

## 血浆中 D-二聚体胶乳增强免疫比浊试剂的开发及性能评价

王 艳, 洪素宾

英科新创(厦门)科技股份有限公司 福建厦门

**【摘要】目的** 依据胶乳增强免疫比浊法的基本原理, 研究 D-二聚体检测方法。**方法** 通过共价交联制备胶乳微球-抗体结合物, 观察胶乳微球-抗体结合物和 D-二聚体的凝集反应, 确备 D-二聚体的检测方法, 并对该方法的准确度、精密度、线性和临床一致性进行评价。**结果** 重复测定 2 个浓度的质控品各 20 次, 其批内、日间精密度变异系数(CV) < 5%; 线性范围为 0.2~20.0 $\mu\text{g/mL}$ , 平均回收率为 93.5%, 与商品化试剂盒临床相关系数为 0.995。**结论** 该研究制备了胶乳比浊法的 D-二聚体检测方法, 各项性能满足临床使用需求, 可用于临床 D-二聚体的检测。

**【关键词】** D-二聚体; 乳胶增强免疫比浊; 试剂评价

**【收稿日期】** 2022 年 10 月 10 日 **【出刊日期】** 2022 年 12 月 13 日 **【DOI】** 10.12208/j.ijmd.20220320

### Development and Performance Evaluation of Plasma D-Dimer Latex for Immunoturbidimetric Enhancement

Yan Wang, Subin Hong

Inke Innovation (Xiamen) Technology Co., LTD, Xiamen, Fujian

**【Abstract】 Objective:** To study the D-dimer detection method based on the basic principle of latex enhanced immunoturbidimetric method. **Methods:** Latex microsphere-antibody conjugate was prepared by covalent cross-linking, and the agglutination reaction between latex microsphere-antibody conjugate and D-dimer was observed. The D-dimer detection method was confirmed, and the accuracy, precision, linearity and clinical consistency of the method were evaluated. **Results:** The variation coefficient (CV) of intra-batch and intra-day precision of the two quality control products was < 5%. The linear range was 0.2-20.0  $\mu\text{g/mL}$ , the average recovery was 93.5%, and the clinical correlation coefficient with commercial kit was 0.995. **Conclusion:** This study prepared the latex turbidimetric method for the detection of D-dimer, the performance can meet the requirements of clinical use, can be used for clinical detection of D-dimer.

**【Keywords】** D-dimer; Latex enhances immune turbidity; Reagent evaluation

#### 前言

D 二聚体是纤维蛋白原经凝血酶、活化的因子作用下聚合、交联, 再经纤溶酶降解后形成的一种可溶性纤维蛋白降解产物。只有凝血发生后, 交联纤维蛋白形成和降解的 D-二聚体才能被激活, 因此 D-二聚体被作为反映体内血浆高凝状态及纤溶系统激活的重要分子标志物<sup>[1]</sup>。近 20 年来, D-二聚体在多种疾病临床诊断和病情监测中都有着广泛应用<sup>[2]</sup>, 如静脉血栓栓塞症(VTE) 的诊断、弥漫性血管内凝血(DIC)的预后判断、心脑血管疾病和恶性肿瘤的辅助诊断、等<sup>[3-4]</sup>。常用的 D-二聚体检测方法有酶联免疫吸附法、免疫比浊法与胶体金法。

#### 1 材料与方法

##### 1.1 试剂与仪器

抗 D-二聚体抗体、D-二聚体质控品、乳胶微球由英科新创(厦门)科技股份有限公司提供。对照试剂为北京九强生物技术股份有限公司生产的 D-二聚体测定试剂盒(胶乳免疫比浊法), 注册证号: 京械注准 20172400926。测定仪器为 Hitachi 7180 型全自动生化分析仪。

