

تأثیر متغیرهای پیش از آنالیز-آنالیز و پس از آنالیز در اندازه گیری دی دایمر

● دکتر شهروز همتی

دکترای علوم آزمایشگاهی، رییس انجمن دکترای علوم
آزمایشگاهی تشخیص طبی ایران، موسس و مسئول
فنی آزمایشگاه تشخیص طبی

drhemmatilab@yahoo.com



● دکتر مهناز آل یاسین

دکترای علوم آزمایشگاهی، موسس و
مسئول فنی آزمایشگاه تشخیص طبی

parsianmedlab@yahoo.com



چکیده

دی دایمر محصول تجزیه فیبرین محلول است که از تخریب فیبرین با واسطه پلاسمین به دست می آید. از این رو دی دایمر را می توان به عنوان نشانگر زیستی (بیومارکر) فعال سازی انعقاد و فیبرینولیز در نظر گرفت و به طور معمول برای رد ترومبوآمبولی (VTE) وریدی استفاده می شود. دی دایمر به طور فزاینده ای برای ارزیابی خطر عود و کمک به تعیین مدت زمان مطلوب درمان ضد انعقاد در بیماران مبتلا به ترومبوآمبولی وریدی، برای تشخیص ترومبوآمبولی وریدی، انعقاد داخل عروقی منتشر و برای غربالگری بیماران پزشکی در معرض خطر ترومبوآمبولی وریدی استفاده می شود. هدف این بررسی (۱) بازنگری در تعریف دی دایمر (۲) بحث در مورد متغیرهای پیش از آنالیز مؤثر بر اندازه گیری دی دایمر (۳) بررسی و مقایسه عملکرد سنجش و برخی از متغیرهای پس از آنالیز (مانند واحدهای مختلف و کات آف های تنظیم شده با سن) و (۴) بحث در مورد استفاده از اندازه گیری دی دایمر در سایر بیماری ها است.

کلمات کلیدی: دی دایمر، ترومبوآمبولی وریدی، متغیرهای پیش از آنالیز، آنالیز، پس از آنالیز، واحد دی دایمر، واحد معادل فیبرینوژن، استاندارد سازی، هماهنگ سازی

مقدمه

دی دایمر چیست؟

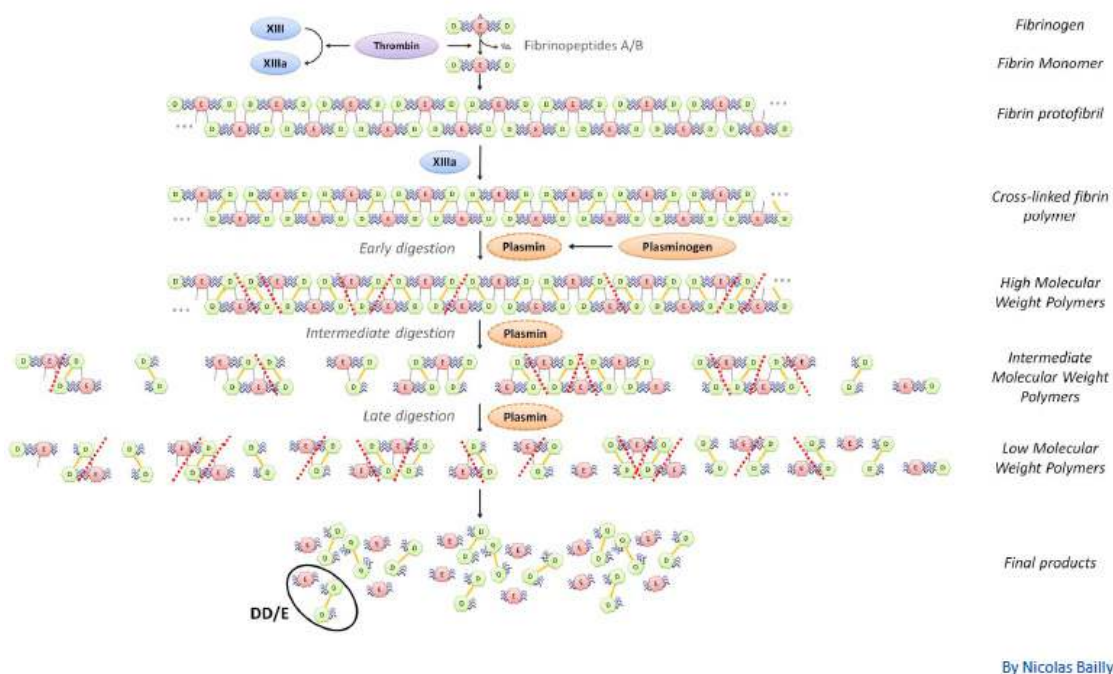
دی دایمر (D-dimer) یک اصطلاح عمومی است که به

قطعات پپتیدی متعدد ناشی از تخریب فیبرین با اتصالات عرضی به واسطه پلاسمین اشاره دارد. حضور دی دایمر در خون نشان دهنده فعال شدن همزمان سیستم انعقادی و فیبرینولیز است.

اولین مرحله در تشکیل دی دایمر، تبدیل فیبرینوژن به مونومرهای فیبرین توسط ترومبین است (شکل ۱). فیبرینوژن انسانی گلیکوپروتئین محلول در پلاسما است که از سه جفت مختلف زنجیره پلی پپتیدی تشکیل شده است $(A\alpha_2, B\beta_2, \gamma_2)$ ، که دو حوزه D خارجی را به حوزه E مرکزی متصل می کند. ترومبین به صورت آنزیمی دو محل پلیمریزاسیون واقع در حوزه E را شکافته و منجر به تولید مونومرهای فیبرین بسیار چسبنده و فیبرینوپپتیدهای A و B می شود. سپس مونومرهای فیبرین به یکدیگر متصل می شوند و شبکه ای محلول را تشکیل می دهند. همزمان، مجموعه بین پلیمرهای محلول فیبرین، ترومبین و فاکتور XIII پلاسما باعث شکل گیری فاکتور XIIIa می شود که اتصال متقابل کووالانسی پلیمر فیبرین را از طریق پیوندهای بین مولکولی تشکیل شده، بین باقی مانده های لیزین و گلوتامین کاتالیز می کند، بنابراین منجر به تولید لخته های نامحلول و پایدار می گردند. سپس، مسیر فیبرینولیتیک شروع به تخریب لخته های تثبیت شده از طریق فعال سازی پلاسمین می کند. پلاسمین از طریق تأثیر فعال کننده پلاسمینوژن بافتی (t-PA) بر روی پلاسمینوژن در سطح فیبرین فعال شده و فیبرین را در مکان های مشخص برش می زند. نتیجه این

پلاسمین، نمونه‌های پلازما حاوی مخلوطی از کمپلکس‌های فیبرین حاوی یک یا چند شکل دی دایمر بوده و وزن مولکولی آن‌ها از ۲۲۸ کیلو دالتون (DD/E) تا چند هزار کیلو دالتون (اولیگومرهای X) متغیر است. این FDP ها می‌توانند هم از لخته فیبرین نامحلول و هم از پلیمرهای محلول فیبرین حاصل شوند.

واکنش محصولات تخریب فیبرین هستند که به طور متداول (FDP) تعریف می‌شوند و مجموعه‌ای گسترده از وزن‌های مولکولی را دارا هستند. در اولین مراحل فیبرینولیز، FDP ها بزرگ هستند. تجزیه مداوم قطعه D-dimer/E کمپلکس (DD/E) را ایجاد می‌کند که دارای دو دامنه D با اتصالات کووالانسی است. به دلیل درجات متغیر پروتئولیز با واسطه



By Nicolas Bailly

شکل ۱- مکانیسم تولید دی دایمر

ایمنی فعلی تشخیص داده شود، لزوماً کمپلکس DD/E نیست. در حقیقت، اصطلاح دی دایمر شامل مخلوط گسترده‌ای از محصولات تخریب فیبرین متقاطع با وزن‌های مولکولی متفاوت است که وزن آن‌ها احتمالاً از ۱۹۰ تا بیش از ۱۰,۰۰۰ کیلو دالتون متغیر است. قطعات D-dimer عمدتاً توسط کلیرانس کلیه و کاتابولیسم سیستم رتیکولاندوتلیال از بین می‌روند. نیمه عمر پلاسمایی دی دایمر ۸ ساعت است. در شرایط طبیعی فیزیولوژیک، حدود ۳-۲٪ فیبرینوژن به فیبرین تبدیل می‌شود، که بلافاصله وارد مسیر فیبرینولیتیک می‌گردند. بنابراین، دی دایمر در افراد سالم در مقادیر کم

تجزیه فیبرینوژن و فیبرین توسط پلاسمین توسط تعدیل کننده‌های آنزیمی متعدد (مهار کننده فیبرینولیز فعال شونده توسط ترومبین، آلفا-۲-آنتی پلاسمین و آلفا-۲-ماکروگلوبولین)، که عملکرد آن‌ها محدود کردن فیبرینولیز در محل آسیب است، صورت می‌گیرد.

اصطلاح «قطعه D-dimer» در ابتدا برای توصیف محصولات نهایی حاصل از هضم پلاسمین (مقاوم در برابر تجزیه بیشتر پلاسمین) از فاکتور XIIIa-لخته فیبرین متقاطع، که قطعه DD/E است، استفاده شد. با این حال، آنتی‌ژن دی دایمر واقعی که می‌تواند با روش‌های سنجش



نیز قابل اندازه‌گیری است و با افزایش سن مقدار آن افزایش می‌یابد.

