

全自动生化分析仪测定 D-二聚体的分析性能评价

冯倩, 邓德耀, 周林华, 陈弟, 薛云松, 李丽莉
(云南省第二人民医院检验科, 云南昆明 650021)

[摘要] **目的** 对在日立 7170 全自动生化分析仪上用免疫透射比浊法检测 D-二聚体的性能进行评价. **方法** 对全自动生化分析仪测定血浆 D-二聚体的精密度、正确度、分析灵敏度、分析测量范围、分析干扰和生物参考区间 6 项分析性能进行验证和评价. **结果** D-二聚体测定在 3 个不同浓度水平的批内不精密度和天间不精密度的都小于厂家规定的不精密度的要求; 4 个浓度校准品检测结果与靶值的相对偏差均 <15%; 功能灵敏度为 0.46 $\mu\text{g/mL}$, 分析测量范围为 0.30 ~ 42.95 $\mu\text{g/mL}$, 略低于厂家给定的范围; 生物参考区间验证结果 <1 $\mu\text{g/mL}$, 在试剂说明书的范围之内. 不同浓度游离胆红素、结合胆红素、乳糜物、血红蛋白对 D-二聚体检测不产生影响. **结论** 日立全自动生化分析仪测定 D-二聚体的分析性能与厂家声明基本一致, 符合临床要求, 可以应用于临床.

[关键词] D-二聚体; 全自动生化分析仪; 性能评价

[中图分类号] R446.61 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003-4706(2013)02-0117-04

Performance Evaluation of Automatic Biochemical Analyzer in D-Dimer Test

FENG Qian, DENG De-yao, ZHOU Lin-hua, CHEN Di, XUE Yun-song, LI Li-li
(Dept. of Laboratory Medicine, The Second People's Hospital of Yunnan Province,
Kunming Yunnan 650021, China)

[Abstract] **Objective** To evaluate the performance feature of Hitachi 7170 automatic biochemical analyzer in D-dimer test. **Methods** According to the evaluation protocols documents and peninent litemture, and by combining our actual work, the precision, accuracy, analytical sensitivity, analytical measurement range, and the biological reference range of D-dimer were verified and evaluated. **Results** The inexactitude within-batch and day was superior to the standard of manufacturer. The related biases between results measured for calibrator at four levels and target valule was less 15%. Functional sensitivity was 0.46 $\mu\text{g/mL}$. Analytical measurement range was 0.30-42.95 $\mu\text{g/mL}$, that lower t than the manufacturer's claim slightly. The biological reference range was < 1 $\mu\text{g/mL}$, within manufacturer's claimed. Different concentrations of free bilirubin, direct bilirubin, chylomicrons, hemoglobin will not influence D-Dimer detection. **Conclusion** The main analytical performances of D-Dimer test with automatic biochemical analyzer are consistent with the claim defined by manufacturer, and could be satisfied in the clinical determination.

[Key words] D-Dimer; Automatic biochemical analyzer; Performance evaluation

近年来, D-二聚体 (D-Dimer) 的检测越来越受到临床医生的重视. 随着研究的深入, D-二聚体不但在深静脉血栓、肺栓塞和弥散性血管内凝血等血栓性疾病中起协助诊断的作用, 而且在其他临床疾病诊断中的应用也有报道. 目前, 定

量测定 D-二聚体的方法, 包括酶联荧光分析技术、免疫比浊法等. 在全自动生化分析仪用免疫透射比浊法定量测定 D-二聚体, 该方法具有操作简便迅速、成本较为便宜的优点, 因此在临床应用普遍, 但有关的性能评价报道较少. 为了深入

了解 D-二聚体在全自动生化分析仪上检测的性能, 笔者参考美国临床实验室标准化委员会 (CLSI) 的相关文件、国内一些定量检测性能评价的报道以及试剂厂家的标准, 在全自动生化分析仪上对试剂进行了性能评价。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 仪器 日立 7170 全自动生化分析仪

1.1.2 试剂 (1) 日本积水医疗株式会社 D-二聚体检测试剂 (批号: 805RCJ); (2) 配套校准品 (批号: 816RJI); (3) 两个水平质控品 (Low、High, 批号 824RKI); (4) 干扰材料 (日本 Sysmex 公司), 包括游离胆红素、结合胆红素、血红蛋白和乳糜物。

