

## • 检验技术与方法 •

## 胶乳增强免疫比浊法测定降钙素原方法学评价及临床意义

方亮,周芸,唐伟,刘伟,徐玮,张云

(宁波美康生物科技股份有限公司研发中心,浙江宁波 315104)

**摘要:**目的 对降钙素原(PCT)胶乳增强免疫比浊检测试剂盒进行性能评估并且探讨在脓毒症评估中的应用价值。方法 采用胶乳增强免疫比浊试剂测定 PCT,根据美国临床实验室标准化协会(CLSI)的标准化评价方案对方法进行精密性、回收率、线性、抗干扰等评价及临床应用。结果 在 0.5  $\mu\text{g/L}$  和 2.0  $\mu\text{g/L}$  这 2 个医学诊断水平,此方法批内和日间变异系数分别为  $CV < 5.0\%$  和  $CV < 2.0\%$ ,平均回收率为 100.6%。检测线性范围为 0.05~60  $\mu\text{g/L}$ ,判断依据为  $r^2 = 0.996$ 。试剂在开口 1 个月和 37  $^{\circ}\text{C}$  水浴 8 d 保存过程中,测值偏差小于 10%。跟 Roche PCT 试剂(化学发光法)相比具有高度的相关性。抗干扰性强,总胆红素小于或等于 600  $\mu\text{mol/L}$ ,血红蛋白小于或等于 400  $\text{mg/dL}$ ,三酰甘油小于或等于 1 000  $\text{mg/dL}$ ,类风湿因子小于或等于 200  $\text{IU/mL}$  对试剂盒的测定均无影响。实验组血清 PCT 检测结果为  $(14.783 \pm 5.654) \mu\text{g/L}$ ,与健康对照组  $(0.237 \pm 0.107) \mu\text{g/L}$  比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。结论 胶乳增强免疫比浊法测定血清 PCT 快速、准确、稳定、可靠、适用于临床脓毒症诊断。

**关键词:**降钙素原; 胶乳增强免疫比浊法; 脓毒症

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.24.043

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)24-3401-03

### Methodology evaluation and Clinical significance of Procalcitonin test using

#### Latex enhanced immunoturbidimetric assay

Fang Liang; Zhou Yun; Tang Wei; Liu Wei; Xu Wei; Zhang Yun

(R&D center, Ningbo Medical System Biotechnology Co. Ltd., Ningbo 315104)

**Abstract: Objective** To evaluate the performance characteristic of Procalcitonin (PCT) Latex-enhanced immunoturbidimetric assay (LETIA) kit and explore its clinical application on diagnosis of sepsis. **Methods** The precision, recovery rate, linearity, anti-interference, correlation and clinical application of PCT kit were analyzed in this study according to standards developed by Clinical and laboratory standards institute (CLSI). **Results** The within-run and day-to-day run imprecision (CVs) of kit was  $< 5.0\%$  and  $< 2.0\%$  respectively at two medical diagnosis level (0.5 and 2.0  $\mu\text{g/L}$ ). The average recovery rate was 100.6%. Linear range was from 0.05–60  $\mu\text{g/L}$ ,  $R^2 = 0.996$  as basis of determination. The test deviation was  $< 10\%$ , the result was obtained after repeated test of reagent kept with lid open for one month and lid closed in 37  $^{\circ}\text{C}$  water bath for 8 days. The test results of PCT kit using LETIA method were highly correlated with Roche PCT Chemiluminescence immunoassay (CLIA) kit. The PCT LETIA kit has excellent anti-interference performance, the serum samples containing Total Bilirubin  $\leq 600 \mu\text{mol/L}$ , Hemoglobin  $\leq 400 \text{mg/dL}$ , Triglyceride  $\leq 1 000 \text{mg/dL}$ , Rheumatoid factor  $\leq 200 \text{IU/mL}$  did not affect the testing result of the kit. The average levels of PCT in the experimental (Sepsis) group was  $(14.783 \mu\text{g/L} \pm 5.654 \mu\text{g/L})$ , which in the control group was  $(0.237 \mu\text{g/L} \pm 0.107 \mu\text{g/L})$ , there was statistically significant difference between them ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The PCT test using LETIA is a rapid, precise and reliable method and it can be used for clinical diagnosis of sepsis.

