

加的假凝集清除液迅速清除,而特异性的免疫凝集对附加的假凝集清除液不敏感,由此可以特异的检出相应的血型抗原或抗体(IgG 或 IgM)。微柱凝胶法的基本原理就是结合微柱凝胶的微孔过滤作用及抗人球蛋白试验,并通过恒温离心技术,将发生了凝集反应的红细胞阻滞在凝胶表面或凝胶中,而未凝集的游离红细胞则不被微孔阻滞,在离心力作用下被甩到微柱的尖底部,从而区分有无凝集。

从本文的结果可以看出,微柱凝胶法所测 IgG 抗 A(B)效价的灵敏度是试管法 12.6 和 14.4 倍,与郭博等^[2]研究结果相似,是凝聚胺法的 46.8 和 50.2 倍;试管法的灵敏度是凝聚胺法的 3.73 和 3.49 倍,与周浩等^[3]研究结果相似。三种方法中,试管法不仅需要水浴致敏和洗涤,还需要显微镜观察结果,难以准确判断,因此易受温度和操作等因素影响,且需时太长,不易自动化,限制了其常规开展。凝聚胺法虽然操作时间短,简便,不需特殊仪器,但易受人为因素的影响且灵敏度低,不建议常规使用。微柱凝胶法操作简便快速、易于自动化、灵敏度高^[4-5]、结果稳定且重复性好,易于观察并可以拍照长期保存,受人为因素影响小,易于标准化,其缺点是成本高,需要特殊设备。

目前,中国 IgG 抗 A(B)效价的参考值仅有试管法^[6],随着微柱凝胶法在输血相容性检测上的普及,由于其易于自动化及灵敏度高等优点,它势必在 IgG 抗 A(B)效价检测中得到推

• 检验技术与方法 •

广,这也要求检验工作者尽快制定出微柱凝胶法检测 IgG 抗 A(B)效价的标准操作程序及参考值,促进 IgG 抗 A(B)效价检测的标准化及应用。

参考文献

- [1] 胡志红,孟黎,胡咏梅,等.母婴 ABO 血型不合与新生儿溶血病的关系[J].山西医科大学学报,2004,35(6):618-619.
- [2] 郭博,张广兰,张启月,等.微柱凝胶技术在 IgG 抗 A、抗 B 效价测定中的应用[J].中华全科医学,2009,7(10):1116-1117.
- [3] 周浩,郭博,刘杨.凝聚胺技术在 IgG 类抗 A、抗 B 效价测定中的应用[J].实用全科医学,2007,5(12):1104-1105.
- [4] Novaretti MC, Sapeleti CR, Dorlhiac-Llacer PE, et al. Use of gel microcolumn assay for the detection of drug-induced positive direct antiglobulin tests[J]. J Clin Lab Anal, 2005, 19(5):219-227.
- [5] Weisbach V, Kohnhuser T, Zimmermann R, et al. Comparison of the performance of microtube column systems and solid-phase systems and the tube low-ionic-strength solution additive indirect antiglobulin test in the detection of red cell alloantibodies[J]. Transfus Med, 2006, 16(4):276-284.
- [6] 叶应妩,王毓三,申子瑜.全国临床检验操作规程[M].3 版.南京:东南大学出版社,2006:257-266.

(收稿日期:2013-09-18)

免疫定量分析仪 MD-QMT001 检测降钙素原的方法学性能评价

陈燕,李文静[△],石冬敏

(南京医科大学附属苏州市立医院本部检验科,江苏苏州 215002)

摘要:目的 对免疫定量分析仪 MD-QMT001 检测降钙素原(PCT)的主要方法学性能进行验证与评价。方法 参考美国临床和实验室标准化协会(CLSI)系列文件,结合实际工作设计验证方案,对免疫定量分析仪检测全血 PCT 的精密度、线性、可比性、抗干扰能力等 4 项分析性能进行验证和评价。结果 该定量方法操作简便、快速,整个检测过程约 17 min;PCT 定量时,批内、批间精密度为 1.26%~3.96%;检测线性良好,相关系数 r 大于 0.99,回归方程检验有意义($P<0.05$),与厂商承诺范围接近;该定量法与半定量法检测结果一致性达 92%;三酰甘油、胆红素对检测结果无明显影响,溶血可使检测结果显著偏高($P<0.05$)。结论 该科室引进的降钙素原免疫定量分析仪操作简便、主要性能评价良好,可满足临床指导抗菌药物的应用等需要。

