

异性结合,则最终形成抗 IgG 抗体-抗体-酶标记的抗 IgG 抗体复合物,加入底物后呈颜色反应。实验结果表明,IgM 抗体在 2-Me 裂解前与裂解后产物的吸光度值差异无统计学意义 ($P>0.05$),且与空白管吸光度值差异无统计学意义 ($P>0.05$),充分说明 IgM 及 IgM 裂解产物都不与抗 IgG 抗体发生特异性反应。

IgG 性质的血型抗体由两条重链和两条轻链通过 S-S 键连结组成,巯基试剂可还原 S-S 键连结的两条重链,使 IgG 在铰链区域有更大的柔性和,更有利于与相应的抗原和抗体发生结合反应^[8-10]。这可以解释为什么用 2-Me 处理的 IgG 抗体 OD 值大于未用 2-Me 处理的 IgG 抗体的 OD 值。

参考文献

[1] 朱铁楠. 血型鉴别标准与血制品应用技术及医院开展新技术新项目解析[M]. 北京:人民卫生出版社,2009:210.

[2] British Committee for Standards in Haematology, Blood Transfusion Task Force. Guidelines for blood grouping and red cell antibody testing during pregnancy[J]. Transfus Med, 1996, 6(1): 71-74.

[3] 杨秀丽. O 型孕妇血清中 IgG 抗体效价与新生儿溶血病的关系[J]. 国际检验医学杂志, 2009, 30(10): 1037, 1039.

[4] 孙悦玲, 孙红格, 施选性, 等. 孕期夫妇血型血清学检测与新生儿溶血病关系的探讨[J]. 中国优生与遗传杂志, 2006, 14(2): 47, 59.

[5] 孟庆宝. 微柱凝胶技术在输血相关试验中的评价及应用研究[J]. 国际检验医学杂志, 2009, 30(9): 848-849, 851.

[6] 周金安, 魏晴, 涂同涛, 等. 微柱凝胶卡及试管法对抗-D 效价检测的比较[J]. 中国输血杂志, 2008, 21(3): 197-198.

[7] 陈才生, 翁彬, 王雷萍, 等. 微柱凝胶技术配血影响因素分析[J]. 现代检验医学杂志, 2006, 21(6): 56-57.

[8] Deuthsch HF, Morton JI. Dissociation of human serum macroglobulins[J]. Science, 1957, 125(3248): 600-601.

[9] Forre O, Michaelesen TE, Natvig JB. Antibody activity of heavy and light chains and recombined IgG of human IgG anti-D[J]. Scand J Immunol, 1976, 5(1-2): 155-156.

[10] Judd WJ. Methods in Immunohematology[M]. 2nd ed. Durham, DC: Montgomery Scientific Publications, 1994: 33-35, 411-412.

(收稿日期: 2010-12-06)

• 检验技术与方法 •

血清 N-端脑钠肽前体对心力衰竭的诊断

欧阳旭

(湖南省宁远县人民医院检验科 425600)

摘要:目的 评价血清 N-端脑钠肽前体(NT-proBNP)对心力衰竭的诊断价值,为 NT-proBNP 在临床的应用提供循证医学证据。方法 对 448 例研究对象同时进行血清 NT-proBNP 和超声心动图等检测,用受试者工作特征曲线(ROC)曲线选取血清 NT-proBNP 诊断心力衰竭的最佳临界点,计算各项评价指标,评价血清 NT-proBNP 诊断心力衰竭的临床价值。结果 选取 362 pg/mL 作为诊断心力衰竭的最佳临界点,NT-proBNP 诊断心力衰竭敏感性与特异性分别为 90.1%、80.8%,阳性预测值与阴性预测值分别为 72.5%、93.5%,ROC 曲线下的面积为 0.876。结论 血清 NT-proBNP 对心力衰竭有较好的诊断价值,特别适合心力衰竭的筛查。

