

## D-二聚体质控品的制备及性能评价

杨清堂, 吴立翔, 张 阳<sup>△</sup>

(重庆大学附属肿瘤医院/重庆市肿瘤研究所/重庆市肿瘤医院检验科, 重庆 400030)

**摘要:**目的 研制一种 D-二聚体质控品, 并对其稳定性进行评价。方法 采用无传染标志[人类免疫缺陷病毒(HIV)抗体、丙型肝炎病毒(HCV)抗体、乙型肝炎表面抗原(HBsAg)、梅毒抗体等均为阴性]混合血浆制备质控品, 并对其精密度、稳定性进行评价。结果 自制的质控品批内及批间不精密度结果分别为 1.83%、3.02%, 均符合 1/4 CLIA'88 及 1/3 CLIA'88 可接受性能指标规定。于 -20 °C 条件下保存 12 个月, 偏移结果和瓶间均一性(变异系数)均符合 1/2 CLIA'88 可接受性能指标规定。结论 自制质控品的均一性和稳定性良好, 可用于 D-二聚体检测室内质量控制。

**关键词:**质控品; D-二聚体; 稳定性

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2018.07.003

中图法分类号:R446.1

文章编号:1673-4130(2018)07-0776-04

文献标识码:A

### The preparation of the quality control material of D-dimer and the evaluation of its function

YANG Qingtang, WU Lixiang, ZHANG Yang<sup>△</sup>

(Department of Clinical Laboratory, the Affiliated Cancer Hospital of Chongqing University/  
the Institute of Cancer Research of Chongqing/Chongqing Cancer Hospital, Chongqing 400030, China)

**Abstract: Objective** To prepare a liquid composite quality control material of D-dimer, and then to investigate its stability. **Methods** Pooled human serum without infection[negative for the antibodies to human immunodeficiency virus(HIV), hepatitis C virus(HCV) and hepatitis B surface antigen(HBsAg), TP-IgG] was used as the medium for the composite quality control material preparation to investigate its precision and stability. **Results** The within-run precision of our product was 1.83% which was < 1/4 CLIA'88 acceptable performance range. The between-run precision was 3.02% which was < 1/3 CLIA'88 acceptable performance range. The quality control material was stable for 12 months at -20 °C. The stability[coefficient of variation (CV%)] of each item of the quality control material was < 1/2 CLIA'88 acceptable performance range. **Conclusion** The liquid composite lipid quality control material has good homogeneity and stability, and it can be used for D-dimer testing the internal quality control.

**Key words:** quality control material; D-dimer; stability

D-二聚体是交联纤维蛋白被纤溶酶水解后降解的终末产物中的一种特殊碎片, 其水平升高, 提示体内存在凝血异常和继发性纤溶活性的增高<sup>[1]</sup>, 广泛用于下肢静脉血栓形成(DVT)与肺栓塞(PE)的排除与诊断<sup>[2-3]</sup>。目前, 检测其水平的室内质控品主要依靠进口, 价格昂贵, 且有人关和运输等意外因素, 会影响质控品及时到达, 从而影响室内质控开展。为此, 本研究以健康者的混合血浆为基础, 自制了 D-二聚体的室内质控血浆, 现对其性能进行评价。

### 1 材料与方

**1.1 仪器与试剂** D-二聚体试剂盒和质控品、校准品购自西门子医学诊断产品(上海)有限公司, 仪器使用希森美康公司的 CS-5100 全自动凝血分析仪。

**1.2 质控血浆的制备** 采用枸橼酸盐抗凝管严格无菌操作采集健康体检人员肘静脉血标本, 常规方法分离血浆标本, 排除溶血、黄疸及脂血标本; 采用病毒核酸检测或酶联免疫吸附法(ELISA)对甲型病毒性肝炎、乙型病毒性肝炎、丙型病毒性肝炎、艾滋病(AIDS)、梅毒等多种传染病病原体进行核酸、抗原、抗体检测, 排除任意一类传染病指标检测结果为阳性的血浆标本。混合符合要求的血浆标本, 4 000 r/min 离心 15 min; 采用 0.22 μm 孔径的硝酸纤维素薄膜过滤, 按每支 300 μL 分装于已消毒的 Eppendoff 标本冻存管中, -20 °C 冷冻保存。

### 1.3 方法

**1.3.1 实验方法** 将 21 支质控样本, 按每组 3 支分

作者简介:杨清堂,男,主管技师,主要从事血液检验研究。△ 通信作者, E-mail: YQZTLZY@163.com。

本文引用格式:杨清堂,吴立翔,张阳. D-二聚体质控品的制备及性能评价[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(7): 776-778.