فیبرینوژنولیز و فیبرینولیز با هم متفاوت هستند. فیبرینوژنولیز منجر به تولید قطعات X، Y، D، E می‌شود (محصولات تخریب فیبرینوژن)، در حالی که فیبرینولیز منجر به ایجاد قطعات پیچیده‌تری به نام الیگومرهای X می‌شود که در توالی‌های مختلف حاوی قطعات D و E هستند. فقط پلیمرهای فیبرین که تحت پیوند عرضی عامل XIII قرار گرفته‌اند قطعات حاوی پیوندهای کووالانسی بین دو حوزۀ D مجاور (یعنی D-dimer) تولید می‌کنند. بنابراین، دی‌دایمر (قطعه DD/E) به عنوان FDP خاص در نظر گرفته شده و توسط بیشتر معرف‌های آنتی بادی مورد استفاده در ارزیابی آزمایشگاهی ترومبوز شناسایی می‌گردد. در حال حاضر سنجش‌های ایمنی دی‌دایمر مورد استفاده جهت تشخیص یک اپی توپ بر روی محصولات حاصل از تخریب فاکتور XIIIa- فیبرین متقاطع ساخته می‌شوند. آنتی بادی‌های مونوکلونال به کار گرفته شده نباید محصولات تخریب فیبرینوژن (به عنوان مثال X، Y، D، E) را به عنوان FDP غیر متقاطع تشخیص دهند، اما به طور قابل پیش بینی باید بتوانند فقط اپی توپ‌های موجود در فاکتور XIIIa- قطعه متقابل دامنه فیبرین را تشخیص دهند.

مشخص شده که شاخص‌های آنتی ژنیک سنجش‌های دی‌دایمر بخشی از پلی پپتیدهای موجود در حوزۀ D است که از نظر ساختاری فقط پس از تأثیر پلاسمین و فاکتور XIIIa، روی پروتئین تغییر یافته، فعال می‌شوند. نکته قابل توجه این است که، هر آنتی بادی مونوکلونال ویژگی خاص خود را نسبت به FDP دارد.

متغیرهای پیش از آنالیز

بر اساس استاندارد ایزو 15189: 2012 آزمایشگاه‌های پزشکی-الزامات مربوط به کیفیت و صلاحیت، مرحله پیش از آنالیز شامل فرآیندهایی است که به ترتیب زمانی از درخواست پزشک شامل معاینه، آماده سازی و شناسایی بیمار، جمع‌آوری نمونه (های) اولیه و حمل و نقل به داخل آزمایشگاه شروع شده و با شروع مرحله آنالیتیک به پایان می‌رسد.

مرحله پیش از آنالیز در آزمایشگاه‌های هموستاز

بیشتر خطاهایی که در آزمایشگاه هموستاز مشاهده می‌شود

مربوط به فعالیت‌های پیش از آنالیز است. خطاهای پیش از آنالیز فرکانسی در حدود ۷۰-۶۰٪ دارند، فرکانسی که بسیار بیشتر از آن چیزی است که در مرحله آنالیز (به عنوان مثال ۱۵-۱۰٪) و پس از آنالیز (به عنوان مثال ۲۰-۱۵٪) رخ می‌دهد. خطاهای پیش از آنالیز عمدتاً به فعالیت‌های شدید دستی مربوط می‌شوند.

در یک مطالعه ۲ ساله، محققین دریافتند که بیشترین مشکلات مرحله پیش از آنالیز مربوط به نمونه‌های دریافت نشده توسط آزمایشگاه (۴۹/۳ درصد)، همولیز (۱۹/۵ درصد)، لخته شدن (۱۴/۲ درصد) و حجم ناکافی نمونه (۱۳/۷٪) است. همچنین در این مطالعه مشخص شد که مشکلات مرحله پیش از آنالیز را می‌توان در ۵/۵ درصد از تمام نمونه‌های انعقادی شناسایی کرد. در یک مطالعه نشان داده شد که نمونه‌های لخته شده (۳۵٪) و حجم ناکافی نمونه (۱۳٪) از عمده‌ترین دلایل رد نمونه هستند. محققین دریافتند که میزان رد نمونه برای آزمایش‌های انعقادی (۱۳/۳ درصد) از همه آزمایش‌ها بیشتر است (به عنوان مثال ۲/۳ درصد برای آزمایش‌های بیوشیمی، ۸/۹ درصد برای گازهای خون و ۹/۸ درصد برای آنالیز ادرار).

منشأ متغیرهای مرحله پیش از آنالیز که کیفیت نمونه را مختل می‌کند را می‌توان به سه دسته اصلی تقسیم نمود:

- ۱- جمع‌آوری نمونه (به عنوان مثال اندازه سوزن، نوع لوله‌های جمع‌آوری کننده خون)
 - ۲- تحویل نمونه به آزمایشگاه (به عنوان مثال سیستم لوله پنوماتیک (PTS)، دما)
 - ۳- پردازش نمونه (به عنوان مثال سانتریفیوژ کردن، نمونه‌های همولیز شده). ذخیره سازی و پایداری نمونه‌ها و همچنین اثر انجماد و ذوب شدن، نیز بخشی از فرآیند مرحله پیش از آنالیز است.
- نکته مهم این که هر مرحله از مراحل پیش از آنالیز در برابر خطاها آسیب پذیر است. بنابراین، پیروی از توصیه‌ها و دستورالعمل‌های پیش از آنالیز در هر مرحله از فرآیند، برای حفظ یکپارچگی نمونه ضروری است. در ادامه مطلب تأثیر هر یک از متغیرهای مرحله پیش از آنالیز در اندازه‌گیری دی‌دایمر در آزمایشگاه‌های هموستاز مورد بحث قرار خواهد گرفت.

اجتناب شود. استفاده از وسیله پروانه‌ای (سوزن کوچک متصل به بال‌های انعطاف پذیر پلاستیکی و متصل به یک لوله قابل انعطاف) معمولاً مورد استفاده قرار نمی‌گیرد زیرا عبور خون در طول لوله ممکن است دلیلی برای افزایش تنش بوده و بنابراین به طور بالقوه باعث فعال شدن هموستاز، آسیب به گلبول قرمز (به عنوان مثال همولیز) می‌شوند؛ همچنین این وسیله گران‌تر است.

مطالعات نشان می‌دهند که استفاده از وسایل پروانه‌ای (با سوزن G21 و طول لوله ۳۰۰ میلی‌متر) سوگیری (Bias) قابل توجهی در مقادیر دی‌دایمر اندازه‌گیری شده با وایداس در مقایسه با سوزن‌های مستقیم معمولی با اندازه G ۲۱ وجود نداشته و فعال شدن احتمالی سیستم هموستاز که در لوله دستگاه پروانه رخ می‌دهد، صرف نظر از ترکیب آن، ممکن است تأثیر ناچیزی در اندازه‌گیری دی‌دایمر داشته باشد. روی هم رفته، استفاده از وسیله پروانه‌ای، حتی با سوزن‌هایی با اندازه کوچک، به نظر می‌رسد گزینه مناسبی برای سوزن‌های مستقیم استاندارد است. با این حال، خونگیری مستقیم از طریق سرسوزن به ویژه هنگامی که سایر آزمایش‌های انعقادی نیز ممکن است درخواست شوند، ترجیح داده می‌شوند.

برای ارزیابی تغییرات قابل توجه در متغیرهای پیش از آنالیز، اغلب از تجزیه و تحلیل آماری استفاده می‌شود. عدم وجود یک سوگیری (Bias) قابل توجه نشان می‌دهد که متغیر پیش از آنالیز تأثیر قابل توجهی بر یک آنالیز خاص نداشته است. بنابراین، معیار بالینی مشخصی برای ارزیابی دقیق تأثیر متغیرهای پیش از آنالیز پیشنهاد می‌شود. در مورد دی‌دایمر، اغلب از یک برش یا کات آف (Cut off) ۱۰٪ قابل قبول از نظر بالینی برای ارزیابی تغییر قابل توجه مرحله پیش از آنالیز (به ویژه برای ارزیابی اثر مواد تداخل کننده و انجام مطالعات پایداری) استفاده شده است.

□ متغیرهای پیش از آنالیز که اندازه‌گیری دی‌دایمر را تحت تأثیر قرار می‌دهند جمع آوری نمونه

وسيله پروانه‌ای و اندازه سوزن (اسکالپ وین) در حال حاضر توصیه می‌شود از سوزن‌هایی با قطر ۱۹ تا ۲۲ گیج (G) استفاده کنید. در خونگیری باید مراقب بود تا به رگ آسیب زیادی وارد نشود. برای محدود کردن خطر ایجاد لخته، که مشخص شده است به طور بالقوه بر غلظت دی‌دایمر تأثیر می‌گذارد، باید از دستکاری بیش از حد رگ با سوزن

Recommendations	Specific data regarding D-dimer
19 to 22 G	19 to 25 G
Butterfly deviced discouraged	Tolerated*

*A discard tube is mandatory for removing air contained within the tubing, which may be associated with collection of an inadequate volume of blood



بنابراین، ممکن است استفاده از دستگاه‌های پروانه در افراد خاص (سالمدان، انکولوژی، اطفال یا در موارد اورژانس) مورد توجه قرار گیرد. هنگامی که خون با استفاده از سیستم جمع‌آوری پروانه‌ای (یا کاتترهای IV) جمع می‌شود، استفاده از یک لوله دور انداختنی (خونگیری دو لوله‌ای) برای از بین بردن هوای موجود در لوله، که ممکن است با جمع‌آوری حجم ناکافی خون همراه باشد، اجباری است.

