

## • 论 著 •

## Sysmex CS5100 检测高浓度 D-二聚体的稀释验证分析

颜楠,屈玲,郑善銮,郝晓柯<sup>△</sup>

(第四军医大学第一附属医院西京医院检验科,西安 710032)

**摘要:**目的 探讨高浓度 D-二聚体在抗原过剩情况下是否需要进行稀释处理及最适稀释倍数。方法 采用 Sysmex CS5100 分析仪对 D-二聚体质控品与校准品进行检测,计算批内与日间精密度。检测校准品进行线性范围及临床可报告范围验证。对 D-二聚体水平小于 5 mg/L、纤维蛋白降解产物(FDP)<20 μg/mL 的标本进行梯度稀释,检测并计算回收率。对 D-二聚体水平大于 5 mg/L、FDP>20 μg/mL 的标本进行梯度稀释,检测并计算回收率。结果 批内及日间精密度分析结果显示,批内及日间变异系数均小于 3%。线性范围验证结果显示,0.207~5.170 mg/L 范围内线性分布良好。临床可报告范围为 0.207~165.440 mg/L。D-二聚体水平小于 5 mg/L、FDP<20 μg/mL 时,D-二聚体检测无抗原过剩现象,无需进行梯度稀释检测。D-二聚体水平大于 5 mg/L、FDP>20 μg/mL 时,D-二聚体检测存在抗原过剩现象,需进行稀释处理。结论 当标本 D-二聚体水平大于 5 mg/L、FDP>20 μg/mL 时,D-二聚体检测存在抗原过剩现象,需进行稀释处理,从而保证高浓度 D-二聚体标本检测结果的准确性。

**关键词:**Sysmex CS5100; D-二聚体; 批内精密度; 日间精密度; 线性范围; 临床可报告范围; 高浓度; 稀释

**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2017.12.017

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2017)12-1630-04

## Dilution validation of high level D-dimer samples in Sysmex CS5100 instrument

YAN Nan, QU Ling, ZHENG Shanluan, HAO Xiaoke<sup>△</sup>

(Clinical laboratory, the First Affiliated Hospital/Xikong Hospital, the Fourth Military Medical University, Xian, Shaanxi 710032, China)

**Abstract: Objective** To investigate the necessity of dilution in samples with high concentrations of D-Dimer and optimum dilution multiple. **Methods** Quality control products and calibration were detected by using Sysmex CS5100 for precision evaluation, including within-batch and between-run precision. Calibration were detected for validation of linear range and clinical reportable. Samples with D-Dimer<5 mg/L and fibrinogen degradation products(FDP)<20 μg/mL were serially diluted and detected to calculate recovery rate. Samples with D-Dimer>5 mg/L and FDP>20 μg/mL were also serially diluted and detected to calculated recovery rate. **Results** Within-batch and between-run coefficients of variation were both less than 3%. Within the scope of 0.207~5.170 mg/L, the linear distribution was fine. The clinical reportable range was 0.207~165.440 mg/L. For samples with D-Dimer<5 mg/L and FDP<20 μg/mL, no antigen excess phenomenon was found, and gradient dilution was not necessary. For samples with D-Dimer>5 mg/L and FDP>20 μg/mL, there was obvious antigen excess phenomenon, and gradient dilution was required. **Conclusion** For samples with D-Dimer>5 mg/L and FDP>20 μg/mL, dilution should be performed to ensure the accuracy of detected results.