为 7 组, 1 组直接混匀测定, 每支测定 2 次, 以 6 次测定结果均值作为质控样本初始结果, 另外 6 组分别保存在 -20 °C 冰箱内, 保存时间分别为 2、4、6、8、10、12 个月, 储存到期后, 各时间段内到期样品先在 -70 °C 冰箱内放置 12 h 后, 再转至 -196 °C 液氮中保存, 至整个试验结束时, 将所有样品同时从 -196 °C 液氮中取出, 融化、混匀后对样本进行分析。以 -20 °C 保存的 6 批次质控样本结果和初始结果相比较, 评价质控样品在 -20 °C 保存条件下的稳定性。在对自制质控品进行性能评价前, 厂家工程师对凝血功能仪器进行校准, 使用 2 个浓度水平原装质控品做质控, 仪器检测结果在控后, 进行样本测定, 保证仪器处于最佳工作状态。

**1.3.2 不精密度测定** 批内不精密度测定: 在同一天内, 分别对自制 D-二聚体质控品进行 20 次测定, 分别计算平均值( $\bar{x}$ )、标准差( $s$ )、变异系数( $CV\%$ )。批间不精密度测定: 分别对的自制 D-二聚体质控品每天随同标本各测定 1 次, 连续测定 20 d, 分别计算  $\bar{x}$ 、 $s$ 、 $CV\%$ 。

**1.3.3 自制凝血质控品稳定性观察** (1) 观察质控样本随时间变化趋势: 以储存时间为 X 轴, 测定结果为 Y 轴, 绘制在 -20 °C 温度下各时间段样本测定结果随时间变化的趋势线, 观察各温时下质控样本稳定性变化的趋势。(2) 变化趋势检验: 对测定数据进行正态分布检验, 结果符合正态分布, 以初始样本测定结果为均值, 与 -20 °C 储存各样本测定结果进行独立样本  $t$  检验, 以判断质控品稳定性。(3) 不稳定趋势计算: 计算各温时下样本测定值同初始值的相对偏差, 以初始样本测定结果均值为靶值( $\bar{x}$ ), -20 °C 各批次测定结果与靶值比较, 计算相对偏差。相对偏差( $\%$ ) = [(当月检测值 - 初始检测值) / 初始检测值] × 100%。

**1.3.4 自制凝血瓶间均一性观察** (1) 取新鲜的自制的质控品 11 瓶, 每瓶检测 2 次, 计算测定结果的均值( $\bar{x}_1$ )和标准差( $s_1$ ), 另取其中 1 瓶连续测定 11 次, 计算测定结果的均值( $\bar{x}_2$ )和标准差( $s_2$ ), 按下列公式计算瓶间变异系数( $CV_{\text{瓶间}}\%$ )。

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}; s = \sqrt{\frac{\sum x_i^2 - (\sum x_i)^2}{n-1}}; s_{\text{瓶间}} = \sqrt{s_1^2 - s_2^2};$$

$CV_{\text{瓶间}}\% = s_{\text{瓶间}} / \bar{x}_1 \times 100$ ; 当  $s_1 < s_2$  时, 令  $CV_{\text{瓶间}}\% = 0$ 。式中:  $\bar{x}$  为均值;  $s$  为标准差;  $n$  为测量次数;  $x_i$  为指定参数第  $i$  次测定值。(2) 随机抽取新鲜 5 瓶质控样品, 每瓶测定 6 次, 对检测数据数据用单因素方差分析评价各瓶的均匀性。

