

免疫透射比浊法在 AU5800 全自动生化分析仪检测降钙素原的方法学评价

戴婉如,周 欢,林燕辉,伍严安(福建医科大学省立临床医学院检验科,福州 300001)

【摘要】 目的 在 AU5800 全自动生化分析仪上用免疫透射比浊法检测降钙素原(PCT)的方法学评价。**方法** 通过 AU5800 全自动生化分析仪来检测 PCT 的精密度、线性、参考区间等指标,并与酶免疫荧光法试剂盒进行相关性比较,从而评价其性能。**结果** 该方法批内和批间精密度分别小于 8%和 15%;0~80 ng/mL 范围内线性良好($Y=0.994\ 1X+0.124\ 5,R^2=0.999$);正常人群的参考范围为小于 0.5 ng/mL;与酶免疫荧光法的相关性良好($Y=0.357\ 4X+0.284\ 2,R^2=0.960\ 7$)。**结论** 本检测方法不仅实现了 PCT 检测的快速、全自动化,而且化学性能优良、操作简单,降低了临床试剂成本,适合临床推广使用。

【关键词】 降钙素原; 免疫比浊法; 方法学评价; 免疫荧光法

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2015.10.049 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2015)10-1447-02

降钙素原(PCT)在临床主要应用于感染性疾病的鉴别^[1],是诊断血行感染、菌血症、败血症的一个较好指标^[2-3]。目前 PCT 的检测方法主要有放射免疫法、双抗体夹心法、胶体金法、免疫荧光法、免疫透射比浊法等。本研究选用的国产免疫透射比浊法,具有快速、简便,且价格相对较低廉的特点。根据美国临床和实验室标准化协会(CLSI)和医学实验室认可标准(ISO15189)对实验室质量的要求^[4],实验室对检测系统(仪器、试剂、校准品等)必须进行性能验证^[5]。因此,实验室需要对厂商声明的主要分析性能进行验证。本文对 AU5800 检测系统测定 PCT 进行精密度、线性范围、参考区间等指标的方法学评价,再与酶免疫荧光法检测结果进行比对,观察结果相关性,以此来评价该检测方法在临床上的价值。

1 材料与方法

1.1 材料来源 患者标本为 2013 年 10~11 月实验室接收的 67 例临床送检标本。酶免疫荧光法随时检测送检标本,剩余血清-80℃保存用于免疫比浊法测试(一次性完成)。正常人群均为健康体检者,年龄 16~77 岁,选择血常规、C 反应蛋白(CRP)正常,即无急、慢性炎症的体检合格标本 20 例。

1.2 仪器与试剂 贝克曼 AU5800 全自动生化分析仪,梅里埃全自动荧光分析仪。安徽大千生物工程有限公司生产的 PCT 测定试剂盒(免疫透射比浊法)(批号 085813),标准品(批号 084113)和质控品(批号 084213)。梅里埃诊断产品(上海)有限公司进口的 PCT 测定试剂盒(酶免疫荧光法)(批号 1002326640),校准品(批号 1057790)和质控品(批号 1057880)。

1.3 方法

1.3.1 免疫透射比浊法 样品中的 PCT 与试剂中的 PCT 抗体发生抗原-抗体反应,形成复合物,从而引起透光度减低,在一定范围内与样本中 PCT 量呈线性相关。

1.3.2 酶免疫荧光法 结合一步免疫测定夹心法和最终荧光检测来进行测定。

1.4 评价标准

1.4.1 精密度评价 按照 CLSI EP15-A2,取 2 个浓度水平质控品,5 d 实验,每天做 1 批,每批每个水平 3 次重复测定,计算

批内精密度和批间精密度的均值、标准差和变异系数。

1.4.2 线性评价 选择低浓度(L)和高浓度(H)患者标本各 1 份,浓度覆盖仪器说明书给出的线性范围,H 和 L 按等比关系配制形成系列浓度血清(如 1L,0.8L+0.2H,0.6L+0.4H,0.4L+0.6H,0.2L+0.8H,1H)。每个实验样品在检测系统上重复测定 2 次,记录结果。将实测值与预期值作比较。采取平均斜率来确定系列样品应含有的待测物的预期值(X),所有样品重复测定的均值为实测值(Y),将所有结果点在 X-Y 坐标图上,计算回归方程: $Y=bX+a$ 和 R^2 ,并用 t 检验验证 a 是否与 0 差异有统计学意义。

