

## ИММУНОЛОГИЯ

©КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Акиншина Ю.А.<sup>1</sup>, Никитина А.В.<sup>1</sup>, Амелина Е.А.<sup>1</sup>, Марданлы С.Г.<sup>1,2</sup>.

### ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ ТЕСТ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ Д-ДИМЕРА

<sup>1</sup>ЗАО «ЭКОлаб», 142530, г. Электрогорск Московской обл., Россия;

<sup>2</sup>Государственный гуманитарно-технологический университет «ГГТУ» ГОУВО Московской обл., 142611, г. Орехово-Зуево Московской обл., Россия

*В работе представлены результаты создания и апробации иммунохроматографической тест-системы для качественного определения D-димера. Оценка теста проводилась на образцах плазмы крови в сравнении с количественным иммуноферментным анализом (ИФА). Разработанная тест-система обеспечивала совпадение результатов с ИФА в 87,1% и в 100% случаев - для образцов с повышенной (более 400 нг/мл ФЭЕ) и нормальной концентрацией D-димера соответственно. Иммунохроматографический тест для определения D-димера может быть включен в диагностическую стратегию как исключаяющий тест после оценки клинической вероятности венозных тромбозов.*

**Ключевые слова:** иммунохроматографический анализ; ИХА; D-димер; иммуноферментный анализ; диагностика; тромбоз.

**Для цитирования:** Акиншина Ю.А., Никитина А.В., Амелина Е.А., Марданлы С.Г. Иммунохроматографический тест для определения D-димера. Клиническая лабораторная диагностика. 2019; 64 (11): 654-658. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-11-654-658>

*Akinshina Yu.A.<sup>1</sup>, Nikitina A.V.<sup>1</sup>, Amelina E.A.<sup>1</sup>, Mardanly S.G.<sup>1,2</sup>.*

#### IMMUNOCHROMATOGRAPHIC TEST FOR DETERMINATION OF D-DIMER

<sup>1</sup> CJSC "EKOLab", 142530, Elektrogorsk, Moscow region;

<sup>2</sup> State educational institution of higher education of the Moscow region;

State Humanitarian University of Technology "GGTU", 142611, Orekhovo-Zuyevo, Moscow region

*The developing and the testing results of an immunochromatographic test for the D-dimer qualitative determination were presents in the article. The test was approved blood plasma samples in comparison with a quantitative enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The results of assay with developed test were the same with ELISA results for 87,1% and 100% for samples with increased (more than 400 ng/ml FEU) and normal concentration of D-dimer, respectively. The immunochromatographic test for determination of D-dimer can be included in the diagnostic strategy as a cut test after the assessment of venous thromboembolism risk.*

**Key words:** immunochromatographic assay; ICA; D-dimer; enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA; diagnostics, thrombosis.

**For citation:** Akinshina Ju.A., Nikitina A.V., Amelina E.A., Mardanly S.G. Immunochromatographic test for determination of D-dimer. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2019;64 (11): 654-658 (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0969-2084-2019-64-11-654-658>

**For correspondence:** Akinshina Yulia Aleksandrovna, specialist of the Innovative Development Department CJSC EKOLab; e-mail: [akinshina.opr@mail.ru](mailto:akinshina.opr@mail.ru)

**Conflict of interests.** The authors declare the absence of conflict of interests.

**Acknowledgment.** The study had no sponsor support.

Received 15.09.2019  
Accepted 10.10.2019

**Введение.** Венозная тромбоземболия (ВТЭ), к которой относят тромбоз глубоких вен и тромбоземболию легочных артерий остается важнейшей проблемой клинической медицины, что обусловлено чрезвычайно высоким риском для здоровья и жизни пациентов [1,6,8,13]. До 34% смертей, связанных с ВТЭ, наступают в связи с внезапной тромбоземболией, более половины этих случаев диагностируются посмертно [2,9]. Среди наиболее зна-

чимых факторов риска развития ВТЭ выделяют хирургическое вмешательство, травмы, длительную иммобилизацию, беременность, пожилой и старческий возраст, онкологию различной локализации [7,14].