##### 1.2 样本收集

##### 1.3 方法和判断标准

(1) 检测原理, 样品中的 D-二聚体与试剂中

包被有特异性 D-二聚体抗体的胶乳微球结合, 使胶乳微球连接起来形成较大的结合物, 从而凝集, 引起反应体系浊度产生变化。在一定范围内, 浊度增加与 D-二聚体浓度呈正相关。通过标准液得出的回归方程, 再通过测量待测样品的浊度计算出样品中 D-二聚体浓度。

(2) 分析参数, 使用 Hitachi7180 全自动生化分析仪, 分析方法为两点终点法, 分析参数: 试剂 1 用量 180  $\mu\text{L}$ 、试剂 2 用量 60  $\mu\text{L}$ 、样本量 4  $\mu\text{L}$ 、波长 700nm。测定步骤: 将试剂 1 和样品加入比色杯, 混合均匀, 37 $^{\circ}\text{C}$  孵化 5min, 加入试剂 2, 混合均匀后 60s 读取此时的吸光度 A1, 继续孵化 4min 读取吸光度 A2, 计算二者吸光度的差值(A2-A1)。样品、校准品、质控品均按照以上方法测定。以各浓度校准品对应的吸光度差值绘制曲线, 以 Logit-Log(4P)函数曲线进行拟合得到校准曲线。将通过上述方法测得样品、质控品的吸光度差值代入校准曲线方程, 计算得到样品、质控品的浓度。

(3) 灵敏度: 将浓度 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 D-二聚体质控品用去离子水稀释成 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 接着将 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$  的样本稀释成 0.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 这样就得到了 5 个不同浓度的样本, 将每个样品都重复测试 10 次, 并分别计算出  $\bar{x}$ 、 $s$ 、 $CV$ 。以  $CV < 10\%$  的最低浓度作为最低检出灵敏度。

(4) 精密度: 参照 CLSI EP5A 的有关要求对精密度进行评价, 取 DD 低、中、高三种浓度的混合血浆样本各一份, 分别作批内和日间测试, 在 4 小时内将 3 份样本分别重复测定 20 次, 然后再每天测定 1 次, 连续测定 20 天, 分别计算平均值( $\bar{x}$ )、标准偏差( $s$ )和异系数( $CV$ )。实验时, 均应由同一人或同一组操作者在同一台仪器上进行, 试剂、校准品的批号应相同。

(5) 回收率: 将两个不同 DD 浓度的血浆样本 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 按照 9:1、19:1、39:1 比例混合配置测试样品, 每个样本分别测试 3 次, 分别计算平均值, 算出回收率。

$$R = \frac{C \times (V_0 + V) - C_0 \times V_0}{C_s \times V} \times 100\%$$

式中: R-回收率; C-混合样品的检测浓度; V-高浓度血浆体积;

$V_0$ -低浓度血浆体积;  $C_s$ -高浓度血浆值;  $C_0$ -低

浓度血浆值。

(6) 线性实验: 参照 CLSI EP6 的有关要求对线性进行评价。将 DD 浓度为 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$  的样本作高浓度, 并将其与低浓度样本 (0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 做 3/4、1/2、1/4、1/8、1/16、1/32 稀释, 并依次按从低到高、从高到低对以上浓度样品分别测定 3 次, 以理论计算值为期望值为横坐标  $x$ , 以测定结果均值为纵坐标  $y$ , 对期望值与测定值进行直线回归分析。

(7) 与商品试剂一致性评价试验: 参照 CLSI EP9-A2 的有关要求对线性进行评价。于临床单位各收集样本, 以对照试剂的测定结果考察本研究 DD 胶乳增强免疫比浊试剂在 Hitachi 7180 型全自动生化分析仪上的测定结果。

