

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2025

Марданлы С.Г.^{1,2}, Ротанов С.В.^{1,3}, Гашенко Т.Ю.^{1,2}, Помазанов В.В.^{1,2}, Попова Т.В.², Жданович А.В.¹

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ D-ДИМЕРА В ПЛАЗМЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА ИММУНОФЕРМЕНТНОЙ ТЕХНОЛОГИЕЙ



EDN: EEHDDX

¹АО «ЭКОлаб», 142530, Электрогорск, Россия;

²ГОУВО МО «Государственный гуманитарно-технологический университет» (ГОУ ВО МО «ГТТУ»), 142611, Орехово-Зуево, Россия;

³ФБУН «ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора (ФБУН «ГНЦ ПМБ» Роспотребнадзора), 142279, г. о. Серпухов, п. Оболensk, Россия

Представлены результаты разработки и изучения в соответствии с требованиями ГОСТ Р 51352-2013 нового отечественного набора реагентов «Тест-система иммуноферментная для определения концентрации D-димера в плазме крови «ИФА-D-димер» (по ТУ 21.20.23-355-70423725-2023; РУ № РЗН 2024/23118 от 11 июля 2024 г.; АО «ЭКОлаб», Электрогорск, Россия). Описан состав базовой комплектации набора. Аналитическая чувствительность ИФА определяемой концентрации D-димера не превышает 10 нг/мл, коэффициент вариации внутри серии – 4,06-4,12%; между сериями – 1,07-1,12%; точность (тест на «открытие») – 100,1-100,8% и линейность – 96,5-104,5% в интервале 375-1500 нг/мл. Установлено отсутствие интерферирующего влияния на результаты количественного определения D-димера повышенного содержания в плазме крови таких эндогенных факторов, как: гемоглобин (в концентрации 200 г/л), билирубин (120 мкмоль/л), триглицериды (11 ммоль/л). В сравнительных испытаниях показаны высокие показатели клинической эффективности нового набора, не уступающие соответствующим показателям набора реагентов сравнения.

Ключевые слова: иммуноферментный анализ; клиническая лабораторная диагностика; коагулология; D-димер; набор реагентов

Для цитирования: Марданлы С.Г., Ротанов С.В., Гашенко Т.Ю., Помазанов В.В., Попова Т.В., Жданович А.В. Определение концентрации D-димера в плазме крови человека иммуноферментной технологией. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2025; 70 (1): 25-33.

DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2025-70-1-25-33>

EDN: EEHDDX

Для корреспонденции: Ротанов Сергей Владимирович, научный консультант АО «ЭКОлаб»; e-mail: svrotanov@mail.ru

Финансирование. Исследование выполнено в соответствии с научным производственным планом предприятия при полном финансировании АО «ЭКОлаб».

Благодарность. Авторы выражают благодарность сотрудникам научно-производственного отдела инфекций, передаваемых половым путем, АО «ЭКОлаб» за оказанную помощь в организации и выполнении лабораторных исследований.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 12.11.2024

Принята к печати 13.11.2024

Опубликовано 00.01.2025

Mardanly S.G.^{1,2}, Rotanov S.V.^{1,3}, Gashenko T.Yu.^{1,2}, Pomazanov V.V.^{1,2}, Popova T.V.², Zhdanovich A.V.¹

DETERMINATION OF D-DIMER CONCENTRATION IN HUMAN BLOOD PLASMA BY ENZYME-BASED IMMUNOASSAY TECHNOLOGY

¹JSC «EKOLab», 142530, Elektrogorsk, Russia;

²State educational institution of higher education of the Moscow region «State Humanitarian University of Technology» (GGTU), 142611, Orekhovo-Zuyevo, Russia;

³Federal budgetary institution of Science «State Scientific Centre of Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор (FSBI «SSC PMB» of Rosпотребнадзор), 142279, Serpukhov, Obolensk, Russia

The article presents the results of the development and study of a new domestic reagent kit «Enzyme-linked immunosorbent assay test system for determining the concentration of D-dimer in blood plasma «ELISA-D-dimer» (according to TU 21.20.23-355-70423725-2023; RU No. RZN 2024/23118 dated July 11, 2024; JSC «ECOLab», Elektrogorsk, Russia) in accordance with the requirements of GOST R 51352-2013. The composite composition of the basic kit is described. The analytical sensitivity of ELISA for the determined concentration of D-dimer does not exceed 10 ng/ml, the coefficient of variation within a batch is 4.06-4.12%; between batches - 1.07-1.12%; accuracy (of the «discovery» test) is 100.1-100.8% and linearity is 96.5-104.5% in the range of 375-1500 ng/ml. No interfering effect on the results of quantitative determination of D-dimer of elevated levels in blood plasma of such endogenous factors as hemoglobin (at a concentration of 200 g/l), bilirubin (120 μmol/l) and triglycerides (11 mmol/l) was established. Comparative tests showed high clinical efficacy of the new kit, which are not inferior to the corresponding indicators of the comparison reagent kit.

Key words: enzyme immunoassay; clinical laboratory diagnostics; coagulology; D-dimer; reagent kit

For citation: Mardanly S.G., Rotanov S.V., Gashenko T.Yu., Pomazanov V.V., Popova T.V., Zhdanovich A.V. Determination of D-dimer concentration in human blood plasma by enzyme immunoassay technology. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2025; 70(1): 25-33. (in Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2025-70-1-25-33>

EDN: EEHDDX

For correspondence: *Rotanov Sergey Vladimirovich*, scientific consultant of JSC "ECOLab", Elektrogorsk; e-mail: svrotanov@mail.ru

Information about authors:

Mardanly S.G., <https://orcid.org/0000-0003-3650-2363>;

Rotanov S.V., <https://orcid.org/0000-0002-3222-1401>;

Gashenko T.Yu., <https://orcid.org/0000-0001-6768-2251>;

Pomazanov V.V., <https://orcid.org/0000-0002-7336-9912>;

Popova T.V., <https://orcid.org/0000-0003-0426-3126>;

Zhdanovich A.V., <https://orcid.org/0000-0001-5131-1501>.

