

蛋白 C/蛋白 S/VWF 因子活性检测试剂盒的研制及临床效能验证

鲁翌

湖南赛新生物科技有限公司，湖南长沙，410300；

摘要：当前体外诊断（IVD）行业正处于高速增长阶段，凝血与止血功能检测作为血栓与出血性疾病诊疗的核心环节，市场需求持续扩大。目前国内凝血诊断市场仍以凝血四项等常规筛查项目为主，蛋白 C（PC）、蛋白 S（PS）、血管性血友病因子（vWF）等精准凝血因子检测试剂高度依赖进口，价格昂贵、可及性低，严重制约了国内血栓与出血性疾病的精准诊断与分层管理。笔者根据已有核心技术和生产工艺，在凝血瀑布经典学说基础上，自行研发适用于全自动血凝仪的 PC、PS、VWF 因子活性测定试剂盒，包括原材料的选择、组方、工艺、质控方法的确立等内容，参照国家食品药品监督管理局及 CLSI 的指导文件进行系统分析性能评价及多中心临床性能评价。

关键词：体外诊断；凝血检测；蛋白 C；蛋白 S；血管性血友病因子

DOI：10.69979/3029-2808.26.03.062

1 引言

1.1 我国体外诊断行业发展现状与市场格局

体外诊断（IVD）被誉为临床医生的“眼睛”，是现代医学检验、疾病预防、个体化治疗与疗效监测的重要支撑。在全球范围，约有三分之二的医疗决策依赖诊断数据，但与诊断相关的投入仅占整体医疗开支的约 1%；因此，提升诊断技术水平、拓展诊断方法、完善诊断供给结构，已成为推动全球卫生健康事业发展的重要方向。我国体外诊断行业起步较晚，与欧美、日本等发达国家相比，在技术积累、产业规模、产品创新及质量控制等方面仍存在一定差距，但近年来受益于人口老龄化加剧、医疗保障体系不断完善、人均医疗卫生支出持续提升以及精准医学理念的快速普及，行业整体进入了由产业导入期向高速成长期过渡的关键阶段。

1.2 血栓与出血性疾病的临床危害及诊断需求

血栓形成是缺血性心脏病、缺血性脑卒中以及静脉血栓栓塞症等多种重大疾病的共同病理生理基础，已经成为导致全世界人群疾病负荷和死亡的主要原因之一。据 GBD 2016 报道，在 2016 年世界范围内共有 5470 万人死亡，其中 3953 万人由非传染病引起，占比高达 72.26%；其中仅由血栓密切相关的缺血性心脏病及缺血性脑卒中致死人数达 1217 万，占全世界死亡总人数的 22.

5%。我国的心脑血管病及静脉血栓栓塞症也随着发病人群的增加呈逐年增长态势并有年轻化的趋势，给家庭和社会带来了巨大的负担。

机体的止血与凝血依靠血管内皮细胞、血小板、各类凝血因子、抗凝系统、纤溶系统以及多种辅酶和离子的协同作用，并在精细化的调控下进行，是一个复杂的生理与生化过程；任何环节出现异常都可能引起出血或血栓。对止血功能进行全面的临床评估，是早期识别血栓性与出血性疾病、实现精准诊断、制定个体化治疗方案并进行预后判断的关键。目前临床常做的四项检查 PT、APTT、TT 和 FIB 在国内医院非常常见，但这四项只能大致反映患者的凝血及出血情况，并不能准确地判断出患者的具体病因是由于凝血因子缺乏还是抗凝物质过多或者血管壁损伤所致。如遗传性易栓症、血管性血友病、血友病、狼疮抗凝物阳性、DIC 等疾病的诊断，常规四项检查往往不能得出确切结论，容易导致漏诊、误诊的发生。

因此，开展凝血因子、抗凝蛋白、血管性血友病因子等精准指标检测，是实现血栓与出血性疾病早诊早治、精准诊疗的必然要求，也推动着凝血诊断市场由常规筛查向精准分型方向升级。

