacienta s určitou složkou diagnostické soupravy. Jiné vzorky zpracuje daná diagnostická souprava zcela bezchybně. Při použití jiné diagnostické soupravy se u daného vzorku efekt interference nemusí projevit. Nebezpečí interference spočívá v možnosti zcela mylné informace o hladině analytu ve vzorku. Důležité interferenty jsou lidské imunoglobuliny (Ig) s nízkou vazebnou afinitou (tzv. heterofilní protilátky), které vznikají během imunitní odpovědi a reagují s Fc fragmenty širokého spektra přítomných Ig. Vyskytují se ve všech třídách, ale nejčastěji jako IgM a tvoří podstatnou část revmatoidních faktorů. Další kategorií interferentů jsou endogenní protilátky proti diagnostickým proteinům (human anti-mouse antibodies – HAMA). Koncentrace interferujících složek se může v čase měnit. Samostatným problémem imunochemických metod je výskyt efektu z nadbytku antigenu (high dose hook effect). Na přítomnost interferentů jsou citlivé zejména metody homogenní imunoanalýzy, např. latexová aglutinace s turbidimetrickou detekcí (Latex Immnuno Assay – LIA). Pro odhalení interference je vhodná analýza ředěného vzorku, nebo konfirmační test v jiném imunochemickém systému – nejlépe s protilátkou kotvenou na pevnou fázi a s promývacím krokem, tj. heterogenní imunoanalýza. Firma Diagnostica Stago dlouhodobě dodává LIA soupravu pro turbidimetrické stanovení DDim (STA LIATEST DDi katalogové číslo 00515, dále jen LIA515). Podle údajů výrobce má tato souprava jen omezenou odolnost k některým interferentům [5]. Stejná firma uvedla v roce 2014 na český trh novou LIA soupravu pro turbidimetrické stanovení DDim (STA LIATEST DDi Plus katalogové číslo 00662, dále jen LIA662), se zvýšenou mírou odolnosti k interferentům [6].

Cílem práce bylo zjistit skutečnou odolnost k působení interferentů u nové soupravy LIA662 ve srovnání s dosud užívanou LIA515. Dále byl stanoven stupeň korelace výsledků při užití obou souprav a byly stanoveny základní chemometrické parametry nové soupravy.

Biologické vzorky s interferenty

Soubor vhodný pro účely testování vlivu interferujících složek plazmy na turbidimetrickou LIA diagnostiku tvořilo 12 pacientů (5 mužů a 7 žen) ve věku od 23 do 77 let. Společným znakem této skupiny bylo anomální chování jejich plazmy v průběhu předchozích imunochemických testů. Při použití soupravy LIA515 byla stanovena velmi vysoká hladina DDim (v některých případech až nad 20 000 µg/l – FEU), ale v referenčním imunochemickém testu (popis viz Metody a materiál) byla hladina DDim normální nebo jen částečně zvýšená. Laboratorní nález získaný pomocí LIA515 (výrazné zvýšení DDim) byl v rozporu s klinickým stavem pacientů, který nesvědčil pro výraznou hyperfibrinolýzu. Protichůdné výsledky lze vysvětlit přítomností interferujících složek v testovaných vzorcích, které specificky ovlivňují soupravu LIA515.

Biologické vzorky bez interferentů

Pro účely stanovení míry korelace výsledků obou turbidimetrických souprav bylo testováno 29 náhodně vybraných vzorků plazmy s koncentrací DDim 70 až 12 000 µg/l – FEU.

Zpracování biologických vzorků

Biologické vzorky byly získány s informovaným souhlasem pacienta. K odběru periferní krve byl použit uzavřený odběrový systém Sarstedt Monovette s 0,109 M citrátem sodným (Sarstedt, Nürmbrecht, Německo). Plná krev byla bezprostředně po odběru odstředěna (2 100 g/30 minut). Plazma byla rozdělena na alikvotní vzorky po 400 µl. Tyto alikvotní vzorky byly před testováním skladovány při teplotě nižší než -70 °C.