关键词:降钙素原; 定量检测; 性能评价

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.23.049

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)23-3209-03

降钙素原(PCT)即降钙素前体,是一种无激素活性的糖蛋白。生理情况下,甲状腺 C 细胞可产生极少量的 PCT,健康人的血液 PCT 水平通常测不到,血液浓度小于 $0.5 \mu\text{g/L}$;细菌感染时,除甲状腺外,肝脏的巨噬细胞和单核细胞,肺、肠道组织的淋巴细胞及内分泌细胞都能合成分泌 PCT,此时血清 PCT 水平会明显升高,且随着感染进展或控制而持续升高或逐渐下降^[1]。Dandona 等^[2]认为细菌内毒素是诱导 PCT 产生的最主要刺激因子,健康人注射少量的细菌内毒素就能刺激 PCT 的合成。早在 2001 年国际脓毒症会议,PCT 已被定为脓毒症诊断标准的指标之一^[3],现在 PCT 水平已作为一个新的炎症指标,广泛应用于感染性疾病的诊断、鉴别诊断、病情监测及抗菌药物应用指导等。降钙素原的检测方法有半定量法和定量法。半定量法通常利用胶体金免疫层析技术,定量法以往

多为化学发光法。本科室新引进的一台免疫定量分析仪,是以免疫层析半定量为基础而研发的定量检测方法,第一步采用固相免疫胶体金层析技术,利用双抗体夹心法检测人全血中的 PCT,出现质控线和检测线,第二步采用图像分析处理技术,通过采集 PCT 检测试剂卡中质控线和检测线的图像,获得浓度信号,分析软件自动将浓度密度值与标准曲线比较分析,即可得出被检测样本中 PCT 的定量结果。现就其主要检测性能作出评价。

1 材料和方法

1.1 检测样本 本院门/急诊及住院患者经乙二胺四乙酸二钾(EDTA- K_2)抗凝的静脉血样本 50 份,其中 PCT 高值血样来自细菌培养阳性的患者。三酰甘油含量为 6.02 mmol/L 的乳糜样本;总胆红素含量为 $184.2 \mu\text{mol/L}$ 的黄疸样本。

[△] 通讯作者,E-mail:lwjsky1314@126.com。

1.2 仪器与试剂 降钙素原免疫定量分析仪、降钙素原检测试剂盒均由武汉明德生物科技有限公司生产。

1.3 方法

1.3.1 精密度试验 选择 PCT 高值 34 $\mu\text{g/L}$ 、低值 0.23 $\mu\text{g/L}$ 的临床样本各一份,同时检测 20 次作批内精密度测试;以质控卡(22~26 $\mu\text{g/L}$)为检测对象,每天随临床标本同时检测,连续 20 天作批间精密度测试,同时做质量控制分析。

1.3.2 线性 按参考文献[4]和 CLSL 的 EP6-A2 文件^[5]方法,本试验以稀释液空白代替低浓度(L),以 PCT 浓度值为 34 $\mu\text{g/L}$ 的患者样本作为高浓度(H),按 20 L、19 L+1 H、18 L+2 H、16 L+4 H、12 L+8 H、8 L+12 H、4 L+16 H、2 L+18 H、20 H 的关系配制,形成系列浓度全血。每个标本重复测量 2 次,记录结果。将实测值与理论值作比较,作直线回归方程。

