

• 临床研究 •

NT-proBNP 检测试剂荧光免疫层析法临床性能评价

彭健灵,温小良,苏 海
(江西省宁都县人民医院 342800)

摘要:**目的** 对美康生物 NT-proBNP 检测试剂荧光免疫层析法进行性能评估。**方法** 按照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度、灵敏度、线性、抗干扰及方法学比较的评价及临床初步应用。**结果** 在 300 和 2 000 pg/mL 这两个浓度水平,美康生物试剂批内和日间变异系数分别为 $CV<10.0\%$ 和 $CV<7.0\%$ 。检测灵敏度 LOB 为 33.4 pg/mL,在 48.6~24 804.6 pg/mL 范围内呈线性,对 145 份血清样本进行分析,与美康生物 NT-proBNP 检测试剂与罗氏 proBNP II 试剂(电化学发光法)具有良好的相关性,决定系数 R^2 为 0.992。美康试剂盒抗干扰性强,红蛋白 ≤ 500 mg/dL,结合胆红素 ≤ 20 mg/dL,非结合胆红素 ≤ 20 mg/dL,维生素 C ≤ 3 mg/dL,乳糜 $\leq 1\,450$ FTU,类风湿因子 ≤ 750 IU/mL 对试剂盒的测定均无影响。**结论**

关键词:NT-proBNP; 临床性能评价; 荧光免疫层析法
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.07.047 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2017)07-0984-03

大量研究数据表明,急性心力衰竭患者的 NT-proBNP 水平明显高于其他原因所致的急性呼吸困难患者^[1-5]。心肌细胞受刺激后,产生含 134 个氨基酸的 B 型脑钠肽原前体,后者在内切酶的作用下裂解为含有 76 个氨基酸、无生物活性的 NT-proBNP 和含有 32 个氨基酸、有生物活性的 B 型脑钠肽。BNP 通过与 BNP 受体结合被清楚,而 NT-proBNP 主要由肾小球滤过,因此 NT-proBNP 受肾功能影响大于 BNP。BNP 半衰期较短(22 min),体外稳定性差,而 NT-proBNP 半衰期较长,体外稳定性强,更有利于心力衰竭的诊断^[6-8]。床旁检测测定 NT-proBNP 可方便快速地提供可靠的检验结果,有助于医生更早制定治疗策略,并节省治疗费用。

1 材料与方法

1.1 材料 (1)仪器和试剂,采用宁波美康生物科技股份有限公司提供的 FP100 干式荧光免疫分析仪和配套 NT-proBNP 检测试剂。(2)质控品,由宁波美康生物科技股份有限公司提供的质控品。(3)NT-proBNP 阴性血浆,购自 Hytest。(3)血清样本,取自我院住院患者血清,其中男性 107 例,女性 93 例,平均年龄 65 岁。

1.2 方法

1.2.1 精密度 根据美国临床实验标准委员会 (CLSI) EP5-A2 文件对于精密度进行评价。分别测定低值(300 pg/mL),高值(2 000 pg/mL)2 个临床诊断水平的 NT-proBNP,2 h 内各水平连续测定 20 次,和每天测定一次,连续测定 20 天计算均值(\bar{x})、标准差(SD)、变异系数(CV)。

1.2.2 灵敏度 根据 EP17-A2 文件做灵敏度 LoB 评价,对空白血浆重复测定 20 次,计算均值 \bar{x} 和标准差 s , $LoB=\bar{x}\pm 2SD$ 。

1.2.3 线性范围测定 按 (CLSI) EP6-A2 文件做线性评价标准。以稀释液空白代替低浓度样本,超过检测上限的高浓度患者标本和稀释液按照 20/0,19/1,18/2,16/4,14/6,12/8,8/12,4/16,2/18,0/20 的比例配制系列浓度样本,在仪器上用本试剂从低值到高值,然后从高值到低值对 10 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 。以理论值横坐标和以均值为纵坐标,绘图并进行直线回归。

