

[7] 钟倩怡,李招云,卢国光,等. 感染性标志物预测血流感染早期诊断价值的分析[J]. 检验医学, 2015, 30(5): 522-524.

[8] 曾淑娟,赵文利,周伟勤,等. 中国可疑血流感染新生儿行血培养阳性率的系统评价和 Meta 分析[J]. 中国妇幼保健, 2014, 29(35): 5941-5944.

[9] 蒋姣姣,李怡霖. 血清降钙素原、C 反应蛋白及白细胞计数联合检测对早期诊断沙门菌血流感染的价值研究[J]. 中国社区医师, 2015, 31(15): 106-107.

[10] Branche AR, Walsh EE, Vargas R, et al. Serum procalcitonin measurement and viral testing to guide antibiotic use for respiratory infections in hospitalized adults: a ran-

domized controlled trial[J]. J Infect Dis, 2015, 212(11): 1692-1700.

[11] 孙红. PCT 和 hs-CRP 检测对血流感染患者诊断的价值[J]. 浙江医学教育, 2016, 15(6): 47-50.

[12] 赵亮. 早期血清降钙素原与细菌性血流感染病原菌相关性研究[J]. 中国医院药学杂志, 2016, 36(21): 1904-1907.

[13] 张群,胡晓波. 降钙素原在革兰阳性菌和革兰阴性菌感染鉴别诊断中的价值探讨[J]. 检验医学, 2015, 30(11): 1113-1118.

(收稿日期:2017-02-17 修回日期:2017-04-24)

• 临床探讨 •

人血清 Kappa、Lambda 轻链透射比浊法检测试剂的研制*

王庆国,吴越光,赵明伟,宿明明[△]

(潍坊三维生物工程集团有限公司,山东潍坊 261061)

摘要:目的 建立人血清 Kappa(KAP)、Lambda(LAM)轻链透射比浊分析方法。方法 采用全自动日立生化分析仪,用自制透射比浊试剂检测临床血清标本,并对试剂的各项性能指标进行评价。结果 KAP 试剂盒的测定范围为 0.75~12.00 mg/mL,灵敏度为 $\Delta A > 0.08/12.00$ mg/mL,准确度偏差 $< 5\%$,批内精密度(CV) $< 5\%$ 、批间 CV $< 10\%$ 。样本中三酰甘油小于或等于 5 g/L、胆红素小于或等于 600 $\mu\text{mol/L}$ 、血红蛋白小于或等于 5 g/L、类风湿因子小于或等于 600 U/mL、抗坏血酸小于或等于 0.3 g/L 时对检测结果无明显影响,自制试剂盒与进口罗氏试剂盒相关系数为 0.999;LAM 试剂盒的测定范围为 0.50~8.00 mg/mL,灵敏度为 $\Delta A > 0.08/8.00$ mg/mL,准确度偏差 $< 5\%$,批内 CV $< 5\%$ 、批间 CV $< 10\%$ 。结论 KAP、LAM 透射比浊试剂盒各项指标均达到临床检测要求,与罗氏同类试剂测定结果有较好的相关性,在临床上有极大的应用前景,可替代国外同类产品试剂盒。

关键词: Kappa 轻链; Lambda 轻链; 透射比浊法

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2017.16.037 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2017)16-2432-03