**1.4 统计学处理** 数据通过 EXCEL2010 和 SPSS21.0 软件分析, 分析方法为一般频数分布, 以  $P < 0.05$  为差异有统计意义。

## 2 结 果

**2.1 批内及批间精密度** 因为国内无 D-二聚体质量的相关质量标准, 用美国临床实验室改进修正案'88 (CLIA'88) 凝血功能中要求最高的 PT 能力验证质量要求, 批内精密度  $\leq 1/4$  CLIA'88, 批间精密度  $\leq 1/3$  CLIA'88 作为质控品批内及批间精密度质量指标, 即批内精密  $CV\% \leq \pm 3.75\%$ , 批间精密度  $CV\% \leq \pm 5.0\%$ , 检测结果符合要求, 见表 1。

表 1 自制凝血质控品批内及批间不精密度实验结果

参数	批内精密度	批间精密度
$\bar{x}$	1.280	1.30
$s$	0.023	0.04
$CV\%$	1.830	3.02

**2.2 质控品稳定性** (1) 以贮存时间为 X 轴, 测定值为 Y 轴, 对测定结果进行趋势性分析, 各时间段的测定结果与初始值比较基本保持稳定。(2) 趋势性检验: 对测定数据进行正态分布检验, 结果符合正态分布, 以初始测定结果为均值, 各温时下的测定值与之进行单样本  $t$  检验, 结果  $P = 0.367$ , 可以认为在贮存 -20 °C 的各时间段样本与初始样本, 结果一致。说明在 -20 °C, 质控样品可以保存 12 个月, 性能稳定。(3) 不稳定趋势计算: 贮存 -20 °C 的各时间段样本测定结果与初始值相比较, 相对偏差最高为 5.47%, 以 CLIA'88 凝血功能中要求最高的凝血酶原时间(PT)能力验证中质量要求, 项目精密度应  $\leq 1/2$  CLIA'88 可接受性能指标为评价其稳定性指标, PT 的可接受范围为靶值  $\pm 15\%$ , 即  $\leq \pm 7.5\%$ , 其稳定性指标符合要求, 见表 2。

表 2 初始样本与 -20 °C 在保存不同时间个月结果比较

储存日期(月)	测定值	相对偏差(%)
0	1.28	0.00
2	1.35	5.47
4	1.22	-4.69
6	1.32	3.13
8	1.33	3.91
10	1.26	-1.56
12	1.32	3.13

**2.3 瓶间均一性观察** 对 11 瓶自制 D-二聚体质控品, 测定结果为:  $\bar{x}_1 = 1.29, s_1 = 0.03, \bar{x}_2 = 1.31, s_2 = 0.02, CV_{\text{瓶间}}\% = 1.733$ , 随机抽取 5 瓶样本, 各样本分别测定 6 次, 对 30 个数据进行正态性分布检验, 符合正态分布, 用单因素方差分析 5 瓶测定数据均一性, 得到的  $F$  值为 0.432, 相应的  $P$  值为 0.657, 说明随机抽取的 5 瓶样本间均一性良好。

## 3 讨 论

凝血系统的激活导致凝血酶生成, 凝血酶结合于纤维蛋白原的中央结构域, 释放纤维蛋白肽 A(FPA) 和纤维蛋白肽 B(FPB), 生成纤维蛋白单体和多聚体。

在活化 XIII 因子的作用下,生成交联的纤维蛋白。纤溶酶降解交联纤维蛋白,生成多种交联的纤维蛋白降解产物(FbDPs),其中一部分是 D-二聚体,除广泛用于 DVT 与 PE 的排除诊断,最近 D-二聚体的检测已深入到弥漫性血管内凝血(DIC)、脑梗死、恶性肿瘤、心血管疾病、糖尿病并发症等诊断和治疗监测方面<sup>[4-10]</sup>。通常情况下,为保证检测结果的可靠性,室内质控(IQC)是质量管理体系中一个重要环节,在检测测定过程中出现误差时,有适当质控方法提醒检验人员<sup>[11]</sup>,采取必要措施消除各种影响质量的因素。作为评价仪器、试剂等检测系统可靠性的质控血浆则是实验室开展室内质控的物质基础<sup>[12]</sup>,但目前由于 D-二聚体片段的异源性及各厂家制备 D-二聚体单克隆抗体的片段和位点不同等问题,尚无 D-二聚体质控品的国家或行业的统一标准,D-二聚体质控品主要依靠进口产品,价格较高,入关和运输时间长,影响了其在实验室的使用,无法满足临床对质控品的要求,因此探索自制的质控品显得尤为迫切。尽管缺乏统一的标准,但通过研制稳定的质控品,用于实验室内部的质量控制,从而保证检测结果的准确性,是切实可行的。本文参考了国内外文献中制备质控品的方法,采取无传染源的混合血浆制备质控品,并对质控品的稳定性和均匀性进行了多方面多层次的验证,结合实验完成了对不同时间、批间、批内、瓶间差异的检测,可在一定程度上满足实验室内部建立合适标准的要求。本文制备的 D-二聚体质控品适用于本实验中试剂盒中各批次之间的质量控制,在不同的定量测试系统,单克隆抗体的不同和 D-二聚体碎裂片段的位点不同,尚需进一步检测并定位。本研究以无传染性的健康者混合血浆为基础所自制的液体 D-二聚体质控品可替代进口质控品,用于临床实验室的室内质量控制。

