

## Modalità di refertazione del D-Dimero e prestazioni dei sistemi analitici: quali informazioni dal programma di Valutazione Esterna di Qualità del Centro di Ricerca Biomedica

Sandra Secchiero<sup>1</sup>, Laura Sciacovelli<sup>1</sup>, Mario Plebani<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Centro di Ricerca Biomedica per la Qualità in Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedale – Università, Padova, Italia

<sup>2</sup>Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedale – Università, Padova, Italia

*Questo lavoro è stato in parte presentato al 52° Congresso Nazionale SIBioC, 6-8 Ottobre 2020, Virtual Edition, quale Comunicazione Orale*

### ABSTRACT

#### Reporting of D-Dimer and performance of analytical systems: data from participants to the External Quality Assessment Scheme of the Biomedical Research Centre in Italy.

**Introduction:** D-Dimer assessment represents a cornerstone in the diagnostic approach to several thrombotic disorders. Recent literature has highlighted the role of D-Dimer also in the diagnostic pathway of coronavirus infection (COVID-19) and the importance of harmonized reporting [D-dimer unit (DDU) or fibrinogen equivalent unit (FEU); unit of measure; cut-off] in order to guarantee the correct interpretation of the results.

**Methods:** D-Dimer data from 100 EQA participants and the inter-laboratory variability (CV%) of the last 7 years for the most used analytical systems: Werfen, HemosIL HS; Werfen, HemosIL HS-500; Auto D-D, Sclavo; Innovance, Siemens; VIDAS, bioMérieux and STA Liatest, Stago have been evaluated.

**Results:** concerning the results expression in DDU or FEU, we observed a prevalence of FEU (55.1%) over DDU (44.9%); the value was confirmed in the last 7 years (average FEU = 55.6%), differently from data obtained in the survey conducted in 2014 at a national level.

The units used are: ng/mL (67.8%), µg/L (29.0%) and mg/L (3.2%) for D-Dimer DDU; ng/mL (57.9%), µg/mL (21.0%), µg/L (15.8%) and mg/L (5.3%) for D-Dimer FEU.

Inter-laboratory variability (mean CV%) calculated on a total of 72 controls is lower for all diagnostic systems at pathological levels than the one observed for concentrations below the cut-off.

**Discussion:** this study demonstrates that the reporting of D-Dimer results does not comply with the 2014 SIBioC consensus document which recommended the use of µg/L FEU, and highlights 8 different types of information. Data reported in this study call for the harmonization of D-Dimer reporting in order to guarantee the correct interpretation of the information, both in the case of COVID-19 and in all the diseases already known where this analyte has a clinical relevance.

### INTRODUZIONE

La determinazione del D-dimero, congiuntamente all'utilizzo di "score" clinici e alla diagnostica per immagini, rappresenta un cardine nell'approccio diagnostico a molti disordini della coagulazione quali la trombosi venosa profonda e l'embolia polmonare, la coagulazione intravascolare disseminata, le trombosi retiniche e altre patologie trombotiche (1). La recente letteratura ha messo in luce il ruolo del D-dimero anche nel processo diagnostico e prognostico di COVID-19.

Tra i parametri di laboratorio più rilevanti per seguire l'evoluzione della coagulopatia presente nei pazienti affetti da COVID-19, infatti, quelli che risultano di particolare utilità sono il conteggio piastrinico, il tempo di protrombina e il D-dimero. Quest'ultimo, come riportato in molti studi, è il parametro che correla meglio con l'evoluzione clinica del paziente (2-7).

Purtroppo la determinazione del D-dimero presenta una serie di problematiche relative sia alla fase pre-analitica, sia a quella analitica nonché alla fase post-analitica (8,9).

Corrispondenza a: Sandra Secchiero, Centro di Ricerca Biomedica per la Qualità in Medicina di Laboratorio, c/o UOC Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedale-Università di Padova, Via Nicolò Giustiniani 2, 35128 Padova, Tel 049 8214491, E-mail sandra.secchiero@aopd.veneto.it

Ricevuto: 11.02.2021

Revisionato: 27.02.2021

Accettato: 08.03.2021

Pubblicato on-line: 14.04.2021

DOI: 10.19186/BC\_2021.018

Relativamente alla fase pre-analitica le maggiori criticità si riscontrano nella scelta della matrice biologica (plasma raccolto in EDTA, eparina, sodio citrato o sangue intero raccolto in sodio citrato) e nella valutazione della qualità del campione raccolto: presenza di emolisi o coaguli, inadeguato rapporto tra sangue e anticoagulante (9).

Le problematiche analitiche possono essere legate all'eterogeneità molecolare dell'analita, all'assenza di un materiale di riferimento, alla scelta del calibratore e al tipo di anticorpi monoclonali utilizzati dal produttore.

Il D-dimero rappresenta una piccolissima quota dei diversi prodotti di degradazione della fibrina stabilizzata derivati dall'azione combinata di 3 enzimi: la trombina, il fattore XIII attivato e la plasmina. Non è quindi una singola molecola ma piuttosto una miscela di peptidi (DDE, YD/DY, YY/DXD) caratterizzati dalla presenza del dimero D il quale può avere una diversa immunoreattività per l'anticorpo utilizzato; inoltre i prodotti di degradazione possono complessarsi tra loro limitando l'accessibilità degli epitopi verso cui gli anticorpi sono diretti. Questa spiccata eterogeneità del D-dimero ha rappresentato un grosso ostacolo nel processo di standardizzazione dato che i calibratori dei differenti metodi e i materiali di controllo differiscono considerevolmente tanto da rendere ogni risultato "metodo specifico".

Dal 1997 sono stati intrapresi vari tentativi di standardizzazione utilizzando materiali diversi (D-dimero purificato, plasma di pazienti con coagulazione intravascolare disseminata), ma nessuno di questi materiali ha permesso la standardizzazione dei vari metodi commerciali (10-15).