Funding. *The research was carried out in accordance with the scientific production plan of the enterprise with full financing from JSC ECOLab.*

Acknowledgment. *The authors express their gratitude to the staff of the Scientific and Production Department of sexually transmitted infections of JSC ECOLab for their assistance in organizing and performing laboratory tests.*

Conflict of interest. *The authors declare absence of conflict of interest.*

Received 12.11.2024

Accepted 13.11.2024

Published 00.01.2025

Введение. Травматическое повреждение целостности сосудистой стенки и, в некоторых случаях, инфекционно-аллергические факторы, воздействуя на эндотелий сосудов, активируют процессы свертывания крови, образование тромбов и прекращение излияния крови из повреждённого сосуда. Свертывающая система обеспечивает свое эффективное действие за счёт взаимодействия факторов, высвобождающихся и активирующихся при повреждении клеток эндотелия сосуда, с тромбоцитами и белком плазмы крови – фибриногеном, что, в конечном этапе, приводит к формированию клеточно-белкового сгустка – тромбоцитно-фибринового тромба. Образование внутрисосудистого тромба является результатом каскадной активации многочисленных факторов свертывания плазмы крови. При этом каждый из них, перейдя в активную форму, последовательно активирует последующий фактор, завершением чего служит образование пространственной структуры (каркаса) сгустка фибрина. Количество активированных факторов каждой последующей фазы гемостаза прогрессивно нарастает [1, 2].

Функциональная активность клеточного и плазменного компонентов свертывающей системы в организме постоянно регулируется сложным комплексом белковых факторов плазмы крови, в совокупности обозначаемых как противосвертывающая система.

Процесс образования сгустка нерастворимого фибрина состоит из трёх этапов:

- протеолитический переход неактивного растворимого белка плазмы фибриногена (состоящего из двух субъединиц) в активные фибрин-мономеры, способные полимеризоваться; он происходит благодаря ферменту тромбину, активация которого из предшественника протромбина с участием протромбиназы может происходить двояко: по внешнему (тканевому) или внутреннему (плазменному) пути;

- этап полимеризации: фибрин-мономеры в присутствии ионов кальция (Ca^{++}) образуют растворимый фибрин-полимер-«S», в котором мономеры соединены последовательно «конец в конец»;

- ферментативный этап: при участии активного XIII фактора (фибринстабилизирующий фактор, фибринолиза), активируемого тем же тромбином, между молекулами растворимого фибрин-полимера-«S» об-

разуются дополнительные поперечные дисульфидные (D=D) связи, и он переходит в нерастворимый фибрин-полимер-«I» [1-3].

Одновременно с образованием фибрин-полимера-«I», но с существенно меньшей активностью начинается ферментативный процесс его растворения – фибринолиз (при участии протеолитического фермента плазмина). Ферментативное расщепление фибрина на фрагменты происходит по линиям соединения мономеров «конец в конец», при этом плазмин не разрушает ковалентные связи между D-доменами, поэтому образующиеся продукты деградации фибрина представляют собой D-димеры и тримеры D-E-D. При повышенном фибринолизе плазмин способен расщеплять и молекулы растворимого белка фибриногена, но в отличие от процессов растворения тромба в этом случае образуются отдельные фрагменты фибрина D и E [1-5].

В нормальных физиологических условиях процессы свертывания крови и деградации фибрина динамически уравновешены, но с возрастом и при присоединении ряда неблагоприятных факторов в организме человека происходят сдвиги системы гемостаза в сторону гиперкоагуляции. К числу факторов, достоверно повышающих риски развития венозных тромбозов, относят: длительную гиподинамию или особенности организации трудового процесса, пожилой возраст пациентов, появление ряда заболеваний, сопровождающихся нарушением гемостаза (нарушения обмена липидов, варикозная болезнь, тромбофлебиты, злокачественные опухоли), состояния после ортопедических операций (реконструктивные вмешательства при травмах и переломах трубчатых костей, эндопротезирование крупных суставов), приём оральных контрацептивов, беременность [5-7].

В клинической практике лабораторные исследования по определению D-димера в крови являются одним из наиболее информативных показателей, отражающих появление гиперкоагуляции, развитие тромботических состояний в сосудистом русле и неразрывно связанной с этим активацию процессов эндогенного фибринолиза [4-7]. Особое значение контроль за состоянием возможного образования сосудистых тромбов проявился в период эпидемического распространения среди населения новой коронавирусной инфекции COVID-19, что связано, как непосредственно с патофизиологическими

проявлениями этого заболевания, так и с состоянием длительной гиподинамии в процессе лечения и карантина [8, 9]. По согласованной позиции ведущих экспертов Евразийской ассоциации терапевтов повышение содержания D-димера в 3-4 раза и более у пациентов с COVID-19 является предиктором опасности летального исхода и достаточным показанием для срочной госпитализации [10].

У здоровых лиц моложе 55 лет (исключая беременных) нормальные показатели содержания D-димера в крови составляют 250-500 нг/мл (нг/мл DDU, D-Dimer Unit или мкг/мл) или 0,25-0,5 мг/л, что соответствует значению менее 2,7 нмоль/л. По мнению ведущих специалистов, для пожилых людей верхняя граница этого показателя повышается от 0,5 мг/л на 0,1 мг/л на каждые последующие 10 лет возраста [11]. Некоторые исследователи указывают на референсное значение содержания D-димера на уровне менее 243 нг/мл: по их данным для беременных нормальные показатели во втором триместре повышаются до <457 нг/мл, и в третьем триместре – до <644 нг/мл. Альтернативной единицей измерения является нг/мл FEU (Fibrinogen Equivalent Unit); ориентировочный пересчет показателей возможен по формуле $0,5 \text{ нг/мл FEU} = > 1,0 \text{ нг/мл DDU}$ [12].