1.4.3 参考区间评价 参考 NCCLSC28-A2 文件,选择 20 份体检合格的健康人标本,在检测系统上进行测定,对结果进行统计并对仪器说明书提供的参考区间进行验证,若 20 份标本检测结果均在仪器说明书提供的参考区间内或仅有 2 个标本超出,则验证通过。否则,进行参考区间确立实验。

1.4.5 相关性评价 通过 67 例不同病例分别用酶免疫荧光法和免疫透射比浊法测定,比较两者的相关性。

1.5 统计学处理 实验数据采用 SPSS13.0 软件和 Microsoft Excel 2000 软件进行统计分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 PCT 精密度结果 精密度评价结果符合厂家声明的批内精密度 $CV\leq 8.0\%$ 、批间精密度 $CV\leq 15.0\%$ 。该检测系统的批内精密度和批间精密度均满足检测要求。见表 1。

表 1 PCT 的精密度

PCT 浓度 X(ng/mL)	批内精密度		批间精密度	
	SD	CV%	SD	CV%
0.75	0.22	2.95	0.02	3.20
3.41	1.17	4.87	0.17	5.08

2.2 线性结果 $R^2=0.999$, $b=0.994\ 1$, $1.03\geq b\geq 0.97$; $a=0.124\ 5$,经 t 检验 $t=0.371$,小于 $t_{0.05}=2.228$,显示 a 与 0 差异无统计学意义($P>0.05$)。验证结果表明 PCT 在 0~58.8

ng/mL 范围内具有良好线性关系,与厂家提供线性范围 0~80 ng/mL 相符合。见表 3 和图 1。

表 3 6 个稀释浓度标本 PCT 结果 (ng/mL)

标本编号	1	2	3	4	5	6
加入高值相对量	0	1	2	3	4	5
实测值 1	0.09	11.84	24.32	36.91	48.37	56.60
实测值 2	0.06	11.46	22.09	36.27	46.11	59.30
实测值均值	0.08	11.65	23.21	36.59	47.24	57.95
斜率		11.65	11.60	12.20	11.81	11.59
平均斜率				11.77		
预期值	0.00	11.77	23.54	35.31	47.08	58.85
X 理论	0.00	11.80	23.50	35.30	47.10	58.80
Y1	0.00	11.80	24.20	36.80	48.30	56.50
Y2	0.00	11.40	22.00	36.20	46.00	59.20
Y 实测均值	0.00	11.58	23.13	36.52	47.17	57.88

注:X 为各组数据的理论值,Y 为各组实测值减去“1”号实测均值后的数值(实测值)。

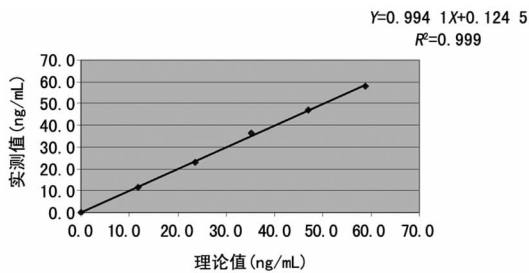


图 1 PCT 的线性测定

2.3 参考区间的验证 参考 NCCLSC28-A2 文件,选择 20 份体检合格的健康人血清标本,在检测系统上进行测定。经验证 20 份健康人血清标本浓度均在仪器说明书提供的参考区间内,符合试剂说明书提供参考范围,无结果超出所验证的参考范围,参考范围通过验证,表明正常人群 PCT 参考范围为小于 0.5 ng/mL。

2.4 相关性实验 取 67 例标本同时用酶免疫荧光法和免疫透射比浊法测定,结果表明两者相关性良好, $Y=0.3574X+0.2842$, $R^2=0.9607$ 。见图 2。