顾敏晔<sup>[13]</sup>对 D-二聚体质控品制备研究中报道了采用健康者的 EDTA-K<sub>2</sub> 抗凝血浆为原料,经尿激酶降解以后,由 pH=7.4 磷酸盐缓冲液、蔗糖、聚乙二醇-20000 衍生物、小牛血清清蛋白(BSA)、叠氮钠(NaN<sub>3</sub>)等定标制备的质控品可作为实验室内部 D-二聚体检测的质量控制,但其制备的质控品在血浆材料的准备上无特殊说明,而本研究以无传染性的健康者混合血浆作为血浆材料更容易获得。制备方法上,本研究的血浆在稳定性验证方面进行了多个层次的验证。周丽艳等<sup>[14]</sup>等利用凝血检测后的剩余血浆,在体外试管中模拟体内弥散性血管内凝血(DIC),使之在试管内发生 DIC 样的化学反应,从而产生大量的 D-二聚体,从而制成 D-二聚体定量测定质控品,该文中也对质控品的稳定性进行了多重验证。刘小勇等<sup>[15]</sup>则对 D-二聚体质控品在复融以后的稳定性及 D-二聚体质控品的复融方法进行了分析研究,认为复融后的

D-二聚体质控品在-20℃条件下复融时如果遵循快速融化原则并及时检测,则 D-二聚体质控品的可稳定保存 5 d,这也从侧面印证了本研究制备的 D-二聚体质控品连续 20 d 的稳定性是有理论基础的。蔡瑜等<sup>[16]</sup>及黄炳坤等<sup>[17]</sup>则报道了应用携带传染病毒的血浆来制备 D-二聚体质控品也能够用于实验室的室内质控,这也丰富了本研究制备质控品的原料来源,与本研究使用的经过检测多种病毒阴性的血浆来制备 D-二聚体质控品在原料上互为补充。闻平等<sup>[18]</sup>等对混合血浆制备的 D-二聚体质控品在不同储存条件下及不同检测系统中的稳定性进行了检测,证明其稳定性良好,这对本研究制备的混合血浆的 D-二聚体质控品的稳定性提供了理论支持,而本研究在制备过程中检测了混合血浆的多种病原体阴性并对质控品均匀性和在时间上的稳定性、精确度都进行了多重检测。本研究通过对同种样品分组测定,对不同时间保存的 6 批次样品结果的比较验证了自制质控品在-20℃保存条件下是稳定的。除此之外,还对在同一天对每批样品的批次内进行了连续 20 d 的测定,并对测定数据进行了正态分布检验。从时间上,对批内、批间的精确度进行了稳定性检测和统计学分析,结果显示其批内不精密度为 1.83%,批间不精密度为 3.02%,精密密度指标均符合 1/4 CLIA'88 及 1/3 CLIA'88 可接受性能指标要求。于-20℃密闭保存 12 个月后质控品性能仍然稳定,相对相对偏差均<1/2 CLIA'88 可接受性能指标,符合要求。均一性方面,各瓶间 CV%=1.73%。随机抽取 5 瓶样本,对测定数据进行单因素方差分析, $F=0.432, P=0.657$ ,各样本间均一性良好。自制 D-二聚体质控品,能有效克服进口冻干质控品每次复融所带来的瓶间差,与被检测样本具有相似的基本性状,未加入无机或有机化学品,减少了基质效应<sup>[11]</sup>。