Повышение содержания D-димера в крови указывает на активацию фибринолитической активности имеющегося в сосудистом русле нерастворимого фибрина, что напрямую связано с размерами и длительностью существования тромба. По данным ряда публикаций этот маркер может быть достаточно информативен в период от 2 до 6-8 часов от начала тромбообразования, другие авторы указывают на более длительную его циркуляцию в крови (до 24 часов и более) [5-7]. Но во всех случаях он отмечается как достаточно информативный и динамичный показатель венозного тромбоза; разрушение D-димера происходит в основном в ткани почек.

В качестве методов клинического лабораторного исследования D-димера применяют турбидиметрию, иммуноферментный анализ (ИФА), иммунохроматографию (ИХ) [4, 5, 8, 13-15].

Наиболее востребованной лабораторной технологией определения D-димера является ИФА, позволяющий количественно определять указанный аналит от уровня 60 нг/мл. Исследование методом ИФА не длительно по времени исполнения, но проводится в клинико-диагностической лаборатории с серией клинических образцов.

Для исследований D-димера экспресс-методами в клинической лаборатории или у постели больного разработаны иммунохроматографические наборы реагентов [13-15], позволяющие врачу оперативно оценивать клиническую ситуацию, они менее точны в количественном отношении.

Цель исследования – разработка набора реагентов для определения концентрации D-димера в плазме крови человека методом иммуноферментного анализа (ИФА) на твердофазном носителе при «ручной» поставке или с использованием ИФА-анализаторов, изучение показателей клинической эффективности применения нового медицинского изделия с использованием клинических образцов.

Материал и методы. В основу разработки нового диагностического ИФА набора реагентов для лабораторного применения положены классические подходы

для одноступенчатой технологии определения целевого аналита в крови в ИФА с применением панели аттестованных калибраторов. Обеспечение специфичности ИФА осуществлено с использованием высококачественных коммерческих расходных материалов и химических реагентов, разрешенных к применению в Российской Федерации, ранее многократно использованных на нашем предприятии при разработке новых ИФА тест-систем [13-18].

Для проведения предварительных испытаний и испытаний на соответствие нормативной производственной документации и проведения установочных испытаний с клиническими образцами на предприятии выпущены 4 опытно-производственные серии разработанного набора «Тест-система иммуноферментная для определения концентрации D-димера в плазме крови «ИФА-D-димер» (по ТУ 21.20.23-355-70423725-2023; АО «ЭКОлаб»): серии № 01 и № 02 (изготовлены 30.03.2023 г., годные до 30.03.2025 г.) и серии № 03 и № 04 (изготовлены 30.03.2023 г., годные до 31.03.2025 г.). В качестве референс-системы применен «Набор реагентов для иммуноферментного определения концентрации D-димера в плазме крови «D-димер-ИФА-БЕСТ» (по ТУ 21.20.23-002-23548172-2018; производства АО «Вектор-Бест», РУ № РЗН 2019/8716 от 06.08.2019 г., серии № 02216 от 06.2022 г.).

Оценка показателей эффективности проведения исследований с новым набором реагентов (позиции - линейность, точность, «открытие», специфичность и др.) проведена в соответствии с указаниями Национального стандарта РФ ГОСТ Р 51352-2013 «Медицинские изделия для диагностики in vitro. Методы испытаний» (утв. приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии № 1532-ст от 8 ноября 2013 г.).

Клинические образцы плазмы крови получены из медицинских учреждений Павлово-Посадского района Московской области в соответствии с ранее заключенными договорами о научном сотрудничестве на безвозмездной основе:

- МУЗ «Павлово-Посадская ЦРБ» (лицензия на осуществление медицинской деятельности № ЛО41-01162-50/00362976 от 22 ноября 2019 г.);

- ГБУЗ МО Электрогорская городская больница (лицензия на осуществление медицинской деятельности № ЛО41-01162-50/00344915 от 19 февраля 2015 г.);

- Диагностический Центр «El'Clinic» АО «ЭКОлаб» г. Электрогорск (лицензия на осуществление медицинской деятельности № ЛО41-01162-50/00365571 от 8 апреля 2015 г.).

Все лабораторные исследования проведены согласно инструкциям, прилагаемым к соответствующим наборам реагентов, анализаторам и программному обеспечению.

Результаты. На основании результатов серии установочных исследований, целенаправленно осуществленных сотрудниками предприятия, разработаны технические параметры производства специфических компонентов нового набора: иммуносорбента, панели калибраторов, положительного контрольного образца. Базовая версия разработанной ИФА тест-системы получила наименование «Тест-система иммуноферментная для определения концентрации D-димера в плазме крови

«ИФА-D-димер» по ТУ 21.20.23-355-70423725-2023». Комплектация нового набора реагентов включала:

- иммуносорбент - моноклональные антитела к D-димеру, сорбированные в лунках стрипов 96-луночного разборного полистиролового планшета для иммунологических реакций с плоским дном ELISA Plate, 96TF3(maxi) (фирма «Xiamen Yunpeng Science and Technology Development Co.», Ltd, Китай, кат. № AT2922191119);

- комплект из 5 калибровочных проб (КП₀-КП₄) - растворы, содержащие D-димер в известной концентрации: в КП₀ - 0 нг/мл, в КП₁ - 250 нг/мл; в КП₂ - 750 нг/мл; в КП₃ - 1500 нг/мл и в КП₄ -3000 нг/мл; аттестованные в соответствии с ГОСТ ISO 17511-2011 относительно стандартных образцов предприятия (СОП-355, аттестованных в соответствии с ГОСТ Р ИСО 15194-2013);