Il metodo che è stato a lungo considerato il "gold standard" è il metodo ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) su micropiastra, largamente utilizzato prima dell'avvento dei metodi di agglutinazione al lattice, principalmente per scopi di ricerca, poiché richiede manualità e competenze tecniche e ha un tempo di risposta (TAT) molto elevato (circa 2-4 ore).

Il metodo ancor oggi considerato di riferimento è un metodo ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay), sviluppato a metà degli anni 90 da BioMerièux, che presenta sensibilità e specificità simili al metodo ELISA su micropiastra ma con il grande vantaggio di essere automatizzato e quindi con un TAT molto ridotto (30 minuti).

Successivamente, sono stati sviluppati metodi chemiluminescenti e immunoturbidimetrici che utilizzano particelle al lattice; questi ultimi, impiegati da molti sistemi analitici, presentano un'alta sensibilità ma una moderata specificità. Gli anticorpi (Ab) monoclonali utilizzati nei vari metodi hanno una diversa reattività verso i diversi prodotti di degradazione della fibrina stabilizzata, in funzione della diversa esposizione degli epitopi; conseguentemente lo stesso Ab monoclonale può reagire diversamente con frammenti diversi e lo stesso frammento può reagire diversamente con differenti Ab monoclonali (16).

La scelta del calibratore da parte del produttore è complessa, poiché difficilmente essa rifletterà

l'eterogeneità dei prodotti di degradazione. Vi sono due possibili tipi di calibratore: il D-dimero purificato (con risultati in unità D-Dimero, DDU a 195 kDa) e la fibrina stabilizzata digerita con plasmina (con risultati in unità di fibrinogeno equivalenti, FEU a 340 kDa). Quindi il risultato del D-Dimero può essere espresso in relazione alla calibrazione dei singoli metodi in DDU o in FEU; dove  $FEU = 2 DDU$  (17,18).

Relativamente alla fase post-analitica ci sono diversi elementi a corredo del valore numerico, necessari per una corretta interpretazione; questi, se male utilizzati, possono dar luogo a confusione e possibili disinformazioni. Favaloro et al. hanno esaminato 21 lavori della recente letteratura ed è emerso che solo 3 riportavano il metodo utilizzato, in nessun lavoro, ad eccezione di uno, veniva specificato se il risultato era espresso in DDU o FEU; solo il 50% dei lavori riportava il livello decisionale; 2 non riportavano le unità di misura e 3 lavori riportavano unità sbagliate (19). Per esempio il lavoro di Wang et al., riporta i risultati del D-dimero in mg/L ma evidentemente sono valori riferiti a  $\mu\text{g/L}$ , dato che risultano 1000 volte superiori a quelli attesi (20); viceversa, i lavori di Gao et al. e Guo et al. riportano i valori in  $\mu\text{g/L}$ , ma risultano 1000 volte inferiori a quelli attesi (21,22).

Questa rassegna ci ha stimolato a valutare i dati relativi alla determinazione del D-dimero, in termini di espressione dei risultati, unità di misura e livelli decisionali, utilizzati dai partecipanti al programma di VEQ del Centro di Ricerca Biomedica per la Qualità in Medicina di Laboratorio (CRB, Azienda Ospedale-Università, Padova). Inoltre abbiamo studiato la variabilità interlaboratorio dei sistemi analitici maggiormente utilizzati, riscontrata negli ultimi 7 cicli di VEQ.

## METODI

Sono stati esaminati i dati relativi al D-dimero di 100 partecipanti al programma di VEQ per la coagulazione del CRB, in termini di espressione dei risultati, unità di misura e livelli decisionali. Ciò è reso possibile dal fatto che, per tutti i programmi di VEQ, la raccolta dei dati avviene mediante il sito web del CRB che permette al laboratorio di inserire i risultati e gli intervalli di riferimento (IR) o, nel caso del D-dimero, i livelli decisionali con le stesse modalità e unità di misura utilizzate per comunicare i risultati al clinico.

Inoltre è stata analizzata la variabilità analitica (CV%) dei sistemi analitici maggiormente utilizzati dai partecipanti, riscontrata per 4 livelli di concentrazione, su un totale di 72 campioni di controllo distribuiti negli ultimi 7 cicli di VEQ. Ogni ciclo di VEQ prevede l'analisi di 8 campioni, suddivisi in 4 esercizi.

I campioni di controllo sono costituiti da plasma liofilizzato, ottenuto da un pool di plasmi umani di donatori sani raccolti in citrato trisodico al 3,2%, opportunamente stabilizzato e liofilizzato. I plasmi con valori patologici sono ottenuti con un particolare procedimento di adsorbimento, per regolare l'attività dei fattori coagulativi a valori appropriati per riprodurre valori

Tabella 1

Caratteristiche dei sistemi analitici maggiormente utilizzati dai partecipanti alla VEQ.

	VIDAS, BioMérieux	STALiatest D-Di, Stago	Innovance, Siemens	HemosIL D-dimer HS, Werfen	HemosIL D-dimer HS 500, Werfen	Auto D-Dimero, Sclavo
<b>Strumento</b>		STA	Sysmex CA-1500	ACL TOP	ACL TOP	Sysmex CS-2100
<b>Metodo</b>	ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay)	Immunoturbidi- metrico con particelle al lattice	Immunoturbidi- metrico con particelle al lattice	Immunoturbidi- metrico con particelle al lattice	Immunoturbidi- metrico con particelle al lattice	Immunoturbidi- metrico con particelle al lattice
<b>Materiale antigenico per la calibrazione</b>	Prodotti di degradazione della fibrina	D-dimero purificato	Prodotti di degradazione della fibrina	D-dimero purificato	Prodotti di degradazione della fibrina	D-dimero purificato
<b>Limite di rivelabilità</b>	45 ng/mL, FEU	0,22 µg/mL, DDU	0,17 mg/L, FEU	69 ng/mL, DDU	146 ng/mL, FEU	50 ng/mL, DDU
<b>Intervallo di misura</b>	45 -10000 ng/mL, FEU	0,22 - 4,00 µg/mL, DDU 0,22 - 20,0 µg/mL, FEU	0,19 - 35,20 mg/L, FEU	150 - 3680 ng/mL, DDU	359 -7650 ng/mL, FEU	50 - 3500 ng/mL, DDU
<b>Sensibilità</b>	100% (82,0-100%)	100% (95,8-100%)	99% (97,0-99,0%)	100% (95,4 -100%)	100% (96,0-100%)	100% (93,3-100%)
<b>Specificità</b>	42% (37-46%)	55,2% (51,9-58,5%)	40% (38-40%)	46,8% (40,1-53,6%)	42,1% (36,6-47,8%)	69,2% (63,3-74,7%)
<b>Valore Predittivo negativo</b>	100%	100% (99,3-100%)	99,5%	100% (95,5-100%)	100% (97,2-100%)	100% (98-100%)
<b>Valore decisionale</b>	500 ng/mL, FEU	0,5 µg/mL, FEU	0,5 mg/L, FEU	250 ng/mL, DDU 500 ng/mL, FEU	500 ng/mL, FEU	200 ng/mL, DDU

