

• 检验技术与方法 •

酶联荧光分析法测定肌钙蛋白 I 的临床应用

马小宏, 陈爱莲[△]

(江苏省如皋市人民医院检验科, 江苏如皋 226500)

摘 要:目的 探讨酶联荧光分析(ELFA)法测定肌钙蛋白 I(cTnI)的临床应用。方法 分别采用 ELFA 法和化学发光免疫分析(CLIA)法测定血清样品中 cTnI 的浓度,对 ELFA 法进行精密度试验、线性试验、回收试验和干扰试验;并对 ELFA 法与 CLIA 法测定 cTnI 的结果进行相关性分析。结果 ELFA 法测定 cTnI 浓度,高值(30.00 $\mu\text{g/L}$ cTnI)和低值(0.12 $\mu\text{g/L}$ cTnI)的批内变异系数(CV)分别为 2.81% 和 1.62%,批间 CV 分别为 5.67% 和 3.52%。ELFA 法检测 cTnI 的可信检测范围为 0.00~30.00 $\mu\text{g/L}$ 。当总胆红素浓度小于 450 $\mu\text{mol/L}$,血红蛋白浓度小于 1.5 g/L,三酰甘油浓度小于 7.0 mmol/L 时,ELFA 法测定 cTnI 无干扰。ELFA 法与 CLIA 法测定 cTnI 浓度具有良好的相关性($r=0.971$)。结论 ELFA 法具有较好的精密度、回收率和线性范围,与 CLIA 法具有较好的相关性,且检测快速简便,适用于急诊检验,能满足临床要求。

关键词:肌钙蛋白 I; 免疫荧光法; 化学发光法

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.19.043

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)19-2670-02

Application of immunofluorescence measured troponin I

Ma Xiaohong, Chen Ailian[△]

(Department of Clinical Laboratory, the People's Hospital of Rugao City, Rugao, Jiangsu 226500, China)

Abstract: Objective To explore the clinical application of determination of troponin I(cTnI) by enzyme linked fluorescent(ELFA) method. **Methods** The concentration of cTnI in serum was detected by chemiluminescence immunoassay(CLIA) method and ELFA method. The precision test, linear test, recovery test and interference test were done on ELFA method. The correlation analysis was done on the results of cTnI detected by ELFA method and CLIA method. **Results** Determination of the concentration of cTnI by ELFA method, the intraassay coefficient of variation(CV) of high(30.00 $\mu\text{g/L}$ cTnI) and low(0.12 $\mu\text{g/L}$ cTnI) values were 2.81% and 1.62%, the interassay CV were 5.67% and 3.52%. Reliable detection range detection of ELFA method was 0.00—30.00 $\mu\text{g/L}$. When the total bilirubin concentration less than 450 $\mu\text{mol/L}$, hemoglobin concentration less than 1.5 g/L, three glycerol concentration less than 7.0 mmol/L, the ELFA method for the determination of cTnI was without interference. Determination of the concentration of cTnI had a good correlation between ELFA method and CLIA method($r=0.971$). **Conclusion** The ELFA method has good precision, recovery and linear range, and has a good correlation with the CLIA method, and the ELFA method is rapid and convenient, suitable for the emergency inspection, can satisfy the clinical requirements.

Key words: troponin I; immunofluorescence; chemiluminescence method

肌钙蛋白 I(cTnI)是目前发现的诊断心肌损伤最特异、最敏感的标志物之一^[1]。心肌损伤标志物在心肌损伤和急性心肌梗死的诊断方面起着重要的作用,随着对急性冠状动脉综合征(ACS)病理生理过程的研究进一步深入,心肌酶谱检测用于诊断心肌损伤表现出早期诊断阳性率低、特异性差、阳性时间窗短等缺陷。因此寻找和筛选特异性强、敏感性高的心肌损伤标志物,以及简便、快捷、灵敏的检测方法显得非常重要^[2]。血液循环中 cTnI 的浓度与心肌损伤的严重程度相关,是检测心肌损伤的最佳指标之一^[3-10]。

cTnI 检测方法主要有免疫层析法、放射免疫法、酶联免疫吸附试验和化学发光分析法等。免疫层析法虽然操作简便,但检测的灵敏度低,不能定量分析;放射免疫法和酶联免疫吸附试验操作繁琐,检测耗时长,不易标准化;化学发光法技术要求高,仪器较昂贵。这些方法不便在急诊实验室全天候常规开展。笔者采用酶联荧光分析(enzyme-linked fluorescent assay, ELFA)检测 cTnI 浓度,并结合美国国家实验室标准化委员会(the National Committee for Clinical Laboratory Standards, NCCLS)的有关文件,对检测系统进行评价并探讨其临床应用价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料