**Key words:**Sysmex CS5100; D-dimer; within-batch; between-run precision; linear range; clinical reportable range; high concentration; dilution

血浆中的 D-二聚体是交联纤维蛋白经纤溶酶水解后的产物之一<sup>[1]</sup>。在凝血级联反应过程后期,纤维蛋白原在凝血酶的作用下形成纤维蛋白单体(FM),彼此以氢键连接、聚合,形成不稳定的可溶性 FM 聚合物(SFM);在 X Ⅲa 因子和钙离子作用下,SFM 的 γ 链和 δ 链之间以共价键(-CO-NH-)交联,形成不溶性的 FM 聚合物,即交联纤维蛋白凝块(血栓)<sup>[2]</sup>,并引发纤维蛋白溶解系统的继发性功能亢进。在纤溶酶的作用下,交联纤维蛋白降解,生成 X'、Y'、D、E' 碎片的同时,生成 D-二聚体及不同相对分子质量的 D-二聚体片段复合物,包括 DY、XD、XY 等。这些产物统称为纤维蛋白降解产物(FDP),其中 D-二聚体是交联纤维蛋白降解的最小产物。采用免疫比浊法检测时,若 D-二聚体浓度异常升高,会出现抗原过剩现象,影响检测结果准确性,无法真实反映标本 D-二聚体水平,因此需

对标本进行稀释。本文探讨了需要对标本进行稀释处理的 D-二聚体与 FDP 浓度水平,以及稀释处理方法,并同时将日本希森美康公司 CS5100 型全自动血凝分析仪(Sysmex CS5100 分析仪)检测 D-二聚体的部分性能验证结果报道如下。

## 1 资料与方法

1.1 仪器与试剂 日本希森美康公司 CS5100 分析仪。德国西门子公司 D-二聚体检测试剂盒(INNOVANCE D-Dimmer),包括检测试剂、缓冲液、补充试剂等<sup>[3]</sup>。试剂盒批号与规格见表 1。

1.2 标本来源 批内、日间精密度验证实验选择质控品与校准品进行检测。线性范围与临床可报告范围验证实验选择校准品进行检测。稀释度验证实验标本为 3 个月内收集的无溶血、黄疸、脂血及高浓度类风湿因子等影响因素的患者标

本<sup>[4-5]</sup>。

表 1 D-Dimmer 试剂盒规格与批号

名称	规格 (mL)	批号
试剂	4.0	561503
缓冲液	5.0	561703
补充试剂	2.6	561803
标本稀释液	5.0	561603
校准品	1.0	561903
质控品	1.0	560783/560684

### 1.3 方法

**1.3.1 批内精密度验证实验** 以 D-二聚体质控品的正常浓度水平作为 1 水平, 质控品的异常浓度水平作为 2 水平, 以校准品作为 3 水平, 采用同一批号试剂检测; 每个水平标本重复测定 11 次, 计算后 10 次检测结果的平均值、标准差与变异系数(CV)。以连续检测结果的 CV 作为评价指标, 需达到说明书要求范围(1 水平 CV<15%, 2 水平 CV<15%), 同时必须在行业标准要求的总误差范围内(正常质控品或血浆标本检测结果 CV<15%, 异常质控品或血浆标本检测结果 CV<10%)。

**1.3.2 日间精密度验证实验** 选择正常和异常水平质控品近 20 d 的检测结果, 计算 20 d 质控数据平均值、标准差和 CV, 以 CV 作为评价指标, 需达到说明书要求(1 水平 CV<15%, 2 水平 CV<15%), 同时必须在行业标准要求的总误差范围内(CV<15%)。当 D-二聚体用于静脉血栓栓塞(VTE)排除诊断时, 临界值水平质控品检测结果日间精密度, 即 CV 应小于 7.5%。

**1.3.3 线性范围验证实验** 采用标本稀释液对高值线性范围验证标本(D-二聚体校准品)按 100%、75%、50%、25%、10%、9%、5%、4% 和 0% 浓度梯度进行稀释。按浓度水平由低到高、再由高到低的顺序进行标本检测, 计算检测结果平均值。根据不同浓度标本检测结果平均值及稀释比例, 计算各标本的理论值, 用实测值与理论值进行回归分析, 计算相关系数(r)和斜率(a), 必须满足说明书规定的范围要求(r>0.99), 同时必须满足行业标准要求的线性回归方程参数范围(a: 1±0.05, r>0.975, 标本稀释后实测值与理论值的百分偏差小于 15%)。