(8) 统计分析: 用 SPSS17.0 统计软件计算两组结果的相关系数和直线回归方程。

## 2 结果

### 2.1 试剂盒的制备

(1) 试剂 150mmol/L 吗啉乙磺酸缓冲液 (MES), 0.5%的氯化钠, 1%的聚乙二醇 6000, pH=6.5。

(2) 试剂 2 聚苯乙烯微球的活化: 1)用缓冲液将聚苯乙烯粒子稀释后, 加入 N-羟基琥珀酰亚胺溶液, 混合均匀、搅拌; 2)缓慢以 2-吗啉乙磺酸缓冲液溶解的碳化二亚胺, 得到浓度为 10mg/mL 的碳化二亚胺溶液; 3)以微球溶液中所含聚苯乙烯微球的重量为计, 将碳化二亚胺溶液滴加至微球溶液中, 震荡活化 1h, 得到活化聚苯乙烯微球溶液; 4)继续搅拌反应 30~60min 之后离心、超声洗涤溶解到缓冲液中, 即得到聚苯乙烯微球溶液; 5) 抗体的偶联: 向聚苯乙烯微球溶液中滴加抗体溶液, 使活化聚苯乙烯微球与抗体上的氨基耦合, 震荡反应 6~8h; 6) 微球的封闭: 向震荡反应过程中的混合液加入 1%牛血浆白蛋白; 7) 洗涤、溶解: 将震荡反应结束后的混合物经过离心去上清液、超声洗涤 2 次后, 溶解到缓冲液中, 即得 D-二聚体检测试剂。

### (3) 校准品的配制

a) 取适量的 D-二聚体溶解于缓冲液中, 搅拌过夜反应, 离心得到 D-二聚体溶液;

b) 以九强的 D-二聚体校准品、检测试剂盒对配置的 D-二聚体溶液进行赋值。

c) 将 D-二聚体用缓冲液稀释几个不同的浓度, 再加入 BSA、甘露醇、氯化钠、叠氮钠混合均

匀, 以每瓶 0.5mL 分装进行冷冻干燥, 每次使用时加入 0.5mL 纯化水复溶后使用。

2.2 D-二聚体检测试剂性能评价

(1) 灵敏度:

检测结果见表 1。本检测方法对 D-二聚体的检测灵敏度为 0.1μg/mL。

(2) 精密度:

检测结果见表 2、表 3。批内重复性平均 CV 为 1.71%; 日间精密度平均 CV 为 1.95%。

(3) 回收率:

平均回收率 93.5%, 见表 4

(4) 线性实验:

按照上述方法配制的 8 份样本用于线性实验, 进行直线回归统计分析, 见图 1。回归方程为  $Y=0.9937X+0.1689$ ,  $r^2=0.999$ 。表明 D-D 试剂在 0.20-20.0μg/mL 浓度范围内呈线性。

(5) 与商品试剂对照试验

共测试临床样本 50 例, 其中超过参考区间上限的样本有 14 例, 该试剂与对照试剂测定临床结果的回归分析方程为  $y=0.994x+0.0199$ , 相关系数  $r^2=0.9958$ 。表明该检测试剂与对照试剂具有良好的相关性, 见图 2。

表 1 D-二聚体灵敏度分析

项目	0.05μg/mL	0.1μg/mL	0.2μg/mL	0.3μg/mL	0.5μg/mL
$\bar{x}(\mu\text{g/mL})$	0.040	0.109	0.213	0.308	0.518
$S(\mu\text{g/mL})$	0.0170	0.0099	0.0189	0.0225	0.0266
CV(%)	42.49%	9.12%	8.87%	7.31%	5.13%