综上所述,本研究采用混合的无传染标志的血浆自制质控品,并进一步测定了质控品的精确度和稳定性,结果显示自制质控品在均匀性和稳定性上符合 1/4 CLIA'88 及 1/3 CLIA'88 可接受性能指标规定,可用于 D-二聚体检测室内质量控制。制备 D-二聚体质控品原料来源方便,制备简单,价格便宜,成本低廉,质控品均匀性、稳定性都能满足要求,有利于开展室内质控,提高检测质量,同时能为科室节约成本。

## 参考文献

- [1] 李锦荣,何秋贤,何日德. 静脉血栓患者凝血功能、纤溶动态变化的研究分析[J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2012, 33(9):1133-1135.
- [2] 郑江,李开南,赵平,等. D-二聚体对老年转子间骨折内固定术后深静脉血栓形成的价值[J]. 重庆医学, 2014, 43(6):709-710.

能纯化制得高性能 TRF,更体现出成本低、操作简单、易于放大等优势。另外,利用 TRF 检测试剂盒(免疫法)测得的 TRF 浓度与分光光度法测得的蛋白浓度比值(Rc)约为 0.95,说明纯化得到的 TRF 与免疫检测试剂盒中的 TRF 抗体具有良好的抗原反应性。最后,用纯化样品免疫新西兰大白兔,经过 4 次免疫后的兔抗血清效价滴度达 1:128 000,说明制备的 TRF 具有良好的免疫原性。综上所述,利用本文纯化工艺流程制备的 TRF 纯度高、回收率高,且具有良好的抗原反应性及免疫原性,可放大工艺规模制备 TRF 用于动物免疫以获得相应的抗 TRF 抗体,为配制灵敏度高、特异性好的 TRF 检测试剂(免疫法)提供良好的原料基础。

## 参考文献

- [1] GOMME P T, MCCANN K B, BERTOLINI J. Transferrin: structure, function and potential therapeutic actions [J]. *Drug Discov Today*, 2005, 10(4): 267-273.
- [2] 秦晓蓉, 易德莲, 张铭金, 等. 鸭血清转铁蛋白的分离纯化 [J]. *膜科学与技术*, 2008, 28(4): 31-34.
- [3] 高兰兴. 运铁蛋白的生理功能及临床意义 [J]. *生理科学进展*, 1984, 15(1): 59-63.
- [4] 刘洪正. 尿特种蛋白定量在诊断糖尿病早期肾损害中的临床应用 [J]. *国际检验医学杂志*, 2014, 35(24): 3420-3421.
- [5] 杨丽华. 粘蛋白联合血红蛋白检测粪便潜血的分析 [J]. *国际检验医学杂志*, 2016, 37(6): 809-810.
- [6] 何涛, 吴明沪, 罗文焯, 等. 人血清转铁蛋白酶联免疫测定

法的研究 [J]. *泸州医学院学报*, 1999, 22(2): 99-101.

- [7] 孙永杰. 胶乳增强免疫比浊法测定尿液转铁蛋白试剂 [P]. CN 102128924, 2011.
- [8] 程宁宁, 单艳菊, 潘志明, 等. 破伤风毒素 C 片段基因的克隆及在大肠杆菌中的高效表达 [J]. *中国预防兽医学报*, 2007, 29(6): 439-441.
- [9] 霍宁宁, 朱伟英, 高洋, 等. 羊伪结核抗体间接 ELISA 检测方法的建立 [J]. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 2016, 44(10): 12-17.
- [10] 窦后松, 森下宗夫, 矢岛毅彦. 螯合亲和色谱法分离转铁蛋白的四种分子形式 [J]. *色谱*, 1996, 14(3): 176-178.
- [11] 张敏林, 应启龙, 梁植权. 分离纯化人血清转铁蛋白的一种简便快速方法 [J]. *中国医学科学院学报*, 1985, 7(2): 154-157.
- [12] WEMER PAM, GALBRAITH R M, AMAUD P. DEAE-Affi-Gel Blue chromatography of human serum: use for purification of native transferrin [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1983, 226(1): 393-398.
- [13] 王革新, 孙南翔, 王者鹏, 等. 人血浆转铁蛋白的分离与纯制 [J]. *化学试剂*, 1991, 13(4): 244-247.
- [14] 秦晓蓉, 张铭金, 伍林, 等. 转铁蛋白的制备方法及其应用前景 [J]. *化学与生物工程*, 2006, 23(10): 5-57.
- [15] ASCIONE E, MUSCARIELLO L, MAIELLO V, et al. A simple method for large-scale purification of plasma-derived apo-transferrin [J]. *Biotechnol Appl Biochem*, 2010, 57(3): 87-95.