关键词:心力衰竭; ROC 曲线; 血清 N-端脑钠肽前体

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2011.12.038

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2011)12-1346-03

心力衰竭(heart failure, HF)是严重影响人们健康的公共卫生问题,美国 Framingham 心脏研究中心的研究表明:65~74 岁男性、女性 HF 患者 5 年病死率分别达 59%与 45%^[1];中国 HF 患者致死亡率呈逐年增加趋势。张建轩等^[2]的研究表明,B 型脑钠肽(brain natriuretic peptide)对老年慢性心力衰竭(chronic heart failure, CHF)有良好的诊断价值,而 N 端脑钠肽前体(N-terminal pro-brain natriuretic peptide, NT-proBNP)对 HF 的诊断价值尚存争议。因此,笔者以 448 例新发 HF 患者为研究对象,进行 NT-proBNP 水平检测和分析,以期进一步阐明 NT-proBNP 对 HF 的诊断价值,为临床提供可靠的循证医学证据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2008 年 6 月 12 日至 2010 年 8 月 26 日于本院诊断为 HF 疑似患者 497 例,均为志愿参与本研究;排除 38 例非心源性呼吸困难、心绞痛、扩张型心肌病患者,及已接受相关外科治疗的 HF 患者;失访 11 例。研究对象最终确定为 448 例,其中 HF 患者 161 例(病例组),非心力衰竭(non-heart failure, nHF)患者 287 例(对照组);HF 诊断参照纽约心脏病学会(New York Heart Association, NYHA)制定的相关

标准。

1.2 仪器和试剂 UniCel DXI800 型免疫分析系统及配套 NT-proBNP、心钠肽(atrial natriuretic peptide, ANP)检测试剂(贝克曼库尔特,美国),IE33 型超声心动仪(飞利浦,荷兰)。

1.3 方法 收集受试对象基本资料(性别、年龄、身高、体重、吸烟史、饮酒史等);在患者接受治疗前进行超声心动图检查,并抽取空腹静脉血 4 mL,离心半径 20.8 cm 条件下 3 000 r/min 离心 10 min,分离血清后进行血清 NT-proBNP、ANP 检测和 NT-proBNP 重复性试验^[3]。

1.4 统计学处理 (1)将血清 NT-proBNP 和 ANP、超声心动图等变量结果录入 SPSS13.0 数据库。计量资料若符合正态性与方差齐性则作两组完全随机化设计资料均数的 *t* 检验(NT-proBNP 检测结果经对数转换后进行 *t* 检验),计数资料作两独立样本比率的 χ^2 检验。(2)绘制血清 NT-proBNP、ANP 诊断 HF 的受试者工作特征曲线(receiver operating characteristic curve, ROC 曲线),计算 ROC 曲线下的面积(area under the ROC curve, AUC);评价 NT-proBNP 在不同临界点时诊断 HF 的灵敏度、特异度等指标,选取最佳临界点;依据最佳临界点制作诊断试验评价四格表,分别计算灵敏度、特异度

等评价指标。

2 结果

2.1 血清 NT-proBNP、ANP 及其他临床资料分析 病例组、对照组血清 NT-proBNP 和 ANP, 以及其他临床资料比较见表 1。

表 1 病例组与对照组 NT-proBNP、ANP 及其他临床资料比较

项目	病例组	对照组
性别(n,男/女)	98/63 [△]	169/118
年龄(岁, $\bar{x} \pm s$)	63.1 \pm 12.8 [△]	64.6 \pm 11.4
身高(m, $\bar{x} \pm s$)	1.63 \pm 0.11 [△]	1.64 \pm 0.10
体重(kg, $\bar{x} \pm s$)	58.4 \pm 7.2 [△]	57.8 \pm 8.4
身体质量指数($\bar{x} \pm s$)	22.1 \pm 2.5 [△]	21.8 \pm 1.8
吸烟史(n,有/无) [#]	28/133 [△]	36/251
饮酒史(n,有/无) [☆]	44/117 [△]	67/220
NT-proBNP ($\bar{x} \pm s$) [*]	2.97 \pm 0.36 [▽]	2.28 \pm 0.23
ANP($\mu\text{g/L}$, $\bar{x} \pm s$)	0.21 \pm 0.03 [▽]	0.16 \pm 0.04

[#]: 平均每天吸烟超过 1 支; [☆]: 平均每周饮酒超过 1 次; ^{*}: NT-proBNP 检测结果 (pg/mL) 的常用对数值; [▽]: $P < 0.05$, 与对照组比较; [△]: $P > 0.05$, 与对照组比较。