**1.3.4 临床可报告范围验证实验** 采用 Sysmex CS5100 分析仪 1/8、1/16、1/32 稀释模式对 D-二聚体校准品进行检测, 平行检测 3 次, 计算平均值, 与 1/8、1/16、1/32 稀释度理论值进行比较, 计算回收率, 回收率=(平均值/理论值)×100%, 要求回收率范围为 90%~110%, 临床可报告范围以线性范围的低值为下限, 线性范围的高值与最高稀释倍数的乘积为上限。

**1.3.5 临床标本稀释检测** (1) 选择符合要求, 且 D-二聚体水平小于 5 mg/L、FDP<20 μg/mL 的患者标本 50 份, 采用 Sysmex CS5100 分析仪进行 D-二聚体与 FDP 原倍检测, 再采用稀释模式(1/8、1/16、1/32 稀释)进行检测, 比较稀释后检测结果与原倍检测结果, 计算回收率。如果回收率为(100±10)%, 说明原倍检测结果与稀释后检测结果比较差异无统计学意义( $P>0.05$ ), 标本无需进行稀释检测。(2) 选择符合要

求, 且 D-二聚体水平大于 5 mg/L、FDP>20 μg/mL 的患者标本 50 份, 采用 Sysmex CS5100 分析仪进行 D-二聚体与 FDP 原倍检测, 再采用稀释模式(1/8、1/16、1/32 稀释)进行检测, 比较稀释后检测结果与原倍检测结果, 计算回收率。如果回收率均不在(100±10)% 范围内, 并且比较差异有统计学意义( $P<0.05$ ), 说明检测结果受抗原过剩影响, 需对标本进行稀释后检测。

### 2 结 果

**2.1 精密度验证结果** 批内精密度实验及日间精密度实验测得的结果均在试剂生产厂商说明书与行业标准要求范围内(批内精密度: 正常质控品或血浆标本检测结果 CV<15%, 异常质控品或血浆标本检测结果 CV<10%; 日间精密度: CV<15%), 见表 2、3。

表 2 D-二聚体检测批内精密度验证结果

标本类型	平均值(mg/L)	标准差(mg/L)	CV(%)
1 水平(正常水平)	0.43	0.01	2.55
2 水平(异常水平)	3.04	0.04	1.20
3 水平(异常水平)	5.31	0.13	2.52

表 3 D-二聚体检测日间精密度验证结果

标本类型	平均值(mg/L)	标准差(mg/L)	CV(%)
正常水平	0.43	0.01	2.55
异常水平	3.04	0.04	1.20

**2.2 线性范围验证结果** D-二聚体线性范围验证结果均在说明书要求范围和行业标准要求范围内。线性范围验证实验实测值与理论值回归方程为  $Y=1.0028X-0.0344$ ,  $r=0.9996$ ,  $a=1.0028$ 。D-二聚体 0.207~5.170 mg/L 范围内, 检测结果呈线性分布。见表 4、图 1。

表 4 D-二聚体检测线性范围验证结果

稀释度	实测值(mg/L)			理论值(mg/L)	偏倚率(%)
	X1	X2	平均值		
0%	—	—	—	—	—
4%	0.230	0.190	0.210	0.207	1.45
5%	0.250	0.270	0.260	0.259	0.39
9%	0.420	0.420	0.420	0.465	-9.68
10%	0.480	0.480	0.480	0.517	-7.16
25%	1.200	1.160	1.180	1.293	-8.74
50%	2.480	2.480	2.480	2.585	-4.06
75%	3.920	3.890	3.905	3.878	0.70
100%	5.200	5.140	5.170	5.170	0.00

注: X1 为标本浓度水平由低到高检测结果; X2 为标本浓度水平由高到低检测结果; — 表示无数据。

**2.3 临床可报告范围验证结果** 采用 1/8、1/16、1/32 稀释模式对 D-二聚体校准品分别平行检测 3 次, 计算平均值, 根据平均值与校准品理论值计算回收率, 均在 90%~110% 范围内, 临床可报告范围为 0.207~165.440 mg/L。见表 5。