1.3.3 可比性 本研究共收集了 50 例标本,先进行半定量 PCT 测定,随后用定量分析仪检测 PCT 的具体含量,比较二者检测结果的一致性。将分离后的血清 200 μL 或 400 μL 加到反应孔中,观察反应区的颜色变化。在出现红色对照带的前提下,如加入的总血清量为 200 μL ,比照 200 μL 的比色卡读出 PCT 的大致范围(结果分为小于 0.5 $\mu\text{g/L}$, $\geq 0.5 \mu\text{g/L}$, $\geq 2 \mu\text{g/L}$, $\geq 10 \mu\text{g/L}$);如加入的总血清量为 400 μL ,比照 400 μL 的比色卡读出 PCT 的大概范围(结果分为小于 0.25 $\mu\text{g/L}$, $\geq 0.25 \mu\text{g/L}$, $\geq 1 \mu\text{g/L}$, $\geq 5 \mu\text{g/L}$)。

1.3.4 干扰试验 按参考文献[4]和 CLSL 的 EP6-A2 文件^[5]方法,分别将乳糜样本、黄疸样本按 20 L、19 L+1 H、18 L+2 H、16L+4 H、12 L+8 H、8 L+12 H、4 L+16 H、2 L+18 H、20 H 的关系用生理盐水配制,形成系列浓度血样,然后将系列浓度的干扰物与待测全血等量混合,在免疫定量分析仪上检测 2 次,取均值。根据文献[6]计算影响度。影响度=[(加入干扰物血样测定值-未加入干扰物血样测定值)/未加入干扰物血样测定值] $\times 100\%$ 。

取同日被检的 10 份临床标本,原 PCT 检测值为 A 组;用带有针头的一次性注射器,反复抽打上述 10 份标本至肉眼可判断为溶血,再次检测得出的 B 组结果,比较其与 A 组值之间的统计学差异。

1.4 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件进行配对 *t* 检验与回归方程分析, $P<0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 精密度验证 样品检测 20 次,批内、批间精密度试验结果见表 1,基本符合 NCCLS EP5-A2 文件推荐的小于 5% 的标准^[7]。

表 1 批内、批间精密度试验结果

类别	检测样本($\mu\text{g/L}$)	平均值($\mu\text{g/L}$)	标准差($\mu\text{g/L}$)	变异系数(%)
批内	高值:34	32.97	0.232	1.26
	低值:0.23	0.42	0.009	3.96
批间	质控卡:22~26	23.20	0.920	3.96

表 2 PCT 线性试验结果

PCT 系列稀释	20 L	19L+1H	18L+2H	16L+4H	12L+8H	8L+12H	4L+16H	2L+18H	20H
稀释浓度(%)	0	5.0	10.0	20.0	40.0	60.0	80.0	90.0	100.0
PCT 实测值 1($\mu\text{g/L}$)	<0.1	1.9	3.0	6.4	13.5	18.5	26.7	30.6	33.6
实测值 2($\mu\text{g/L}$)	<0.1	1.6	2.8	6.0	13.6	17.5	27.3	29.8	34.4
PCT 实测均值($\mu\text{g/L}$)	<0.1	1.7	2.9	6.2	13.6	18.0	27.0	30.2	34.0
理论值($\mu\text{g/L}$)	<0.1	1.7	3.3	6.6	13.2	19.8	26.4	29.7	33.0

表 3 半定量法和定量法检测 PCT 结果的一致性比较

半定量 PCT 范围($\mu\text{g/L}$)	<i>n</i>	定量 PCT 范围($\mu\text{g/L}$)	定量 PCT 偏差较大值	总偏差例数	一致率(%)
≥ 10	4	9.82~34.0	9.82	1	75.0
2~ <10	7	3.24~10.57	10.57	1	85.7
0.5~ <2	9	0.65~1.85	—	0	100.0
0.25~ <0.5	12	0.28~0.43	—	0	100.0
<0.25	18	0.10~0.27	0.27	2	92.9
合计	50	—	—	4	92.0