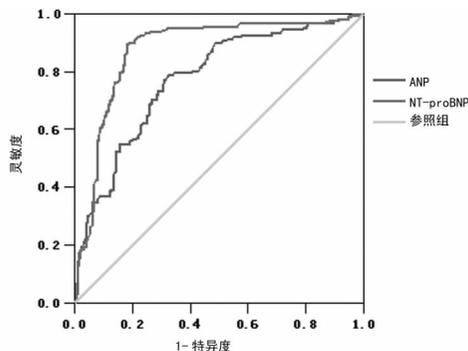


图 1 血清 NT-proBNP 与 ANP 诊断 HF 的 ROC 曲线

表 2 不同临界点时血清 NT-proBNP 对心力衰竭的诊断价值

临界点 (pg/mL)	灵敏度 (%)	特异度 (%)	阳性预测值 (%)	阴性预测值 (%)	阳性似然比	阴性似然比
300	94.4	68.6	62.8	95.6	3.01	0.08
350	90.1	79.4	71.1	93.4	4.37	0.12
362	90.1	80.8	72.5	93.5	4.69	0.12
370	85.7	82.6	73.4	91.2	4.93	0.17
420	71.4	87.1	75.7	84.5	5.53	0.33

2.2 ROC 曲线分析 根据血清 NT-proBNP、ANP 检测结果与 NYHA 标准的判定结果作 ROC 曲线, 见图 1。NT-proBNP 与 ANP 诊断心力衰竭的 AUC 及其 95% 置信区间 (95% confidence interval, 95% CI) 分别为 0.876 (95% CI: 0.841~0.912)、0.776 (95% CI: 0.731~0.820)。NT-proBNP 在不同临界点诊断 HF 的灵敏度、特异度等评价指标见表 2。以 ROC 曲线选取 362 pg/mL 作为 NT-proBNP 诊断 HF 的最佳临界点, 制备 NT-proBNP 诊断 HF 的四格表, 并计算血清 NT-proBNP 诊断

HF 的灵敏度为 90.1%, 特异性为 80.8%, 漏诊率为 9.9%, 误诊率为 19.2%, 阳性预测值为 72.5%, 阴性预测值为 93.5%, 阳性似然比为 4.69; 阴性似然比为 0.12。

2.3 重复性试验 重复性试验显示血清 NT-proBNP 浓度为 151 pg/mL 时, 批内、批间、日间及总变异系数 (coefficient of variability, CV) 为 3.1%、3.5%、3.9% 和 6.8%; 浓度为 398 pg/mL 时, 批内、批间、日间及总 CV 为 2.9%、3.4%、3.7% 和 6.4%。

3 讨论

本研究显示, 血清 NT-proBNP 诊断 HF 的灵敏度、特异性、阳性预测值及其阴性预测值分别达 90.1%、80.8%、72.5%、93.5%, 具有良好的诊断价值, 与国外的研究大致相似^[4]。汪隆海等^[5]的研究表明, HF 患者血清 NT-proBNP 水平随病情程度的加重呈指数增加。有研究显示, NT-proBNP 可作为 HF 预后指标, 其机制可能是心力衰竭时, 心脏的容量负荷和压力负荷加重使心肌细胞受到牵张, 从而导致 NT-proBNP 分泌增加^[6-7]。

本研究采用 ROC 曲线选取 362 pg/mL 作为血清 NT-proBNP 诊断 HF 的临界点, 可获得最佳诊断价值。以往的研究对于临界点的选取争议较大, 如王兰兰等^[8]建议以 155 pg/mL 作为最佳临界点, 而裘宇容等^[9]建议以 697 pg/mL 为最佳临界点, 其间的差异可能与研究对象选取有关。已有研究表明, 不同人群间血清 NT-proBNP 浓度存在明显差异^[10]。利用不同检测系统所确定的最佳临界点也有可能不同, 这就要求实验室根据各自所使用的检测系统确定相应的最佳临界点并进行评价。本研究显示, 血清 NT-proBNP 诊断 HF 的阳性预测值与阳性似然比分别为 72.5%、4.69, 若血清 NT-proBNP 检测结果符合 HF 诊断, 则应考虑以超声心动图检查确诊; 血清 NT-proBNP 诊断 HF 的阴性预测值和阴性似然比分别为 93.5% 和 0.12, 若血清 NT-proBNP 检测低于临界点, 则可排除 HF 诊断, 不必进行超声心动图检查, 可有效减少相关医疗费用。本研究在资料收集过程中采了严格的纳入标准与排除标准, 所得结果能较客观地反映血清 NT-proBNP 对 HF 的诊断价值。但仍存在一些不足之处, 如本研究仅在本医院招募研究对象, 不能有效控制由于不同医院间入院率不同所导致的选择偏倚。本研究排除了心绞痛、扩张型心肌病等患者, 因此本研究结果是否可用于其他心脏疾病的诊断有待进一步分析。