В связи с вышесказанным своевременная диагностика ВТЭ приобретает первостепенное значение [5,12]. Отсутствие патогномичных симптомов ВТЭ обуславливает необходимость инструментальной диагностики, так же как и для исследования спинномозговой жидкости [3]. Однако недоступность такой диагностики в условиях неотложных состояний и в каждодневной практике, а также частота получаемых отрицательных результатов являются причиной использования тестов для обнару-

Для корреспонденции: Акиншина Юлия Александровна, специалист отдела перспективных разработок ЗАО «ЭКОлаб», [akinshina.opr@mail.ru](mailto:akinshina.opr@mail.ru)

жения маркеров тромбообразования, наиболее ценным из которых является D-димер [2]. D-димеры - продукты распада фибринового сгустка и неотъемлемый показатель прошедшей активации системы коагуляционного гемостаза, а их высокая концентрация в крови – неперемutable следствие тромботического состояния [10]. Определение D-димеров считается необходимым звеном диагностики венозной тромбоэмболии и включается в валидированный диагностический алгоритм после оценки клинической претестовой вероятности развития ВТЭ [1,10].

D-димер не является высокоспецифичным маркером, поэтому обнаружение его в повышенных концентрациях должно подтверждаться инструментальными методами диагностики. Однако высокая чувствительность D-димера (95-98%) определяет его важнейшее отрицательное предиктивное значение, позволяющее исключить тромбозы любой локализации при выявлении D-димера ниже порогового уровня [11,12].

Концентрацию D-димера определяют различными методами, и результаты, полученные с помощью них, могут отличаться. Это связано с различной эпитопной специфичностью антител, используемых в тестах, отсутствием единого калибратора и международного стандарта, возможностью использования двух единиц измерения D-димера [10]. Наиболее широко применяемой является фибриноген-эквивалентная единица (FEU, ФЭЕ), когда калибратором являются продукты деградации фибрина. Если в качестве калибратора используют очищенный D-димер, то результаты измеряются в единицах D-димера (DDU, ДДЕ). В зависимости от выбранного калибратора и по результатам апробации метода на клиническом материале каждый производитель устанавливает свой уровень порогового значения [12].

В лабораторной диагностике D-димера успешно применяются экспрессные и недорогие методы, способные с высокой точностью исключить ВТЭ во внебольничных условиях, не требующие специализированного оборудования. В связи с этим целью нашей работы являлась разработка иммунохроматографического теста для определения D-димера в образцах плазмы крови человека и оценка возможности его применения в сравнении с иммуноферментным анализом (ИФА).

**Материал и методы.** Иммунохроматографический анализ. В работе использовались мышинные моноклональные антитела к D-димеру человека (ООО «Биалекса», Москва) для тестовой зоны и козы антитела к IgG мыши («Имтек», Москва) для зоны контроля. В качестве калибратора для предварительного подбора концентраций антител в контрольной и тестовой линий с целью достижения необходимой чувствительности теста (400 нг/мл ФЭЕ) использовали рекомбинантный антиген D-димера (ООО «Биалекса») с известной концентрацией.

Изготовление иммунохроматографических тестов проводилось, как было описано ранее [4].

**Исследуемые образцы.** С помощью полученных тестов были исследованы образцы плазмы пациентов в возрасте старше 60 лет, пребывающих в различных ЛПУ Люберецкого района ( $n=622$ ). Все образцы были разделены на 3 группы:

I группа: 60-70 лет ( $n=73$ ); II группа: 71-80 лет ( $n=257$ ); III группа: 81-100 лет ( $n=292$ ).

Иммунохроматографический анализ (ИХА) проводили при комнатной температуре. В отверстие тест-кассеты

для образца вносили 1 каплю (40 мкл) пробы и 1 каплю буферного раствора (0,05М трисовый буфер (pH=7,2) с 0,1% БСА). Для каждого образца использовали отдельную тест-кассету. Результат анализа визуально контролировали через 10 мин после внесения пробы. Нижний предел визуального определения составлял 400 нг/мл ФЭЕ D-димера. Положительным (наличие D-димера выше уровня 400 нг/мл ФЭЕ) считался результат исследования с образованием двух различимых полос розового или красного цвета в контрольной и тестовой зонах. Отрицательный результат анализа (наличие D-димера ниже уровня 400 нг/мл ФЭЕ) фиксировали при появлении одной окрашенной полосы в области контрольной зоны. В случае отсутствия окрашивания полосы в зоне контроля результат анализа считался недействительным, и проводилось повторное исследование пробы. При положительном результате анализа образцу присваивали значения от «1+» до «3+» в зависимости от степени интенсивности окрашивания, где «1+» - слабое окрашивание тестовой линии; «3+» максимальное окрашивание, по интенсивности равное таковому в контрольной зоне.