**Key words:** Procalcitonin; Latex enhanced Immunoturbidimetric assay; Sepsis

降钙素原(PCT)是降钙素的前体,是一个含有 116 个氨基酸糖蛋白,相对分子质量  $13 \times 10^3$ 。PCT 基因位于人类第 11 号染色体上,在健康人群体内主要在甲状腺滤泡细胞生成和分泌,肺细胞也会生成和分泌少量的 PCT。在人体中特殊蛋白酶的作用下,PCT 分解成氨基端肽,活性降钙素和降钙蛋白三部分<sup>[1]</sup>。PCT 在人体内的半衰期为 20~24 h,稳定性好,在分泌入血液前,由于大部分 PCT 被蛋白酶分解,只有少量的进入人体血液循环中,因此在健康人群血液中浓度极低(小于 0.5  $\mu\text{g/L}$ )。PCT 与其他炎症指标相比,是一种非常敏感而且特异的血清标志物<sup>[2]</sup>。在细菌感染 2~3 h 后,即可升高,因此,对于细菌感染具有早期诊断价值。在局部感染,病毒性感染或自身免疫性疾病时 PCT 浓度不增加或者少量增加。只有在有严

重的全身系统性感染的人群中,如脓毒症或者严重脓毒症患者血液中 PCT 浓度才明显升高。因此,决定了 PCT 具有高度的特异性<sup>[3]</sup>。除了以上所述,PCT 检测在指导临床正确使用抗菌药物,减少耐药菌株的产生等方面也具有良好的效果<sup>[4]</sup>。

### 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 血清样本取自 2014 年 3~4 月在宁波美康国宾健康管理中心体检人员中的健康人群 200 例,无心、肝、肾等病史,其中男 100 例,平均 49 岁;女 100 例,平均 41 岁。另选 2014 年 1~6 月间在美康中医院诊断患有脓毒症患者 130 例,其中男 90 例,女 40 例,平均 52 岁,其中还包括溶血、脂血、黄疸、类风湿因子呈阳性的样本各 10 例,用作抗干扰性能分析试验。

**1.2 仪器与试剂** PCT 检测试剂盒(胶乳增加免疫比浊法)及其配套校准品来自宁波美康生物科技股份有限公司,对照试剂 PCT 检测试剂盒(化学发光法)及其配套校准品采购自罗氏公司。PCT 检测试剂盒(胶乳增加免疫比浊法)配套质控品来自宁波美康生物科技股份有限公司,PCT 检测试剂盒(化学发光法)配套质控品采购自罗氏公司。美康生物 PCT 检测试剂盒使用 Hitachi 7180 型全自动生化分析仪进行检测。对照试剂 Roche PCT 检测试剂盒使用 Roche Cobas e602 全自动免疫分析仪进行检测。

**1.3 方法**

**1.3.1 检测原理** 样本中的 PCT 与表面包被有抗 PCT 抗体的胶乳颗粒结合后,使相邻的胶乳颗粒彼此交联,发生凝集反应产生浊度。该浊度与样本中的 PCT 浓度成正比,与同样条件下校准液相比较,可以算出样本中 PCT 浓度。

**1.3.2 主要分析参数** 样本体积 15  $\mu\text{L}$ ,R1 体积 210  $\mu\text{L}$ ,R2 体积 70  $\mu\text{L}$ ,主波长 600 nm,采用终点法。反应温度为 37  $^{\circ}\text{C}$ ,反应方法为向上反应。

**1.3.3 精密度** 根据美国临床实验标准委员会(CLSI)EP5-A2 文件对于精密度的评价要求。分别测定低值(0.5  $\mu\text{g/L}$ )、高值(2  $\mu\text{g/L}$ )2 种临床诊断水平的 PCT 浓度,2 h 内各浓度连续测定 20 次,每天测定 1 次,连续测定 20 d 计算均值( $\bar{x}$ )、标准差( $s$ )、变异系数(CV)。