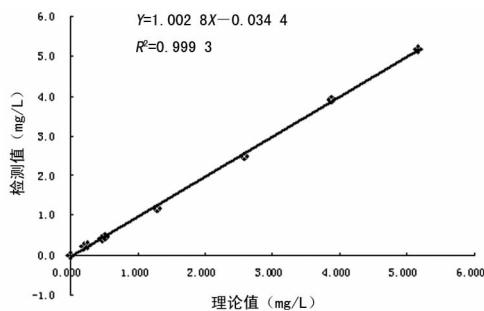


图 1 D-二聚体检测线性范围验证结果散点图

**2.4 临床标本检测** (1)采用1/8、1/16、1/32稀释模式对D-二聚体水平小于5 mg/L、FDP<20 μg/mL的50份标本进行检测,根据稀释后检测结果与原倍检测结果,计算回收率,均在(100±10)%范围内。(2)采用1/8、1/16、1/32稀释模式对D-

二聚体水平大于5 mg/L、FDP>20 μg/mL的50份标本进行检测,根据稀释后检测结果与原倍检测结果,计算回收率,回收率均不在(100±10)%范围内。不同浓度范围标本原倍与稀释后D-二聚体检测结果及回收率见表6。

表 5 D-二聚体临床可报告范围验证结果

稀释倍数	检测结果(mg/L)				理论值 (mg/L)	回收率 (%)
	X1	X2	X3	平均值		
原倍	4.870	4.880	4.880	4.877	4.877	100.00
1/8稀释	4.860	4.430	4.720	4.670	4.877	95.76
1/16稀释	4.720	4.820	5.170	4.903	4.877	100.55
1/32稀释	5.160	4.320	5.000	4.827	4.877	98.97

注:X1为第1次检测结果;X2为第2次检测结果;X3为第3次检测结果。

表 6 不同浓度范围标本原倍与稀释后D-二聚体检测结果及回收率[mg/L(%)]

D-二聚体(mg/L)	FDP(μg/mL)	1/8稀释	1/16稀释	1/32稀释
5.00	15.60	4.86(97)	4.87(97)	5.00(100)
3.99	19.73	3.65(91)	3.88(97)	4.02(101)
2.17	14.69	2.30(106)	2.28(105)	2.32(107)
4.33	18.85	4.48(103)	4.50(104)	4.51(104)
4.85	16.88	5.01(103)	5.05(104)	5.04(104)
7.78	24.43	9.81(126)	9.88(127)	10.51(135)
8.96	29.19	11.19(125)	11.16(125)	11.35(127)
7.23	30.51	11.12(154)	11.01(152)	11.84(164)
8.81	34.23	14.53(165)	14.02(159)	13.30(151)
9.96	37.08	15.72(158)	14.94(150)	16.08(161)
7.88	56.34	21.09(268)	23.16(294)	21.89(278)
11.23	58.54	22.47(200)	21.52(192)	21.61(192)
7.07	65.29	19.12(270)	21.07(290)	21.46(304)

### 3 讨 论

目前,D-二聚体检测方法有多种,包括半定量胶乳凝集法、酶联免疫吸附法(ELISA)、化学发光技术、发光氧通道免疫技术(LOCI)、基于胶乳凝集的免疫比浊法等<sup>[6-7]</sup>。半定量胶乳凝集法敏感性低,且不能定量,目前临床应用较少;而ELISA、化学发光技术敏感性高,但实验过程中需要洗脱,因此比较费时;LOCI是新近发展起来的新兴技术,敏感性高,均相、快速,无需洗脱,但和化学发光方法一样,成本昂贵,应用也受到了限制;基于胶乳凝集的免疫比浊法可以定量,敏感性高,试剂稳定,价格适中,检测快速,几分钟内就可以报告结果,目前广泛应用于临床<sup>[8]</sup>。