**Имуноферментная тест-система.** Для определения концентрации D-димера в исследуемых пробах плазмы крови пациентов использовалась иммуноферментная тест-система «D-димер-ИФА-БЕСТ» (ЗАО «Вектор-Бест», Новосибирск). В основе метода лежит одностадийный «сэндвич» вариант твердофазного ИФА. Минимальная определяемая набором концентрация D-димера - 10 нг/мл. В тест-системе «D-димер-ИФА-БЕСТ» используются калибраторы на основе очищенного D-димера, поэтому получаемые с помощью набора значения концентрации производитель предлагает оценивать в единицах D-димера (DDU). Интерпретацию результатов анализа производитель предлагает проводить самостоятельно, учитывая, что при определении D-димера с помощью данного набора реагентов его концентрация в плазме 80% здоровых доноров находилась в диапазоне 0-250 нг/мл DDU и у 97% здоровых доноров - в диапазоне 0-285 нг/мл DDU.

На основании инструкции производителя пробы с концентрацией D-димера более 285 нг/мл DDU относили к положительным (концентрация D-димера выше нормы), пробы с концентрацией менее 250 нг/мл DDU – к отрицательным (концентрация D-димера не повышена). Образцы с концентрацией D-димера в диапазоне 250-285 нг/мл DDU расценивались как неопределенные. Анализ проб проводили согласно инструкции производителя.

**Результаты.** В иммуноферментной тест-системе «D-димер-ИФА-БЕСТ» было исследовано 622 образца плазмы крови людей старше 60 лет, разделенных на 3 группы. Более половины всех положительных результатов (52,4%) приходилось на пробы III группы. С увеличением возраста испытуемых возрастала доля образцов с содержанием D-димера выше 285 нг/мл (положительные): 43,8%, 78,2%, 82,5% в каждой группе соответственно (табл. 1).

В массиве положительных образцов с увеличением возраста пациентов наблюдалась также тенденция к возрастанию числа образцов и с наиболее высокими значениями концентрации D-димера (от 1000 нг/мл DDU и выше). Так, в первой возрастной группе такие пробы составили 21,9 % от общего числа положительных результатов в пределах группы, во второй - 42,5%, а в третьей - 64,7% (рис. 1).

Таблица 1

**Результаты исследования образцов плазмы крови в иммуноферментной тест-системе «D-димер-ИФА-БЕСТ» (n=622)**

Возрастные группы	Отрицательные (менее 250 нг/мл DDU)	Неопределенные (250-285 нг/мл DDU)	Положительные (более 285 нг/мл DDU)
I (n=73)	37 (50,7%)	4 (5,5%)	32 (43,8%)
II (n=257)	57 (22,2%)	13 (5,0%)	187 (72,8%)
III (n=292)	42 (14,4%)	9 (3,1%)	241 (82,5%)
Итого (n=622)	136 (21,9%)	26 (4,2%)	460 (73,9%)

Таблица 2

**Результаты исследования проб в ИФА и ИХА (n=622)**

№ группы	Концентрация D-димера		Количество образцов	
	в нг/мл DDU	в нг/мл ФЭЕ*	в ИФА	в ИХА (совпадающие с ИФА)
1	<200 нг/мл DDU	< 400 нг/мл ФЭЕ	98	98 (100%)
2	200-1000 нг/мл DDU	400-2000 нг/мл ФЭЕ	281	204 (72,6%)
3	1000-3000 нг/мл DDU	2000-6000 нг/мл ФЭЕ	112	109 (97,3%)
4	> 3000 нг/мл DDU	> 6000 нг/мл ФЭЕ	131	131 (100%)

Примечание: \* – учитывая разницу единиц измерения концентрации D-димера в двух методах, использовали условный пересчет 1 нг/мл DDU ≈ 2 нг/мл ФЭЕ.