1.1.3 标本 患者和体检健康人标本用 109 mmol/L 枸橼酸钠 1:9 抗凝, 3 000 r/min 离心 10 min, 取血浆检测, 或留取血浆标本置于 -20℃ 待检。

1.2 方法

1.2.1 精密度实验 用两个水平的质控品 (Low、High) 和患者新鲜混合血浆按标本检验程序进行测

$$\text{计算影响度 (F)} = \frac{\text{含干扰物质标本检测值} - \text{无干扰物质标本 (空白) 检测值}}{\text{无干扰物质标本检测值}} \times 100\%^{[2]}$$

F 绝对值 >10% 认为该浓度干扰物质对 D-二聚体检测有影响。

1.2.4 分析灵敏度实验 本次分析灵敏度的包括检测低限 (lower limit of detection, LLD) 和功能灵敏度 (functional sensitivity, FS)。按厂家推荐的方案, 并参考文献^[3,4]介绍的方法进行验证: (1) 样品制备: 用生理盐水作为空白样品, 并用生理盐水与低浓度的新鲜混合血浆标本按照 10:0, 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 4:6, 3:7, 2:8, 1:9, 0:10 稀释, 作为检测限的实验样品; (2) 样品测定: 空白样品在批内重复测定 10 次, 其余制备好的一系列的样本每天测定 2 次, 测定 5 d, 共重复测定 10 次, 记录每次检测的吸光度值 (A) 和浓度值 ($\mu\text{g/mL}$); (3) 检测低限 (LLD) 的确定: LLD 为样品单次检测, 可以达到的非空白检测响应量对应的分析物的量。按 99.7% 的可信限, 空白样品 $\pm 3s$ 所对应的 D-二聚体的量即为 LLD; (4) 功能灵敏度 (FS) 的确定: 根据厂家提供的不精密度要求, 以日间重复 CV 最接近 20% 时对应检测限样品具有的平均 D-二聚体浓度为检测系统的 FS。

定, 在批内重复测定 20 次, 以及每份样本每天测定 1 次, 连续测定 20 d。分别计算批内及日间均值 ($\bar{x} \pm s$) 标准差 (SD) 和变异系数 (CV)。并判断是否小于厂家规定的性能标准。

1.2.2 正确度实验 依据参考文献^[1], 对另一批号的校准品 (批号 817RJI) 的高值和低值进行检测, 然后与厂家提供的“靶值”比较。计算检测值与靶值的相对偏差 (%), 并判断是否小于厂家规定的性能标准, 如果偏差低于厂商声明的偏差, 则正确度验证成功。

1.2.3 分析干扰实验 采用 Sysmex 干扰检查试剂盒。空白液与新鲜混合血浆按 1:9 比例制备各自干扰物的空白对照 A 液。将结合胆红素、血红蛋白、游离胆红素和乳糜物用蒸馏水溶解, 按 1:9 的比例分别加入相同的新鲜混合血浆, 制成不同的干扰物 B 液, 制成后结合胆红素 B 液浓度为 20 mg/dL, 血红蛋白 B 液 500 mg/dL, 游离胆红素 B 液 21 mg/dL, 乳糜物 B 液 3 000 FTU。将 A 液与 B 液按照 10:0 (空白管), 8:2 (1 号管), 6:4 (2 号管), 4:6 (3 号管), 2:8 (4 号管), 0:10 (5 号管) 比例混合, 制备成空白管及含不同干扰物浓度的 1-5 号管。对每一份样品进行两次 D-二聚体浓度测定, 结果取平均值。

1.2.5 分析测量范围实验 按参考文献^[5], 厂家提供 D-二聚体线性样本, 用生理盐水稀释。稀释液 (L) 与高值样本 (H) 按照 10 L、9 L+1 H、8 L+2 H、7 L+3 H、6 L+4 H、5 L+5 H、4 L+6 H、3 L+7 H、2 L+8 H、1 L+9 H、10 H 的关系配制, 形成系列浓度样品。每个浓度重复测定 2 次, 以平均值为实测值, 按照公式预期浓度 = $(CL \times VL + CH \times VH) / (VL + VH)$ 计算预期值。以实测值为 Y 轴、预期值为 X 轴, 将结果点在 X-Y 坐标图上, 计算回归方程 $y = bx + a$ 。若相关系数 $r \geq 0.975$, b 在 0.97 ~ 1.03 范围内, a 接近于 0 为可接受, 说明检测结果可达到验证高限。