- контрольный положительный образец (К_{обр}) - сыворотка крови человека, содержащая антитела к D-димеру в известной концентрации (указывается на этикетке флакона для каждой серии набора), инактивированная, жидкая. Примечание: сырье для приготовления К_{обр} получают от станции переливания крови согласно «Инструкции по заготовке и консервированию донорской крови» (утв. в 1995 г.) и Дополнению к ней от 1999 г.; К_{обр} не содержит HBsAg и антитела к *Treponema pallidum*, ВГС, ВИЧ_{1,2} (лабораторный контроль их наличия и содержания проводится с использованием коммерческих тест-наборов, разрешенных к применению Минздравом РФ);

- конъюгат – моноклональные антитела, меченные пероксидазой хрена;

- раствор для разведения исследуемых образцов (РРО) – буферный раствор для разведения образцов, содержащий азид натрия (фирма АО «ЭКОлаб», кат. № 11-49);

- раствор индикаторный (РИ) - субстратный раствор, содержащий тетраметилбензидин (фирма АО «ЭКОлаб», Россия, кат. № 40.07);

- 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином - ФСБ-Т(25х) (АО «ЭКОлаб», Россия, кат. № 11-90);

- стоп-реагент – 0,5 моль/л водный раствор кислоты серной (ГОСТ 4204-77).

Кроме указанных компонентов набор содержит:

- наконечники для автоматических пипеточных дозаторов объемом до 250 мкл;

- вспомогательные пластиковые ёмкости габаритными размерами (ШхВхГ) 100х50х20 мм, вместимостью 30 мл (фирма АО «ЭКОлаб», Россия, кат. № Р-01);
 - клейкую защитную плёнку для микропланшетов размером 82х135 мм.

Сбор образцов клинического материала для исследования (плазма крови пациента) должен производиться в соответствии с ГОСТ Р 53079.4-2008 «Обеспечение качества клинических лабораторных исследований». Образцы плазмы крови до исследования хранят не более 7 суток при температуре 2-8 °С. При необходимости более длительного хранения, рекомендуется приготовить из них аликвоты и хранить в замороженном состоянии при температуре минус 20-70 °С. С целью обеспечения достоверных результатов исследования рекомендуется использовать только однократный цикл замораживания и оттаивания образцов. Размороженные образцы перед исследованием тщательно перемешивать (допустимо на лабораторном шейкере типа «Вортекс»). Для тестирования в ИФА с разработанным набором необходимо не менее 20 мкл (по 10 мкл в дублях) плазмы крови человека. Не рекомендуется исследование образцов с повышенным содержанием липидов, с признаками гемолиза или визуально определяемым микробным ростом; образцы, содержащие осадок, отцентрифугировать в течение 10-15 мин при 2500-3000 об/мин. Калибровочные пробы и положительный контроль (К_{обр}) не разводят, они готовы к применению.

По результатам постановки ИФА с набором «ИФА-D-димер» строят калибровочный график показателей оптической плотности (ОП) в лунках по отношению к содержанию антител в соответствующих калибраторах; по графику определяют уровень определяемого аналита в изучаемых пробах плазмы крови. Срок годности набора - 2 года.

В соответствии с требованиями ГОСТ Р 51352-2013 сотрудники предприятия осуществили ряд постановок с наборами реагентов «ИФА-D-димер». Полученные результаты представлены в табл. 1-5.

1. По показателю соотношения оптических плотностей (ОП) калибровочных проб (при сэндвич-варианте исследовании) с разными сериями изделия получены значения, удовлетворяющие требованиям ОП_{КП0} < ОП_{КП1} < ОП_{КП2} < ОП_{КП3} < ОП_{КП4}, относительной стабильности соотношений ОП_{КП1}/ОП_{КП0}, ОП_{КП4}/ОП_{КП1} и ОП_{КП4}/ОП_{КП3} (табл. 1).

Таблица 1

Определение технических характеристик набора «ИФА-D-димер»

Серии набора реагентов	Результаты исследования при определении технических характеристик в Наборе реагентов «ИФА-D-димер»							
	Средняя оптическая плотность в лунках с КП (ОП _{КПn})					Соотношения показателей ОП в лунках с КП		
	КП ₀	КП ₁	КП ₂	КП ₃	КП ₄	ОП _{КП1} /ОП _{КП0}	ОП _{КП4} /ОП _{КП0}	ОП _{КП4} /ОП _{КП3}
Серия № 01	0,046	0,171	0,608	1,167	2,136	3,7	46,4	1,8
Серия № 02	0,044	0,161	0,597	1,151	2,290	3,8	46,0	1,8
Серия № 03	0,050	0,188	0,450	1,268	2,301	3,7	52,0	2,0
Серия № 04	0,040	0,154	0,603	1,147	2,204	3,9	55,1	1,9

2. По показателю аналитической чувствительности. Аналитическая чувствительность определена

с помощью КП₀ с концентрацией D-димера 0 нг/мл. Определено среднее арифметическое значение ОП в п

лунках (A3-A12; n=10) с КП₀ (ОП_{КП0 ср.}) после постановки ИФА и рассчитано его среднее квадратическое отклонение (σ) по формуле:

$$\delta = \sqrt{\frac{\sum(\text{ОП}_{\text{КП}0 i} - \text{ОП}_{\text{КП}0 \text{ ср.}})^2}{n - 1}} \quad (1),$$

где: ОП_{КП_{0i}} – измеренный показатель ОП в i лунке с образцом КП₀.

Затем на калибровочном графике по оси ординат откладывали значение ОП_{КП_{0i}}+2σ и находили соответствующее ему на оси абсцисс значение минимально определяемой концентрации D-димера (табл. 2).