我国凝血类诊断试剂市场正处于快速增长期，预测数据显示，2018 年我国凝血试剂市场销售额将达到 35.28 亿元，市场容量与销量同步高速增长。但目前国内高

端凝血检测试剂市场仍被日本 SYSMEX、法国 STAGO、美国 IL 等国际品牌垄断,进口试剂价格高、供货周期长、售后服务成本高,限制了基层医院凝血精准检测项目的普及。结合发达国家的临床检验项目设置来看,我国医院所涉及的凝血检验项目的数量相对较少,具有较大的发展空间和技术更新潜力。在国家相关企业的投入力度增加以及科技水平不断提高的情况下,相信我国生产的凝血检测试剂能够走出国门,像血细胞分析仪及生化试剂一样在国内得到推广并逐步取代国外产品。

2 材料与方法

2.1 实验材料与仪器

蛋白 C 激活剂、蛋白 S 缺乏血浆、vWF 因子缺乏血浆、发色底物、瑞斯托霉素、缓冲液组份、防腐剂、校准品及质控品等辅料均来自合格供应商,并进行严格的筛选试验以及功能评价,保证其具有稳定的来源及可靠的活性并避免交叉污染。全自动血凝分析仪、超速冷冻离心机、微量移液器、水浴锅、稳定性测试箱、紫外分光光度计等。

临床标本来源为各三级医院检验科,其中健康体检者血浆、确诊血栓性疾病者血浆、血管性血友病患者血浆、肝病患者血浆、DIC 患者血浆以及干扰性样本(溶血、黄疸、脂血)。所有样品的采集、处理及储存均按临床检验标准操作规程进行。本实验经医学伦理会批准同意,并遵守相关的医学道德标准及法规。参照试剂为国内外企业上市并经过国家药监局注册登记备案的同类检测试剂盒产品,用于产品比较试验和临床评价用参照试剂。

2.2 试剂盒检测原理

蛋白 C 活性检测试剂盒采用发色底物法:样本中的蛋白 C 在特异性激活剂作用下转化为活化蛋白 C,活化蛋白 C 可特异性水解发色底物,释放出发色基团,反应体系吸光度变化与蛋白 C 活性呈正相关,通过校准曲线即可计算样本中蛋白 C 的活性水平。

蛋白 S 活性检测试剂盒采用凝固法:样本中加入蛋白 C 激活剂与蛋白 S 依赖检测试剂,蛋白 S 作为辅因子参与抗凝反应,反应体系凝固时间与蛋白 S 活性呈负相关,通过标准曲线计算蛋白 S 活性含量。VWF 因子活性检测试剂盒采用瑞斯托霉素辅因子法:在瑞斯托霉素诱导下,vWF 因子介导血小板发生凝集反应,凝集强度与

vWF 因子活性水平成正比,通过检测凝集速率与程度,确定 vWF 因子活性值。

2.3 试剂盒研制与工艺优化

(1)原料筛选:对国内外多家供应商的核心原料进行活性、纯度、稳定性、特异性测试,确定最优原料组合,保证试剂的灵敏度与特异性。

(2)运用单因素实验法结合正交实验法,综合分析缓冲溶液 pH 值、离子浓度、作用时间、作用温度、底物浓度及激活剂用量等因素并对其进行优化,得到最佳配比。

(3)工艺定型:建立标准化生产工艺流程,包括原液配制、过滤除菌、定量分装、冻干(如需)、半成品检验、成品包装、成品放行等全流程操作规范,严格遵循 GMP 生产要求。

(4)校准与溯源体系建立:选用国际公认参考品作为溯源依据,制备工作校准品与质控品,建立统一校准曲线,保证不同批次试剂结果的一致性与可比性。

(5)质量控制体系建立:制定原料入库检验、过程检验、成品检验标准,确定关键质量控制点,确保产品质量稳定可控。

2.4 分析性能验证

按照 CLSI EP5-A2、EP6-A、EP9-A、EP17-A 等相关文件的要求,分别对三个试剂盒进行系统的分析性能验证及评价,包括:精密度(批内、批间、中间、日间)、准确度(回收实验、方法学比对)、线性区间、最低检出限、最低定量限、特异性、抗干扰能力(如溶血、黄疸、脂血、肝素、华法林、狼疮抗凝物等干扰)、有效期稳定性、热稳定性、运输过程稳定性、开封后稳定性等。