1.2.4 方法学比对试验 根据 (CLSI) EP9-A2 文件做方法学比较。以 Roche Cobas e 电化学发光检测系统的检测结果为对照,考核美康生物 NT-proBNP 试剂盒的检测结果。Roche 与

美康试剂盒检测结果的回归分析采用一元直线回归分析。
1.2.5 抗干扰实验 根据 (CLSI) EP7-A2 文件做抗干扰能力分析,分别将高值干扰物(血红蛋白 2 000 mg/dL,结合胆红素 80 mg/dL,非结合胆红素 80 mg/dL,维生素 C 12 mg/dL,乳糜 5 800 FTU,类风湿因子 3 000 IU/mL)和生理盐水按照 20/0、15/5、10/10、5/15、0/20 的比例混合,制备系列浓度干扰物,然后将系列浓度干扰物与待测血清等量混合,重复测定 3 次,取平均值,然后计算相对偏差。

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		
	$\bar{x}(\mu\text{g/L})$	SD	$CV(\%)$	$\bar{x}(\mu\text{g/L})$	SD	$CV(\%)$
低值	298.4	22.3	7.47	296.7	24.0	8.08
中值	2 072.8	136.4	6.58	2 077.8	122.2	5.88

2.2 灵敏度 根据 CLSI EP17-A2 文件,空白样本单次检测结果有 95% 的概率在区间 ($\bar{x}\pm 2SD$),故得出 $LOB=\bar{x}\pm 2SD=33.4$ pg/mL。

2.2 线性范围的试验结果 取高浓度样本(34 804.6 pg/mL)和低浓度样本(48.1 pg/mL)按 20:0,19:1,18:2,16:4,12:8,8:12,4:16,2:18,0:20 比例混合配制出不同浓度的样本用于线性实验,见表 2。

对检测结果进行 3 次多项式回归分析,回归方程为 $Y=50.09+24\,390X+17\,87X^2-1\,904X^3$,结果见图 1。对回归方程进行线性检验,经 t 检验 $P>0.05$,表示非线性系数与零无显著性差异,数据组被认为具线性,因此可认为美康生物 NT-proBNP 试剂在 48.6~24 804.6 范围内呈线性关系。

2.3 方法学比对 145 例样本以 Roche 试剂盒的检测结果划分浓度梯度,其中 NT-proBNP <300 pg/mL 的有 51 例,300~450 pg/mL 的有 11 例, >450 pg/mL 的有 83 例。对 145 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 2 970 pg/mL,范围为 6~25 594 pg/mL;美康试剂盒的检测均值为 2 885 pg/mL,范围为 6~24 629 pg/mL。相关性分析显示美康生物试剂盒的测定值与 Roche 试剂盒的测定值呈显著相关,回归方程为($Y_{\text{美康}}=1.006x_{\text{Roche}}-8.102,R^2=0.992$),见图 2。

表 2 美康生物 NT-proBNP 试剂盒线性分析实验结果

样本号	高浓度:低浓度	稀释系数	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	0 : 20	0.00	48.6	54.1	51.4	48.1
2	2 : 18	0.10	2 494.2	2 567.1	2 530.7	2 523.7
3	4 : 16	0.20	4 842.0	5 010.0	4 926.0	4 999.4
4	8 : 12	0.40	10 100.1	9 981.0	10 040.6	9 950.7
5	12 : 8	0.60	14 761.3	14 811.6	14 786.5	14 902
6	14 : 6	0.70	17 106.6	17 791.1	17 448.9	17 377.7
7	16 : 4	0.80	19 960.6	19 586.5	19 773.6	19 853.3
8	18 : 2	0.90	22 405.6	21 825.4	22 115.5	22 328.9
9	19 : 1	0.95	22 695.1	23 198.2	22 946.7	23 566.8
10	12 : 0	1	24 321.2	24 614.1	24 467.7	24 804.6