—:该项无数据。

2.3 比对试验 参照文献[8]制定不同半定量范围内的 PCT

与定量 PCT 检测结果是否一致的判断标准。由表 3 可以看出,两种方法检测结果一致率达 92%,仅 8% 的标本检测结果有偏差。

2.4 干扰试验 将系列浓度的乳糜和黄疸干扰物与待测全血等量混合,测定值及影响度见表 4、5。将 10 份标本溶血处理前后得到的结果做配对 *t* 检验, $t=-3.554$, $P<0.05$,说明溶血后检测结果显著升高。

2.2 线性评价和检测限 PCT 系列浓度标本测定结果见表 2,以理论值为 *X*,实测均值为 *Y*,建立 $Y=a+bX$ 的回归方程,PCT 回归方程为 $Y=0.533+0.969X$, $r=0.998$,决定系数 r^2 为 0.996。*F* 显著性检验: $F=1\,510.4$, $P<0.05$,回归方程有意义。同时,由表 2 可看出,免疫定量分析仪的检测下限为 0.1 $\mu\text{g/L}$,与厂商提供的一致。

表 4 TG 对 PCT 检测结果的影响

TG 稀释	20 L	19L+1H	18L+2H	16L+4H	12L+8H	8L+12H	4L+16H	2L+18H	20H
稀释浓度(%)	0.000	5.000	10.000	20.000	40.000	60.000	80.000	90.000	100.000
TG 加入值(mmol/L)	0.000	0.301	0.602	1.204	2.408	3.612	4.816	5.418	6.020
PCT 实测均值($\mu\text{g/L}$)	13.000	12.900	13.500	12.800	13.300	13.200	13.100	13.600	13.400
影响度(%)	0.000	-0.770	3.850	-1.540	13.100	1.540	0.770	4.620	3.080

表 5TBIL 对 PCT 检测结果的影响

TBIL 稀释	20 L	19L+1H	18L+2H	16L+4H	12L+8H	8L+12H	4L+16H	2L+18H	20H
稀释浓度(%)	0.00	5.00	10.00	20.00	40.00	60.00	80.00	90.00	100.00
TBIL 加入值(μmol/L)	0.00	9.21	18.42	36.84	73.68	110.52	147.36	165.78	184.20
PCT 实测均值(μg/L)	13.50	13.20	14.00	13.70	13.30	13.00	14.10	13.80	13.40
影响度(%)	0.00	-2.22	3.70	1.48	-1.48	2.96	4.44	2.22	-0.74

3 讨 论

PCT 作为细菌性感染最特异的指标之一,临床应用越来越广泛,如脓毒症的诊断与监测:血液中 PCT 浓度小于 0.5 μg/L 表示脓毒症的可能性低、>2 μg/L 表示极可能为脓毒症,发展至重症脓毒症和/或脓毒症性休克的风险较高、在 0.5~2.0 μg/L 之间时,需结合患者的病史来判定结果;细菌性与非细菌性感染的鉴别诊断:血液 PCT 升高多由于细菌性感染,而 PCT 无明显升高则可能是其他原因导致的感染,包括创伤、外科手术、重症胰腺炎、肿瘤浸润等;临床抗菌药物应用的指导:PCT 浓度<0.1 μg/L,不建议使用抗菌药物;在 0.1~0.25 μg/L 之间,不鼓励使用抗菌药物;在 0.25~0.50 μg/L 之间,建议使用抗菌药物;>0.5 μg/L 时,强烈建议使用抗菌药物等。

本科室新引进一台降钙素原免疫定量分析仪,其检测参数的准确性直接影响临床诊断及治疗,因此需要对其主要分析性能进行验证与评价。选取两份临床标本,分别在高、低两个水平验证免疫定量分析仪检测全血 PCT 的精密度。结果表明,该仪器的检测精密度为 1.26%~3.96%。在仪器说明书显示的范围内,也达到了国际公认的质量要求^[7]。每日的质控卡检测结果均在正常范围内,说明仪器在控,检测结果均可信。选择 1 份线性高值的样品配成系列浓度水平用理论值与实测值作回归分析得出 PCT 的回归方程 Y=0.533+0.969X(X 为理论值),r=0.998,决定系数 r² 为 0.996。表明线性良好,与仪器说明书上的结果基本一致,也达到公认的质量要求^[5]。