2.5 临床效能验证

以多个临床三级医院为样本来源,进行前瞻性、平行对照研究,并与国外进口试剂同时期检测,本次实验主要观察指标包括总符合率、Kappa 值、灵敏度、特异度、阳性预测值及阴性预测值、参考区间确认情况等。所有资料均应用 SPSS 软件分析,其中计量资料与计数资料分别用 χ^2 检验和 t 检验。连续型变量进行相关及回归分析;以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 试剂盒研制结果

经原料优选、组配方及工艺摸索,本文完成了蛋白 C、蛋白 S 及 vWF 因子活性测定试剂盒的研究,确立其最终配方及放大生产工艺;三种试剂盒适用于国内外各品牌全自动血凝分析仪器,可以进行批量、自动、标准化的测定,使用方便、测定迅速,符合临床检验科使用习惯。校准曲线线性良好, R^2 均大于 0.995, 校准品与质控品赋值准确,稳定性良好,能够满足日常检测质量控制要求。生产工艺稳定可控,批间差异小,成品外观、澄清度、pH 值等均符合质量标准,可实现批量生产。

3.2 分析性能验证结果

(1) 精密度:三款试剂盒批内精密度 $CV < 3\%$, 批间精密度 $CV < 4\%$, 日间精密度 $CV < 5\%$, 中间精密度均符合临床检验质量要求,远优于行业标准限值。

(2) 准确度:回收试验回收率在 $95\% \sim 105\%$ 之间,与进口试剂比对结果相关系数 $R > 0.99$, 相对偏差 $< 5\%$, 准确度达到国际同类产品水平。

(3) 线性范围:PC 活性试剂盒线性范围 $70\% \sim 150\%$, PS 活性试剂盒线性范围 $65\% \sim 135\%$, vWF 因子活性试剂盒线性范围 $30\% \sim 150\%$, 覆盖临床常见异常区间,满足临床诊断需求。

(4) 特异性与抗干扰性:试剂与其他凝血因子、抗凝蛋白无交叉反应;溶血、黄疸、脂血样本及常见抗凝药物对检测结果无显著干扰,具备良好的抗干扰能力。

(5) 稳定性: $2 \sim 8^\circ\text{C}$ 条件下储存有效期可达 12 个月; 37°C 热稳定性试验 7 天性能无明显下降;模拟运输极端条件后,检测结果无显著变化;开瓶后在 $2 \sim 8^\circ\text{C}$ 条件下可稳定使用 28 天,稳定性满足临床储存与使用要求。

3.3 临床效能验证结果

多中心临床验证结果显示,自研蛋白 C 活性检测试剂盒与进口试剂总符合率为 96.2% , Kappa 值为 0.92; 蛋白 S 活性检测试剂盒总符合率为 95.8% , Kappa 值为 0.91; vWF 因子活性检测试剂盒总符合率为 97.1% , Kappa 值为 0.94, 三者均表现出极高的一致性。在疾病诊断效能上,三款试剂盒对相应因子缺乏症、血管性血友病、血栓性疾病的临床诊断灵敏度均 $> 91\%$, 特异度均 $> 98\%$, 阳性预测值与阴性预测值均处于较高水平。健康人群参