METODY A MATERIÁL

Testované soupravy LIA662 a LIA515 byly zpracovány na koagulačním analyzátoru Diagnostica Stago STA-R s možností turbidimertické detekce. Analytické parametry obou LIA souprav stanovené výrobcem shrnuje tabulka 1. Ve většině parametrů se obě soupravy shodují. Deklarována je však výrazně vyšší odolnost LIA662 proti revmatoidnímu faktoru a HAMA. Odolnost k protilátkám

proLékaře.cz | 9.9.2025

Tab. 1 Parametry LIA souprav pro turbidimetrické stanovení D–dimeru (DDim) STA LIATEST DDi (LIA 515) a STA LIATEST DDi Plus (LIA 662) deklarované výrobcem [5, 6]

Název Stago Název v textu	STA LIATEST DDi (LIA515)	STA LIATEST DDi Plus (LIA662)
Katalogové číslo	00515	00662
Mez detekce	270 μg/l – FEU	270 μg/l – FEU
Pracovní rozsah	270–4 000 μg/l – FEU, s automatickým ředěním 270–20 000 μg/ml – FEU	270–4 000 μg/l – FEU, s automatickým ředěním 270–20 000 μg/ml – FEU
„hook effect“	nevyskytoval se ani při hladině DDim 50 0000 μg/l – FEU	nevyskytoval se ani při hladině DDim 50 0000 μg/l – FEU
Míra korelace	R^2 = 0,998 (kat. č. 00662 a kat. č. 00515)	
CV (%) Normální vzorek v sérii	7,3	7,2
CV (%) Patologický vzorek v sérii	3,9	3,3
CV (%) Normální vzorek mezi sériemi	6,3	6,5
CV (%) Patologický vzorek mezi sériemi	2,1	2,4
Odolnost k revmatoidnímu faktoru	Přítomnost revmatoidního faktoru > 50 IU / ml může způsobit nadhodnocení hladiny DDim.	Přítomnost revmatoidního faktoru > 1000 IU/ml může způsobit nadhodnocení hladiny DDim.
Odolnost k anti-BSA a HAMA	Test není odolný proti anti-BSA Ig ani proti HAMA.	Test není odolný proti anti-BSA Ig, je odolný proti HAMA.
Odolnost k dalším interferentům	Odolnosti proti interferencím vlivem přítomnosti hemoglobinu, lipidů, bilirubinu, heparinu a LMWH jsou u obou souprav identické: odolnost proti hemoglobinu do 2 g/l; Odolnost proti konjugovanému bilirubinu do 290 mg/l; proti nekonjugovanému bilirubinu do 200 mg/l; proti nefrakcionovanému heparinu do 2 IU/ml; proti nízkomolekulárnímu heparinu do 2 IU anti-Xa/ml.	

proti hovězímu sérovému albuminu (BSA) deklarována není [5, 6]. Výrobcem obou LIA souprav i koagulačního analyzátoru je Diagnostica Stago, Francie. Pro účely stanovení analytických parametrů soupravy LIA662 byly použity kontrolní plazmy na normální (N) a patologické (P) hladině (Diagnostica Stago STA Liatest Control N + P, kat. č. 00526), výrobce Diagnostica Stago, Francie.

Výsledky obou LIA metod byly srovnávány s výsledky referenční metody pracující v systému Enzyme-Linked Fluorescence Immuno Assay (dále jen ELFIA). ELFIA je sendvičová imunoanalýza s protilátkou kotvenou na pevné fázi a obsahuje promývací krok. Vzhledem k heterogennímu uspořádání má ELFIA vyšší odolnost k vlivům interferentů než LIA. Použitá ELFIA souprava BioMérieux VIDAS® D-Dimer Exclusion II™ (kat. č. 30 455) byla zpracována na analyzátoru s fluorimetrickou detekcí MiniVIDAS. Kontrolní i kalibrační materiál byl součástí soupravy. Výrobce ELFIA soupravy i analyzátoru MiniVIDAS je firma BioMérieux, Francie.

Koncentrace DDim stanovené oběma LIA soupravami i referenční ELFIA metodou jsou vyjádřeny jako μg/l – FEU. Jako cut-off hodnotu jsme v této práci použili koncentraci 600 μg/l – FEU.

Korelační závislost byla vypočtena a graf vytvořen s použitím software Microsoft Excell, variační koeficienty a průměry se směrodatnou odchylkou byly spočteny s použitím běžného ručního kalkulátoru se statistickými funkcemi.