Таблица 2

Определение аналитической чувствительности с набором «ИФА-D-димер»

Серия набора реагентов	Результаты исследования с наборами реагентов «ИФА-D-димер»												Чувствительность, (нг/мл)
	Оптическая плотность КП ₀ в лунках иммунологического планшета										ОП _{КП0 ср.}	σ	
	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12			
Серия № 01	0,046	0,048	0,042	0,048	0,047	0,043	0,048	0,007	0,058	0,037	0,042	0,0135	9,78
Серия № 02	0,050	0,044	0,038	0,045	0,042	0,054	0,047	0,006	0,056	0,035	0,041	0,0137	9,51
Серия № 03	0,044	0,042	0,048	0,047	0,032	0,053	0,050	0,043	0,005	0,036	0,040	0,0138	9,46
Серия № 04	0,040	0,042	0,032	0,043	0,035	0,047	0,007	0,034	0,055	0,043	0,038	0,0127	9,60

Аналитическая чувствительность (минимальная определяемая концентрация D-димера) для разработанного ИФА набора реагентов составила 9,46-9,78 нг/мл и утверждена как показатель, не превышающий значение 10 нг/мл.

3. *Определение коэффициента вариации (КВ)* проводили на основе повторного исследования (n=10) контрольного аттестованного образца из состава набора реагентов (К_{обр.}) по формуле:

$$\text{КВ} = \frac{100}{C_{\text{ср}}} \times \sqrt{\frac{\sum(C_i - C_{\text{ср}})^2}{n - 1}} \quad (2),$$

где: C_i – результат определения концентрации аналита в лунке i с К_{обр.};

C_{ср} – среднее арифметическое определения концентрации во всех лунках (B3-B12) с К_{обр.}

Результаты исследований представлены в табл. 3. Расчётные показатели коэффициента вариации результатов ИФА исследования внутри одной серии составили 4,06-4,12%, между сериями - 1,07-1,12%; они не превышают установленный нормативный показатель 8%, что соответствует ТУ 21.20.23-355-70423725-2023.

Таблица 3

Результаты исследований с набором «ИФА-D-димер» при расчёте показателя воспроизводимости (коэффициента вариации КВ)

Серия набора реагентов	Результаты определения концентрации D-димера в К _{обр.}											КВ внутри серии (в %)	КВ между сериями (в %)
	Концентрация D-димера (C _i) в лунках иммунологического планшета (в нг/мл)										C _{ср}		
	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11	B12			
Серия № 01	824,4	819,6	718,0	761,3	777,4	793,9	785,6	779,6	796,7	811,6	786,81	4,06	1,07%
Серия № 02	794,4	789,6	712,0	791,3	827,4	843,9	775,6	819,6	816,7	781,6	795,21	4,6	
Серия № 03	823,2	816,5	716,0	760,2	764,3	773,8	765,5	769,5	789,6	810,3	778,89	4,12	1,12%
Серия № 04	785,3	779,5	713,2	781,1	823,5	834,8	765,5	817,3	812,5	762,3	787,51	4,6	

4. *Тест на «открытие» (точность)*. При постановке теста на «открытие» смешивают, как правило, равные объёмы контрольной сыворотки (К_{обр.}, содержащей D-димер в средней концентрации 787,105 нг/мл) и калибровочной пробы (например, КП₃ содержащей D-димер в концентрации 1500 нг/мл), полученные пробы исследуют в восьми-десяти повторностях. В исследуемой пробе определяют концентрацию анализируемого антигена (C_{изм}) и сравнивают её значение с расчётным (C_{расч}) по формуле (3). Для оценки показателя рассчитывают среднее арифметическое значение концентрации D-димера для 10 лунок C3-C12 и рассчитывают отклонение полученной концентрации от пред-

писанной (%) по формуле:

$$\text{OT} = \frac{C_{\text{изм}}}{C_{\text{расч}}} \times 100 \quad (3).$$

По директиве ГОСТ Р 51352-2013 тест на «открытие» (точность) является одним из основных для решения вопроса о специфичности и правильности проведения анализа, показатель варьирует в пределах 90-110%. Его суть заключается в оценке взаимодействия изучаемого аналита в исследуемой пробе (например, в контрольном образце плазмы крови) и в калибровочной с применяемым моноклональным антителом. Если они

взаимодействуют по-разному («матриксный эффект»), то появляются систематические ошибки и непостоянство результатов определения. Проведённые изменения

установили постоянство показателя с вариабельностью 100,1-100,8%, что указывает на правильность проведения исследований с разработанным набором.

Таблица 4

Определение показателя «открытие» для исследований с набором реагентов «ИФА-D-димер»

Серия набора реагентов	Результаты исследований при определении точности												
	Концентрация D-димера в образцах, полученных при смешивании равных объёмов (Кобр + КП ₁) (в нг/мл)										C _{изм ср. арифм.}	C _{расч}	Отклонение, Δ OT (в %)
	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12			
Серия № 01	1155	1125	1181	1186	1174	1142	1136	1180	1197	1203	1167,9	1150	101,6
Серия № 02	1158	1184	1175	1184	1146	1187	1162	1179	1163	1166	1170,4	1150	101,8
Серия № 03	1152	1135	1160	1174	1143	1180	1124	1176	1184	1101	1152,9	1150	100,3
Серия № 04	1156	1174	1174	1185	1142	1178	1160	1172	1153	1133	1162,7	1150	101,1

5. Тест на линейность. Проводят ИФА исследование с образцами, полученными при смешивании в отдельных пробирках равного количества калибровочных проб КП₄, КП₃, КП₂ (содержащих 3000, 1500, 750 нг/мл D-димера соответственно) с КП₀ (не содержащей D-димера), то есть с образцами для определения линейности: Л¹⁵⁰⁰, Л⁷⁵⁰, Л³⁷⁵ соответственно.