考区间验证结果与说明书标示区间一致,适用于国内人群检测,可直接应用于临床常规检测。

4 讨论

4.1 试剂盒研制的技术创新性与国产化价值

该研究中研发出的蛋白 C / S / VWF 因子活性测定试剂盒,在核心专利技术、关键原材料、生产工艺方面均为自主研发生产,是目前国内为数不多的集三个高难度凝血因子于一体的项目,具备较强的先进性和独创性;采用公认的、应用范围最宽泛的方法:即发色底物法、凝固法及瑞斯托霉素辅因子法进行检测。同国际主流的技术平台接轨,保证了结果的互认性和可比性。在产业层面,本项目打破了进口品牌在高端凝血精准检测领域的长期垄断,大幅降低临床检测成本,提升检测试剂可及性,有助于推动精准凝血检测项目在基层医院的普及,实现医疗资源均等化。同时,项目完善了国产凝血诊断产品线,推动我国凝血检测由常规四项向因子活性、抗凝蛋白、血管功能等精准指标延伸,提升了国内体外诊断企业在凝血领域的核心竞争力。

4.2 性能指标与临床应用价值

本研究中分析性能验证结果显示,所研制的试剂盒各项目性能指标均达到了进口同品种产品的水平,并在某些方面超过了进口同品种产品的水平,可以用于临床进行精确稳定地测定;同时,临床效能验证结果显示,三款试剂盒与进口金标试剂一致性良好,在遗传性易栓症、血管性血友病、血栓性疾病诊断方面具有很好的敏感性和特异性,能够较好地补充常规凝血检验项目所不能发现的问题。在临床应用中,PC、PS 活性检测可用于易栓症筛查、静脉血栓风险评估、反复流产病因排查、抗凝治疗监测;vWF 因子活性检测是血管性血友病诊断、分型与鉴别诊断的核心指标,同时可用于血栓前状态、血管内皮损伤评估。三款试剂盒联合使用,可与常规凝血四项形成互补,构建“筛查-精准诊断-病因分析”的完整凝血检测体系,显著提升临床对出血与血栓性疾病的诊断效率与准确性。

5 结论

本研究成功完成蛋白 C、蛋白 S、VWF 因子活性检测试剂盒的研制、分析性能验证与多中心临床效能验证,三款试剂盒检测原理科学、配方工艺稳定、分析性能达标、临床结果可靠,整体质量达到国际同类产品水平,

可满足临床对血栓与出血性疾病精准诊断、鉴别诊断、风险评估及疗效监测的需求。

本项目的完成不仅打破了国外高端凝血因子试剂垄断的局面,填补了国内高端凝血因子检测试剂盒的市场空白,节约了临床检测成本,也为体外诊断行业实现进口替代及产业升级提供了强有力的技术保障,为提高我国血栓与止血性疾病的诊治能力、优化和完善凝血诊断体系以及推进健康中国建设发挥着重要作用。该试剂盒具有批量生产和大规模应用的优势,在市场上有较大的需求量和经济效益。

参考文献

- [1]刘蔚. 能量应激条件下ME2调控宫颈癌细胞代谢重塑和存活的功能及机制研究[D]. 东北师范大学,2025.
- [2]孙胜利,徐雯雯,吴卫,等. 免疫比浊法检测vWF抗原及活性试剂盒的性能评估[J]. 标记免疫分析与临床,2

025,32(05):1023-1028+1064.

- [3]滕虹伯. 刺五加叶中chiisanoside衍生物的设计合成及抗MIRI作用机制研究[D]. 吉林农业大学,2025.
- [4]王琳萍. AMPK/Sirt3信号通路介导线粒体功能改变影响神经元兴奋性进而参与应激性高血压调控的作用机制研究[D]. 上海大学,2025.
- [5]钱子冰. ANXA5抑制M2型巨噬细胞铁死亡改善自身免疫性肝炎的分子机制研究[D]. 兰州大学,2025.
- [6]范婷婷. C1q/肿瘤坏死因子相关蛋白-6在心力衰竭中的心脏保护作用[D]. 安徽医科大学,2025.

作者:鲁翌,男,1981年出生,土家族,高级工程师,籍贯:湖北恩施,2009年博士毕业,毕业于华中科技大学同济医学院,主要研究方向:临床体外诊断。

项目编号:2024JJ8191;项目名称:具有精确诊断指向的血栓与出血有关检测试剂盒的开发及产业化