□ مواد موجود در لوله آزمایش

مواد غیر فعال کننده (شیشه با روکش سیلیکونی یا پلاستیک پلی پروپیلن) برای آزمایش هموستاز ترجیح داده می‌شود زیرا این لوله‌ها از شروع شدن انعقاد خون به دلیل فعال شدن ناخواسته هموستاز در لوله جمع‌آوری خون جلوگیری می‌کند.

چندین مطالعه برای مقایسه استفاده از مواد مختلف موجود در لوله‌های جمع‌آوری کننده خون، انجام شده است. در این مطالعات مشخص شد که در هنگام استفاده از لوله‌های جمع‌آوری کننده شیشه‌ای در مقایسه با لوله‌های پلی اتیلن ترفتالات (PET) تفاوت معنی داری در مقادیر اندازه‌گیری شده دی‌دایمر با روش الیزا وجود ندارد. همچنین استفاده از لوله‌های Vacutainer و Greiner و لوله‌های شیشه‌ای با سیترات ۳/۲٪ تفاوت چشمگیری در مقادیر دی‌دایمر ندارند. بنابراین، به نظر می‌رسد کیفیت اندازه‌گیری دی‌دایمر اساساً به نوع لوله جمع‌آوری کننده وابسته نیست.

□ ضد انعقاد (یا مواد افزودنی به لوله‌های جمع‌آوری کننده خون)

استفاده از لوله‌های جمع‌آوری کننده حاوی ۳/۲٪ (۱۰۹-۱۰۵ میلی مول در لیتر) ضد انعقاد سیترات سدیم بافره اکنون توسط موسسه استاندارد آزمایشگاه بالینی (CLSI) و سازمان بهداشت جهانی (WHO) برای اکثریت قریب به اتفاق آزمایش‌های هموستاز توصیه می‌شود. نسبت خون به ضد انعقاد ۹ به ۱ توصیه می‌شود زیرا ضد انعقاد سیترات سدیم فقط به صورت مایع قابل استفاده است. عدم

پر شدن صحیح لوله ضد انعقاد سیترات به طور معمول باعث افزایش مدت زمان لخته شدن (PT، APTT و TT) می‌شود و ممکن است منجر به ارزیابی پایین مقادیر دی‌دایمر و فیبرینوژن گردد. بنابراین، نمونه باید از نظر کیفیت بررسی شود (به عنوان مثال لخته شدن، کم پر شدن یا پر شدن بیش از حد). همچنین خون باید آزادانه به درون لوله جریان یابد و پس از خون‌گیری سریعاً ظرف ۳۰ ثانیه مخلوط شود (با ۳ تا ۶ وارونگی کامل)، این کار توزیع کامل فعالیت ماده ضد انعقادی را تضمین می‌کند. نمونه‌های سرم و پلاسما هیپارینه/EDTA قابل پذیرش نیستند زیرا این مواد افزودنی به طور چشمگیری در آزمایش‌های مبتنی بر لخته تداخل می‌کنند (به عنوان مثال PT، APTT، FV، FVIII).

با این حال، چندین روش سنجش دی‌دایمر (از جمله آزمایش‌های POC) اجازه استفاده از پلاسمای سیتراته، هیپارینه یا EDTA را می‌دهد، در حالی که سایر روش‌ها فقط خون ضد انعقاد سیترات سدیم را توصیه می‌کنند. شوئنگس و همکاران میانگین غلظت دی‌دایمر بالاتری را در لوله‌های جمع‌آوری کننده حاوی هیپارین (۲۵۱۰ میکروگرم در لیتر)، در مقایسه با سیترات (۲۰۶۰ میکروگرم در لیتر) مشاهده کردند، اما این تفاوت از نظر آماری معنی دار نبود. غلظت بالاتر دی‌دایمر در پلاسمای هیپارینه احتمالاً ناشی از تأثیر عامل رقت در لوله‌های خون حاوی سیترات است. گرچه ووکوویچ و همکاران گزارش دادند که نمونه‌های هیپارینه و سیتراته دارای مقادیر دی‌دایمر یکسان در نمونه هستند، آن‌ها استفاده از ضریب تصحیح ۰/۸۴ را توصیه می‌کنند تا تأثیر رقت ماده ضد انعقاد سیترات در نظر گرفته شود، فرآیندی که ممکن است در عمل کمی گیج‌کننده باشد. افزایش سایر ماتریس‌ها باید قبل از استفاده در بالین تأیید شوند، به ویژه هنگامی که تولید کننده توصیه می‌کند فقط از نمونه‌های سیتراته استفاده کنید. لیبی و همکاران یک سوگیری نسبتاً کم در مقادیر دی‌دایمر را (Immulite 2000) بین لوله‌های خون لیتیم-هیپارین و سدیم سیترات مشاهده نمودند.

Recommendations	Specific data regarding D-dimer
<ul style="list-style-type: none"> - 105–109 mmol/L sodium citrate, buffered anticoagulant - Serum, heparinized/EDTA plasma samples cannot be accepted 	<ul style="list-style-type: none"> - EDTA or heparinized plasma sample tolerated* - Serum discouraged**
Respect the required ratio of sodium citrate to whole blood (1:9)	Underestimation
Non-activating material (silicone-coated glass or polypropylene plastic)	Glass or plastic

* Dilution factor has to be taken into account

** False positive results were frequently encountered in patients under anticoagulant treatment, whilst false negative values were also seen when FDP were entrapped in the clot

به ورید استفاده می‌شود. معمولاً توصیه می‌شود که تورنیکت را باید به محض قرار گرفتن سوزن در رگ یا هنگام پر شدن اولین لوله خارج کنید و هرگز نباید بیش از ۱ تا ۲ دقیقه در محل خود باقی بماند. مهم‌ترین اشکال در بستن طولانی مدت تورنیکت غلیظ شدن خون و تشکیل لخته است که ممکن است کیفیت آزمایش انعقادی را به خطر بیندازد. مشاهده شد وقتی که نمونه‌های جمع آوری شده پس از ۳ دقیقه استاز وریدی اندازه گیری می‌شوند مقادیر دی دایمر در روش وایداس به طور قابل توجهی ۱۳/۴٪ افزایش می‌یابد.

□ تحویل نمونه به آزمایشگاه

نمونه‌ها باید در کمترین زمان ممکن (معمولاً کمتر از ۱ ساعت) پس از جمع آوری در دمای مناسب (۱۵-۲۲ درجه سانتیگراد) به آزمایشگاه تحویل داده شوند. نمونه‌های خون باید به حالت عمودی تحویل داده شده و درپوش لوله نباید برداشته شود. انتقال لوله‌های خون در حالت عمودی و نه در حالت افقی، میزان تولید ریز ذرات را در شرایط آزمایشگاهی محدود می‌کند. اگر چه وجود مراکز خونگیری نزدیک به آزمایشگاه بهترین گزینه برای محدود کردن متغیرهای پیش از آنالیز است، اما بسیاری از بیمارستان‌ها نمونه‌های خون را با سیستم

مزیت اصلی استفاده از سایر مواد ضد انعقاد (به عنوان مثال هپارین) امکان اندازه گیری سایر آنالیت‌ها (به عنوان مثال الکترولیت‌ها، تروپونین‌های قلبی) است. با این حال، عامل رقت مخدوش کننده نتایج بوده و ممکن است به تنظیم الگوریتم‌های خاص برای اصلاح داده‌ها نیاز داشته باشد. بنابراین، سایر مواد ضد انعقاد باید به صورت محلی تأیید شده یا استفاده از آن‌ها برای شرایط خاص اختصاص یابد. بنابراین سدیم سیترات بافره (۳/۲٪ یا ۱۰۹-۱۰۵ میلی مول در لیتر) همچنان به عنوان ماده ضد انعقادی توصیه شده باقی می‌ماند. قابل ذکر است که دی دایمر در ابتدا با حذف مقدماتی فیبرینوژن در نمونه‌های سرمی اندازه گیری شد تا از واکنش متقاطع آن با آنتی بادی‌های پلی کلونال جلوگیری شود. با این حال، نتایج مثبت کاذب اغلب در بیماران تحت درمان ضد انعقادی مشاهده می‌شود، در حالی که مقادیر منفی کاذب نیز به دلیل محبوس شدن FDP ها در لخته مشاهده می‌گردد. از دست دادن فیبرینوپیپتید A نیز با تخریب FDP غیر متقاطع همراه است.

□ استفاده از تورنیکت

تورنیکت به طور متداول برای جلوگیری موقت از جریان خون ورید و در نتیجه کمک به خونگیری در شناسایی و دسترسی



زیرا کاهش یا افزایش ناگهانی شتاب بیش از حد نیروهای جاذبه شعاعی، ارتعاش و تغییرات فشار هوا ممکن است باعث فعال شدن پلاکت‌ها و همولیز شود.