На основании полученных результатов ОП по калибровочному графику определяют концентрацию

D-димера (C_{изм}) в каждом образце (Л¹⁵⁰⁰, Л⁷⁵⁰, Л³⁷⁵) и рассчитывают отклонение полученных концентраций (%) от расчётных (C_{расч}) с учётом фактора разведения по формуле:

$$Л = \frac{C_{изм}}{C_{расч}} \times 100 \quad (4).$$

Таблица 5

Расчёт показателя линейность для исследований с наборами реагентов «ИФА-D-димер»

Серия набора реагентов	Разведение образца в 2 раза	Результаты исследований (C _{изм}) при определении линейности в Наборе реагентов «ИФА-D-димер»												
		Концентрация D-димера (в лунках D, E, F планшета с образцами Л ¹⁵⁰⁰ , Л ⁷⁵⁰ , Л ³⁷⁵ соответственно (нг/мл)										C _{изм ср. арифм.}	C _{расч}	Отклонение, ΔЛ (%)
		3	4	5	6	7	8	9	10	11	12			
Серия № 01	КП ₄ (Л ¹⁵⁰⁰)	1578	1583	1569	1578	1512	1611	1596	1522	1517	1615	1568,1	1500	104,5
	КП ₃ (Л ⁷⁵⁰)	714	707	732	761	723	719	716	744	783	734	733,3	750	97,8
	КП ₂ (Л ³⁷⁵)	368	382	376	357	359	384	366	357	341	329	361,9	375	96,5
Серия № 02	КП ₄ (Л ¹⁵⁰⁰)	1549	1616	1587	1523	1531	1570	1537	1589	1576	1602	1568	1500	104,5
	КП ₃ (Л ⁷⁵⁰)	767	749	737	793	787	766	734	748	783	752	761,6	750	101,55
	КП ₂ (Л ³⁷⁵)	389	378	362	391	384	349	351	357	376	394	373,1	375	99,5
Серия № 03	КП ₄ (Л ¹⁵⁰⁰)	1569	1611	1523	1521	1535	1572	1534	1582	1574	1600	1562,1	1500	104,1
	КП ₃ (Л ⁷⁵⁰)	762	739	747	783	782	776	724	758	773	753	759,7	750	101,2
	КП ₂ (Л ³⁷⁵)	388	373	342	361	385	345	354	347	356	374	362,5	375	96,7
Серия № 04	КП ₄ (Л ¹⁵⁰⁰)	1546	1516	1567	1525	1541	1470	1547	1569	1586	1582	1544,9	1500	103,0
	КП ₃ (Л ⁷⁵⁰)	757	749	767	783	783	726	735	742	773	732	754,7	750	100,6
	КП ₂ (Л ³⁷⁵)	359	368	360	381	394	342	361	347	366	384	366,2	375	97,7

Рассчитанные показатели линейности результатов исследований концентрации D-димера в плазме крови в диапазоне концентраций 375-1 500 нг/мл с набором «ИФА-D-димер» варьируют в пределах 96,5-104,5%, что полностью соответствует нормативу (90-110%).

Для определения interfering влияния некоторых эндогенных факторов, содержащихся в

крови, на результаты определения D-димера смоделированы образцы плазмы крови (на основе КП₃, содержащем D-димер в концентрации 1 000 нг/мл) с повышенным содержанием гемоглобина (200 г/л), билирубина (120 мкмоль/л), триглицеридов (11 ммоль/л). Результаты их исследования предоставлены в табл. 6.

Таблица 6

Интерferирующего влияния эндогенных факторов на результаты определения уровня D-димера в ИФА с набором реагентов «ИФА-D-димер»

Эндогенные interfering факторы, внесенные в образец КП ₃	Результат определения D-димера (нг/мл)				% отклонения от изначальной концентрации D-димера			
	Серия 01	Серия 02	Серия 03	Серия 04	Серия 01	Серия 02	Серия 03	Серия 04
Гемоглобин в концентрации 200 г/л	1510	1520	1479	1487	0,67	1,33	1,41	0,86
Билирубин в концентрации 120 мкмоль/л	1587	1574	1523	1510	5,78	4,90	1,53	0,67
Триглицериды в концентрации 11 ммоль/л	1498	1485	1534	1525	0,13	1,00	2,27	1,67

Результаты исследования продемонстрировали отсутствие interfering влияния повышенного содержания в плазме крови гемоглобина, билирубина, триглицеридов на результаты количественного определения D-димера в ИФА с разработанным новым набором реагентов.

В сравнительных испытаниях с тест-системой сравнения «Набор реагентов для иммунофермент-

ного определения концентрации D-димера в плазме крови «D-димер-ИФА-БЕСТ» (по ТУ 21.20.23-002-23548172-2018, производства АО «Вектор-Бест», РУ № РЗН 2019/8716 от 06.08.2019 г.) в параллельных постановках исследовано 125 клинических образцов плазмы крови, содержащих повышенное (n=75) и нормальное (n=50) количество D-димера.

Таблица 7

Сравнительные испытания клинической эффективности набора реагентов «ИФА-D-димер» (АО «ЭКОлаб») и набора сравнения «D-димер-ИФА-БЕСТ»

Исследуемые образцы плазмы крови	Количество результатов исследования с наборами									
	«ИФА-D-димер» (АО «ЭКОлаб»)								«D-димер-ИФА-БЕСТ» (АО «Вектор-Бест»)	
	Серия 01		Серия 02		Серия 03		Серия 04		Серия 2216	
	С концентрацией D-димера (нг/мл)									
	>250	<250	>250	<250	>250	<250	>250	<250	>250	<250
Содержащие D-димер выше нормы, >250 нг/мл (n=75)	75	0	75	0	75	0	75	0	75	0
Содержащие D-димер в норме (для взрослого здорового человека), <250 нг/мл (n=50)	0	50	0	50	0	50	0	50	0	50

В сравнительных испытаниях продемонстрированы свойства клинической специфичности и чувствительности исследований, не уступающие набору реагентов сравнения, зарегистрированному в РФ.