对照组:2014 年 3 月本院健康体检者 20 例,

其中,男性 11 例,女性 9 例,平均年龄 52.5 岁(31~72 岁)。急性心肌梗死(AMI)组:本院心血管内科确诊为 AMI 的住院患者 15 例,其中,男性 8 例,女性 7 例,平均年龄 52.5 岁(31~72 岁)。

1.2 仪器与试剂

采用法国生物梅里埃公司生产的 VIDAS 全自动酶联荧光分析仪进行 ELFA 检测;采用美国贝克曼公司生产的 Coulter DXI 800 化学发光分析仪进行化学发光免疫分析(chemiluminescent immunoassay, CLIA)。检测试剂、校准品、质控品及配套用稀释液等分别由法国生物梅里埃公司和美国贝克曼公司提供其原装配套试剂。

1.3 方法

1.3.1 检测方法

用真空采血管采集静脉血 4 mL,以 3 000 r/min 离心 5 min,分离血清,分别用 ELFA 法和 CLIA 法测定血清 cTnI 浓度。严格按操作说明书操作,校准并进行质控,结果在控。

1.3.2 精密度试验

收集无黄疸、无溶血、无脂浊的新鲜血清,用 ELFA 法连续测定 cTnI 浓度 20 次(30.00 $\mu\text{g/L}$ cTnI 的高值样品和 0.12 $\mu\text{g/L}$ cTnI 的低值样品各 1 份),计算其平均值、标准差及批内变异系数(CV)。将上述混合血清分装于 20 支带塞试管中,密封后于 4℃ 冰箱保存,每天取 1 支测定,连续测定 20 d,计算批间 CV。

1.3.3 线性试验 选择 cTnI 浓度为 0.00 $\mu\text{g/L}$ 和 30.00 $\mu\text{g/L}$ 的混合血清各 1 份,将 2 份血清按不同比例混合,配成 0.10、7.50、15.00、22.50 和 30.00 $\mu\text{g/L}$ cTnI 的 5 个不同浓度样品,进行线性试验。用 ELFA 法进行测定,每份样品测定 2 次,计算平均值。用测定值(Y)与理论值(X)计算相对偏差率,线性范围上下限依据相对偏差率在 $\pm 5\%$ 的范围内。

1.3.4 回收试验 按不同的比例加入已知 cTnI 浓度为 15.00 $\mu\text{g/L}$ 的混合血清,血清标本分别占 20.0%、40.0%、80.0%,进行回收试验,每份标本测定 2 次,取平均值,计算回收率。

1.3.5 干扰试验 准备 1 份 cTnI 浓度为 15.00 $\mu\text{g/L}$ 的血清样品,分别加入一定量的总胆红素、血红蛋白和三酰甘油后,测定其 cTnI 浓度。

1.3.6 相关性分析 选择不同浓度 cTnI 的血清样品,分别用 ELFA 法和 CLIA 法测定,按照 NCCLS EP9-A 文件要求对数据进行计算、处理,去除离群值。以 ELFA 法为 Y,以 CLIA 法为 X 进行相关性分析。

1.4 统计学处理 采用 SPSS11.0 软件进行统计学分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 *t* 检验;2 种检测方法的相关性比较采用线性相关分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 精密度试验结果 ELFA 法测定 cTnI 浓度,高值和低值的批内 CV 分别为 2.81% 和 1.62%,批间 CV 分别为 5.67% 和 3.52%。

2.2 线性试验结果 ELFA 法检测 cTnI 的可信检测范围为 0.00~30.00 $\mu\text{g/L}$,回归方程为 $Y = 1.05X - 0.15$ ($r = 0.995$, $P < 0.01$)。对于 cTnI 浓度高于 30.00 $\mu\text{g/L}$ 的样品,应该稀释后再测定,结果乘以稀释倍数。

2.3 回收试验结果 cTnI 浓度为 15.00 $\mu\text{g/L}$ 的血清比例为 20.0%、40.0%、80.0% 时,回收率依次为 102.8%、98.1% 及 96.9%。

2.4 干扰试验结果 当总胆红素浓度小于 450 $\mu\text{mol/L}$,血红蛋白浓度小于 1.5 g/L,三酰甘油浓度小于 7.0 mmol/L 时,ELFA 法测定 cTnI 无干扰。

2.5 相关性分析结果 ELFA 法与 CLIA 法测定 cTnI 浓度具有良好的相关性($r = 0.971$),回归方程为 $Y = 0.89X + 2.89$,见图 1。