轻链约由 214 个氨基酸组成,通常不包含碳水化合物,相对分子质量大约为 24×10^3 。每条轻链有 2 个由链内二硫键所组成的环肽。L 链有两类: Kappa(KAP)及 Lambda(LAM),同一天然免疫球蛋白中 L 链的类别是相同的^[1]。健康者血清中 KAP:LAM 比例约为 2:1^[2]。细胞克隆异常增生会导致单克隆球蛋白或游离免疫球蛋白片段(游离的轻链)增加,这会造成 KAP 与 LAM 链比例失衡, KAP 及 LAM 的比值失衡可预示单克隆 Y 球蛋白血症^[3-4]。在轻链生成增加的情况下,游离轻链的滤过也会增加,若超出肾小管的重吸收能力,该测试可定量检测结合及游离免疫球蛋白中的轻链。尿中轻链的检测是诊断及监测轻链型多发性骨髓瘤、轻链淀粉样变性重要的标志物^[2,5-11]。定量检测不同种类轻链水平有助于诊断巨球蛋白血症(巨型球蛋白生成增多)、结缔组织病(如类风湿关节炎、系统性红斑狼疮)等疾病^[12-13]。另外,感染、肝硬化、急慢性肝炎等疾病也会导致血中轻链增多,但一般表现为 KAP、LAM 同时增多;糖尿病、肾病等患者尿中也会出现 KAP、LAM 同时增多^[14-19]。已有的检测方法主要包括免疫电泳法、酶联免疫法,前者检测时间较长,操作比较繁琐,对非典型患者不能作出明确诊断;酶联免疫法有酶催化的扩大效应,定量不准确,这一点限制了它的应用。本文采用自制免疫透射比浊试剂进行血

清 KAP、LAM 检测,与罗氏同类试剂测定结果有较好的相关性,在临床上有极大的应用前景,可替代国外同类产品试剂盒。

1 材料与仪器

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料 羊抗 KAP、LAM 多克隆抗体由本实验室自制;质量控制(简称质控)血清、对照试剂分别为朗道(货号: 284LPC、329LPC、330LPC)、罗氏(KAP 货号: 06749976190; LAM 货号: 11820184316)公司产品。

1.1.2 样本 样本均来自潍坊市寒亭区人民医院。

1.1.3 仪器 日立 7080 全自动生化分析仪。

1.2 方法

1.2.1 试剂 分别取经亲和层析纯化处理的浓度为 24.3 mg/mL 和 16.2 mg/mL 的 KAP、LAM 抗体 0.5 mg,用稀释缓冲液(含 0.9% 的氯化钠注射液,0.01% 叠氮钠,0.05 mol/L Tris-HCl, pH 7.4)进行稀释,充分混匀,分装抗体,4℃ 保存。

1.2.2 标准品的制备 将 100 份新鲜高值血清混合,用 0.22 μm 的除菌滤膜过滤,用罗氏抗体试剂检测,并用标准品稀释液(含 0.9% 的氯化钠注射液,0.01% 叠氮钠,0.05 mol/L Tris-HCl, pH 7.4)进行稀释分装,-20℃ 冻存。

1.2.3 分析操作程序 将含有 KAP、LAM 的样本与多克隆

* 基金项目:山东省潍坊市高新区 2016 年度科技发展基金资助项目(2016GXZJ05)。

[△] 通信作者, E-mail: 3V-diagnostics@163.com。

抗体按一定比例混合,在反应缓冲液(0.1%叠氮钠,4% PEG6000,50 mmol/L Tris-HCl,pH 7.4)作用下,样本中的抗原在液相中与其相应特异性抗体反应,产生免疫复合物,从而引起溶液浊度改变,并在 340 nm 处吸光度发生变化,仪器自动检测透射光强度,反应液中透射光强度随浊度的变化而变化,全部检测过程由仪器自动完成。

1.3 室内质控 采用低值、高值室内质控液。

1.4 方法学评价

1.4.1 分析灵敏度 使用 3 批试剂,在日立 7080 生化仪 700/340 nm 波长处以蒸馏水为检测样本,即可测得试剂空白吸光度。检测浓度:KAP 为 12 mg/mL,LAM 为 8 mg/mL 样品吸光度差值,即为分析灵敏度。

1.4.2 准确度测试 分别对高、中、低值质控各进行 3 次平行测定,计算均值、偏差。KAP 浓度分别为 1.79、3.44、5.24 mg/mL;LAM 浓度分别为 0.95、1.80、2.74 mg/mL。