1.2.6 参考区间验证 参考 CLSI C28-A2^[6]文件, 选取健康体检者 20 例, 年龄 20 ~ 56 岁, 平均 36 岁。男女各一半。按照标准操作程序进行检测。对结果进行统计并与试剂说明书提供的参考区间进行比较, 若 20 份标本的检测结果均在试剂说明书提供的参考区间内或不超过 2 个标本, 则说明参考区间有效。否则, 自建生物参考区间。

1.3 统计学处理

应用 SPSS11.5 统计软件进行数据分析。分析

测量范围的验证中截距 a 与 0 的比较用 t 检验.

2 结果

2.1 精密度实验结果

批内 CV 均小于 5%, 天间 CV 均小于 10%, 达到厂家性能标准, 见表 1.

2.2 正确度实验结果

相对偏差小于 15%, 达到厂家性能标准, 见表 2.

2.3 分析干扰实验结果

不同浓度游离胆红素、结合胆红素、血红蛋白和乳糜物对 D 二聚体检测的干扰 (F) 都小于 10%, 见表 3.

2.4 分析灵敏度实验结果

按 99.7% 的可信限, 空白样品均值的 3SD 为: $0.06+0.08 \times 3 = 0.30 \mu\text{g/mL}$, 所以本检测系统的

LLD 是 $0.30 \mu\text{g/mL}$, 小于厂家给定的 LLD ($0.5 \mu\text{g/mL}$). 在平均浓度为 $0.46 \mu\text{g/mL}$ 时, 天间不精密密度为 14.46%, 最接近 20%, 所以本检测系统的 FS 为 $0.46 \mu\text{g/mL}$.

2.5 分析测量范围实验结果

以实测值为 Y 轴、预期值为 X 轴, 得到实测值与预期值均值之间的直线回归方程 $y = 0.995x - 0.564$, $r = 0.999$. 相关系数 $r \geq 0.975$, b 在 0.97 ~ 1.03 范围内, a 与 0 比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 可判断本实验中分析测量范围的上限为 $42.95 \mu\text{g/mL}$. 结合本方法的 LLD, 本方法的线性为 $0.30 \sim 42.95 \mu\text{g/mL}$.

2.6 参考区间验证结果

20 份表面健康人血浆 D-二聚体检测结果浓度在 $0.6 \sim 0.8 \mu\text{g/mL}$, 均在试剂说明书提供的参考区间 ($< 1 \mu\text{g/mL}$) 之内.

表 1 日立 7170 全自动生化分析仪测定 D-二聚体的批内、天间不精密密度结果

Tab. 1 The inexactitude of D-dimer test with Hitachi 7170 automatic biochemical analyzer in the same batch and day

样品	批内不精密密度			天间不精密密度		
	$\bar{x}(\mu\text{g/mL})$	$s(\mu\text{g/mL})$	CV(%)	$\bar{x}(\mu\text{g/mL})$	$s(\mu\text{g/mL})$	CV(%)
质控 1	3.59	0.11	2.98	3.99	0.20	5.01
质控 2	9.92	0.27	2.71	10.56	0.45	4.26
混合血浆	2.91	0.12	4.10	3.03	0.26	8.58

表 2 日立 7170 全自动生化分析仪测定 D-二聚体的偏差结果

Tab. 2 The deviation of D-dimer test with Hitachi 7170 Automatic biochemical analyzer

校准品批号	靶值($\mu\text{g/mL}$)	验证值($\mu\text{g/mL}$)	绝对偏差($\mu\text{g/mL}$)	相对偏差 (%)
817RJI	1.0	1.1	0.1	10
817RJI	2.8	3.0	0.2	7
817RJI	15.0	14.3	0.7	5
817RJI	29.0	30.1	1.1	4

表 3 不同浓度干扰物质对 D-二聚体检测的干扰 (%)

Tab. 3 The effect of different concentration of interfering substance on D dimer test (%)