(收稿日期: 2017-09-12 修回日期: 2017-11-02)

(上接第 778 页)

- [3] 王佳丽, 赵国厚, 袁开芬. D-二聚体在老年肺癌合并肺栓塞的研究进展 [J]. *中国老年保健医学杂志*, 2016, 14(9): 85-87.
- [4] 刘勇, 代丽, 甘辞海. 凝血及纤溶指标在弥散性血管内凝血产妇中的临床应用 [J]. *检验医学与临床*, 2014, 11(2): 181-182.
- [5] 解学龙, 曾梅. DD、FDP 和 AT-III 联合检测对 DIC 实验诊断及治疗监测的价值 [J]. *国际检验医学杂志*, 2015, 36(1): 134.
- [6] 周熙琳, 梁辉, 黄洁杰. 急性脑梗死患者血栓弹力图与血小板聚集率和 D-二聚体相关性研究 [J]. *上海交通大学学报(医学版)*, 2013, 33(4): 459-462.
- [7] 潘静玲, 王小娟, 吴萍, 等. 化疗对胃肠道肿瘤患者凝血功能的影响 [J]. *中国综合临床*, 2012, 28(2): 1245-1249.
- [8] 高彤, 郭燕, 王筠, 等. 不同剂量三维适形放疗对恶性肿瘤患者凝血功能的影响 [J]. *中国疑难病杂志* 2013, 12(6): 446-449.
- [9] 周炜, 陈曼华. D-二聚体在主动脉夹层中的临床意义 [J]. *心血管病进展*, 2012, 33(2): 234-236.
- [10] 焦小四. 血浆 D-二聚体测定在诊断 2 型糖尿病并发症中的意义 [J]. *检验医学与临床*, 2013, 10(1): 34-35.

- [11] 丛玉龙, 尹一兵, 陈瑜. 检验医学高级教程 [M]. 北京: 人民军医出版社, 2013: 37-40.
- [12] 黄淑, 孙小成, 杨显福, 等. 正常凝血质控血浆质量考察 [J]. *中国输血杂志*, 2007, 20(2): 118-120.
- [13] 顾敏敏. D-二聚体质控品制备方法学研究 [J]. *现代检验医学杂志*, 2012, 27(1): 154-157.
- [14] 周丽艳, 张志国, 曲灿华, 等. D-二聚体质控品的制备 [J]. *中华检验医学杂志*, 2006, 29(7): 600.
- [15] 刘小勇, 冯金. D-二聚体质控品复溶后稳定性及复融方式的研究 [J]. *齐齐哈尔医学院学报*, 2015, 36(2): 168-169.
- [16] 蔡瑜, 戎国栋, 徐婷, 等. 自制室内质控血浆在罗氏 Cobas AmpliPrep/TaqM an48 超敏 PCR 检测系统的应用 [J]. *中华实验和临床感染病杂志*, 2014, 8(5): 20-24.
- [17] 黄炳坤, 华建江, 陈艳敏, 等. 病理水平 D-二聚体室内质控品的制备及应用评价 [J]. *中国城乡企业卫生*, 2017, 6(6): 8-10.
- [18] 闻平, 俞晓阳, 庄建伟, 等. 血清作为 D-二聚体质控品的可行性研 [J]. *临床和实验医学杂志*, 2013, 12(17): 1410-1413.

(收稿日期: 2017-09-23 修回日期: 2017-11-13)