1.4.3 干扰试验 将同一正常临床样本分为同体积的若干小份,在每份中各加入相同体积的血红蛋白、胆红素、抗坏血酸、三酰甘油、类风湿因子,以得到含有不同浓度干扰物质的样本。与罗氏试剂同时测定。

1.4.4 精密度(CV)试验 批内 CV:取高、中、低值样本各 1 份,各重复测定 15 次,计算均值及 CV 值;批间 CV:自制试剂测定高、中、低值 3 种不同浓度样本,计算均值及 CV 值。

1.4.5 与国外同类试剂的相关性 用自制试剂与罗氏试剂同

时测定 40 份临床标本,计算测定结果的相关性。

2 结果

2.1 分析灵敏度 在日立 7080 生化仪 700/340 nm 波长处以蒸馏水为检测样本,即可测得试剂空白吸光度。检测最高浓度点样品吸光度差值,即为分析灵敏度。KAP 测定值:试剂 1 检测浓度为 12 mg/mL 的样品时,吸光度差值为 0.825 1A;试剂 2 检测浓度为 12 mg/mL 的样品时,吸光度差值为 0.834 8A;试剂 3 检测浓度为 12 mg/mL 的样品时,吸光度差值为 0.827 9A。LAM 测定值:试剂 1 检测浓度为 8 mg/mL 的样品时,吸光度差值为 1.375 9A;试剂 2 检测浓度为 8 mg/mL 的样品时,吸光度差值为 1.374 2A;试剂 3 检测浓度为 8 mg/mL 的样品时,吸光度差值为 1.380 6A。

2.2 准确度测试 对高、中、低值质控各进行 3 次平行测定,计算均值、偏差,见表 1。

表 1 KAP、LAM 轻链测定试剂盒准确度试验结果

质控	KAP		LAM	
	均值(mg/mL)	偏差(%)	均值(mg/mL)	偏差(%)
低值	1.79	0.5	0.90	-2.4
中值	3.57	2.0	1.86	1.4
高值	5.39	2.9	2.89	2.5

2.3 干扰试验 将同一正常临床样本分为同体积的若干小份,在每份中各加入相同体积的三酰甘油(5 g/L),胆红素(600 μmol/L),血红蛋白(5 g/L),类风湿因子(600 U/mL),抗坏血酸(0.3 g/L),以得到含有不同浓度干扰物质的样本。与罗氏试剂同时测定,见表 2。

表 2 KAP、LAM 轻链测定试剂盒抗干扰性能结果

干扰物	自制 KAP 试剂		罗氏 KAP 试剂		自制 LAM 试剂		罗氏 LAM 试剂	
	均值(mg/mL)	偏差(%)	均值(mg/mL)	偏差(%)	均值(mg/mL)	偏差(%)	均值(mg/mL)	偏差(%)
水	2.55	—	2.56	—	1.66	—	1.66	—
血红蛋白	2.66	4.22	2.67	4.31	1.73	4.04	1.73	3.83
胆红素	2.66	4.27	2.67	4.31	1.73	4.09	1.73	4.10
类风湿因子	2.66	4.21	2.67	4.37	1.73	4.17	1.73	3.88
抗坏血酸	2.45	-4.01	2.45	-4.19	1.58	-4.67	1.58	-4.89
三酰甘油	2.45	-4.05	2.45	-4.09	1.58	-4.55	1.59	-4.72

注:—表示无数据

2.4 精密度试验 按 1.4.4 的方法进行试验,试剂盒的批内 CV<5%(表 3),批间 CV<10%(表 4)。

表 3 KAP、LAM 轻链批内 CV 结果(n=15)

样本	KAP		LAM	
	均值(mg/mL)	CV(%)	均值(mg/mL)	CV(%)
低值	1.64	0.98	0.88	1.29
中值	3.46	1.85	1.80	2.99
高值	5.19	2.77	2.74	2.83

行线性回归分析,结果两种试剂所得的数值存在良好的相关性(图 1), $Y=1.001X-0.512$, $r=0.999$ (Y 代表罗氏试剂,X 代表自制试剂)。