VÝSLEDKY

Odolnost vůči matricovému efektu

Ve vzorcích plazmy s obsahem interferujících složek byla stanovena koncentrace DDim. Výsledky dosažené soupravami LIA515 a LIA662 byly porovnávány s výsledky referenční metody ELFIA. Vzhledem k neexistenci mezinárodního standardu DDim jsou diagnostické soupravy kalibrovány pomocí interního standardu příslušného výrobce. Nelze proto srovnávat stanovené koncentrace DDim absolutně. Lze však srovnávat shodu výsledku vyjádřeného jako pozitivní/negativní nález při užití kritéria cut-off. Pomocí grafu (obr. 1. a obr. 2.) lze rozlišit tři skupiny výsledků:

I. skupina (vzorky 1–8) – shoda výsledků LIA662 s referenční ELFIA, výsledky LIA515 jsou falešně pozitivní.

II. skupina (vzorky 9–10) – výsledky LIA662 i LIA515 jsou ve srovnání s referenční ELFIA falešně pozitivní, nicméně výsledek LIA662 je výrazně méně ovlivněn, než výsledek LIA 515.

III. skupina (vzorky 11–12) – v této skupině došlo k falešně pozitivním výsledkům při použití LIA515 i LIA662. Míra vychýlení je přibližně stejná.

proLékaře.cz | 9.9.2025

Korelace výsledků stanovených pomocí soupravy LIA515 a LIA662

Bylo provedeno paralelní stanovení koncentrace DDim u 29 pacientských vzorků soupravami LIA515 a LIA662. Stanovené koncentrace DDim ležely v intervalu 70 až 12 000 µg/l – FEU. Byla vypočtena korelace výsledků pro celý soubor stanovených koncentrací. V souboru hodnot od 70 do 12 000 µg/l – FEU byla lineární závislost popsána rovnicí y = 0,9838x + 11,375. Korelační koeficient R^2 = 0,9944 (obr. 3). Pokud byly k výpočtu korelačního koeficientu použity pouze hodnoty ležící v oblasti nad 600 µg/l – FEU (17 vzorků) byla korelace ještě těsnější (R^2 = 0,9952).

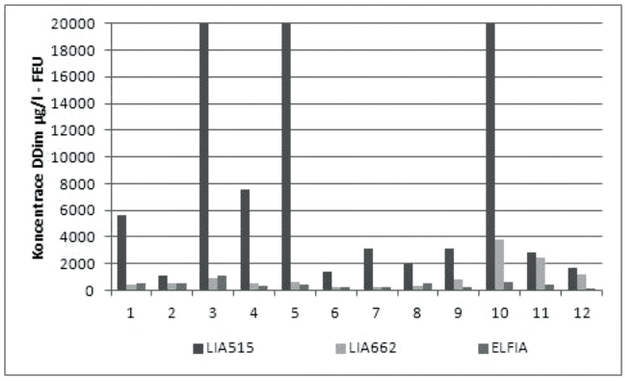
Analytické parametry soupravy LIA662

Pomocí soupravy LIA662 byla opakovaně stanovena koncentrace DDim v kontrolní plazmě na N a P hladině. Všechny změřené hodnoty (včetně intervalu nejistoty měření) ležely ve výrobcem deklarovaných mezích. Analytická kvalita soupravy LIA662 byla testována stanovením variačního koeficientu (VK) metody v sérii a mezi sériemi (tab. 2, tab. 3).