为验证免疫定量分析仪的可靠性,本研究比较了 2 种不同方法的检测结果,由于一种是定量检测,一种是半定量检测,检测结果不能进行相关性分析,若按照半定量 PCT 检测方法中小于 0.25 μg/L 作为阴性值的判断标准,则从检测结果阴阳性的角度考虑,其中 46 例二者的检测结果一致,一致率高达 92%,说明免疫定量分析仪检测结果较为可靠。

干扰试验表明,加入三酰甘油、胆红素前后,检测结果无明显变化,影响度均小于 5%,说明三酰甘油、胆红素不引起干扰效应,该方法检测特异性较好。另外,对标本进行人为溶血处理后,检测结果表明 10 份标本 PCT 水平均明显升高。Schuetz 等已证实^[9],内毒素和炎症介质刺激后,外周血单核细胞(PBMC)中 ProCT mRNA 上调近一倍,各白细胞亚群亦表现出不同程度 ProCT 蛋白增加。因此,当单核细胞破碎后,细胞内的 PCT 释放,可造成全血 PCT 水平的升高。

降钙素原免疫定量分析仪为融合了胶体金免疫层析技术的定量检测方法,既避免半定量法主观判断带来的人为误差,又较化学发光法定量法操作简便,且用血量较少,使检测过程更为客观、科学、方便。其次,使用 EDTA-K₂ 抗凝的全血代替

血清,可与急性时相反应蛋白(CRP)一起作为血常规检查的附加项目,缩短了检测周期,可使患者及时得到检验结果,方便临床医生参考、确定抗菌药物治疗方案,既能及时控制炎症,又能避免抗菌药物的滥用。

综上,本文对免疫定量分析仪检测 PCT 的主要分析性能进行验证,其结果与厂商承诺的性能指标基本一致,也与公认的质量指标基本一致;且它是一款具有操作简便、精密度高、线性好、检测范围广、结果重复性好、抗干扰能力强、检测速度快等优点的定量检测仪,可在实际工作中应用并推广。然而,该方法仍存在一定的不足,如溶血样本对检测结果有干扰,应避免使用溶血样本;某些含有抗试剂盒中某种成分的抗体的样品可能会影响检验结果的准确性;可能存在假阳性、假阴性结果等。因此检验结果仍需临床医生结合患者的病史及所进行的所有其他化验结果来判定,临床确诊应由专业人员结合患者临床症状、体征以及辅助检查等其他诊断依据进行综合判断。

参考文献

[1] 呼新建.降钙素原的研究进展[J].医学综述,2010,16(12):1795-1797.

[2] Dandona P,Nix D,Wilson MF,et al. Pmcaltitonin increase after endotoxin injection in normal subjects[J]. J Clin Endocrinol Metab,1994,79(6):1608-1605.

[3] Levy MM,Fink MP,Marshall JC,et al. 2001 Secm/ESKM/AC-CP/ATS/SIS internationnal sepsis definitions conference[J]. Crit Care Med,2003,31(4):1250-1256.

[4] 丛玉隆,冯仁丰,陈晓东. 临床实验室管理学[M]. 北京:中国医药科技出版社,2004:96-108.

[5] CLSI. EP6-A Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures; a statistical approach, approved guideline[S]. Wayne,PA,USA:CLSI,2003.

[6] 郑卫东,范小斌,唐红艳. STA-R 全自动血凝仪性能评价[J]. 实用医学杂志,2005,21(5):533-535.

[7] CLSI. EP5A-2 Evaluation of precision performance of quantitative measurent methods; approved guideline-second edition [S]. Wayne,PA,USA:CLSI,2004.

[8] 高红军,郑敏,周艳秋. 王洪武两种降钙素原检测方法的比较研究[J]. 中国医药导报,2011,8(32):86-87.

[9] Schuetz P,Christ-Crain M,Thomann R,et al. Effect of Procalcitonin-Based guidelines vs standard guidelines on antibiotic use in lower respiratory tract infections[J]. JAMA,2009,302(10):1059-1066.