表 4 KAP、LAM 轻链批间 CV 结果(n=15)

样本	KAP		LAM	
	均值(mg/mL)	CV(%)	均值(mg/mL)	CV(%)
低值	1.63	1.60	0.88	2.32
中值	3.45	4.89	1.83	3.68
高值	5.28	4.91	2.77	5.06

2.5 与国外同类试剂的相关性 40 份临床血清标本同时用自制和罗氏公司试剂进行检测,比较二者的相关性。

2.5.1 检测 KAP 分别检测 40 份血清样本,将两组数据进

2.5.2 检测 LAM 分别检测 40 份血清样本,将两组数据进行线性回归分析,结果两种试剂所得的数值存在良好的相关性

(图2), $Y=0.993X+1.162$, $r=0.999$ (Y代表罗氏试剂, X代表自制试剂)。

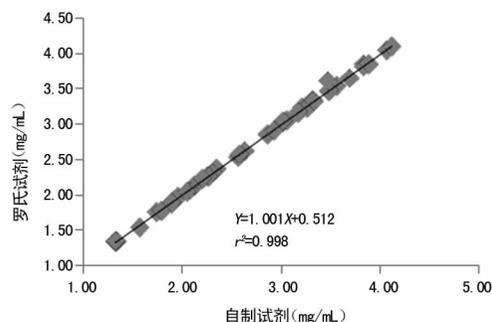


图1 自制试剂与罗氏试剂测定 KAP 相关性

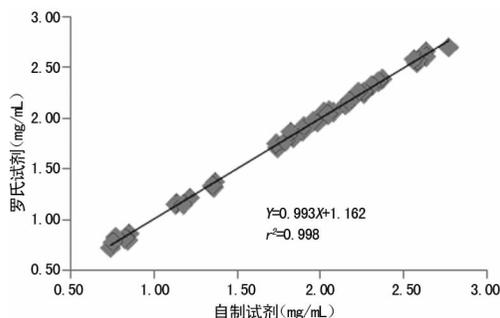


图2 自制试剂与罗氏试剂测定 LAM 相关性

3 讨论

免疫比浊测定法是将免疫分析引入到生化检测领域而形成的生化-免疫联合应用技术,它同时具备生化检测的快速性和免疫分析的特异性,是将现代光学测量仪器与自动化检测系统相结合应用于沉淀反应的方法,可对各种液体介质中的微量抗原、抗体和药物及小分子半抗原物质进行定量测定。免疫比浊测定法方法学的基础是抗原-抗体反应。

透射比浊法检测的灵敏度高、线性范围广、结果稳定、操作简单、抗干扰能力强、速度快,适合各种有全自动生化分析仪的医院,完全符合实验室常规检测的要求。因此,免疫透射比浊法在临床实验室的应用中具有广泛的应用价值与优势。与已有的检测方法(免疫电泳法、酶联免疫法)比较,采用免疫比浊法不但大大缩短了测定时间,而且节省试剂,降低了成本,同时操作更简便,节省人力,便于实现自动化,还可提高免疫学诊断的灵敏度和准确性。

本研究表明,自制免疫透射比浊法 KAP、LAM 试剂盒准确度相对偏差小于或等于 5.5%,批内 $CV < 5\%$,具有较好的重复性,批间 $CV < 10\%$,优于国家标准;临床检测血清标本分析的灵敏度($\Delta A > 0.08/12.00 \text{ mg/mL}$, $\Delta A > 0.08/8.00 \text{ mg/mL}$),样本检测值与国外罗氏试剂之间相关性良好。

潍坊三维生物工程集团有限公司自制透射比浊试剂盒与国外罗氏公司同类试剂测定结果有较好的相关性,检测成本较国外罗氏试剂低很多,在临床上有很大的应用前景,有望替代国外同类产品试剂盒,对推动国内诊断行业发展有重要意义。