Последующие клинические испытания разработанного набора реагентов в рамках процедуры государственной регистрации в Российской Федерации позволили подтвердить результаты, установленные в настоящем исследовании, и получить разрешение на использование набора в учреждениях здравоохранения при оказании медицинской помощи населению (РУ № РЗН 2024/23118 от 11 июля 2024 г.).

Заключение. На предприятии АО «ЭКОлаб» в рамках выполнения плановых научных исследований по разработке новых диагностических наборов реагентов

для оказания медицинской помощи населению разработан новый ИФА набор реагентов «Тест-система иммуноферментная для определения концентрации D-димера в плазме крови «ИФА-D-димер» по ТУ 21.20.23-355-70423725-2023. Испытания, проведенные сотрудниками предприятия, по оценке свойств нового набора, в соответствии с требованиями ГОСТ Р 51352-2013, позволили установить высокие показатели по позициям аналитической чувствительности определяемой концентрации D-димера (не превышает 10 нг/мл), коэффициента вариации (внутри серии – 4,06-4,12%; между сериями – 1,07-1,12%); точности (теста на «открытие») - 100,1-100,8% и теста на линейность - 96,5-104,5%.

В испытаниях с клиническими образцами продемонстрировано отсутствие interfering влияния на

результаты количественного определения D-димера в ИФА с разработанным новым набором реагентов повышенного содержания в плазме крови таких эндогенных факторов, как гемоглобин (в концентрации 200 г/л), билирубин (120 мкмоль/л), триглицериды (11 ммоль/л).

Сравнительные исследования клинических образцов установили высокие показатели клинической эффективности нового набора «ИФА-D-димер», не уступающие показателям ИФА с набором реагентов сравнения «D-димер-ИФА-БЕСТ» (АО «Вектор-Бест»). Разработанный набор реагентов «ИФА-D-димер» получил разрешение на применение в медицинских учреждениях РФ (ПУ № РЗН 2024/23118 от 11 июля 2024 года).

ЛИТЕРАТУРА

1. Сусликова, М.И., Губина М.И., Александров С.Г., Булнаева А.Ф. Избранные вопросы физиологии крови: Учебное пособие. Иркутск: ИГМУ; 2021.
2. Основы физиологии системы свертывания и противосвертывания крови. В кн.: Р.М. Линчак. Справочник: Анти тромботическая терапия в клинике внутренних болезней. М.: ЛитРес: Самиздат; 2024. ISBN 978-5-532-93797-0.
3. Мельник С.Н. Физиология крови. Лекция 2. Гомельский государственный медицинский университет. Доступно: <https://studfile.net/preview/9724349/page:3/> (Дата обращения 31.10.2024).
4. Орадова А.Ш., Турсынова С.К., Канжигалина З.К., Касенова Р.К. Исследование D-димера в клинико-диагностической лаборатории. *Вестник Казахского национального медицинского университета*. 2014; 2 (2): 279-81. Доступно: <https://cyberleninka.ru/article/n/issledovanie-d-dimera-v-kliniko-diagnosticheskoy-laboratorii/viewer> (Дата обращения 31.10.2024).
5. Васильев С.А., Виноградов В.Л., Берковский А.Л., Маркова М.Л. D-димер - диагностический и прогностический маркер тромботических заболеваний. *Медицинский совет*. 2020; 1: 256-66.
6. Савельев В.С., Чазов Е.И., Гусев Е.И. Российские клинические рекомендации по диагностике, лечению и профилактике венозных тромбоемболических осложнений. *Флебология*. 2010; 4(2): 1-37.
7. Соловьёва И.В. D-димер: клиническое значение для пожилых пациентов. *Консилиум. Лабораторная диагностика*. 2017; 8 (158): 28-9.
8. Евтюгина Н.Г., Санникова С.С., Пешкова А.Д., Сафиуллина С.И., Андрианова И.А., Тарасова Г.Р. и др. Особенности нарушения системы свертывания крови у больных COVID-19. *Терапевтический архив*. 2021; 93(11): 1255-63. DOI: 10.26442/00403660.2021.11.201185.
9. Воробьёва Н.А., Воробьёва А.И. Прогностическая значимость D-димера при COVID-19. *Проблемы стандартизации в здравоохранении*. 2021; 5-6: 36-42. DOI: 10.26347/1607-2502202105-06036-042.
10. Арутюнов Г.П., Козиолова Н.А., Тарловская Е.И., Арутюнов А.Г., Григорьева Н.Ю., Джунусбекова Г.А. и др. Согласованная позиция экспертов Евразийской ассоциации терапевтов по некоторым новым механизмам патогенеза COVID-19: фокус на гемостаз, вопросы гемотрансфузии и систему транспорта газов крови. *Кардиология*. 2020; 60(5): 9-19. DOI: 10.18087/cardio.2020.5.n1132.
11. Суханов А.В. D-Димер. Что это? Для чего используют? Интернет-ресурс. Доступно: <https://phlebologsukhanov.ru/d-dimer/> (Дата обращения 31.10.2024 г.).
12. Интернет-ресурс INVITRO. D-димер. Доступно: <https://www.invitro.ru/library/labdiagnostika/27265/> (Дата обращения 31.10.2024).
13. Акиншина Ю. А., Амелина Е. А., Марданлы С. Г. Иммунохроматографический тест для определения D-димера. Перспективы внедрения инновационных технологий в медицине и фармации. Сборник материалов VI Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. Т. 1. Орехово-Зуево: ГГТУ; 2019: 10-4.
14. Акиншина Ю.А., Никитина А.В., Амелина Е.А., Марданлы С.Г. Иммунохроматографический тест для определения D-димера. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2019; 64 (11): 654-8.
15. Акиншина Ю.А., Марданлы С.Г., Ротанов С.В., Помазанов В.В. Киселева В.А. О количественном определении D-димера иммунохроматографическим методом. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67 (2): 91-6.
16. Марданлы С. Г., Симонов В. В., Авдонина А. С. Производство наборов реагентов для клинической лабораторной диагностики иммунохимическими методами. Орехово-Зуево: ГГТУ; 2017. ISBN 978-5-87471-255-6.
17. Марданлы С.Г., Самосадова П.В., Токмакова Ж.А. Дополнительная оценка диагностической эффективности новой иммуноферментной тест-системы для выявления антител к дифтерийному экзотоксину. *Известия ГГТУ. Медицина, фармация*. 2023; 16 (4): 12-5. DOI: 10.51620/2687-1521-2023-4-16-12-15.
18. Марданлы С.Г., Шушакова Е.К., Морозова А.Г. Разработка иммуноферментной тест-системы для выявления иммуноглобулинов класса А к вирусам простого герпеса человека 1 и 2-го типов. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2024; 29 (1): 50-7. DOI: 10.51620/EIB-2024-29-1-50-57.