**1.3.4 线性范围测定** 按(CLSI)EP6-P 文件做线性评价标准。取高浓度 PCT 血清(59.53  $\mu\text{g/L}$ )和低浓度 PCT 血清(0.052  $\mu\text{g/L}$ )按不同比例混合。稀释成 7 个不同浓度的样本,其中 0  $\mu\text{g/L}$  为生理盐水。在仪器上用本试剂从低值到高值,然后从高值到低值对 8 个不同浓度的样本分别平行测定 5 次,求得均值为  $Y$ ,理论值为  $X$ 。

**1.3.5 回收率** 取低值(0.5  $\mu\text{g/L}$ )和高值(20.0  $\mu\text{g/L}$ )新鲜血清样本各 1 份。以不同比例混合配制分析样品,然后分别测定 PCT 浓度,每份血清测定 3 次,取平均值,计算回收率。

**1.3.6 稳定性** 将试剂在 2~8  $^{\circ}\text{C}$  下,上机开瓶与不开瓶放置 30 d,第 0 天校准后,随后不再校准,分别在第 0,2,4,8,12,20,30 天测相同 2 份(低值,高值)血清样本。37  $^{\circ}\text{C}$  热破坏性试验中,将试剂密封放入 37  $^{\circ}\text{C}$  水浴中 8 d,每次测定前从水浴拿出

重新校准,分别在第 0,2,4,6,8 天测相同 2 份(低值,高值)血清样本。为了排除血清样本的不稳定性,2 份血清样本各分装成 12 份后,保存在 -20  $^{\circ}\text{C}$ ,每次检测时各取一份复溶后检测。

**1.3.7 相关性分析** 根据(CLSI)EP9-A2 文件做方法学比较。以 Roche PCT 检测试剂盒在 Roche Cobas e602 免疫分析仪的检测结果为对照考核 PCT 胶乳增强免疫比浊试剂盒在 Hitachi 7180 全自动生化分析仪上的检测结果。

**1.3.8 抗干扰试验** 10 例黄疸样本中的总胆红素(TBil)浓度为 40~600  $\mu\text{mol/L}$ ;10 例类风湿因子(RF)阳性样本中的 RF 浓度为 50~200 IU/mL;10 例溶血样本中的血红蛋白(Hb)浓度为 100~400 mg/dL;10 例脂血样本中的三酰甘油(TG)浓度为 200~1 000 mg/dL。每份样本用胶乳增强免疫比浊试剂盒和 Roche 试剂盒(化学发光法)测定 3 次,取平均值,并且观察 2 种试剂盒检测结果的差异。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,相关性分析采用直线方程, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结果**

**2.1 批内和日间精密度结果** 见表 1。

表 1 批内与日间的精密度

标本	批内			日间		
	$\bar{x}(\mu\text{g/L})$	$s$	CV(%)	$\bar{x}(\mu\text{g/L})$	$s$	CV(%)
低值	0.512	0.024 0	4.68	0.508	0.025 1	4.94
高值	2.21	0.041 0	1.86	2.16	0.042 1	1.95

**2.2 线性范围的试验结果** 取高浓度样本(59.53  $\mu\text{g/L}$ )和低浓度样本(0.052  $\mu\text{g/L}$ )按不同比例混合配制出不同浓度的样本用于线性实验,见表 2(见《国际检验医学杂志》网站主页"论文附件")。按照上述方法,配制出来的 7 份样本的理论浓度由高到低依次为 59.53、44.66、29.79、14.92、3.03、0.65 和 0.052  $\mu\text{g/L}$ ,再加上生理盐水为 0  $\mu\text{g/L}$ ,一共 8 个不同浓度的样本用于线性实验,见表 3。回归方程为  $Y = 1.031X - 0.301$ , $r^2 = 0.996$ 。PCT 试剂盒的检测线性范围为 0.05~60  $\mu\text{g/L}$ 。