美国颁布的《临床实验室修正法案的最终法规》、ISO15189医学实验室认可标准及美国病理家学会(CAP)的认证标准均要求实验室对引进或改变的检测系统做性能验证后方可应用于常规工作<sup>[9-10]</sup>。做好仪器性能评价是保证检测质量的重要措施<sup>[11]</sup>,所以本文将Sysmex CS5100分析仪D-二聚体检测的部分性能验证结果如批内与日间精密度、线性验证实验、临床可报告范围验证结果列举其中。

近年来,D-二聚体检测逐渐拓展到很多领域,尽管其诊断特异性不高,但该实验所具有的高敏感性和极高的阴性预期值<sup>[12]</sup>,使其在许多疾病中,特别是对于活动性深静脉血栓形成和肺栓塞(PE)的排除诊断、弥散性血管内凝血(DIC)的诊断、心血管疾病和恶性肿瘤抗凝治疗、原发与继发性纤溶鉴别诊断、溶栓治疗监测等方面都具有重要价值<sup>[2]</sup>。

Sysmex CS5100分析仪采用免疫比浊法进行D-二聚体检测,原理是当试剂与含有D-二聚体片段复合物的标本混合时,用单克隆抗体(8D3)共价包被的聚乙烯颗粒进行凝集反应。D-二聚体交联的区域具有立体对称结构,即单克隆抗体作用的抗原表位出现2次。因此,单个抗体即可触发凝集反应,使反应体系浊度升高,采用比浊法检测吸光度,与标准曲线比较后,即可获得检测浓度结果。由于D-二聚体是交联纤维蛋白降解的最小产物,而不同厂家试剂检测的是不同相对分子质量的D-二聚体片段的复合物,而不是通常认为的D-二聚体最小片段。因此,不同厂家试剂很难做到检测结果的一致性。每个检测体系都有其独立的用于静脉血栓形成排除性诊断的医学决定水平,因此缺乏通用的标准品或校准物<sup>[13]</sup>。在免疫比浊法

测定中,抗原与抗体按一定的分子比例结合。当 D-二聚体浓度升高时,可出现抗原过剩现象,造成抗原抗体反应比例失调<sup>[14]</sup>。D-二聚体试剂中一定量的单克隆抗体没有足够的量与过剩的含 D-二聚体片段复合物的抗原结合,所以测得的 D-二聚体浓度并不是患者血浆中真实 D-二聚体浓度。因此及时对抗原过剩的标本进行稀释处理才能确保高浓度 D-二聚体临床标本测定的准确性。对于 D-二聚体水平大于 5 mg/L、FDP>20 μg/mL 的标本,应该进行稀释处理,但稀释倍数越大,结果准确性越低。因此,建议选择最小稀释倍数进行稀释后检测。对于 D-二聚体水平大于 5 mg/L、FDP>20 μg/mL 的标本,本实验室选择的最小稀释模式,即 1/8 稀释模式对标本进行稀释后,再进行 D-二聚体检测。

## 参考文献

- [1] Tripodi A. D-Dimer testing in laboratory practice[J]. Clin Chem, 2011, 57(9):1256-1262.
- [2] 许文荣,谷俊侠. 临床血液学检验[M]. 南京:东南大学出版社,2001:304.
- [3] 白著晓,刘慧敏,姜宏兵,等. Innovance 测定血浆 D-二聚体的分析性能评价[J]. 检验医学与临床, 2015, 12(9): 1211-1214.
- [4] 廖萍,周文杰,张霞,等. SYSMEX CS-5100 全自动血凝仪的抗干扰性能研究[J]. 血栓与止血学, 2015, 21(1):5-9.
- [5] 杨敏. D-二聚体测定的影响因素及临床意义[J]. 中国卫生产产业, 2013, 10(33):14-15.
- [6] 李广华,范小斌,梁玲,等. Sysmex Ca1500 全自动血凝仪检测 D-二聚体临床可报告范围的建立[J]. 中国现代医学

(上接第 1629 页)

2017, 38(1):133-134.