DDU, unità di D-dimero; FEU, unità di fibrinogeno equivalenti.

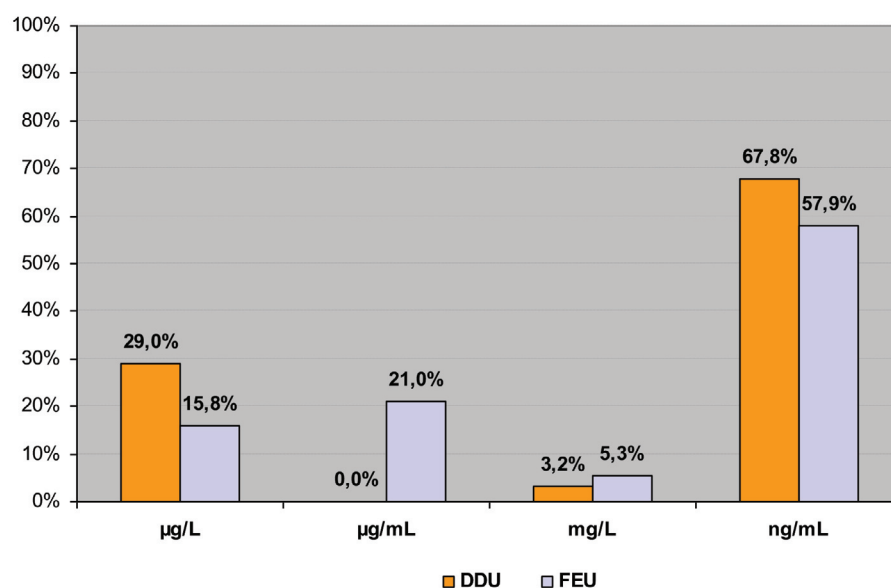


Figura 1

Unità di misura utilizzate dai partecipanti al programma di VEQ del CRB per la refertazione del D-dimero. CRB, Centro di Ricerca Biomedica; DDU, unità di D-dimero; FEU, unità di fibrinogeno equivalenti.

di plasmi patologici o di pazienti in terapia. I campioni di controllo sono spediti ai singoli laboratori partecipanti al programma di VEQ a due a due per un totale di 5 spedizioni/anno.

I sistemi analitici maggiormente utilizzati dai partecipanti nei cicli 2014-2020 sono i seguenti: HemosIL HS, Werfen (n = 36, min 19 - max 48), HemosIL HS-500, Werfen (n = 8, min 7 - max 9), Auto D-D, Sclavo (n = 12, min 7 - max 19), Innovance, Siemens (n = 14, min 7 - max 19), VIDAS, BioMérieux (n = 10, min 7 - max 18) e STALiatest, Stago (n = 9, min 7 - max 15). Sono tutti metodi immunoturbidimetrici che utilizzano particelle di lattice rivestite di Ab monoclonali ad eccezione di VIDAS che permette la determinazione immunoenzimatica dei prodotti di degradazione della fibrina nel plasma umano con la tecnica ELFA. In Tabella 1 sono riportate le relative caratteristiche con dati ricavati dalla letteratura (23-29).

I Programmi di VEQ del CRB raccolgono (in modo facoltativo) gli IR adottati dai laboratori partecipanti. Ad ogni ciclo di VEQ viene pubblicato un report con una rappresentazione grafica che mette in relazione i risultati di tutti i partecipanti, ottenuti dalla determinazione di un campione di controllo, con i rispettivi IR dichiarati. Per rendere confrontabili gli IR si chiede ai partecipanti di indicare quello riferito ad un maschio in età adulta (30).

## Analisi statistica

Per l'analisi della variabilità analitica intra-metodo (CV% medio) sono stati utilizzati, per ogni campione, i CV% medi di ciascun sistema analitico con numerosità di risultati >7, considerando solo i valori superiori al limite di rilevabilità indicato dal produttore.