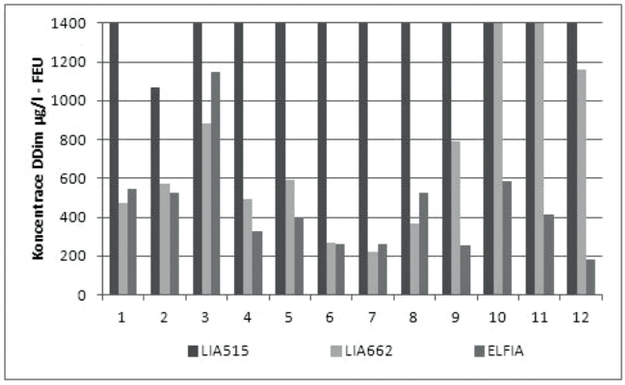
DISKUSE

LIA s turbidimetrickou detekcí je analytická metoda vhodná pro rutinní analyzátory. Relativní jednoduchost metody je vykoupena nevýhodami homogenní imunochemické analýzy. Riziko přítomnosti interferentu je stálé a bylo důvodem k otestování skutečné robustnosti zaváděné soupravy LIA662. Při testu 12 vzorků s obsahem interferující složky dosud užívanou soupravou LIA515 bylo (ve srovnání s referenční metodou ELFIA) všech 12 výsledků falešně pozitivních. Při testu soupravou LIA662 byly falešně pozitivní jen 4 výsledky, zbytek byl stanoven ve shodě s referenční metodou. Z toho ve dvou případech bylo vychýlení výsledku soupravy LIA662 výrazně nižší (4–5krát), než vychýlení výsledku soupravy LIA515. Ve zbývajících dvou případech bylo vychýlení výsledku u obou LIA souprav srovnatelné. Důvodem přetrvávajícího falešného nadhodnocení koncentrace DDim soupravou LIA662 u části vzorků je zřejmě přítomnost interferentu, který není eliminován složkami reakčního pufru (např. protilátky k BSA).

Výrobce deklaruje velmi těsnou korelaci diagnostických souprav LIA515 a LIA662. Z provedené korelační studie plyne, že v celém koncentračním rozsahu testovaných vzorků (70–12000 µg/l – FEU) bylo dosaženo korelačního koeficientu R^2 = 0,9944. V oblasti patologických koncentrací DDim (500–12 000 µg/l – FEU) je dosažený korelační koeficient R^2 = 0,9952. Korelace obou metod je proto velmi dobrá. Nahrazení soupravy LIA515 novou, robustnější, LIA662 by nemělo vyvolat skokovou změnu a umožňuje zachování kontinuity vydávaných výsledků.



Obr. 1 Matricový efekt plazmy při turbidimetrickém stanovení D-dimeru (DDim) soupravou STA LIATEST DDi (LIA 515) a soupravou STA LIATEST DDi Plus (LIA 662)
Referenční metoda ELFIA VIDAS® D-Dimer Exclusion™ (ELFIA). Výsledky zobrazeny až do maxima pracovního rozsahu obou souprav (20000 µg/ml – FEU). Vzorky 1–8 falešná pozitivita výsledků STA LIATEST DDi (LIA 515), vzorky 9–12 falešná pozitivita výsledků STA LIATEST DDi (LIA 515) i STA LIATEST DDi Plus (LIA 662).



Obr. 2 Matricový efekt plazmy při turbidimetrickém stanovení D-dimeru (DDim) soupravou STA LIATEST DDi (LIA 515) a soupravou STA LIATEST DDi Plus (LIA 662)
Detail výsledků z obrázku 1 v oblasti rozlišovací meze (600 µg/l – FEU). Referenční metoda ELFIA VIDAS® D-Dimer Exclusion™ (ELFIA). Vzorky 1–8 falešná pozitivita výsledku STA LIATEST DDi (LIA 515), vzorky 9–12 falešná pozitivita výsledků STA LIATEST DDi (LIA 515) i STA LIATEST DDi Plus (LIA 662).

Chemometrické parametry soupravy LIA662 odpovídají údajům deklarovaným v příbalovém letáku. Výrobek je možno použít pro detekci DDim až do 20 000 µg/l – FEU. Byly stanoveny velmi dobré hodnoty VK v oblasti patologických hodnot, hodnoty VK v oblasti normálu jsou vyšší. Fyziologická koncentrace DDim v plazmě je podstatně nižší, než jeho koncentrace při výrazných patologiích. Tomu odpovídá i vyšší VK v oblasti nízkých, tj. fyziologických hladin DDim [7].

proLékaře.cz | 9.9.2025

Tab. 2 Preciznost měření koncentrace D-dimeru (DDim) v sérii – opakovatelnost

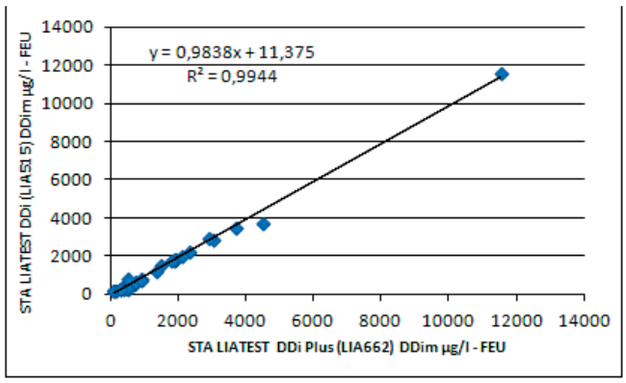
Normální hodnoty		Patologické hodnoty	
Koncentrace DDim	Variační koeficient	Koncentrace DDim	Variační koeficient
průměr ± SD (μg/l)	VK (%)	průměr ± SD (μg/l)	VK (%)
234 ± 27	11,9	2102,5 ± 33	1,6

Souprava STA LIATEST DDi Plus (LIA 662). Kontrolní materiál: Diagnostica Stago STA System Control N+P, šarže 110832. Deklarovaný interval N: 100–500 μg/l – FEU, deklarovaný interval P: 1800–2 700 μg/l – FEU. Měřeno v sérii, 20krát na hladině N a 20krát na hladině P.