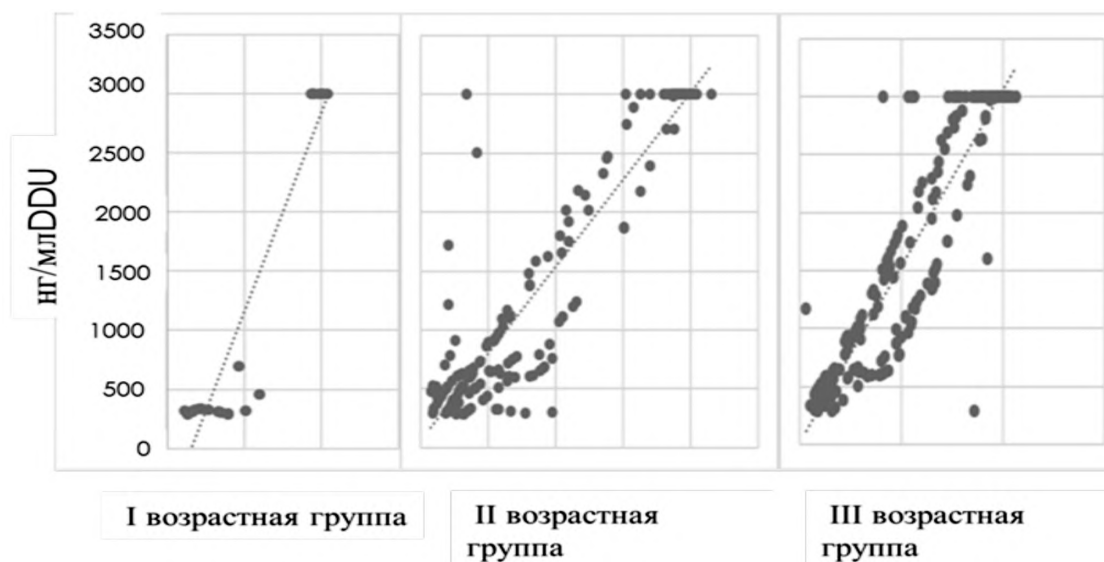


Рис. 1. Распределение положительных результатов (более 285 нг/мл DDU), выявленных в иммуноферментной тест-системе при исследовании плазмы крови пациентов трех возрастных групп (n=460).

Полученные нами результаты полностью согласуются с литературными данными и подтверждают возрастное увеличение концентрации D-димера в крови [1, 2, 5, 6].

Образцы, охарактеризованные в ИФА были в дальнейшем исследованы в разработанной иммунохроматографической тест-системе «ИХА-D-димер». В связи с отличным от ИФА пороговым уровнем (400 нг/мл ФЭЕ), а также с целью установления корреляции между концентрацией D-димера и интенсивностью окрашивания в ИХА, было выделено 4 группы проб с разным содержанием D-димера. Первую группу составили отрицательные образцы (с концентрацией D-димера менее 200 нг/мл DDU (n= 98), вторая, третья и четвертая группы содержали пробы с концентрацией D-димера в диапазонах 200-1000 нг/мл DDU (n=281); 1000-3000 нг/мл DDU (n=112) и более 3000 нг/мл DDU (n=131) соответственно (табл. 2).

При исследовании образцов плазмы первой (n=98) и

четвертой группы (n=131) результаты двух методов полностью совпадали. Из третьей группы три пробы (2,7%) оказались отрицательными в ИХА. При исследовании образцов второй группы наблюдалось значительное совпадение результатов в ИФА и ИХА (72,6%). Для остальных образцов этой группы (n=77) результаты ИХА были отрицательными. Среди проб, для которых были получены дискордантные результаты, большая часть (87,0%) содержала D-димер в диапазоне от 200 до 280 нг/мл DDU. Данный интервал является пограничным при дифференциации повышенных и нормальных значений концентрации D-димера. Получение различных результатов для проб с «пограничным» уровнем D-димера в двух методах может объясняться разницей в единицах измерения D-димера, их пересчете и в калибраторах, используемых для установления порогового уровня.

Для оценки возможной связи между концентрацией D-димера и степенью окрашивания тестовой полосы в