## RISULTATI

### Espressione dei risultati e unità di misura

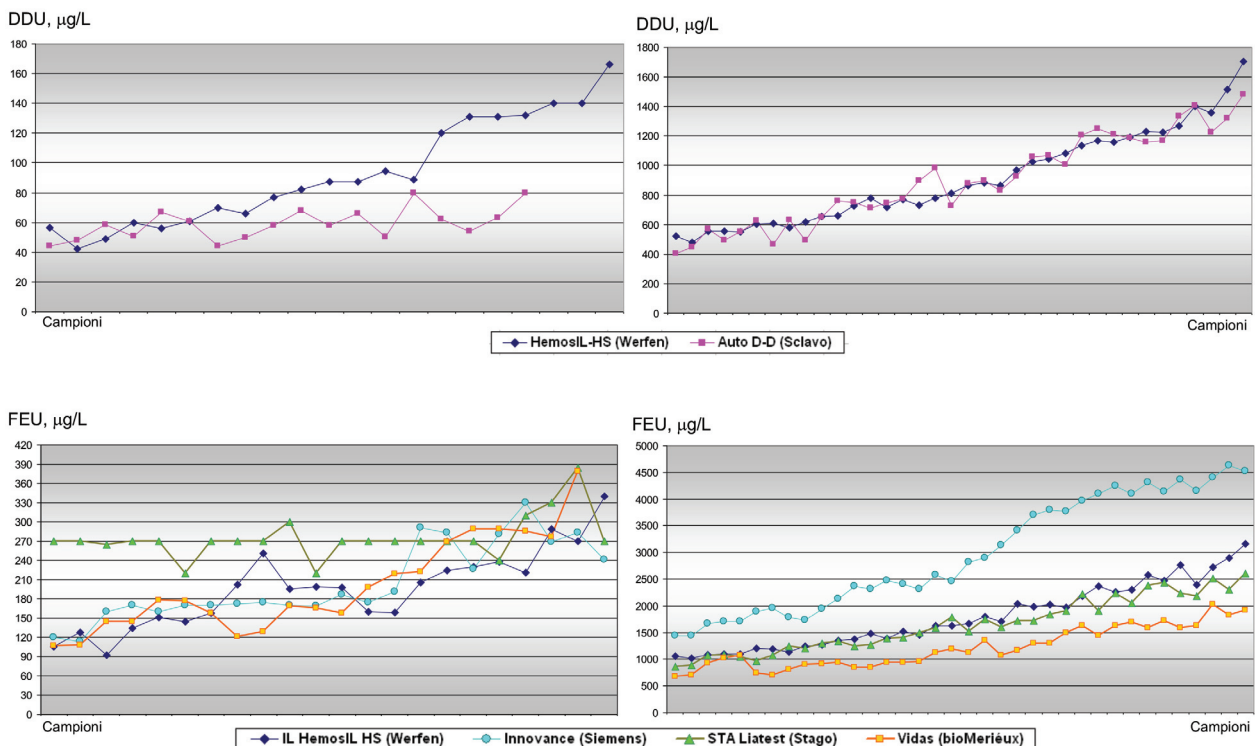
In Figura 1 sono riportate le unità di misura utilizzate dai partecipanti alla VEQ.

Attualmente circa il 55% dei partecipanti esprime i risultati in FEU, questa leggera prevalenza del FEU rispetto al DDU risulta pressoché costante negli ultimi 7 anni di VEQ con un valore medio di 55,6%.

Tra i partecipanti che esprimono il D-dimero in FEU, il 57,9% utilizza come unità di misura ng/mL, il 21,0% µg/mL, il 15,8% µg/L e il 5,3% mg/L. Tra i partecipanti che esprimono il D-dimero in DDU, il 67,8% utilizza ng/mL, il 29,0% µg/L, e il 3,2% mg/L.

### Variabilità analitica

In Figura 2 è riportato il valore medio del D-dimero,



**Figura 2**

Valori medi del D-dimero ( $\mu\text{g/L}$ ) dei diversi sistemi analitici utilizzati dai partecipanti alla VEQ del CRB, relativi a 72 campioni di controllo, rappresentati in funzione della concentrazione crescente.

I due pannelli di sinistra sono relativi a campioni di controllo con concentrazioni nell'ambito della normalità mentre i due pannelli di destra si riferiscono a campioni con concentrazioni patologiche. DDU, unità di D-dimero; FEU, unità di fibrinogeno equivalenti.

ottenuto con i diversi sistemi diagnostici, sui 72 campioni di controllo, ordinati a concentrazioni crescenti.

Relativamente ai campioni con concentrazioni inferiori al livello decisionale, si osserva un'ampia variabilità di risultati. Da notare che per i campioni di controllo a concentrazione bassa non tutti i laboratori forniscono il valore numerico, mentre altri riportano il risultato anche se inferiore al valore minimo dell'intervallo analitico indicato dal produttore. Per campioni patologici, le concentrazioni risultano sovrapponibili per i due sistemi diagnostici che sono calibrati con il D-dimero purificato e che quindi esprimono i risultati in DDU (HemosIL-HS e Auto D-D). Per i sistemi diagnostici calibrati con fibrina stabilizzata digerita con plasmina, e che quindi esprimono i risultati in FEU, le concentrazioni risultano pressoché sovrapponibili per HemosIL-HS e STALiatest, mentre Innovance fornisce valori notevolmente più elevati e VIDAS valori inferiori, lungo tutto l'intervallo di concentrazione.