لوله پنوماتیک (PTS) به آزمایشگاه تحویل می‌دهند. از مزیت بزرگ PTS کاهش زمان چرخش کاری (TAT) است، اما این سیستم‌ها باید قبل از استفاده تأیید شوند،

Recommendations	Specific data regarding D-dimer
At ambient temperature (15-22°C)	4°C or less possible
Vertical position	Pneumatic system tube tolerated*
Usually <1 hour, no more than 4 hours	Stable at various conditions

*It is advisable that each laboratory assesses its local PTS, since the systems are rather heterogeneous in terms of length, internal diameter, maximal acceleration force and speed



□ سانتریفیوژ کردن

به غیر از روش‌های POCT دی‌دایمر که بر روی خون کامل انجام می‌شود، نمونه‌ها باید در دمای اتاق در ۱۵۰۰g برای حداقل ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شوند، تا پلاسما به طور قابل قبولی از اجزای سلولی جدا شود. در یک بررسی نشان داده شد که وقتی نمونه‌ها در ۴۵۰۰g به مدت ۲ دقیقه به جای ۱۵۰۰g به مدت ۱۵-۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شوند، هیچ تفاوتی در مقادیر دی‌دایمر (سنجش Vidas) مشاهده نمی‌شود. استفاده از زمان سانتریفیوژ کوتاه‌تر در مواقع اورژانس برای کاهش TAT بسیار مفید خواهد بود. نمونه‌های خون سیرترانه سانتریفیوژ نشده را می‌توان قبل از اندازه‌گیری دی‌دایمر در دمای اتاق تا ۸ ساعت و در دمای ۴ درجه سانتیگراد تا ۲۴ ساعت نگهداری نمود. در یک بررسی نمونه‌های خون را در دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفیوژ کرده و دی‌دایمر را با دو روش سنجش ایمنی کمی Innovance و AxSYM

برخی مطالعات نشان داده‌اند که تفاوت معنی‌داری بین مقادیر اندازه‌گیری شده با دستگاه Tina-quant در نمونه‌های تحویل داده شده توسط PTS (با طول ۱۰۰ متر) در مقایسه با نمونه‌های حمل شده توسط دست‌نشد. همچنین اختلاف معنی‌داری در مقادیر دی‌دایمر (سنجش MediRox سوئد) تحویل داده شده به آزمایشگاه توسط PTS (با طول ۵۰۰ متر) در مقایسه با آنچه در آزمایشگاه جمع‌آوری شده است، مشاهده نگردید.

□ پردازش نمونه

قبل از آنالیز، نمونه‌ها باید از نظر وجود ماده افزودنی نامناسب، خطاهای شناسایی، حجم ناکافی (نسبت ۹ به ۱ رعایت نشده) و حتی وجود لخته به دقت بررسی شوند. سپس باید نمونه‌های نامناسب رد شده و نتایج آزمایش برای حفظ ایمنی بیمار اعلام نشود.

مولکولی، توصیه می‌کند از آزمایش نمونه‌هایی با همولیز واضح به دلیل سوگیری احتمالی در آزمایش‌های انعقادی به دلیل آزاد شدن پیش فاکتورهای انعقادی از سلول‌های آسیب دیده اجتناب شود.

تکنیک‌های مختلفی برای به دست آوردن نمونه‌های همولیز جهت بررسی تداخل استفاده می‌شود (انجماد و ذوب کردن خون کامل حاوی ضد انعقاد، لیز مکانیکی خون کامل حاوی ضد انعقاد توسط اسپیراسیون از طریق یک سوزن نازک یا یک هموژنایزر با تیغه چرخان). نمونه‌هایی با همولیزات یا محلول خالص هموگلوبین نامناسب هستند (لیز لکوسیت‌ها و پلاکت‌ها نیز در نظر گرفته می‌شود) و همولیز مکانیکی به دست آمده با سرنگ مجهز به یک سوزن ظریف (یعنی تجزیه سلول‌های ناشی از خونگیری آسیب‌زا) به روش انجماد-ذوب ترجیح داده می‌شود. رد تمام نمونه‌های همولیز شده توسط CLSI توصیه می‌شود. اکثر نمونه‌های همولیز شده (۹۵٪) در آزمایشگاه‌های بالینی فقط خفیف همولیز دارند (هموگلوبین بدون سلول ۰/۶-۰/۳ گرم در لیتر). بنابراین، وقتی غلظت هموگلوبین فاقد سلول زیر یک حد غیر قابل تداخل باشد (یعنی کمتر از ۳ گرم در لیتر)، مقادیر دی دایمر ممکن است قابل اعتماد بوده و با خیال راحت به پزشکان گزارش شود. اجتناب از رد همه نمونه‌های همولیز شده، نمونه‌گیری اضافی خون را کاهش می‌دهد و ممکن است روند تصمیم‌گیری بالینی را کوتاه کند، در نتیجه بر میزان کار پرسنل، راحتی بیمار و هزینه‌های آن تأثیر مثبت می‌گذارد.

اندازه‌گیری کرده و دریافتند که شواهدی مبنی بر سانتریفیوژ نمودن نمونه در سرما (توسط سانتریفیوژ یخچالدار) برای آزمایش دی دایمر وجود ندارد.

□ مواد مداخله گر

انواع تداخل‌های رخ داده در مرحله پیش از آنالیز آزمایش‌های انعقادی، به طور معمول به پاراپروتئینمی، زردی، لیپمی و همولیز با بیشترین مطالعه، طبقه بندی می‌شوند. همولیز در شرایط آزمایشگاهی هنوز هم یکی از مشکلات مرحله پیش از آنالیز در آزمایشگاه‌های بالینی است، شیوع آن بین ۷۰-۳۰٪ کل نمونه‌های نامناسب است. دلایل نمونه‌های همولیز می‌تواند مربوط به بیمار یا بیماری‌ها (به عنوان مثال کم خونی همولیتیک، اختلالات متابولیکی، عوامل عفونی، انتقال خون)، فلبوتومی (به عنوان مثال گیج سوزن G، زمان تورنیکت، خونگیری با آسیب به ورید، عدم مخلوط شدید خون در لوله‌ها)، حمل و نقل نمونه (به عنوان مثال PTS، زمان حمل و نقل، واحدهای اورژانس یا واحد مراقبت‌های ویژه)، پردازش نمونه (به عنوان مثال تأخیر قبل از سانتریفیوژ، سانتریفیوژ مجدد نمونه، زمان/دمای حمل و نقل) و ذخیره سازی (به عنوان مثال دما و مدت زمان نگهداری) باشد. همچنین تداخل به روش آنالیز مورد استفاده (فتومتریک، لخته شدن و سنجش ایمنی) نیز بستگی دارد. دستورالعمل CLSI H21-A5، جمع آوری، انتقال و پردازش نمونه‌های خون برای آزمایش سنجش‌های انعقادی مبتنی بر پلاسما و سنجش‌های هموستاز

Recommendations	Specific data regarding D-dimer
Not analyse if visible hemolysis*,**	Cell-free hemoglobin (i.e., <3 g/L)
Icterus	Less widely discussed in the literature
Lipemia	
Paraproteinemia	

* In vitro hemolysis still represents one of the most frequent causes of preanalytical problems in clinical laboratories, with a prevalence ranging between 30-70% of all unsuitable specimens

** The majority of hemolyzed samples (±95%) from clinical laboratories are only mildly hemolytic (cell-free hemoglobin 0.3-0.6 g/L)



□ اثرات پایداری، ذخیره سازی و سیکل‌های یخ‌زدن و آب کردن

در حال حاضر توصیه می‌شود که نمونه‌ها بیش از ۴ ساعت قبل از آزمایش در دمای اتاق (۲۵-۱۵ درجه سانتیگراد) نگهداری نشوند. با این حال و همانطور که در زیر بحث خواهد شد، چندین مطالعه نشان داده است که دی دایمر ممکن است برای مدت طولانی‌تری پایدار باشد ولی این موضوع نگران کننده است زیرا پزشکان اغلب درخواست اضافه کردن آزمایش دی دایمر را به نمونه‌هایی که از بخش اورژانس برای سایر آزمایش‌ها ارسال شده است، را دارند.

اطلاعات دقیق در مورد پایداری دی دایمر در جدول ۱ نشان داده شده است. برای ارزیابی پایداری این آنالیت از نمونه‌های سیرتراه شده استفاده شده است. پایداری دی دایمر به طور گسترده در پلاسما و خون کامل مورد مطالعه قرار گرفته است. به طور خلاصه، دی دایمر برای حداقل ۲۴ ساعت (در پلاسما / خون کامل) در دمای اتاق (RT) یا در ۸-۲ درجه سانتیگراد با بسیاری از روش‌های مختلف سنجش ایمنی پایدار است. همچنین نمونه‌های منجمد شده ممکن است در مواقعی که به دوره‌های طولانی‌تری برای ذخیره سازی (مثلاً ماه‌ها یا سال‌ها) نیاز است، خصوصاً برای اهداف تحقیق مورد استفاده قرار گیرد.

تأثیر لیپمی، زردی و پارپروتئینمی در مقالات کمتر مورد بحث قرار گرفته است. به نظر می‌رسد که روش دی دایمر در Sysmex CA-7000 تحت تأثیر بیلی روبین (بیلی روبین آزاد و کونژوگه تا ۱۰۰۰ میلی گرم در لیتر، ۱۷۱۰/۴ میلی مول در لیتر) قرار نمی‌گیرد. با این حال، نتایج اشتباهی دی دایمر پس از افزودن غلظت زیاد بیلی روبین آزاد (از ۸۰۰ میلی گرم در لیتر، ۱۳۶۸/۳ میلی مول در لیتر) در دستگاه StA مشاهده شد.