干扰物质	含不同干扰物浓度的血浆测得的干扰误差 (F)				
	F1	F2	F3	F4	F5
游离胆红素	1.4	1.4	0	1.7	2.0
结合胆红素	0.0	0.7	0.7	0.0	1.4
血红蛋白	2.4	3.4	4.1	4.1	3.1
乳糜物	2.0	1.4	2.7	3.1	3.4

3 讨论

D-二聚体是交联的纤维蛋白的降解产物,纤维蛋白单体经 XIII a、Ca²⁺ 交联后形成稳定的交联纤维蛋白,再经纤溶酶水解所产生的特异性降解产物碎片就称为 D-二聚体。免疫透射比浊法测定 D-二聚体的检测原理是标本中的 D-二聚体与鼠抗人 D-二聚体单克隆抗体致敏胶乳颗粒发生抗原抗体反应,产生凝集以致浊度产生,通过反应物的浊度来定量检测标本中 D-二聚体的含量。临床实验室的管理部门和相关机构都要求实验室要选择适当的方法对检测系统的分析性能进行评价,证实其能够达到所要求的性能标准,才可将分析系统用于常规工作。再加上目前 D-二聚体检测最大的问题是不同仪器和试剂测定结果相差很大,几乎没有可比性,标准化也很困难^[1],所以各实验室评价所开展的 D-二聚体检测是否能达到厂家给定的分析性能要求就显得尤为重要。本文对日立 7170 全自动生化分析仪测定 D-二聚体的主要分析性能进行评价,包括不精密度、不准确度、分析测量范围、分析灵敏度、分析干扰实验、生物参考区间验证,来了解该系统的性能。

一个检测系统最基本的性能指标是精密度,在本检测系统,高低值质控及患者混合血浆的批内、日间变异都小于厂家声明的 CV 值,同时也观察到混合血浆的批内、日间 CV 都大于同时测定的两个配套质控品,这可能与混合血浆的稳定性有关。正确度的验证,有关文件建议可以通过与参考方法比对或检测定值参考物(包括室间质量评价样本、校准品)来验证。D-二聚体检测与参考方法比对无法实现,而且国内还未开展室间质量评价,所以本实验使用不同批号的校准品验证正确度,结果达到厂家性能要求。不同浓度的游离

胆红素、结合胆红素、血红蛋白和乳糜物对检测结果的影响度均小于厂家给定的批内变异系数(10%),可认为这些浓度的干扰物质不影响 D-二聚体的检测。分析测量范围为 0.30 ~ 42.95 μg/mL,上限低于厂家给出的线性范围上限(60 μg/mL),这可能与样品的制备有关。20 份健康人标本血浆浓度均在试剂说明书的参考区间之内,验证了厂家的声明。

总之,本文参考试剂厂家、CLSI 文件以及国内关于定量检测分析系统性能评价的相关报道,评价了运用免疫透射比浊法在全自动生化分析仪上检测 D-二聚体的性能,基本与厂家声明的性能一致,该检测系统能够用于临床。

[参考文献]

- [1] 杨有业,张秀明. 临床检验方法学评价[M]. 北京:人民卫生出版,2008:136-140.
- [2] 孙虹,牛华,赵崇吉,等. 胆红素、血红蛋白和乳糜微粒对生化检测结果的干扰评价[J]. 国际检验医学杂志,2011,32(21):2509-2511.
- [3] 冯仁丰. 临床检验质量管理技术基础[M]. 上海:上海科学文献技术出版社,2008:111-138.
- [4] 张秀明,庄俊华,郑松柏,等. 临床化学发光免疫法检测 AFP 的分析性能验证与实验方法[J]. 中华检验医学杂志,2007,30(11):1293-1296.
- [5] 王治国. 临床检验方法确认与性能验证[M]. 北京:人民卫生出版社,2009:153-159.
- [6] Clinical and Laboratory Standards Institute. How to define and determine reference intervals in the clinical laboratory; Approved guideline—second edition (C28-A2). Wayne: CLSI,2000.
- [7] 苏薇,邱玲. D-Dimer PLUS测定血浆D-二聚体浓度性能评价[J]. 现代检验医学杂志,2008,23(4):38-41.

(2012-12-11 收稿)