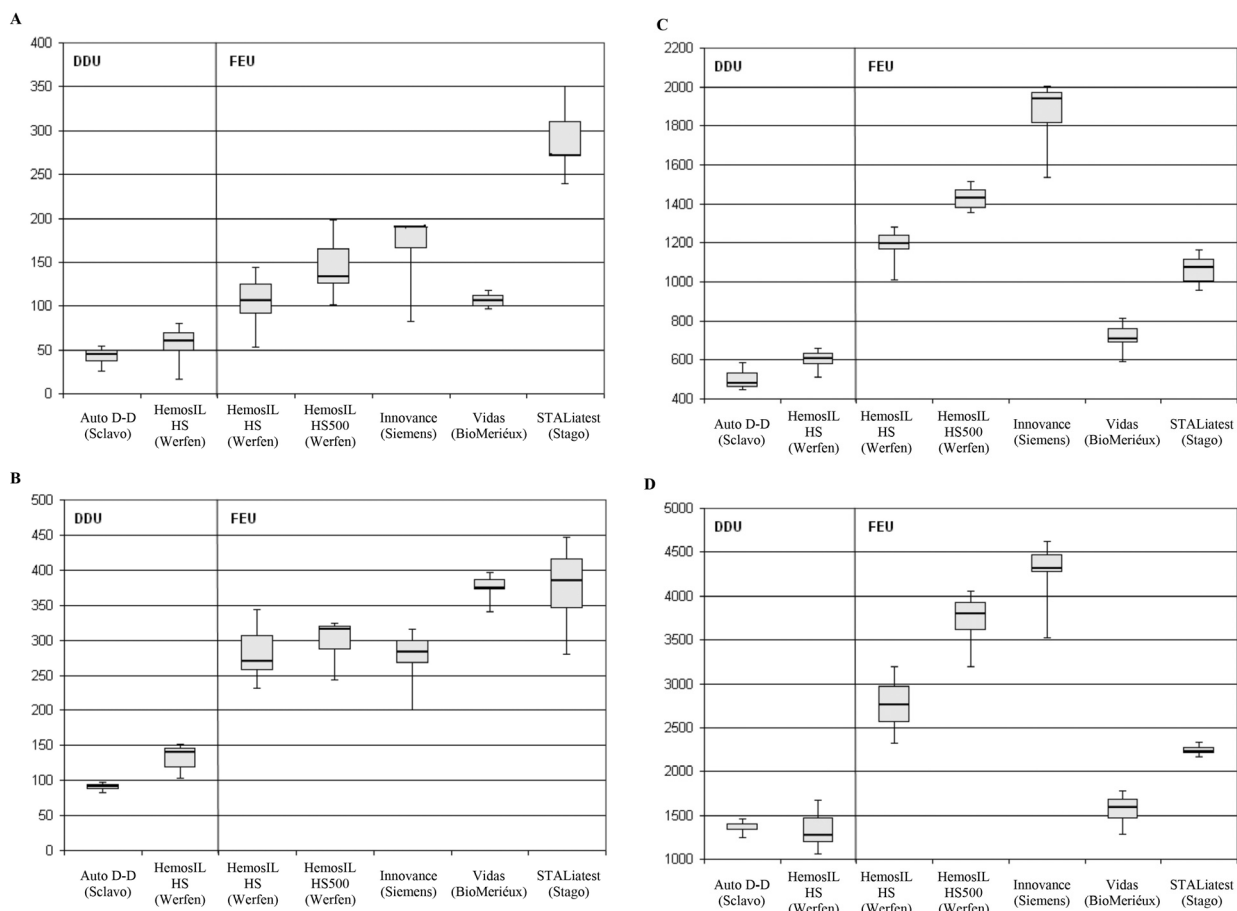
In Figura 3 il grafico a box-plot (diagramma a scatola

e baffi) riporta i risultati ottenuti su 4 campioni di controllo a diversa concentrazione (A, B, C, D) suddivisi per sistema analitico.

Sono compresi tutti i valori numerici forniti dai partecipanti anche se alcuni sono inferiori rispetto al limite di rilevabilità indicato dal produttore.

Per i due campioni con concentrazioni superiori al livello decisionale (C e D) le differenze tra i sistemi sono risultate pressoché costanti, mentre per i due campioni con concentrazioni inferiori al livello decisionale (A e B) si nota un diverso comportamento dei sistemi analitici studiati.

In Tabella 2 sono riportati i CV% medi riscontrati nei campioni di controllo suddivisi in 4 intervalli di concentrazione. Per valori di D-dimero inferiori al livello decisionale (livello 1 e 2) il CV% supera quello raccomandato del 10%, per tutti i sistemi analitici ad eccezione di VIDAS e STALiatest mentre per valori patologici (livello 3 e 4) è risultato <10% per tutti i sistemi analitici ed è compreso tra 4,5% e 7,2%.



**Figura 3**

Risultati del D-dimero ( $\mu\text{L}$ ), ottenuti con i sistemi analitici maggiormente utilizzati dai partecipanti al programma di VEQ del CRB, relativi a 4 campioni di controllo con valori nell'intervallo di normalità (A e B) e con valori patologici (C e D).

DDU, unità di D-dimero; FEU, unità di fibrinogeno equivalenti.

Tabella 2

Variabilità inter-laboratori dei principali sistemi utilizzati dai partecipanti alla VEQ.

Sistema analitico	Unità di misura	Numerosità	Livello	Intervallo analitico $\mu\text{g/L}$	N. campioni	CV% media $\pm$ DS
<b>Auto D-D</b> (Sclavo)	DDU	12 $\pm$ 5	1	50 - 115	14	22,1 $\pm$ 11,2
			2	63 - 170	5	12,6 $\pm$ 6,1
			3	402 - 896	16	5,0 $\pm$ 3,1
			4	728 - 1482	20	5,6 $\pm$ 2,5
<b>HemosIL-HS</b> (Werfen)	DDU	23 $\pm$ 4	1	70 - 131	17	16,8 $\pm$ 5,1
			2	108 - 166	8	12,4 $\pm$ 5,1
			3	480 - 780	16	5,9 $\pm$ 2,1
			4	781 - 1705	20	7,2 $\pm$ 3,7
<b>HemosIL-HS</b> (Werfen)	FEU	13 $\pm$ 4	1	82 - 251	26	14,8 $\pm$ 5,6
			2	206 - 340	8	13,5 $\pm$ 1,7
			3	1016 - 1517	16	4,5 $\pm$ 1,9
			4	1622 - 3158	20	6,2 $\pm$ 2,6
<b>HemosIL-HS500</b> (Werfen)	FEU	8 $\pm$ 1	1	151 - 227	11	16,3 $\pm$ 8,0
			2	316	1	8,2
			3	1430 - 2033	5	5,7 $\pm$ 3,2
			4	1858 - 3856	8	5,0 $\pm$ 1,9
<b>Innovance</b> (Siemens)	FEU	14 $\pm$ 4	1	160 - 191	12	11,5 $\pm$ 6,4
			2	227 - 331	8	12,4 $\pm$ 4,9
			3	1439 - 2468	16	6,4 $\pm$ 2,6
			4	2463 - 4629	20	6,1 $\pm$ 2,0
<b>Vidas</b> (BioMérieux)	FEU	10 $\pm$ 3	1	84 - 219	28	7,6 $\pm$ 3,0
			2	138 - 379	8	6,8 $\pm$ 4,6
			3	673 - 1071	16	5,6 $\pm$ 2,2
			4	1072 - 2019	20	5,3 $\pm$ 2,7
<b>STALiatest</b> (Stago)	FEU	9 $\pm$ 3	1	220 - 300	28	6,2 $\pm$ 5,6
			2	240 - 385	8	10,1 $\pm$ 8,7
			3	860 - 1490	16	5,7 $\pm$ 2,4
			4	1520 - 2600	20	4,6 $\pm$ 1,5

DDU, unità di D-dimero; FEU, unità di fibrinogeno equivalenti.