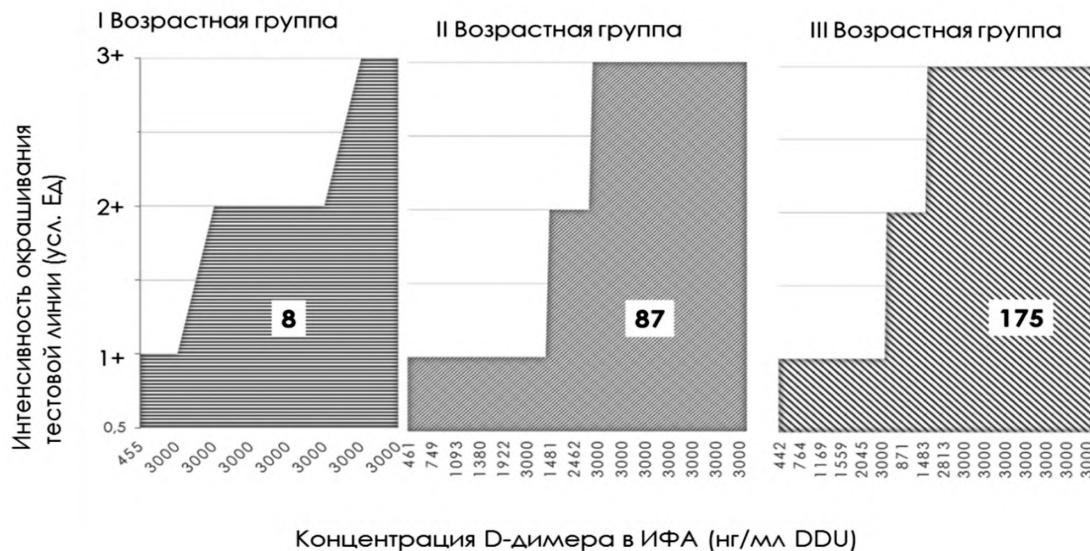


Рис. 2. Изменение интенсивности окрашивания тестовой линии в ИХА при исследовании образцов плазмы трёх возрастных групп (n=270).

ИХА была отобрана группа образцов (n=270), содержащих D-димер в количестве от 200 до 3000 нг/мл DDU. При исследовании в ИХА наблюдалось усиление интенсивности окрашивания (от 1+ до 3+) с увеличением концентрации D-димера в пробах. Для образцов из третьей возрастной группы, содержащей наибольшее число проб с высоким уровнем D-димера (около 3000 нг/мл DDU), отмечалось большее, чем в других группах, количество срабатываний с максимально интенсивным окрашиванием (на уровне 3+) в ИХА (рис 2.).

**Обсуждение.** В результате нашей работы был создан иммунохроматографический тест для определения D-димера и была проведена оценка его работы в сравнении с ИФА. При исследовании образцов плазмы крови продемонстрирована высокая корреляция результатов ИХА с результатами, полученными в ИФА, по отрицательным образцам (100%) и по образцам с концентрацией D-димера выше 1000 нг/мл DDU (98,8%). При анализе проб в обоих методах отмечалось нарастание уровня D-димера с увеличением возраста пациентов. При этом с увеличением концентрации D-димера в пробах наблюдалось возрастание интенсивности окрашивания тестовой полосы в ИХА.

Для группы проб с концентрацией аналита от 200 до 1000 нг/мл DDU отмечались дискордантные результаты, полученные в двух методах, прежде всего, при исследовании образцов с «пограничной» концентрацией D-димера. Расхождение в результатах анализа для таких проб могут объясняться различиями в используемых калибраторах и единицах измерения D-димера для каждого метода, а также различной специфичностью антител в составе теста. Для минимизации ложноположительных результатов необходимо использовать антитела, связывающиеся с эпитопами в составе молекулы D-димера и при этом остающиеся инертными по отношению к фибриногену. Для получения воспроизводимых результатов для эффективной диагностики тромбозов и мониторинга тромболитической терапии рекомендуется использовать тест-системы одного производителя и ин-

терпретировать результаты строго в соответствии с инструкцией по применению.

**Заключение.** Разработанный иммунохроматографический тест обеспечил совпадение результатов с ИФА в 87,1% и в 100% случаев - для образцов с повышенной (более 400 нг/мл ФЭЕ) и нормальной концентрацией D-димера соответственно. Полученные результаты позволяют рекомендовать применение иммунохроматографического теста для определения D-димера в качестве теста второй линии после оценки клинической претестовой вероятности тромбоза.

**Благодарность.** Авторы выражают благодарность сотрудникам отдела перспективных разработок ЗАО «ЭКОлаб» за оказанную помощь при проведении исследований.