综上所述, 血清 NT-proBNP 是可用于 HF 诊断的较为敏感的指标, 具有良好的诊断价值。

参考文献

- [1] Levy D, Kenchaiah S, Larson MG, et al. Long-term trends in the incidence of and survival with heart failure[J]. N Engl J Med, 2002, 347(18): 1397-1402.
- [2] 张建轩, 吕文涛, 张兴旺, 等. 老年慢性心力衰竭患者血清 MMP-9、TNT- α 、BNP、CRP 及 Ua 联合检测的临床应用[J]. 国际检验医学杂志, 2009, 30(4): 390-393.
- [3] 郭健. 临床检验方法评价[M]. 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 149-151.
- [4] Maisel AS, Krishnaswamy P, Nowak RM, et al. Rapid measurement of B-type natriuretic peptide in the emergency diagnosis of heart failure[J]. N Engl J Med, 2002, 347(3): 161-167.
- [5] 汪隆海, 张平, 陈启松, 等. 定量检测 N 末端脑钠肽对心衰的诊断价值[J]. 国际检验医学杂志, 2009, 30(1): 23-25.
- [6] Alehagen U, Dahlström U, Lindahl TL. Cystatin C and NT-proB-

NP, a powerful combination of biomarkers for predicting cardiovascular mortality in elderly patients with heart failure: results from a 10-year study in primary care[J]. Eur J Heart Fail, 2009, 11(4):354-360.

[7] Melanson SE, Lewandrowski EL. Laboratory testing for B-type natriuretic peptides(BNP and NT-proBNP): clinical usefulness, utilization, and impact on hospital operations[J]. Am J Clin Pathol, 2005, 124(Suppl):122-128.

[8] 王兰兰, 蔡蓓, 刘兴斌, 等. N 末端脑型钠尿酸定量检测在心力衰

竭诊断中的价值[J]. 中华检验医学杂志, 2006, 29(1):35-38.

[9] 裴宇容, 杨春莉, 魏东, 等. 血清 NT-proBNP 水平检测在心血管疾病中的诊断价值[J]. 广东医学, 2009, 30(5):773-775.

[10] 潘文志, 巩雪, 周京敏, 等. 心房颤动对不同心功能分级的患者血浆脑钠肽水平的影响[J]. 中华心律失常学杂志, 2009, 13(3):213-216.

(收稿日期:2010-11-20)

• 检验技术与方法 •

尿微量清蛋白时间分辨荧光免疫检测法的建立

李跃松, 黄 颺[△], 朱 岚, 陈永伟, 马智鸿

(江苏省原子医学研究所附属江原医院检验科, 无锡 214063)

摘要:目的 建立尿微量清蛋白(UmALB)的时间分辨荧光免疫分析法(TRFIA)。方法 以羊抗兔 IgG 包被板条, 双功能整合剂异氰酸苄基-二乙三胺四乙酸络合 Eu³⁺ 及标记清蛋白(ALB), 采用竞争法建立 UmALB-TRFIA 检测方法。发光增强系统为以 β-二酮体为主的增强液, 数据采用双对数法数据处理程序。结果 此法的批内和日间 CV 分别为 4.8% 和 5.4%, 平均回收率为 100.93%, 灵敏度为 0.34 μg/mL, 线性范围为 0.34~135 μg/mL。本方法与 β₂-微球蛋白无交叉反应, 血红蛋白浓度小于 4 g/L 时对本方法无干扰, 同放免法比较, 结果相关性好。结论 尿微量清蛋白的时间分辨荧光免疫分析法的敏感度、特异性、准确度等指标符合临床诊断要求。

关键词:白蛋白类; 荧光免疫测定; 尿

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.12.039

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2011)12-1348-03

尿微量清蛋白(urinary microalbumin, UmALB)检测是诊断和监测肾脏损伤、糖尿病肾病、心血管疾病和自身免疫性疾病等的主要检测项目^[1-2]。其测定方法较多, 如放射免疫法(radioimmunoassay, RIA)、免疫比浊法(immunoturbidimetry, ITM)、酶联免疫吸附法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)等, 但 RIA 有可能导致环境污染, 且试剂有效期较短; ITM 和 ELISA 线性范围窄、灵敏度不高、受标本基质干扰大。笔者对如何应用时间分辨荧光免疫分析法(time-resolved fluoroimmunoassay, TRFIA)检测 UmALB 进行了分析, 结果报道如下。