#### Livelli decisionali

In Figura 4 sono riassunti i livelli decisionali adottati dai partecipanti alla VEQ, relativi ad un maschio di 50 anni di età. Per quanto riguarda il D-dimero refertato come DDU, il livello decisionale maggiormente utilizzato è 250  $\mu\text{g/L}$ , come suggerito dai produttori, ma, anche nell'ambito dello stesso sistema analitico, alcuni laboratori fissano il livello decisionale a 200  $\mu\text{g/L}$  e uno a

300  $\mu\text{g/L}$ . Relativamente al D-dimero refertato in FEU, il livello decisionale maggiormente utilizzato è 500  $\mu\text{g/L}$ , un laboratorio lo fissa a 550  $\mu\text{g/L}$  e un altro a 400  $\mu\text{g/L}$ , pur nell'ambito dello stesso sistema analitico. Un errore da imputare alla fase post-analitica che riguarda vari costituenti è quello di esprimere i risultati con una unità di misura e il livello decisionale con una diversa unità come nel caso riportato in Figura 4.



8 modalità di refertazione diverse. Ed è particolarmente allarmante il possibile utilizzo di DDU o FEU (come riportato sopra FEU = 2 DDU), in due laboratori appartenenti allo stesso comprensorio ma a due diverse organizzazioni (esempio ULSS e Azienda Ospedaliera). Quando un paziente viene trasferito da una struttura che referta il D-dimero in DDU ad un'altra che utilizza il FEU, anche se con la stessa unità di misura, il risultato numerico del secondo laboratorio sarà il doppio del primo (300 µg/L DDU = 600 µg/L FEU) e questo può essere fuorviante per i clinici. Lo scambio di un risultato in DDU con quello in FEU e viceversa può infatti generare misure terapeutiche scorrette e la modalità di refertazione una concreta possibilità di rischio clinico.

### Variabilità analitica

La mancanza di un materiale di riferimento per il D-dimero rende impossibile il confronto diretto tra i risultati dei diversi sistemi. Anche i dati riportati in Figura 2 e 3 confermano che i risultati del D-Dimero sono sistema analitico-dipendenti. Tutti i metodi immunoturbidimetrici forniscono risultati (espressi in FEU) più elevati rispetto al metodo ELFA utilizzato da VIDAS (quello con le concentrazioni più elevate è Innovance). Se tra i sistemi immunoturbidimetrici e il metodo ELFA le differenze potrebbero essere dovute in parte alle diverse modalità di rilevazione, i bias sistematici tra i metodi immunoturbidimetrici indicano che alcune variabili (calibrazione, specificità anticorpale, applicazione del metodo, sostanze interferenti) sono scarsamente controllate.

Sono disponibili poche informazioni relative alle prestazioni dei sistemi analitici per la determinazione del D-dimero ottenute mediante Programmi di VEQ; tuttavia quelle disponibili hanno sempre evidenziato una grande variabilità di risultati tra i diversi sistemi analitici, alcuni dei quali possono fornire concentrazioni fino a 20 volte superiori a quelle di altri (36). Consistenti variazioni nella concentrazione del D-dimero, anche tenendo conto di possibili problemi di non-commutabilità dei materiali di controllo, erano già state osservate in passato sia nel nostro programma di VEQ (37), sia in un altro programma di VEQ italiano (38). Anche i risultati del programma di VEQ australiano, ottenuti su 3 campioni di controllo a diversa concentrazione, hanno evidenziato differenze tra i sistemi STALiatest e VIDAS analoghe a quelle riscontrate nel nostro studio (19). La scarsa armonizzazione nei risultati del D-dimero è sicuramente un problema internazionale: anche nello studio del College of American Pathologists (CAP) condotto dal 2004 al 2011 si è osservata un'ampia variabilità intermetodo, con CV fino al 42%, e per alcuni sistemi una scarsa riproducibilità (39).

Il programma di VEQ del CRB elabora i risultati solo per metodo omogeneo (stesso sistema analitico): per valori molto inferiori al livello decisionale, si è osservata un'ampia variabilità analitica (con CV% medi anche del 20%) e <10% solo per i sistemi analitici VIDAS e STALiatest, mentre per concentrazioni patologiche la

variabilità analitica è risultata contenuta per tutti i sistemi diagnostici.

La partecipazione a Programmi di VEQ, oltre ad essere un requisito fondamentale per l'accreditamento dei laboratori clinici (40), può aiutare i partecipanti nella scelta dei sistemi analitici che presentano una minore variabilità intra-metodo.

### Livelli decisionali

È noto che l'utilizzo di livelli decisionali incrementali in funzione dell'età rappresenta un elemento fondamentale per aumentare la specificità diagnostica di questo biomarcatore per la diagnosi e la valutazione prognostica dei pazienti con tromboembolismo venoso (41-43).

Dai dati raccolti mediante il programma di VEQ del CRB, non è possibile evincere quanti laboratori utilizzino per il D-dimero livelli decisionali diversi in funzione dell'età; è possibile solo riportare i livelli decisionali adottati dai partecipanti per un soggetto maschio di 50 anni.

La maggior parte dei partecipanti utilizza lo stesso livello decisionale, e precisamente quello riportato nei foglietti illustrativi dei vari produttori: 250 µg/L DDU e 500 µg/L FEU.