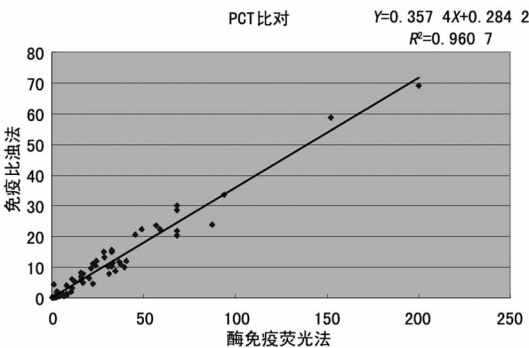


图 2 免疫比浊法和免疫荧光法检测 PCT 结果比对

3 讨 论

根据医学实验室认可标准(ISO15189)对实验室质量的要求,实验室对检测系统(仪器、试剂、校准品等)必须进行验证。

对试剂验证包括:精密度、线性、准确度和参考范围等^[6]。

精密度评价按照 CLSI EP15-A2 文件进行,实验数据显示在 AU5800 全自动生化分析仪上 PCT 测定的精密度达到了厂家检测声明,批内和批间精密度分别小于 8% 和 15%。线性评价即分析测量范围评价根据 EP6-A 文件,采用简便的平均斜率法。在 AU5800 全自动生化分析仪上 PCT 的浓度在 0~58.8 ng/mL 范围内具有良好线性关系,由于 PCT 达到 80 ng/mL 的血清标本难以获得,最高检测限 58.8 ng/mL 偏低于厂家的最高测定值,有待于进一步验证。参考区间的验证参考 NCCLSC28-A2 文件,选择 20 份体检合格的健康人血清标本全部通过验证。与法国梅里埃诊断产品(上海)有限公司进口的 PCT 测定试剂盒(酶免疫荧光法)进行相关性实验,表明 PCT 免疫比浊法结果同样可靠($n=67$, $R^2=0.9607$)。

目前检测 PCT 的方法很多^[7]。传统的放射免疫法敏感性较高,但检测时间较长,且有放射性元素污染,使用受限;胶体金法为半定量法,不依赖仪器,操作简便快速,但敏感性低,线性范围小无法满足临床需求,只能作为临床筛查;免疫发光法具有敏感度高、特异性强等特点,但是成本昂贵,不利于临床推广^[8]。临床需要一种快捷、准确、成本相对低廉的 PCT 测定方法,以便于临床广泛应用。免疫比浊法简便、快捷,适用于波长包括 600 nm 的各种生化分析仪,可满足临床急诊及批量检测的需要;而且成本较低,可以大大减低患者的检测费用。

综上所述,免疫比浊法检测 PCT 的各项性能指标进行验证和评价,均能满足临床检测的要求,具有良好的发展前景。

参考文献

[1] 杨滨,康梅.降钙素原在细菌感染性疾病诊断及治疗中的应用[J].现代预防医学,2009,36(3):596-597.

[2] Mueller F,Christ-crain M,Bregenzer TA,et al. Procalcitonin levels predict bacteremia in patients with Community-Acquired pneumonia a prospective cohort trial[J].CHEST,2010,138(1):121-129.

[3] van Nieuwkoop C,Bonten TN,van't Wout JW,et al. Procalcitonin reflects bacteremia and bacterial load in urosepsis syndrome: prospective observational study[J]. Crit Care,2010,14(6):206.

[4] 魏昊,丛玉隆,中国实验室国家认可委员会技术委员会医学分会.医学实验室质量管理与认可指南[M].北京:中国计量出版社,2004:59-75.

[5] 庄俊华.临床生化检验技术[M].北京:人民卫生出版社,2009.

[6] 杨有业,张秀明.临床检验方法学评价[M].北京:人民卫生出版社,2008.

[7] 张国富,师伟.降钙素原的检测及应用[J].实用医技杂志,2012,19(9):947-948.

[8] 孙丽萍,伏瑾,胡凤华,等.免疫色谱法与发光免疫分析法测定血清降钙素原[J].中华医学研究杂志,2007,7(2):108-110.