表 3 胶乳增强免疫比浊 PCT 试剂盒线性分析实验结果

样本号	高浓度 : 低浓度	稀释因子	从高值到低值测 5 次后的平均值	从低值到高值测 5 次后的平均值	测值(平均值)	理论值
1	N/A	N/A	0	0	0	0
2	0 : 100	N/A	0.072	0.059	0.065	0.052
3	1 : 99	100	0.59	0.53	0.56	0.65
4	5 : 95	20	3.29	3.49	3.39	3.03
5	25 : 75	10	14.58	15.05	14.82	14.92
6	50 : 50	2	31.47	32.78	32.13	29.79
7	75 : 25	1.05	40.23	42.89	41.56	44.66
8	100 : 0	1	58.23	57.43	57.83	59.53

**2.3 回收率** 平均回收率 100.6%,见表 4。

**2.4 稳定性** 2~8  $^{\circ}\text{C}$  闭口保存的试剂测值最大相对偏差

3.8%(低值)、5.1%(高值),2~8  $^{\circ}\text{C}$  开口保存的试剂测值最大相对偏差 3.7%(低值)、5.2%(高值),37  $^{\circ}\text{C}$  闭口保存的试剂

测值最大相对偏差 3.8%(低值)、3.9%(高值)。见表 5(见《国际检验医学杂志》网站首页"论文附件")。

表 4 试剂回收试验结果

样本号	理论值( $\mu\text{g/L}$ )	回收浓度( $\mu\text{g/L}$ )	回收率(%)
1	0.5	0.521	104.20
2	1.0	0.984	98.40
3	2.0	2.09	104.50
4	5.0	4.91	98.20
5	10.0	9.91	99.10
6	20.0	19.89	99.45

**2.5 试剂盒相关性分析** 140 例样本(不包括用于做抗干扰试验的 40 份)以 Roche 试剂盒的检测结果划分浓度梯度,其中  $\text{PCT} < 0.5 \mu\text{g/L}$  的有 78 例,  $0.5 \sim 2.0 \mu\text{g/L}$  的有 42 例,  $\text{PCT} > 2.0 \mu\text{g/L}$  的有 20 例。其中 9 份血清样本的浓度大于  $60 \mu\text{g/L}$  高于胶乳增强免疫比浊试剂盒的检测上限, 25 份血清样本的浓度小于  $0.05 \mu\text{g/L}$ , 低于胶乳增强免疫比浊试剂盒的检测下限, 因此, 将有效数据的 106 份样本进行相关性和偏倚的分析。罗氏试剂盒的检测均值为  $4.45 \mu\text{g/L}$ , 范围为  $0.05 \sim 56.98 \mu\text{g/L}$ ; 胶乳增强免疫比浊试剂盒的检测均值为  $4.58 \mu\text{g/L}$ , 范围为  $0.09 \sim 59.12 \mu\text{g/L}$ 。相关性分析显示胶乳增强免疫比浊试剂盒的测定值与 Roche 试剂盒的测定值呈显著相关, 回归方程为( $Y_{\text{胶乳}} = 1.003X_{\text{Roche}} + 0.110, r^2 = 0.975$ )。根据 Bland-Altman 方法分析显示胶乳增强免疫比浊试剂盒与罗氏试剂盒测定值的平均偏倚为  $0.3 \mu\text{g/L}$ , 一致性界限为  $-5.06 \sim 5.67 \mu\text{g/L}$ , 见图 1。

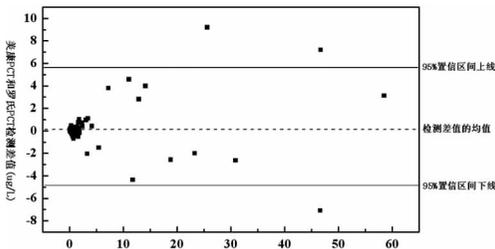


图 1 胶乳增强免疫比浊试剂测值与罗氏试剂测值结果比较-Bland Altman 图

**2.6 抗干扰试验** 在对每类血清 10 份, 总共 40 份的检测中, 其中测值都是在试剂盒检测范围之内。2 种试剂盒检测结果显示(血清样本  $\text{Tbil} \leq 600 \mu\text{mol/L}$ ,  $\text{Hb} \leq 400 \text{mg/dL}$ ,  $\text{TG} \leq 1000 \text{mg/dL}$  或者  $\text{RF} \leq 200 \text{IU/mL}$ )测定值呈显著相关, 因此血清中的干扰物对这 2 种试剂盒的测定均无影响。