در مورد تداخل پارپروتئینمی، موگلسر و همکاران یک مورد بیمار مبتلا به بیماری کاستلمن را که با افزایش سطح دی دایمر همراه است گزارش کرد و مشخص شد که گاموپاتی مونوکلونال مرتبط با بیماری کاستلمن منبع نتیجه مثبت کاذب دی دایمر است. غلظت‌های کاذب دی دایمر ناشی از آنتی بادی‌های هتروفیلیک نیز در مقالات گزارش شده است. در هر زمان که ناهماهنگی‌های بالینی وجود دارد باید همیشه به تداخل‌های احتمالی در آزمایش دی دایمر شک داشته باشید. برای غلبه بر مشکل می‌توان از معرف‌های مسدود کننده هتروفیلی و سایر روش‌ها استفاده کرد. مقایسه با روش دیگر نیز برای نشان دادن تداخل گزینه مناسبی برای بررسی تداخل است.

Stability	Conditions	Anticoagulant	Plasma/whole blood	U-timer assay	Subjects	Stability criteria	Reference
24h	RT	heparin	Plasma	"two-quart" (roche)	27 patients	Student t-test and regression equation	[38]
24h	RT	citrate	Plasma	"two-quart" (roche)	27 patients	Student t-test and regression equation	[38]
6h	RT	Citrate	Plasma	Innovance [®] (Siemens)	40 patients	30% deviation from baseline, regression equation and discordance at the cutoff level of 0.5 mg/L FEU	[66]
24h	RT	citrate	Plasma	Innovance [®] (Siemens)*	20 patients	30% deviation from baseline, analysis of variance, regression equation, and Pearson correlation coefficient	[70]
24h	RT	citrate	Whole blood	VISAC [®] (Siemens)	117 patients	Spearman correlation coefficient, regression equation and discordance at the cutoff level of 100 ng/mL FEU	[76]
24h	RT	Citrate	Whole blood	Innovance [®] (Siemens)	44 patients	10-20% deviation from baseline, Student t-test, two regression equations	[76]
24h	RT	citrate	Whole blood	ACL-TOP [®] (Werfen)	26 patients	Wilcoxon's paired t-test, regression equation and two plot	[46]
24h	RT	citrate	Whole blood	Accutrac [®] (Stago)	68 patients	Analysis of variance, 30% deviation from baseline	[76]
24h	RT	citrate	Whole blood	ACL-TOP [®] (Werfen)	128 patients	Analysis of variance, Student t-test or Wilcoxon signed rank test, Bland-Altman plot and discordance at the cutoff level of 0.5 mg/L FEU	[27]
24h	3-8°C	Citrate	Plasma	Innovance [®] (Siemens)	40 patients	30% deviation from baseline, regression equation and discordance at the cutoff level of 0.5 mg/L FEU	[66]
24h	4°C	citrate	Plasma	Innovance [®] (Siemens)*	20 patients	30% deviation from baseline, analysis of variance, regression equation and Pearson correlation coefficient	[70]
24h	4°C	citrate	Plasma	VISAC [®] (Siemens)	20 patients	Wilcoxon's paired t-test, 30% deviation from baseline	[77]
24h	4°C	Citrate	Whole blood	ACL-TOP [®] (Werfen)	26 patients	Wilcoxon's paired t-test, regression equation and two plot	[46]
14 months	-24 to -75°C	Citrate	Plasma	STA-Liatest [®] (Stago)	Plasma pool (6 patients)	Statistical change**, 5-10% deviation from baseline	[71]
2 weeks	-20°C	citrate	Plasma	STA-Liatest [®] (Stago)	23 HV and 12 patients	Paired t-test, 10% deviation from baseline	[72]
24 months	-80°C (or less)	citrate	Plasma	Innovance [®] (Siemens)	20 patients	30% deviation from baseline, regression equation and discordance at the cutoff level of 0.5 mg/L FEU	[66]
8 years	-80°C	citrate	Plasma	STA-Liatest [®] (Stago)	40 patients	Wilcoxon's paired t-test	[70]

RT = room temperature, FEU = fibrinogen equivalent units, HV = healthy volunteers, *using the Sysmex[®] CA 7000 platform, **specific test not mentioned.
Pavenskov et al. Crit Rev Clin Lab Sci. 2018; minor revision

جدول ۱- پایداری دی دایمر

اورژانس استفاده می‌شود، ذخیره سازی نمونه‌ها در آزمایشگاه‌های مرکزی در مقاصد تحقیقاتی نیز ممکن است مورد نیاز باشد. جدول ۲ خلاصه‌ای از اطلاعات در مرحله پیش از آنالیز را در مورد آزمایش دی دایمر نشان می‌دهد.

سیکل‌های انجماد و ذوب به طور معنی داری بر غلظت دی دایمر اندازه گیری شده با روش‌های مختلف اندازه گیری دی دایمر تأثیر نمی‌گذارد. در نتیجه در حالی که دی دایمر عمدتاً برای تشخیص

Pre-analytical variables	General recommendations in hemostasis laboratories	Specific data regarding D-dimer
Sample collection		
- Needle bore size	19-22 G	23-25 G also tolerated
- Butterfly devices	Discouraged	Tolerated
- Tube material	Non-activating material (silicone-coated glass or polypropylene plastic)	Glass or plastic
- Anticoagulant sample	Sodium citrate 3,2% (105-109 mmol/L)	Heparin and EDTA tolerated*
- Tourniquet use	Removed as soon as the needle is in the vein (max 1-2 minutes)	Longer tourniquet use (i.e., 3 min) not tolerated
Sample delivery to the laboratory	At RT (15-22°C), in vertical position, usually <1 hours	PTS tolerated
Sample processing		
- Centrifugation	At RT, 1,500 x g for at least 15 min	Faster protocol allowed (at RT, 4,500 x g for 2 min)
- Interfering substances	Do not analyze samples with hemolysis	Cell-free hemoglobin i.e., <3 g/L tolerated
Stability, storage and F/T effects	At RT (15-22°C), no more than 4 hours	At least 24h at RT or at 2-8°C or years at -60 to -80°C No impact of F/T procedure

G = gauge, RT = room temperature, PTS = pneumatic tube system, F/T = freezing/thawing, * correction factor needed (dilution).

جدول ۲- اطلاعات پیش از آنالیز در مورد آزمایش دی دایمر

از دست دادن فیبرینوپیپتید A در طی آماده سازی سرم، تشخیص FDP غیر متقاطع را مختل می‌کند. اندازه گیری FDP در ابتدا با استفاده از روش‌های بر اساس تثبیت لاتکس و آگلوتیناسیون، مهار هم‌آگلوتینین، جمع شدن استافیلوکوک، ایمونو الکتروفورز و ایمونو دیفیوژن انجام می‌شد. روش اندازه گیری دی دایمر با معرفی آنتی بادی‌های مونوکلونال با هدف قرار دادن دامنه‌های D در اوایل دهه ۱۹۸۰ به یک دستاورد قابل توجه از ویژگی و حساسیت رسید. روش‌های سنجش ایمنی اپی توپ‌های خاصی را در دی دایمر مورد هدف قرار می‌دهند، که در هر دو بخش FDP و قطعات غیر متقاطع فیبرین وجود ندارد. در این

متغیرهای مرحله آنالیتیکال

سنجش‌های مختلف اندازه گیری دی دایمر اولین نسل از روش‌های سنجش دی دایمر، که در دهه ۱۹۷۰ توسعه یافت، قادر به شناسایی فیبرینوژن و FDP با استفاده از آنتی بادی‌های پلی کلونال بود. این سنجش‌های ایمنی فقط بر روی سرم انجام می‌شدند تا از واکنش متقابل فیبرینوژن موجود در پلاسما در غلظت‌های بالا جلوگیری شود. با این حال، نتایج مثبت کاذب در بیمارانی که از داروهای ضد انعقاد استفاده می‌کنند و نتایج منفی کاذب در نمونه‌هایی که لخته ایجاد کرده و محصولات تجزیه شده در لخته محبوس می‌شوند، مشاهده می‌گردد.



روش استفاده از پلاسما به دلیل به حداقل رساندن واکنش متقابل فیبرینوژن (یا FDP) امکان پذیر بود. از زمانی که اولین آنتی بادی مونوکلونال توسط ریلان و همکاران در سال ۱۹۸۳ (B63) توسعه یافت، بیش از ۲۰ آنتی بادی مونوکلونال بدین منظور تولید و در آزمایشگاه‌ها مورد استفاده قرار گرفته است. روش‌های نسل اول عمدتاً با استفاده از روش‌های کیفی سنجش ایمنی آگلوتیناسیون لاتکس با استفاده از ریز ذرات لاتکس پوشیده شده با آنتی بادی که امکان مشاهده چشمی آگلوتیناسیون را امکان پذیر می‌ساخت، توسعه یافت.

توسعه سنجش‌های ایمنی آگلوتیناسیون لاتکس نسل دوم به صورت اتوماتیک یا دستگامی (یا روش سنجش ایمنوتوربیدومتری تشدید شده با لاتکس) امکان اندازه‌گیری کمی دی‌دایمر را از طریق میزان تجمع ذرات لاتکس در پاسخ به دی‌دایمر فراهم می‌کند. پس از افزودن نمونه حاوی دی‌دایمر، ذرات لاتکس تجمع یافته و بنابراین از عبور نور از محلول جلوگیری می‌کنند. افزایش جذب نوری اندازه‌گیری شده مستقیماً با غلظت دی‌دایمر متناسب است. سنجش‌های کمی ایمنو تورییدومتری تقویت شده با لاتکس سریع بوده و حساسیت قابل مقایسه با سنجش‌های (ELISA) را دارند.