1 材料与与方法

1.1 主要试剂、仪器与材料 (1)主要试剂:兔抗人清蛋白抗体(兔抗)和清蛋白(Albumin, ALB)(Biodesign, 美国)、羊抗兔 IgG(华美生物工程公司, 中国)、RIA 试剂盒(中国原子能科学研究院同位素研究所)、β₂-微球蛋白(β₂-microglobulin, β₂-m)标准品(PekinElmer, 美国)、三价铕(Eu³⁺)标记盒(PekinElmer, 美国)、琼脂糖 CL-6B(Pharmacia, 美国)。(2)主要仪器:AutoDELFLIA-1235 型全自动时间分辨荧光检测仪(PekinElmer, 美国)、FT-630G 型放射免疫分析仪(北京核仪器厂, 中国)、SPINCHRON R CENTRIFUGE 型离心机(Beckman-Coulter, 美国)。(3)标本:60 例本院体检健康者(对照组)和 39 例确诊糖尿病患者晨尿标本(患者组)。

1.2 方法

1.2.1 放射标记 ALB 的制备 参照 Eu³⁺ 标记盒说明书操作。在冻干粉小瓶中按质量比 1:1 加入 ALB 和 EU³⁺-N₂-[P-异氰酸-苄基]二乙三胺四乙酸{Eu³⁺-N₂-[P-fulminic acid-benzyl group] diethylene triamine tetraacetic acid, EU³⁺-DTTA}, 25 °C 磁力搅拌 20 h 后用琼脂糖 CL-6B(1×40 cm)层

析, 280 nm 条件下收集蛋白峰即为 Eu³⁺-ALB, 稀释后分装冻干保存。

1.2.2 增强液的制备 以 β-二酮体(β-Naphthoyltrifluoroacetone, β-NTA)及三辛基氧化膦(trioctylphosphine oxide, TOPO)为主要原料制备增强液, 具体方法见参考文献[3]。

1.2.3 固相抗体的制备 将羊抗兔 IgG 用 50 mmol/L Na₂CO₃-NaHCO₃(pH9.6)缓冲液稀释至 10 mg/L; 按 200 微升/孔加入 96 孔板中, 4 °C 放置过夜; 弃去包被液洗涤 3 次后按 200 微升/孔加入含 3 g/L 牛血清清蛋白的封闭缓冲液, 4 °C 放置过夜; 弃去封闭液真空抽干后-20 °C 保存。

1.2.4 兔抗稀释度选择 将兔抗倍比稀释至 1:100 到 1:3 200, 分别吸取 100 μL 加入含 100 μL 一定浓度 Eu³⁺-ALB 的包被板中, 经温育、洗涤、加增强液振荡反应后荧光检测, 计算抗体-抗原结合率。以兔抗稀释度为横坐标, 结合率为纵坐标, 绘制曲线后确定结合率为 50% 的兔抗稀释度。

1.2.5 测定方法 采用竞争法。在包被微孔板孔中依次加入 25 μL ALB 标准品、β₂-m 标准品或待测标本, 100 μL 已稀释的兔抗及 100 μL 1:60 稀释的 Eu³⁺-ALB, 25 °C 振荡孵育 1.5 h 后用洗涤液洗涤 4 次; 每孔加增强液 200 μL, 振荡反应 5 min 后在 AutoDELFLIA-1235 分析仪上检测各孔荧光强度。

1.2.6 方法学评价试验 (1)精密度:取 ALB 浓度分别为 9.0 和 70.0 μg/mL 的尿液标本, 每份标本平行测定 10 孔或每份标本每 d 测定 1 次, 连续测定 10 d(双孔测定取均值), 计算批内和日间变异系数(coefficient of differentiation, CV)平均值。

(2)特异性:以 β₂-m 标准品配制 0.5~16.0 mg/L 不同浓度系列稀释液, 记录检测结果。(3)回收率:在 3 份 100 μL 新鲜尿标本中分别加入 5 μL 浓度为 100、50、25 μg/mL 的标准液, 检测并计算回收率。(4)干扰试验:取肝素抗凝全血标本以 6.4

[△] 通讯作者, E-mail:jswxhb@163.com.