**2.7 临床试验** 200 例健康对照组, 用胶乳增强免疫比浊试剂检测血清 PCT 在健康人群中呈正态分布, 男性 PCT 浓度( $0.25 \pm 0.112$ ) $\mu\text{g/L}$ , 女性 PCT 浓度( $0.224 \pm 0.102$ ) $\mu\text{g/L}$ , 不同年龄组间及不同性别间比较差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。130 例脓毒症患者, 血清 PCT 平均浓度为( $14.783 \pm 5.654$ ) $\mu\text{g/L}$ , 其中有 8 位患者检测呈阴性反应,  $\text{PCT} < 0.5 \mu\text{g/L}$

L, 43 位患者 PCT 浓度在  $0.5 \sim 2.0 \mu\text{g/L}$ , 占患者总人数的 33%, 其他患者的  $\text{PCT} > 2.0 \mu\text{g/L}$ 。与健康对照组 PCT 平均浓度( $0.237 \pm 0.107$ ) $\mu\text{g/L}$  比较, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), 阳性检出率为 94% (122/130)。

### 3 讨论

早期, 在对细菌性感染以及由感染引起的脓毒症的诊断中, 缺乏相关的标志物。通过传统的血培养来诊断, 往往要花费很长的时间, 因此对急诊室和重症监护室来说是一个重大的挑战。由于我国人口多, 很多经济发达地区人口密度高, 工业化造成的环境污染, 使各种感染以及由感染造成的脓毒症发生率增高。PCT 作为最新的细菌感染的标志物, 对脓毒症的诊断和预后评估是相当重要的, 相较于其他炎症因子如白细胞介素 IL-6, IL-8, C-反应蛋白以及白细胞计数等, PCT 在早期脓毒症诊断中具有更好的灵敏度和特异度<sup>[5]</sup>。

本研究显示, PCT(胶乳增强免疫比浊法)具有较好的精密度(批内低值小于 5.0%, 高值小于 2.0%; 日间低值小于 5.0%, 高值小于 2.0%), 检测线性范围为  $0.05 \sim 60.0 \mu\text{g/L}$ , 能够满足临床检测需要。试剂稳定性好并且具有良好的抗干扰性能, 对溶血、黄疸、脂血和含有高浓度类风湿因子的样本基本没有影响。本研究中把 Roche 公司的 PCT 化学发光试剂作为对照试剂盒进行了相关性分析。通过检测分析, PCT(胶乳增强免疫比浊法)检测试剂盒和 Roche 试剂盒具有良好的相关性。由于 PCT 具有高灵敏度和特异度的特点, 因此, 在临床检测脓毒症中应用潜力大。而且随着 PCT 在国内临床检测中不断的开放, 检测量也会随之增长。胶乳增强免疫比浊 PCT 试剂在全自动生化分析上实现了自动化检测, 和化学发光试剂相比较具有检测时间短, 操作简便, 可以实现高通量检测的特点, 可以广泛应用在临床对脓毒症诊断中。

### 参考文献

- [1] Pacifico L, Osborn JF, Natale F, et al. De Curtis M and Chiesa C [J]. Procalcitonin in pediatrics[J]. Adv Clin Chem, 2013, 59(1): 203-263.
- [2] Luzzani A, Polati E, Dorizzi R, et al. Comparison of Procalcitonin and C-reactive protein as marker of sepsis [J]. Crit Care Med, 2003, 31(6): 1737-1741.
- [3] Tang BM, Eslick GD, Craig JC, et al. Accuracy of Procalcitonin for sepsis diagnosis in critically ill patients; systematic review and meta-analysis[J]. Lancet Infect Dis, 2007, 20(7): 210-217.
- [4] Heyland DK, Johnson AP, Reynolds SC, et al. Procalcitonin for reduced antibiotic exposure in the critical care setting: a systematic review and an economic evaluation. [J]. Crit Care Med, 2011, 39(7): 1792-1799.
- [5] 陈艳, 王天. 降钙素原对脓毒症患者的早期诊断及预后判断的意义[J]. 中国医学指南, 2014, 19(1): 45-46.

(收稿日期: 2014-10-18)