سنجش‌های الایزا قبل از سنجش‌های آگلوتیناسیون لاتکس، عمدتاً برای اهداف تحقیقاتی انجام می‌شد. در این روش‌ها، آنتی بادی گیرنده آنتی ژن دی‌دایمر را بر روی صفحه متصل می‌کنند. پس از انکوباسیون با نمونه، یک آنتی بادی ثانویه دارای نشانگر آنزیمی به چاهک اضافه می‌شود و به آنتی ژن دی‌دایمر متصل شده و تشکیل ساندویچ را می‌دهند. پس از اضافه شدن ماده رنگزا یک واکنش رنگ سنجی ایجاد می‌شود. اگر چه روش میکروپلیت الایزا برای دی‌دایمر بسیار حساس هستند و مدت‌هاست که به عنوان روش مرجع در نظر گرفته می‌شوند، علی‌رغم آن، این روش دستی بوده، به مهارت‌های فنی نیاز داشته، وقت گیر هستند (یعنی حدود ۴-۲ ساعت) و درجه بالایی از عدم دقت آنالیتیکال را دارند.

در اواسط دهه ۱۹۹۰ بیومیو، یک روش مبتنی بر ELISA با نقطه پایانی فلورسانس (روش ایمنوفلورسانس مرتبط با آنزیم (ELFA)) را به بازار عرضه کرد. این روش دارای حساسیت و ویژگی مشابه الایزا است، با این مزیت بزرگ که خودکار بوده و در نتیجه در مدت زمان کمتری (۳۰ دقیقه)

نتایج دقیق‌تری را ایجاد می‌کند. روش وایداس هنوز به عنوان روش سنجش ایمنی کمی مرجع در نظر گرفته می‌شود و از نظر بالینی معتبرترین روش اندازه‌گیری دی‌دایمر است.

اخیراً، سنجش‌های ایمنومتریکی کمی لومینسانس که حساسیت مشابهی را با الایزا نشان می‌دهند نیز تولید شده است. در این روش از ذرات مغناطیسی پوشیده شده با آنتی بادی‌های مونوکلونال ضد دی‌دایمر استفاده می‌شود. انکوباسیون آنتی بادی ضد دی‌دایمر با ایزولومینول یک واکنش شیمیایی ایجاد می‌کند که نور ایجاد شده مستقیماً با غلظت دی‌دایمر متناسب است.

دلیل اصلی تمایل به روش‌های POC دی‌دایمر امکان غربالگری سریع بیماران از نظر بیماری ترومبوآمبولیک است، بنابراین منجر به کاهش ازدحام در مراکز مراقبت‌های اورژانس می‌شود. اکثر آزمایش‌های POC از خون کامل استفاده می‌کنند، همگن هستند، از آنتی بادی‌های مونوکلونال استفاده می‌کنند و زمان چرخه کاری کوتاهی دارند. در روش‌های هم‌آگلوتیناسیون، از آنتی بادی‌های دو ظرفیتی بر علیه سلول‌های قرمز خون و دی‌دایمر استفاده می‌شود. در صورت وجود دی‌دایمر در خون، آگلوتیناسیون گلبول‌های قرمز رخ می‌دهد و نتیجه به صورت کیفی قرائت می‌شود. کیت‌های تشخیصی بر اساس روش‌های ایمنو کروماتوگرافی، فلورسانس و کمی لومینسانس نیز وجود دارد. جدول ۳ مشخصات اصلی سنجش‌های دی‌دایمر را خلاصه می‌کند.

□ تغییرات بین آزمایشگاهی

تنوع در بین سنجش‌ها

مطالعه مقایسه سنجش فیبرین (FACT) که در سال ۲۰۰۱ منتشر شد، ۲۳ روش کمی سنجش ایمنی تقویت شده با لاتکس، ۶ روش الایزا و ۲ روش سنجش ایمنی مبتنی بر غشا را ارزیابی کرد. نویسندگان دریافتند که میانگین مقادیر به دست آمده در ۳۹ نمونه از ۶۳۰ میکرو گرم در لیتر به ۱۳۳۵۰ میکرو گرم در لیتر (تقریباً ۲۱ برابر) تغییر کرده است، دو روش واکنش متقابل قابل توجهی نسبت به محصولات تخریب فیبرینوژن را از خود نشان می‌دهد. همچنین مشخص شد که الایزا و آزمایش ایمنی تقویت شده با لاتکس به ترتیب نسبت به فیبرین با پیوند

۷ سنجش دی دایمر که اغلب مورد استفاده قرار می‌گیرد، مشخص شد که در برخی از روش‌ها غلظت دی دایمر ۲۰ برابر بیشتر از سایر روش‌ها است. عرضی با وزن مولکولی کم و فیبرین با وزن مولکولی بالا واکنش بیشتری نشان می‌دهند. بر این اساس، مطالعه میجر و همکاران، بر اساس بررسی ۳۵۷ آزمایشگاه با استفاده از

	ELISA	ELFA	Unenhanced Latex agglutination assay	CLIA	Latex-enhanced immunoturbidimetric assay	POC assay
Type	Quantitative	Quantitative	Qualitative/semi-quantitative	Quantitative	Quantitative	Qualitative/quantitative
TAT	2-4h	35-40min	Rapid	25-40min	15min	2-20min
Pros	Considered as the gold standard, Sensitivity, observed independent	Considered as reference method, most validated method, sensitivity, automation, wide linear range (0-1,000 µg/mL), automated, observed independent	Rapid, inexpensive	Sensitivity, rapid, automated, observed independent	Sensitivity, automated, rapid, observed independent	Readily available, fast, higher specificity, whole blood
Cons	Highly manual, technical skills, time-consuming, not optimal linear range, moderate specificity	Moderate specificity	Moderate sensitivity, manual, observer dependent	Lack clinical validation, moderate specificity	Moderate specificity	Sensitivity, not all FDA cleared, observer dependent, manual
Example	Asserachrome* (Stago), Enzygnost* (Dade Behring)	Vidas* (bioMérieux), AxSYM* (Abbott), Stratus CS* (Dade Behring)	Dimertest latex* (IL); Fibrinosticon* (bioMérieux); Dade Dimertest* (Siemens)	AcuStar* (Werfen), Immulite* (Siemens)	Tina-quant* (Roche), STA-Liatest* (Stago), HemosIL HS* (Werfen) Innovance* (Dade-Behring)	SimpliRed* (Agen), Clearview Simplify* (Agen)

ELISA = Enzyme-linked immunosorbent assay, ELFA = Enzyme-linked immunofluorescence assays, CLIA = Chemiluminescent enzyme immunometric Assay, POC = Point of care.

Favresse et al. Crit Rev Clin Lab Sci. 2018, minor revision

جدول ۳- مشخصات سنجش‌های دی دایمر

استاندارد سازی در مقابل هماهنگ سازی Standardization vs Harmonization

منبع اصلی ایجاد تغییرات بزرگ بین آزمایشگاهی ناهمگنی قطعات حاصل از هضم پلاسمین فیبرین با پیوند عرضی (از LMWF تا HMWF)، استفاده از آنتی بادی‌های مونوکلونال نسبت به اپی توپ‌های مختلف دی دایمر، عدم وجود کنترل‌های داخلی مجاز بین المللی یا کالیبراتورها و استفاده از واحدهای مختلف و کات آف های بالینی هستند، بنابراین استاندارد سازی سنجش دی دایمر اگر غیر ممکن نباشد یک هدف چالش برانگیز است. از آنجا که الزامات استاندارد سازی سنجش دی دایمر برآورده نمی‌شود، روش‌های هماهنگ سازی کمتر سخت گیرانه، مبتنی بر استفاده از مدل‌های ریاضی،

کالیبراتور

برای به دست آوردن مواد کالیبراسیون عمدتاً از لیز کنترل شده لخته‌های فیبرین استفاده می‌شود. از این رو، تولیدکنندگان برای حفظ تنوع محصولات تخریب، باید اطمینان حاصل کنند که لیز قابلیت باز تولید را داراست یا خیر، زیرا حساسیت سنجش ممکن است متناسب با مقادیر نسبی فیبرینوژن با وزن مولکولی بالا (HMWF) یا فیبرینوژن با وزن مولکولی کم (LMWF) تغییر کند. سنجش‌های دی دایمر ممکن است با معادل‌های دی دایمر قطعه فیبرین خالص یا با توجه به مقدار فیبرینوژن مورد استفاده برای تهیه کالیبراسیون، کالیبره شوند. بنابراین واحدهای دی دایمر ممکن است با توجه به نوع کالیبراتور استفاده شده، یعنی واحدهای دی دایمر (DDU) یا واحدهای معادل فیبرینوژن (FEU) متفاوت باشد.



پیشنهاد شده است تا نتایج به دست آمده از سنجش‌های مختلف قابل مقایسه باشد.