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### ЛИТЕРАТУРА (п.п. 7–14 см. REFERENCES)

1. Гильманов А.Ж. D-Димер: Что? Как? У кого? С какой целью? *Клинико-лабораторный консилиум*. 2009; 31(6): 38-46.
2. Кишкун А.А. Лабораторная диагностика неотложных состояний. М.: Лабора; 2012: 271-9.
3. Марданлы С.Г., Первушин Ю.В., Иванова В.Н. Спинномозговая жидкость, лабораторные методы исследования и их клинико-диагностическое значение. Электроргорск: ЭКОлаб; 2011.
4. Никитина А.В., Акиншина Ю.А., Ницакова Н.Е., Амелина Е.А., Марданлы С.Г. Иммунохроматографический тест для выявления скрытой крови в кале. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2019. 65 (9):536-40.
5. Рабочая группа по диагностике и ведению острой эмболии лёгочной артерии Европейского общества кардиологов (ESC). Рекомендации ESC по диагностике и ведению пациентов с острой эмболией системы легочной артерии. *Российский кардиологический журнал*. 2015: 8(124):67-110.
6. Савельев В. С., Чазов Е. И., Гусев Е. И. Российские клинические рекомендации по диагностике, лечению и профилактике венозных тромбозов и тромбоэмболических осложнений. *Флебология*. 2010; 4(2): 1–37.

## REFERENCES

1. Gil'manov A. D-Dimer: Analyte, methods, targets, purposes. *Kliniko-laboratornyj konsilium*. 2009; 31(6): 38-46. (in Russian)
2. Kishkun A.A. laboratory diagnosis of emergency cases. Moscow: Labora; 2012:271-9. (in Russian)
3. Mardanly S. G., Pervushin Yu. V., Ivanova V. N. Spinal fluid, laboratory research methods and their clinical and diagnostic value. Spinnomozgovaja zhidkost', laboratornye metody issledovaniya i ih kliniko-diagnosticheskoe znachenie. Elektrogorsk: ECOLab; 2011. (in Russian)
4. Nikitina A.V., Akinshina Ju.A., Nishhakova N.E., Amelina E.A., Mardanly S.G. Immunochromatographic test for detection of fecal occult blood. *Klinicheskaja laboratornaja diagnostika*. 2019. 65(9):536-40. (in Russian)
5. The Task Force for the Diagnosis and Management of Acute Pulmonary Embolism of the European Society of Cardiology (ESC). ESC recommendations for the diagnosis and management of patients with acute pulmonary embolism. *Rossiyskiy kardiologicheskij zhurnal*. 2015; 8(124):67-110. (in Russian)
6. Savel'ev V.S., Chazov E. I., Gusev E. I. Russian clinical guidelines for the diagnosis, treatment and prevention of venous thromboembolic complications. *Flebologiya*. 2010; 4(2): 1-37. (in Russian)
7. Anderson F.A.Jr., Spencer F.A. Risk factors for venous thromboembolism. *Circulation*. 2003; 107 (23): 9-16.
8. Heit J.A., The Epidemiology of Venous Thromboembolism in the Community. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008; 28(3): 370-2.
9. Konstantinides S.V., Torbicki A., Agnelli G., Danchin N., Fitzmaurice D., Galiè N. et al. 2014 ESC guidelines on the diagnosis and management of acute pulmonary embolism. *Eur Heart J*. 2014; 35(43): 3033-69.
10. Lippi G., Cervellini G., Casagrande I., Morelli B., Testa S., Tripodi A. D-dimer testing for suspected venous thromboembolism in the emergency department. *Consensus document of AcEMC, CISMEL, SIBioC, and SIMeL. Clin. Chem. Lab. Med*. 2013; 52(5): 1-8.
11. Lippi G., Tripodi A., Simundic A.M. International Survey on D-Dimer Test Reporting: A Call for Standardization. *Seminars in Thrombosis & Hemostasis*. 2015; 41(3): 287-93.
12. Olson J.D., Adcock D.M., Bush T.A., de Moerloose P., Gardiner C., Giniard V.R. et al. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Quantitative D-Dimer for exclusion venous thromboembolic disease. *Approved Guideline*. 2011;31(6):1-31.
13. Silverstein M.D., Heit J.A., Mohr D.N., Petterson T.M., O'Fallon W.M., Melton L.J. Trends in the incidence of deep vein thrombosis and pulmonary embolism: a 25-year population-based study. *3<sup>rd</sup> Arch.Intern. Med*. 1998; 158(6): 585-93.
14. Timp J.F., Braekkan S.K., Versteeg H.H., Cannegieter S.C. Epidemiology of cancer-associated venous thrombosis. *Blood*. 2013; 122 (10): 1712-23.

Поступила 15.09.19

Принята к печати 10.10.19