- [4] 孙淑君,刘丽华,杨洋,等. 广东籍献血人群 HTLV 感染状况调查[J]. 临床输血与检验, 2013, 15(1):15-18.
- [5] Okochi K, Sato H, Hinuma Y. A retrospective study on transmission of adult T cell leukemia virus by blood transfusion[J]. Vox Sang, 1984, 46(5):245-253.
- [6] 郑朝晖,冯月清,王雪飞,等. 台州地区无偿献血者人类嗜 T 淋巴细胞白血病病毒感染情况调查[J]. 中国输血杂志, 2015, 28(4):426-427.
- [7] 周平,罗均,谢朝阳. 湛江地区无偿献血人群 HTLV-1 感染状况的调查研究[J]. 广东医学院学报, 2009, 27(3): 309-310.
- [8] 陈长荣,谢金镇,张永昌,等. 厦门市无偿献血者 HTLV 感染情况及基因亚型分析[J]. 中国输血杂志, 2012, 25(12):1257-1261.

杂志, 2015, 23(1):94-97.

- [7] Kappel A, Ehm M. Immunoassays for diagnosis of coagulation disorders[J]. Hamostaseologie, 2010, 30(4): 194-201.
- [8] 钟政荣,徐云侠,田万林,等. 高浓度 D-二聚体检测时稀释倍数的探讨[J]. 检验医学, 2013, 38(4):466-468.
- [9] 魏昊,丛玉隆,中国实验室国家认可委员会技术委员会医学分委会. 医学实验室质量管理与认可指南[M]. 北京: 中国计量出版社,2004:59-75.
- [10] U. S. Department of Health and Human Services, Centers for Medicare & Medicaid Services. Clinical laboratory improvement amendments of 1988: final rule[J]. Fed Register, 1992, 57(40):7002-7186.
- [11] 王瑾,许程洁,李顺君,等. Sysmex CA7000 全自动凝血分析仪性能评价[J]. 现代生物医学进展, 2015, 15(16):3136-3138.
- [12] Righini M, Perrier A, De Moerloose P, et al. D-Dimer for venous thrombolism diagnosis: 20 years later [J]. J Thromb Haemost, 2008, 6(7):1059-1071.
- [13] 门剑龙,任静. D-二聚体临床应用及标准化分析进展[J]. 中华检验医学杂志, 2010, 33(8):793-797.
- [14] 郑卫东,曾淑燕. 免疫比浊法定量检测 D-二聚体的实验程序优化及实际价值[J]. 现代检验医学杂志, 2005, 20(1):42-44.

(收稿日期:2017-02-09 修回日期:2017-04-09)

- [9] 李交,刘志泉. 佛山市地区 HTLV-1 感染的血清流行病学研究[J]. 医学检验与临床, 2008, 19(3):77-78.
- [10] 庄文,陈雪利,刘利明,等. 献血员血清中成人嗜 T 淋巴细胞病毒的血清学调查[J]. 临床输血与检验, 2001, 3(1): 14-15.
- [11] 林铁辉,许海. 莆田地区无偿献血人群 HTLV-I / II 感染调查与分析[J]. 中国输血杂志, 2014, 27(7):754-756.
- [12] 伍晓菲,王华,王迅,等. SYBRGreen 荧光定量 PCR 检测 HTLV-1 前病毒 tax 基因方法的建立[J]. 现代检验医学杂志, 2008, 23(3):21-23.
- [13] Davison KL, Dow B, Barbara JA, et al. The introduction of anti-HTLV testing of blood donations and the risk of transfusion-transmitted HTLV, UK: 2002 – 2006 [J]. Transfus Med, 2009, 19(1):24-34.

(收稿日期:2017-01-23 修回日期:2017-03-27)