هماهنگی سنجش‌های اندازه‌گیری دی دایمر ممکن است برای تشخیص و نظارت بر انعقاد داخل عروقی منتشر (DIC) بسیار مفید باشد، زیرا تنوع زیاد بین سنجش‌های دی دایمر ممکن است به طور مستقیم بر نمره DIC تأثیر گذاشته و منجر به طبقه‌بندی نادرست بیماران شود. هماهنگی نتایج دی دایمر سازگاری بهتری ایجاد می‌کند و محاسبه نمرات DIC را بهبود می‌بخشد. با این حال، ناهمگونی ذاتی و چالش‌های هماهنگ‌سازی، شناسایی یک برش یا کات آف تشخیصی یکسان را دشوارتر و از نظر بالینی زیر سؤال می‌برد، زیرا نتایج منفی کاذب تأثیر نامطلوبی بر مدیریت بیماری دارند. با این وجود، رویکردهای فوق‌الذکر نشان می‌دهند که هماهنگ‌سازی امکان‌پذیر است و باید در مقیاس بزرگ‌تری مورد توجه قرار گیرند. اخیراً، فراخوانی جهت هماهنگ‌سازی توسط کمیته‌های فرعی استاندارد سازی فیبرینولیز و DIC توسط ISTH مطرح شد. استفاده از تعداد زیادی از نمونه‌های بیماران با شرایط مختلف بالینی ممکن است برای تولید یک ماده مرجع لیوفیلیزه حاوی غلظت‌های بالای دی-دایمر مشتق شده از LMWF و HMWF مفید باشد. برای به دست آوردن خط رگرسیون مرجع برای روش‌های سنجش ایمنی دی دایمر می‌توان از این ماده مرجع طیف وسیعی از مقادیر دی دایمر تولید کرد. استفاده از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال که تمایل زیادی به گونه‌های FDP با وزن مولکولی کم و متوسط دارند، همراه با آنتی‌بادی‌های مونوکلونال که فرم‌های با وزن مولکولی بالاتر را هدف قرار می‌دهند نیز ممکن است یک گزینه عملی باشد.

توصیه‌هایی در مورد عملکرد سنجش‌های دی دایمر

به دلیل ناهمگونی سنجش‌های ایمنی دی دایمر (یعنی فرمت‌ها و آنتی‌بادی‌ها) و عدم استاندارد سازی/هماهنگ‌سازی، عملکرد آنالیتیکال و کلینیکال روش به کار برده شده در هر آزمایشگاه باید همیشه قبل از اجرا در استراتژی‌های مدیریتی برای VTE ارزیابی شود. مقدار کات آف مورد استفاده برای حذف VTE باید در

همان محل تأیید شود، همانطور که توسط کمیته استاندارد انگلیس در دستورالعمل‌های خون‌شناسی پیشنهاد شده است، حداقل ۲۰۰ مقاله و چندین تولیدکننده نیز استفاده از کات آف محلی را توصیه می‌کنند. با این حال، این روش ممکن است برای همه آزمایشگاه‌ها عملی نباشد. بنابراین می‌توان از کات آف پیشنهاد شده توسط سازنده استفاده کرد، به شرطی که مطالعات اعتبار سنجی معتبر در جای دیگری انجام شده باشد و هیچ‌گونه تغییر قابل توجهی از یک دسته کیت به دسته دیگر پیدا نشده باشد.

بررسی CAP نشان داد که ۴۸۸ آزمایشگاه از ۱۵۰۶ آزمایشگاه در ایالات متحده از مقادیر کات آف بالاتر از مقادیر توصیه شده در مقالات یا تولیدکننده کیت استفاده می‌کنند. همچنین یک نظرسنجی در اروپا نشان داد که ۲۴٪ و ۵۵٪ از شرکت‌کنندگان به ترتیب از کات آف کمتر یا بیشتر از مقدار توصیه شده استفاده کرده‌اند.

سند جدید توافق ایتالیا استفاده از روش‌های ایمنی سنجی کمی را برای آزمایش پلاسماهای بیماران بخش اورژانس توصیه می‌کند. همچنین توصیه شده است که روش‌های سنجش ایمنی دی دایمر باید دارای عدم دقت کمتر از ۱۰٪ نزدیک به کات آف تشخیصی داشته و دامنه اندازه‌گیری و خطی بودن کیت ۵۰ تا ۵۰۰۰ میلی‌گرم FEU در لیتر باشد. نکته مهم این که سنجش‌های دی دایمر نباید با فیبرینوژن یا FDP واکنش نشان داده و ترجیحاً نباید با قطعات فیبرین و فیبرینوژن آزاد شده از پروتئولیز با واسطه آنزیم‌های مختلف واکنش نشان دهند.

پزشکان باید از مشخصات عملکردی روش‌های دی دایمری که استفاده می‌کنند آگاه باشند زیرا دی دایمر شامل مخلوطی از محصولات تخریب فیبرین متقاطع با وزن‌های مولکولی ناهمگن است. علاوه بر این، آزمایشگاه همیشه باید از مقادیر کات آف‌های معتبر بالینی استفاده کند، زیرا این آستانه تشخیصی نقشی اساسی در تصمیم‌گیری بالینی دارد.

متغیرهای مرحله پس از آنالیز

طبق استاندارد ISO 15189: 2012، مرحله پس از آنالیز به عنوان «فرآیندهای پس از آنالیز شامل بازبینی سیستماتیک و تفسیر، مجوز صدور جواب، گزارش و انتقال نتایج و ذخیره

سازی نمونه‌های آزمایش شده» تعریف شده است.

اگر چه اکنون به وضوح مشخص شده است که بیشتر مشکلات آزمایشگاه هموستاز در مرحله پیش از آزمون (۷۰-۶۰٪) به وجود می‌آیند، مرحله پس از آزمون هنوز هم علت ایجاد درصد زیادی از خطاهای تشخیصی است (۲۰-۱۵٪) که می‌تواند ایمنی بیمار را به خطر بیندازد. در اینجا ما درباره موضوعات مرحله پس از آنالیز که مخصوص اندازه گیری دی‌دایمر هستند بحث می‌کنیم.

□ واحدهای گزارش دی‌دایمر

از دیدگاه آزمایشگاهی، آزمایش دی‌دایمر فاقد یک واحد اندازه گیری استاندارد است. مقادیر دی‌دایمر به عنوان واحد جرم در حجم گزارش می‌شود. با این حال، برای توصیف جرمی دی‌دایمر نیز از دو واحد مختلف استفاده می‌شود.

Fibrinogen Equivalent Unit) یا FEU: جرم معادل فیبرینوژن که برای تولید دی‌دایمر در نمونه مورد نیاز است و کالیبراتورها از تخریب لخته فیبرینوژن خالص شده توسط پلاسمین در حضور فاکتور XIII تهیه می‌شوند.

(D-Dimer Unit) یا DDU: جرم دی‌دایمر خالص را تعیین می‌کند و کالیبراتورها از دی‌دایمر خالص تهیه می‌شوند.

وزن مولکولی FEU (۳۴۰ کیلو دالتون) و DDU (۱۹۰ کیلو دالتون) بوده که در صورت ضرب در عدد ۲ ممکن است به طور متغیر مورد استفاده قرار گیرند، زیرا جرم FEU تقریباً دو برابر جرم یک DDU است. بنابراین، ۱ میکرو گرم بر لیتر دی‌دایمر اندازه گیری شده در DDU تقریباً برابر با ۲ میکرو گرم بر لیتر در FEU است. بسیاری از آزمایشگاه‌ها نیز به وضوح مشخص نمی‌کنند که از کدام واحد جرمی استفاده می‌کنند. بنابراین توصیه می‌گردد که علاوه بر وارد کردن واحد جرم در حجم دی‌دایمر در گزارش، نوع واحد جرمی نیز به دقت قید گردد. توصیه می‌شود برای هماهنگ سازی آزمایشگاه‌ها واحدها را تبدیل و نتیجه را به یکی از دو صورت زیر در جوابدهی گزارش نمایند:

250 ng DDU/mL

500 ng FEU/mL

مشکل دیگر ناشی از استفاده از حداکثر ۷ واحد اندازه گیری متفاوت برای گزارش نتایج دی‌دایمر است.

(به عنوان مثال، ng/mL، mg/L، µg/L، µg/mL، g/L، mg/dL). به علاوه، همین سنجش دی‌دایمر در حال حاضر در واحدهای مختلف گزارش شده است. بنابراین، حداقل ۱۴ ترکیب برای اندازه گیری دی‌دایمر با هم وجود دارد.

همانطور که اخیراً توسط اولسون و لیبی گزارش شده است، اکثر آزمایشگاه‌های بالینی (به ترتیب ۵۹٪ و ۶۰٪) از FEU برای اندازه گیری دی‌دایمر استفاده کردند، در حالی که واحد اصلی اندازه گیری mg/L بود و به دنبال آن ng/mL در هر دو نظرسنجی مورد استفاده قرار گرفته بود. واحد اندازه گیری که احتمالاً بیشتر با سیستم بین المللی (IS) مطابقت دارد «µg/L» است که در اصل همان «ng/mL» است و احتمالاً واحدی است که به بهترین وجهی با سیستم SI نزدیک است و همچنین توسط سند اجماع ایتالیا نیز توصیه می‌شود. بعضی از آزمایشگاه‌ها (۸٪ در نظرسنجی CAP) حتی از نوع واحد اندازه گیری اطلاع نداشتند.