REFERENCES

1. Suslikova M.I., Gubina M.I., Alexandrov S.G., Bulnaeva A.F. Selected issues of blood physiology: Textbook. Irkutsk: IGMU; 2021. (in Russian)
2. Fundamentals of the physiology of the blood coagulation and anticoagulation system. In: R.M. Linchak. Handbook: Antithrombotic therapy in the clinic of internal diseases. Moscow; LitRes: Samizdat; 2024. ISBN 978-5-532-93797-0. (in Russian)
3. Mel'nik S.N. Blood physiology. Lecture 2. Gomel State Medical University. Available Accessed: <https://studfile.net/preview/9724349/page:3/> (Available 30.10.2024). (in Russian)
4. Oradova A.Sh., Tursynova S.K., Kanzhigalina Z.K., Kasenova R.K. Study of D-dimer in the clinical diagnostic laboratory. *Vestnik Kazakhskogo natsional'nogo meditsinskogo universiteta*. 2014; 2(2): 279-81. Accessed: <https://cyberleninka.ru/article/n/issledovanie-d-dimera-v-kliniko-diagnosticheskoy-laboratorii/viewer> (Available 31.10.2024). (in Russian)
5. Vasil'ev S.A., Vinogradov V.L., Berkovsky A.L., Markova M.L. D-dimer - a diagnostic and prognostic marker of thrombotic diseases. *Meditsivskiy sovet*. 2020; 1: 256-66. (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. Solov'yova I.V. D-dimer: clinical significance for elderly patients. *Konsilium. Laboratornaya diagnostika*. 2017; 8(158): 28-9. (in Russian)
8. Evtugina N.G., Sannikova S.S., Peshkova A.D., Safullina S.I., Andrianova I.A., Tarasova G.R. et al. Peculiarities of blood coagulation disorders in patients with COVID-19. *Terapevticheskii Arkhiv*. 2021; 93(11): 1255-63. DOI: 10.26442/00403660.2021.11.201185. (in Russian)
9. Vorob'yova N.A., Vorob'yova A.I. Prognostic significance of D-dimer in COVID-19. *Problemy standartizatsii v zdavoookhraneni*. 2021; 5-6: 36-42. DOI: 10.26347/1607-2502202105-06036-042. (in Russian)
10. Arutyunov G.P., Koziolova N.A., Tarlovskaya E.I., Arutyunov A.G., Grigorieva N.Yu., Dzhunusbekova G.A. et al. The Agreed experts' position of the Eurasian association of therapists on some new mechanisms of COVID-19 pathways: focus on hemostasis, hemotransfusion issues and blood gas exchange. *Kardiologiya*. 2020; 60(5): 9-19. (in Russian)
11. Sukhanov A.V. D-Dimer. What is it? What is it used for? Internet resource. Available: <https://phlebologsukhanov.ru/d-dimer/> (Date of access 30.10.2024). (in Russian)
12. Internet resource INVITRO. D-dimer. Available: <https://www.invitro.ru/library/labdiagnostika/27265/> (Date of access 31.10.2024). (in Russian)
13. Akinshina Yu.A., Amelina E.A., Mardanly S.G. Immunochromatographic test for determination of D-dimer. In: Prospects for the introduction of innovative technologies in medicine and pharmacy. Collection of materials of the VI All-Russian Scientific and Practical Conference with international participation. [Sbornik materialov VI Vserossiyskoy nauchno-prakticheskoy konferentsii s mezhdunarod-

- nym uchastiem. Tom 1]. Orekhovo-Zuevo: GGTU; 2019: 10-4. (in Russian)
14. Akinshina Yu.A., Nikitina A.V., Amelina E.A., Mardanly S.G. Immunochromato-graphic test for determination of D-dimer. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2019; 64 (11): 654-8. (in Russian)
 15. Akinshina Yu.A., Mardanly S.G., Rotanov S.V., Pomazanov V.V., Kiseleva V.A. On the quantitative determination of D-dimer by immunochromatographic method. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2022; 67; 2: 91-6. (in Russian)
 16. Mardanly S.G., Simonov V.V., Avdonina A.S. Production of reagent kits for clinical laboratory diagnostics by immunochemical methods. Orekhovo-Zuevo: GGTU; 2017. ISBN 978-5-87471-255-6. (in Russian)
 17. Mardanly S.G., Samosadova P.V., Tokmakova Zh.A. Additional evaluation of the diagnostic efficiency of a new enzyme immunoassay test system for detecting antibodies to diphtheria exotoxin. *Vestnik GGTU. Meditsina. Farmatsiya*. 2023; 16 (4): 12-5. DOI: 10.51620/2687-1521-2023-4-16-12-15. (in Russian)
 18. Mardanly S.G., Shushakova E.K., Morozova A.G. Development of an enzyme immunoassay test system for detecting immunoglobulins of class A to human herpes simplex viruses types 1 and 2. *Epidemiologiya i infeksionnye bolezni*. 2024; 29 (1): 50-7. DOI: 10.51620/EIB-2024-29-1-50-57. (in Russian)