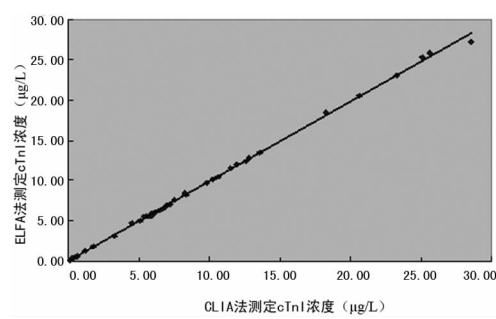


图 1 ELFA 法与 CLIA 法测定 cTnI 浓度相关性分析散点图

3 结论

心肌损伤标志物急诊检测的周转时间(TAT)应小于 60 min。AMI 发作后 1 h 内得到治疗,患者病死率为 1%;而 AMI 发作后 6 h 内得到治疗,其病死率为 10%~12%;治疗时间每延迟 30 min,病死率增加 1%^[11-12]。cTnI 诊断 AMI 有很高的准确性,为临床及时发现 AMI 患者,并实施抢救争取了更多的

时间^[13]。

ELFA 法检测 cTnI 浓度时,固相管不但起到移液装置作用,还起到固相作用。仪器将样本加入含有碱性磷酸酶(ALP)标记的鼠抗人 cTnI 单克隆抗体的孔中。样本/偶联物进出固相管循环多次,使 cTnI 固定在固相管内壁的免疫球蛋白上,偶联形成“三明治”,未结合部分在清洗步骤被除去。ELFA 法测定中应用固相管为载体,增加了鼠抗人 cTnI 单克隆抗体的吸附表面;选择 4-甲基伞形酮为发光剂,被 ALP 催化水解,去磷酸化,生成具有荧光活性的 4-甲基伞形酮,反应系统快速,具有稳定性好的荧光活性;采用全封闭式自动化检测系统,其加样、稀释、反应、洗涤和分析等全自动化,在 20 min 内获得测定结果,可快速定量检测 cTnI 浓度。本文结合 NCCLS 的有关文件,对 ELFA 法进行了系统的方法学评价。结果表明,ELFA 法具有较好的精密度、回收率和线性范围;当总胆红素浓度小于 450 $\mu\text{mol/L}$,血红蛋白浓度小于 1.5 g/L,三酰甘油浓度小于 7.0 mmol/L 时,ELFA 法测定 cTnI 无干扰;ELFA 法与 CLIA 法测定 cTnI 浓度具有良好的相关性($r = 0.971$),回归方程为 $Y = 0.89X + 2.89$,完全达到临床应用的检测要求。

参考文献

- [1] Apple FS, Murakami MM. The diagnostic utility of cardiac biomarkers in detecting myocardial infarction[J]. Clin Cornerstone, 2005, 7(1): 25-30.
- [2] 杨振华. 心肌损伤生化标志物的研究进展[J]. 中华医学杂志, 2000, 80(3): 75-77.
- [3] 赵金龙, 管益国, 李大锋. cTnI 快速定量检测在诊断非 ST 段抬高型急性心肌梗死中的应用[J]. 放射免疫学杂志, 2011, 24(3): 335-337.
- [4] 袁瑾, 李娜娜, 李文花, 等. cTnI、Mb 联合应用评价异丙肾上腺素诱导的心肌缺血损伤及凋亡发生[J]. 中国实验诊断学, 2011, 15(9): 1455-1457.
- [5] 黄春晓, 曹丽霞, 赵明, 等. Mb 在心肌梗死中的意义[J]. 中国误诊学杂志, 2011, 11(15): 3645-3646.
- [6] 许志有, 董战玲. 血清 cTnI 和 CK-MB 在重症肺炎患儿心肌损伤早期诊断中的价值[J]. 现代预防医学, 2011, 38(24): 5073-5074.
- [7] 周剑波, 陆忠明, 俞静文, 等. cTnI、MB 和 CK-MB 联合检测在急性心肌梗死诊断中的临床应用[J]. 职业与健康, 2011, 27(20): 2388-2389.
- [8] 高杰, 汤国高. 早期急性心肌梗死患者 cTnI 和 hs-CRP 及 CK-MB 测定的临床意义[J]. 河北医药, 2011, 33(12): 1805-1806.
- [9] 邓明红, 林春旺, 陈锦金. 小儿毛细支气管炎、细菌性肺炎和支气管炎 cTnI 检测及心肌细胞损害发生率的临床研究[J]. 临床和实验医学杂志, 2010, 9(14): 1047-1048.
- [10] 信朝霞, 黄燕. cTnI、NT-proBNP 及 CK-MB 联合检测对急性心肌梗死的诊断价值[J]. 中国实验诊断学, 2010, 14(6): 926-927.
- [11] 陈效琴. 三种心肌肌钙蛋白的检测方法比较及其应用研究[J]. 吉林医学, 2011, 32(24): 4994-4995.
- [12] 杜国有, 顾向明, 黄国强, 等. 高敏肌钙蛋白 I 低水平表达在冠心病中的诊断价值[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(12): 1486-1487.
- [13] Le Moigne F, Beauvieux MC, Derache P, et al. Determination of myoglobin: comparative evaluation of the new automated VIDAS assay with two other immunoassays[J]. Clin Biochem, 2002, 35(4): 255-262.