استفاده از واحدهای مختلف (FEU یا DDU) و همچنین واحدهای اندازه گیری متفاوت برای پزشکان چالش برانگیز است و باعث سردرگمی آن‌ها شده و به طور بالقوه منجر به طبقه بندی غلط یا تشخیص غلط بیماران می‌شود. این واقعیت که ۳۳ درصد از ۱۵۰۰ آزمایشگاه ایالات متحده واحدهای دی‌دایمر خود را نسبت به موارد توصیه شده توسط سازنده کیت تغییر دادند، وضعیت را بیش از پیش پیچیده کرد. این تغییرات سردرگمی بیشتری را به مشکلات تشخیصی اضافه می‌کند، به ویژه هنگامی که آزمایشگاه‌های همسایه از واحدهای دیگر استفاده می‌کنند. آزمایشگاه‌های بالینی باید هر گونه تغییر در واحدهای اندازه گیری دی‌دایمر را به موقع با همکاران پزشک در میان بگذارند. حتی مهم‌تر از آن، دستیابی به توافق جهانی در مورد یک واحد اندازه گیری یکنواخت نیاز قانع کننده‌ای برای دستیابی به هماهنگ سازی سنجش‌های ایمنی دی‌دایمر است.

بنابراین همانطور که ملاحظه می‌شود در دو سطح احتمال گزارش نادرست وجود دارد.

در سطح اول استفاده از واحدهای توصیفی جرم است که همانطور که گفته شد FEU دو برابر DDU است.

در سطح دوم استفاده از واحدهای جرمی متفاوت است. مثلاً



استفاده از واحدهای mg/L و $\mu g/L$ که گرچه از نظر مقداری معدل هم هستند ولی از نظر نوشتاری واحد اول ۱۰۰۰ برابر واحد دوم است. بنابراین این اختلاف ۱۰۰۰ برابری در سطح دوم در ترکیب با اختلاف دو برابری در سطح اول موجب ایجاد یک خطای ۲۰۰۰ برابری در مقادیر گزارش شده می‌گردد. بنابراین عدم ثبت واحدهای توصیفی موجب می‌شود که شاهد تفاوت‌های بین آزمایشگاهی در مقادیر دی‌دایمر باشیم. مثال زیر شاید روشن‌کننده مطلب باشد.

$$500 \mu g FEU/L = 0.25 mg DDU/L$$

که گرچه مقادیر گزارش شده یکسان هستند ولی از نظر عددی اولی ۲۰۰۰ برابر دومی است.

□ کات آف ویژه سن

مقادیر دی‌دایمر معمولاً به موازات افزایش سن افزایش می‌یابد، بنابراین منجر به افزایش نسبت زیادی از بیماران مسن با سطح دی‌دایمر بالاتر از حد معمول $500 \mu g FEU/L$ می‌شود

استفاده از کات آف‌های متناسب با سن (age-adjusted cutoffs $ng FEU/mL = (age \text{ in year}) \times 10$) اکنون به طور جهانی برای گزارش نتایج آزمایش دی‌دایمر توصیه می‌شود. بدین ترتیب که اگر مقدار کمتر از $500 ng FEU/mL$ در افراد زیر ۵۰ سال نرمال در نظر گرفته می‌شود، در یک فرد ۷۰ ساله محدوده مرجع بایستی $700 ng FEU/mL$ در نظر گرفته شود. استفاده از این کات آف‌ها باعث افزایش قابل توجه ارزش اخباری مثبت (PPV) می‌شود بدون این که به میزان قابل توجهی به ارزش اخباری منفی (NPV) خدشه وارد کند و در نهایت سودمندی بالینی اندازه‌گیری دی‌دایمر را در بیماران مسن (به عنوان مثال ۵۰ سال یا بیشتر) با احتمال بالینی پایین بهبود می‌بخشد. تجزیه و تحلیل جمعیت‌های مختلف با سنجش ایمنی مختلف حداقل تا حدی ممکن است چنین اختلافاتی را توضیح دهد. این مسئله بر این موضوع تاکید می‌کند که نتایج به دست آمده از روش‌های دی‌دایمر را نمی‌توان از یک آزمایش به آزمایش دیگر تعمیم داد.

با این حال، یک نظر سنجی بین‌المللی در مورد گزارش نتایج آزمون دی‌دایمر نشان داد که توصیه‌های منتشر شده

در مورد استفاده از کات آف‌های متناسب با سن به طور گسترده‌ای اجرا نشده است (یعنی کمتر از ۱۰٪ آزمایشگاه‌های بالینی این روش را اجرا کرده‌اند).

همراه با ۱۴ ترکیب واحد دی‌دایمر، استفاده از برش‌های تنظیم شده برای سن تصمیم‌گیری بالینی را بیشتر پیچیده می‌کند. تقریباً ۲۸ احتمال مختلف برای گزارش نتایج آزمون D-dimer وجود دارد. برای یکسان‌سازی گزارش نتایج آزمون دی‌دایمر، تلاش‌های جهانی لازم است تا زمینه برای اجرای گسترده از قطع‌های تنظیم شده با سن فراهم شود. قطع‌های ویژه‌ای که برای زنان باردار و کودکان استفاده می‌شود نیز پیشنهاد شده است. با این حال، همان طور که دی‌دایمر از نظر فیزیولوژیکی در طول بارداری افزایش می‌یابد، شناسایی آستانه تشخیص دقیق دی‌دایمر چالش برانگیز خواهد بود. اخیراً مطالعه نشانگرهای تشخیصی PE در بارداری (DiPEP) نشان داده است که هیچ نشانگر زیستی کارایی تشخیصی برای تشخیص VTE در بارداری یا در دوران پس از بارداری را ندارد.

لازم به ذکر است که در کات آف تنظیم شده با سن به این نکته توجه داشته باشیم که ضریب سن به واحد جرمی و واحد توصیفی جرم بستگی دارد و یک ضریب ثابت نیست مثال:

$$ng FEU/mL \times 10$$

$$ng DDU/mL \times 5$$

$$mg FEU/L \times 0.01$$

□ زمان چرخه کاری

زمان چرخه کاری (TAT) جنبه اساسی در گزارش دی‌دایمر است زیرا این تست بیشتر در شرایط بالینی اورژانس مورد استفاده قرار می‌گیرد. سند اجماع ایتالیا اخیراً زمان چرخه کاری کمتر از یک ساعت را توصیه کرده است که برای مدیریت اکثریت قریب به اتفاق درخواست‌های اورژانسی دی‌دایمر مناسب به نظر می‌رسد.

استفاده از روش‌های ایمنی دی‌دایمر با دامنه خطی گسترده (یعنی حداکثر ۵۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر) بدون ایجاد رقت‌های اضافی همراه با استفاده از فرآیندهای سانتیفریوژ سریع‌تر و آزمایش‌های قابل اعتماد بر بالین روش‌های ارزشمندی هستند. روش‌های الایزای دستی زمان چرخه کاری توصیه شده را

۶- بیماری‌های کبدی، بدخیمی‌ها، تروما، جراحی، بارداری و افزایش سن.

□ موارد کاهش کاذب دی‌دایمر:

- ۱- نمونه برداری زود هنگام پس از تشکیل ترومبوز
- ۲- نمونه برداری دیر هنگام (چند روز پس از تشکیل ترومبوز)
- ۳- بیمارانی که تحت درمان با داروهای ضد انعقاد هستند. ریواروکسابان و ابیکاترون سطح دی‌دایمر را کاهش می‌دهند.
- ۴- استاتین‌ها موجب کاهش ملایم دی‌دایمر می‌گردند. نظر به اینکه مقادیر کمتر از $500 \mu\text{g FEU/L}$ طبیعی در نظر گرفته می‌شود، در این موارد بهتر است به جای استفاده از اصطلاح کاهش کاذب (*false decrease*) دی‌دایمر از اصطلاح نرمال کاذب (*False Normal*) استفاده شود. زیرا دی‌دایمر نرمال معتبرترین و مطمئن‌ترین آزمایش جهت شناسایی افراد با ریسک پایین ترومبوز محسوب می‌شود.

برآورده نمی‌کنند، در حالی که روش‌های جدید آزمایشگاهی دی‌دایمر، با زمان آنالیز بین ۴۰-۱۵ دقیقه، به احتمال زیاد معیار یک ساعت را برآورده می‌کنند (جدول ۳). قابل ذکر است که به دلیل نیمه عمر ۶-۸ ساعته دی‌دایمر، تکرار آزمایش در این بازه زمانی اساس بالینی ندارد.

□ موارد افزایش کاذب دی‌دایمر:

- ۱- حضور آنتی‌بادی هتروفیل، فاکتور روماتوئید و پاراپروتئینمی در نمونه
- ۲- هماتوکریت بیمار بیش از ۵۵٪ باشد. به علت اثر ترقیقی سیترات در حجم پلاسما.
- ۳- تأثیر نمونه‌های لیپمیک و ایکتریک در سیستم‌هایی که بر اساس فتومتری کار می‌کنند.
- ۴- عدم پرشدن لوله‌های جمع‌آوری کننده خون (عامل رقت)
- ۵- بستن تورنیکت به مدت بیش از ۳ دقیقه

References:

- 1- Favresse J, Lippi G, Roy P-M, et al. D-dimer: preanalytical, analytical, postanalytical variables, and clinical applications. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2018;55:548-577.
- 2- Linkins L-A, Takach Lapner S. Review of D-dimer testing: good, bad, and ugly. *Int J Lab Hematol*. 2017;39(Suppl 1):98-103. doi:10.1111/ijlh.12665.