Tab. 3 Preciznost měření koncentrace D–dimeru (DDim) v čase – mezilehlá preciznost

Normální hodnoty		Patologické hodnoty	
Koncentrace DDim	Variační koeficient	Koncentrace DDim	Variační koeficient
průměr ± SD (μg/l)	VK (%)	průměr ± SD (μg/l)	VK (%)
230 ± 18	7,8	2 125 ± 46	2,2

Souprava STA LIATEST DDi Plus (LIA 662). Kontrolní materiál: Diagnostica Stago STA Liatest Control N+P, šarže 110832. Deklarovaný interval N: 100–500 μg/l – FEU, deklarovaný interval P: 1 800–2 700 μg/l – FEU. Měřeno 4krát mezi sériemi, celkový počet měření 51krát na hladině N a 51krát na hladině P.



Obr. 3 Korelace výsledků LIA souprav pro turbidimetrické stanovení D-dimeru (DDim) STA LIATEST DDi (LIA 515) a STA LIATEST DDi Plus (LIA 662) v intervalu koncentrace DDim 70–12 000 μg/l – FEU

ZÁVĚR

Provedená analýza skupiny archivovaných vzorků s interferentem potvrzuje možnost vzniku falešně pozitivního výsledku při použití soupravy LIA515. Získaná data naopak potvrzují, že souprava LIA662 má vyšší odolnost proti revmatoidním faktorům (tato odolnost ale není absolutní). Použití nové soupravy snižuje možnost výskytu falešné pozitivity, tj. snižuje se pravděpodobnost výskytu analytické chyby. Přínos odolnější soupravy pro kvalitu stanovení DDim je zřejmý.

LITERATURA

1. Selby C. Interference in immunoassay. Ann Clin Bioch 1999; 36: 704–721.
2. Wadhwa M, Bird C, Dilger P, Gaines-Das R, Thorpe R. Strategies, measurement and characterization of unwanted antibodies induced by therapeutic biologicals. J Immunol Meth 2003; 278: 1–17.
3. Šmídl P. Návaznost kalibrace imunochemických měření. In Vitro Diagnostika 2008; 8: 14–15.
4. Šmídl, P. Korelace mezi komerčně dostupnými imunochemickými metodami. In Vitro Diagnostika 2008; 9: 21–22.
5. Příbalový leták diagnostické soupravy Diagnostica Stago STA LIATEST D-Di (kat. č. 00515), verze srpen 2012.
6. Příbalový leták diagnostické soupravy Diagnostica Stago STA LIATEST D-DiPlus (kat. č. 00662), verze srpen 2012.
7. Šmídl P. Nejistoty imunochemických stanovení. Klin Bioch Metabol 2008; 16(1): 46–47.

Podíl autorů při přípravě rukopisu

F. M. – *teoretická část, statistika, sepsání textu;* I. H. – *teoretická část, výběr vzorků, supervize nad pokusy;* I. M. – *spolupráce při výběru vzorků;* M. Z. + J. M. – *analýzy na referenčním analyzátoru;* D. Č. – *turbidimetrické analýzy.*

Prohlášení autorů

Autor práce prohlašuje, že v souvislosti s tématem, vznikem a publikací tohoto článku není ve střetu zájmů a vznik ani publikace článku nebyly podpořeny žádnou farmaceutickou firmou. Toto prohlášení se týká i všech spoluautorů.

Doručeno do redakce: 18. 11. 2014
Přijato po recenzi: 28. 1. 2015

Ing. František Mareček, Dr.
Laboratoř pro poruchy hemostázy
Ústav hematologie a krevní transfuze v Praze,
U Nemocnice 2094/1, 128 20 Praha 2
e-mail: Frantisek.Marecek@uhkt.cz

Inzerce A15I004100 ▶