### Limiti dello studio

I campioni di controllo distribuiti nel corso dei vari cicli di VEQ, per la difficoltà nel reperire campioni di controllo a ben definite concentrazioni, rientrano nei valori o normali o patologici e pertanto non è stato possibile trarre conclusioni per valori di D-dimero vicini al livello decisionale.

Nei programmi di VEQ del CRB le informazioni relative agli IR e ai livelli decisionali, sono raccolte su base volontaria e si chiede ai partecipanti di riferirli ad un soggetto adulto maschio (50 anni). Non è stato possibile pertanto valutare se i partecipanti impiegano livelli decisionali fissi o aggiustati per età e la relativa concordanza.

### CONCLUSIONI

Il nostro studio evidenzia ancora una volta la necessità di armonizzare le modalità di refertazione del D-dimero nei laboratori italiani (44,45).

Questa necessità emerge ancor più quando si riportano i dati degli studi relativi al COVID-19, data l'importanza che può avere questo parametro nell'influenzare il processo decisionale clinico (19,46).

Nella Comunicazione dell'International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH) viene raccomandato di indicare sempre: il tipo di sistema analitico utilizzato e le sue caratteristiche (come ad esempio sensibilità, specificità); di refertare i risultati in FEU, µg/L; di indicare sempre il livello decisionale (47). I Programmi di VEQ possono essere un valido supporto alla diffusione di queste raccomandazioni e avere un

importante ruolo nel promuovere l'armonizzazione nella refertazione di questo utile biomarcatore (48,49).

### CONFLITTO DI INTERESSE

Nessuno.

### BIBLIOGRAFIA

1. Tripodi A. D-dimer testing in laboratory practice. *Clin Chem* 2011;57:1256-62. *Biochim Clin* 2012;36:196-203.
2. Morelli B, Montaruli B, Bazzan M, et al. Alterazioni dei meccanismi dell'emostasi in corso di infezione da SARS-CoV-2 (COVID-19). *Biochim Clin* 2020;44:15-6.
3. Lippi G, Favaloro EJ. D-dimer is associated with the severity of Coronavirus disease 2019: a pooled analysis. *Thromb Haemost* 2020;120:876-7.
4. Tang N, Bai H, Chen X, et al. Anticoagulant treatment is associated with decreased mortality in severe coronavirus disease 2019 patients with coagulopathy. *J Thromb Haemost* 2020;18:1094-9.
5. Yao Y, Cao J, Wang Q, et al. D-dimer as a biomarker for disease severity and mortality in COVID-19 patients: a case control study. *JINC* 2020;8:49. Doi:10.1186/s40560-020-00466-z
6. Yu H-H, Qin C, Chen M, et al. D-dimer is associated with the severity of COVID-19. *Thromb Res* 2020;195:219-25.
7. Li Y, Zhao K, Wei H, et al. Dynamic relationship between D-dimer and COVID-19. *Br J Haematol* 2020;190, e1-e38.
8. Thachil J, Lippi G, Favaloro EJ. D-dimer testing: laboratory aspects and current issues. *Methods Mol Biol* 2017; 1646:91-104.
9. Favresse J, Lippi G, Roy PM, et al. D-dimer: preanalytical, analytical, postanalytical variables, and clinical applications. *Crit Rev Clin* 2018;55:548-77.
10. Gaffney PJ, Edgell T, Creighton-Kempford LJ, et al. Fibrin degradation product (FnDP) assays: analysis of standardization issues and target antigens in plasma. *Br J Haematol* 1995;90:187-94.
11. Nieuwenhuizen W. A reference material for harmonisation of D-dimer assays. Fibrinogen Subcommittee of the Scientific and Standardization Committee of the International Society of Thrombosis and Haemostasis. *Thromb Haemost* 1997;7:1031-3.
12. Dempfle CE, Zips S, Ergul H, et al. The fibrin assay comparison trial (FACT): correlation of soluble fibrin assays with D-dimer. *Thromb Haemost* 2001;86:1204-9.
13. Meijer P, Klufft C. The harmonization of quantitative test results of different D-dimer methods. *Semin Vasc Med* 2005;5:321-7.
14. Meijer P, Haverkate F, Klufft C, et al. A model for the harmonisation of test results of quantitative D-dimer methods. *Thromb Haemost* 2006;95:567-72.
15. Jennings I, Woods TA, Kitchen DP, et al. Laboratory D-dimer measurement improved agreement between methods through calibration. *Thromb Haemost* 2007;98:1127-35.
16. Madoiwa S, Kitajima I, Ohmori T, et al. Distinct reactivity of the commercially available monoclonal antibodies of D-dimer and plasma FDP testing to the molecular variants of fibrin degradation products. *Thromb Haemost* 2013;132:457-64.
17. Riley RS, Gilbert AR, Dalton JB, et al. Widely used types and clinical applications of D-Dimer assay. *Lab Medicine* 2016;47:90-102.
18. Johnson ED, Schell JC, Rodgers GM. The D-dimer assay. *Am J Hematol* 2019;94:833-9.
19. Favaloro EJ, Thachil J. Reporting of D-dimer data in COVID-19: some confusion and potential for misidentification. *Clin Chem Lab Med* 2020;58:1191-9.
20. Wang D, Hu B, Hu C, et al. Clinical characteristics of 138 hospitalized patients with 2019 novel coronavirus-infected pneumonia in Wuhan, JAMA 2020;323:1061-9.
21. Gao Y, Li T, Han M, et al. Diagnostic utility of clinical laboratory data determinations for patients with the severe COVID-19. *J Med Virol* 2020;92:791-6.
22. Guo W, Li M, Dong Y, et al. Diabetes is a risk factor for the progression and prognosis of COVID-19. *Diabetes Metab Res Rev* 2020 Mar 31;e3319. doi: 10.1002/dmrr.3319.
23. Pittet JL, De Moerloose P, Reber G, et al. VIDAS® D-dimer: fast quantitative ELISA for measuring D-dimer in plasma. *Clin Chem* 1996;42:410-5.
24. Mountain D, Jacobs I, Haig A. The VIDAS D-dimer test for venous thromboembolism: a prospective surveillance study shows maintenance of sensitivity and specificity when used in normal clinical practice. *Am J Emerg Med* 2007;25:464-71.
25. Herak DC, Milos M, Zadro R. Evaluation of the Innovance D-Dimer analytical performance. *Clin Chem Lab Med* 2009;47:945-51.
26. De Moerloose P, Vanrusselt M, Reber G, et al. Performances of the Hemosil D-dimer HS assay for the exclusion of venous, thromboembolism *J Thromb Haemost* 2005;3:2361-3.
27. Legnani C, Cini M, Scarvelis D, et al. Multicenter evaluation of a new quantitative highly sensitive D-dimer assay, the Hemosil D-dimer HS 500, in patients with clinically suspected venous thromboembolism. *Thromb Res* 2010;125:398-401.
28. Aguilar C, Sartori M, D'Angelo A, et al. on behalf of the DiET Study Group. Validation of the STA-Liatest DDi assay for exclusion of proximal deep vein thrombosis according to the latest Clinical and Laboratory Standard Institute/Food and Drug Administration guideline: results of a multicenter management study. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2018;29:562-6.
29. Legnani C, Cini M, Frascaro M, et al. Diagnostic accuracy of a new D-Dimer assay (Sclavo Auto D-Dimer) for exclusion of deep vein thrombosis in symptomatic outpatients. *Clin Appl Thromb* 2017;23:221-8.
30. Plebani M. Harmonization in laboratory medicine: requests, samples, measurements and reports. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2015;15:1-13.
31. Secchiero S, Sciacovelli L, Faggian A, et al. Gli strumenti di assicurazione della Qualità in Medicina di Laboratorio: i Programmi di VEQ e gli Indicatori di Qualità del Centro di Ricerca Biomedica. *Ligand Assay* 2013;18:41-53.
32. Lippi G, Tripodi A, Simudic AM, et al. International survey on D-dimer test reporting: a call for standardization. *Semin Thromb Hemost* 2015;41:287-93.
33. Lippi G, Morelli B, Tripodi A. Indagine sulla modalità di refertazione dell'esame D-dimero nei laboratori nazionali e indicazioni per una sua armonizzazione. *Biochim Clin* 2015;39:591-4.
34. Lippi G, Cervellin G, Casagrande I, et al. D-dimer testing for suspected venous thromboembolism in the emergency department. Consensus document of AcEMC, CISMEL, SIBioC, and SIMEI. *Clin Chem Lab Med* 2014;52:621-8.
35. Lippi G, Cervellin G, Casagrande I, et al. Documento di consenso di "Academy of Emergency Medicine and Care", Comitato Italiano per la standardizzazione dei metodi ematologici e di laboratorio, SIBioC – Medicina di Laboratorio e Società Italiana di Medicina di laboratorio sull'utilizzo del dosaggio del D-dimero per il sospetto di tromboembolismo venoso in condizioni di urgenza. *Biochim Clin* 2014;38:136-8.