参考文献

[1] 莫其农,何进才,宋林立,等.血清游离轻链 κ/λ 比值在慢性肾病患者肾损伤中的诊断价值[J]. 国际检验医学杂志, 2014, 35(2): 161-163.
 [2] 吕礼应,刘万利,杨九华,等.尿轻链检测的临床意义探

讨[J]. 检验医学, 2013, 28(11): 1051-1053.
 [3] 李迎伟,沈元元,王会平,等.血清尿游离轻链检测在结缔组织病中的临床意义[J]. 安徽医学, 2014, 35(6): 737-739.
 [4] Katzmann JA, Clark RJ, Abraham RS, et al. Serum reference intervals and diagnostic ranges for free kappa and free lambda immunoglobulin light chains; relative sensitivity for detection of monoclonal light chains[J]. Clinical Chemistry, 2002, 48(9): 1437-1444.
 [5] 刘莉. 116 例多发性骨髓瘤免疫特征表型分析[J]. 检验医学与临床, 2013, 10(10): 1249-1252.
 [6] Abraham RS, Katzmann JA, Clark RJ, et al. Quantitative analysis of serum free light chains; A new marker for the diagnostic evaluation of primary systemic amyloidosis[J]. Am J Clin Pathol, 2003, 119(2): 274-278.
 [7] 缪丽萍. 多发性骨髓瘤 15 例实验室检查结果分析[J]. 检验医学与临床, 2013, 10(7): 854-855.
 [8] 朱杰,赵成艳,王敏,等.多发性骨髓瘤免疫表型及胞浆轻链检测的临床意义[J]. 中国实验诊断学, 2013, 17(6): 1068-1071.
 [9] 滕文浩,李辉军,万凯,等.多发性骨髓瘤血清总轻链检测临床价值的探讨[J]. 临床血液学杂志, 2014, 27(3): 227-230.
 [10] 高云,邵国庆,马卫国.轻链和免疫球蛋白检测对多发性骨髓瘤的诊断意义[J]. 中国热带医学, 2014, 14(10): 1235-1236.
 [11] 梁德平,黄云剑.轻链型肾淀粉样变的诊治进展[J]. 检验医学与临床, 2015, 12(4): 554-556.
 [12] 柯培锋,陈炜焯,徐建华,等.尿轻链在检测系统性红斑狼疮肾脏损伤中的应用[J]. 广东医学, 2012, 33(24): 3716-3718.
 [13] 俞可佳,钱锡峰,王莉莎,等.系统性红斑狼疮合并多发性骨髓瘤的临床特点分析[J]. 检验医学与临床, 2014, 11(14): 1945-1948.
 [14] 杨新宏,杨晓峰,张晨晰,等.血清 κ/λ 轻链比值在多发性骨髓瘤合并肾功能不全与肾功能不全患者中的鉴别诊断价值[J]. 标记免疫分析与临床, 2015, 22(9): 900-902.
 [15] 张利方,阎有功,石莉萍,等.轻链 κ/λ 比值测定对多发性骨髓瘤诊断的临床应用[J]. 临床血液学杂志, 2015, 28(1): 19-21.
 [16] 刘玉梅,白俊.多克隆轻链型多发性骨髓瘤 1 例分析[J]. 检验医学与临床, 2012, 9(19): 2517-2518.
 [17] 宋森涛,李峰,王若燕,等.血清蛋白电泳、免疫球蛋白及其轻链测定对肝病患者的临床意义[J]. 中国肝脏病杂志, 2012, 5(4): 6-8.
 [18] 马春芳,汪强,陈雪静,等.血清游离轻链测定在系统性红斑狼疮活动期的应用价值探讨[J]. 中国卫生检验杂志, 2013, 23(9): 2122-2124.
 [19] 陆玉静,李兴翠,向代军,等.血清中轻链免疫球蛋白与狼疮肾炎的临床相关性[J]. 临床检验杂志, 2012, 30(2): 104-107.