表 2 DD 高、中、低三种水平的批内重复性分析

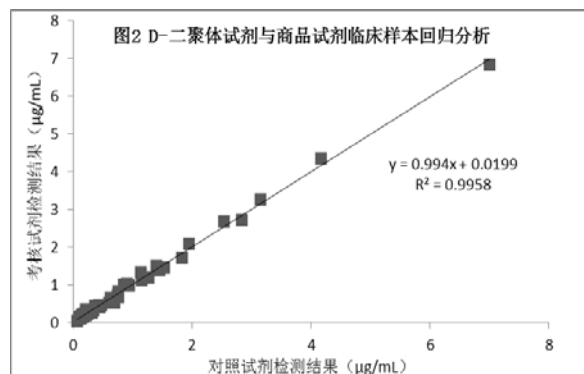
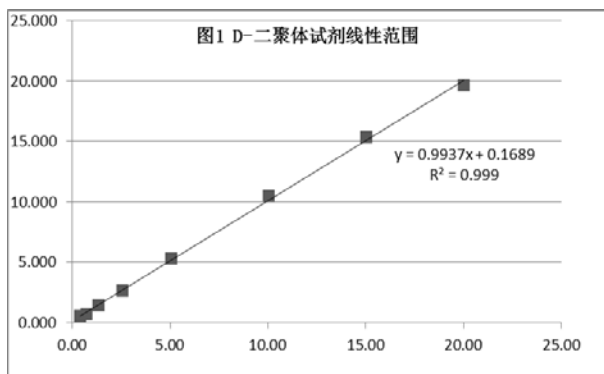
组别	均值 (μg/mL)	标准差	批内变异	平均 CV%
低值	1.132	0.035	3.12	1.71
中值	5.137	0.068	1.33	
高值	10.610	0.070	0.66	

表 3 DD 高、中、低三种水平的日间精密度分析

组别	均值 (μg/mL)	标准差	日间变异	平均 CV%
低值	1.108	0.041	3.73	1.95
中值	5.152	0.072	1.40	
高值	10.626	0.076	0.71	

表 4 回收率实验结果

D-二聚体测定值 (μg/mL)	低浓度血浆	高浓度血浆	混合比例	回收浓度	回收率 (%)
样本 1			9:1	2.03	95.5%
样本 2	1.13	10.61	19:1	1.57	93.6%
样本 3			39:1	1.34	91.1%



### 3 讨论

D-二聚体作为一种可提示凝血和继发性纤溶活性异常的标记物, 具有测定简便快速, 准确性好且较为敏感的特点。D-二聚体阴性检测结果可作为静脉血栓栓塞(VTE)可疑患者的排除诊断标准<sup>[5, 6]</sup>; 又是弥漫性血管内凝血(DIC)实验室诊断的标志物之一。此外, D-二聚体还可在动脉血栓、心脑血管疾病、肿瘤与多种疾病中作为辅助诊断的指标<sup>[5]</sup>。

本方法以免疫比浊法的基本原理为指导, 建立了可在自动生化分析仪上定量测定D-二聚体的胶乳增强透射免疫分析法; 并对试剂进行了精密度、线性范围、检测限、等方法学评价试验, 可见本方法研制的试剂具有较满意的方法学性能; 同时与临床上认可度良好的商品试剂进行了临床标本检测的对比实验, 研究证实本检测方法与国产商品试剂有很好的相关性, 满足临床使用需求。上述工作为该法的产业化以及临床推广应用奠定了基础。

### 参考文献

- [1] Weitz JI, Fredenburgh JC, Eikelboom JW. A Test in Context: D-Dimer [J]. J Am Coll Cardiol, 2017, 70(19): 2411-2420.

- [2] 王兆钺. D-二聚体临床应用的进展[J]. 血栓与止血学, 2014, 20(1): 46-48.
- [3] 周佳子. 血浆D-二聚体检测对临床疾病诊疗分析评价[J]. 世界最新医学信息文摘, 2019, 19(25): 153-155.
- [4] 陈聪, 蔡毅. 重组组织型纤溶酶原激活剂静脉溶栓对急性脑梗死患者血浆D-二聚体的影响分析[J]. 中国地方病防治杂志, 2017, 32(07): 805-806.
- [5] 王兆钺. D-二聚体临床应用的进展[J]. 血栓与止血学, 2014, 20(1): 46-48.
- [6] 中华医学会外科学分会血管外科学组. 深静脉血栓形成的诊断和治疗指南(第二版)[J]. 中华外科杂志, 2012, 50: 611-614.

**版权声明:** ©2022 作者与开放获取期刊研究中心(OAJRC)所有。本文章按照知识共享署名许可条款发表。

<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



**OPEN ACCESS**