36. Spannagl M, Haverkate F, Hans R, et al. The performance of quantitative D-dimer assays in laboratory routine. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2005;16:439-43.
37. Plebani M, Sanzari MC, Zardo L. Quality control in coagulation testing. *Semin Thromb Hemost* 2008;34:642-6.
38. Tripodi A, Chantarangkul V. Performance of quantitative D-dimer methods: results of the Italian external quality assessment scheme. *J Thromb Haemost* 2007;5:184-5.
39. Olson JD, Cunningham MT, Higgins RA, et al. D-dimer – Simple test, tough problems. *Arch Pathol Lab Med* 1913; 137:1030-8.
40. ISO 15189:2012. Medical laboratories. Requirements for quality and competence. International Organization for Standardization, Geneva 2012.
41. Legnani C, Palareti G, Cosmi B, et al. for the PROLONG Investigators on behalf of FCSA, Italian Federation of Thrombosis Centers). Different cut-off values of quantitative D-dimer methods to predict the risk of venous thromboembolism recurrence: a post-hoc analysis of the PROLONG study. *Haematol* 2008;93:900-7.
42. Lippi G, Favalaro EJ, Cervellin G. A review of D-dimer testing for prediction of recurrent venous thromboembolism with increasing age. *Semin Thromb Hemost* 2014;40:634-9.
43. Palareti G, Legnani C, Antonucci E, et al. for the DULCIS (D-dimer and ULtrasonography in Combination Italian Study) Investigators. D-dimer testing, with gender-specific cutoff levels, is of value to assess the individual risk of venous thromboembolic recurrence in non-elderly patients of both genders: a post hoc analysis of the DULCIS study. *Intern Emerg Med* 2020;15:453-62.
44. Longstaff C, Adcock D, Olson JD, et al. Harmonisation of D-dimer – A call for action. *Thromb Res* 2016;137:219-20.
45. Favalaro EJ, Lippi G. On the complexity of hemostasis and the need for harmonization of test practice. *Clin Chem Lab Med* 2018;56:1568-74.
46. Aloisio E, Serafini L, Chibireva M, et al. Hypoalbuminemia and elevated D-dimer in COVID-19 patients: a call for result harmonization. *Chin Chem Lab Med* 2020;58:e255-6.
47. Tachil J, Longstaff C, Favalaro E, et al. The need for accurate D-dimer reporting in COVID-19: Communication from the ISTH SCC on fibrinolysis. *J Thromb Haemost* 2020;18:2408-11.
48. Preston FE, Lippi G, Favalaro EJ. Quality issues in laboratory haemostasis. *Haemophilia* 2010;16, Suppl 5:93-9.
49. Favalaro EJ, Jennings I, Olson J, et al. Towards harmonization of external quality assessment/proficiency testing in hemostasis. *Chin Chem Lab Med* 2019;57:115-26.