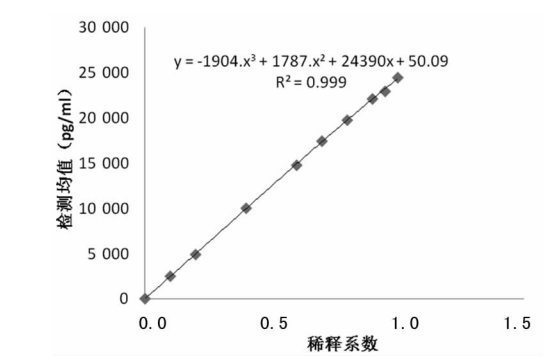


图 1 试剂盒线性回归方程

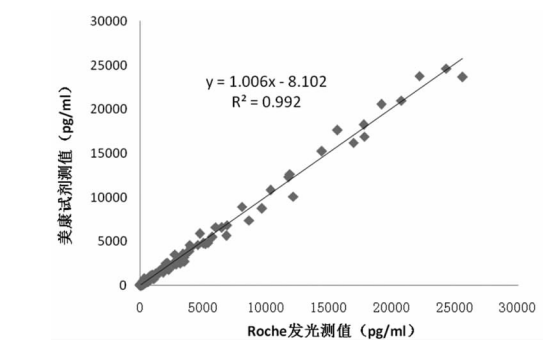


图 2 美康试剂测值分别与罗氏试剂结果比较-直线回归图

2.4 抗干扰试验 在同一份人血清样品中分别加入不同含量的干扰物质后进行测定。加入干扰物质后的测定值与加入干扰物质前的测定值之间的差值除以加入干扰物前的测定值比值即为干扰率，试验结果表明血红蛋白≤500 mg/dL，结合胆红素≤20 mg/dL，非结合胆红素≤20 mg/dL，维生素 C≤3 mg/dL，乳糜≤1450FTU，类风湿因子≤750 IU/mL 对测定结果的干扰率均在 10%以下，见表 2。

表 2 美康生物 NT-proBNP 试剂盒抗干扰实验结果(%)					
干扰物	浓度 1	浓度 2	浓度 3	浓度 4	浓度 5
血红蛋白					
添加量(mg/dL)	0	125	250	375	500
影响率	0.6	0.7	-0.4	-2.1	-4.1
结合胆红素					
添加量(mg/dL)	0	5	10	15	20

续表 2 美康生物 NT-proBNP 试剂盒抗干扰实验结果(%)

干扰物	浓度 1	浓度 2	浓度 3	浓度 4	浓度 5
影响率					
4.6	0.10	3.6	1.0	6.2	
非结合胆红素					
添加量(mg/dL)	0	5	10	15	20
影响率	1.6	0.1	-1.0	3.8	2.2
VC					
添加量(mg/dL)	0.00	0.75	1.50	2.25	3.00
影响率	-2.9	6.0	-0.3	-2.0	-6.40
乳糜					
添加量(RTU)	0.0	362.5	725.0	1 087.5	1 450.0
影响率	-4.40	6.2	0.5	4.7	6.4
类风湿因子 RF					
添加量(IU/mL)	0.0	187.5	375.0	562.5	750.0
影响率	3.8	1.8	4.5	5.9	8.7

3 讨 论

本研究以罗氏化学发光试剂为对照，对美康生物的 NT-proBNP 检测试剂盒进行了性能评估。经评价，美康生物 NT-proBNP 试剂盒具有较好的精密度(批内低值<7.47%，高值<6.58%；日间低值<8.08%，高值<5.88%)，检测灵敏度 LOB 为 33.4 pg/mL，在 48.6~24 804.6 范围内呈线性关系，能够较好地满足临床需要。以 Roche NT-proBNP 检测试剂盒作为对照试剂盒进行了相关性分析，美康生物的 NT-proBNP 检测试剂盒与 Roche 试剂盒具有良好的相关性，决定系数 R²=0.992。试剂具有良好的抗干扰性能，血红蛋白≤500 mg/dL，结合胆红素≤20 mg/dL，非结合胆红素≤20 mg/dL，维生素 C≤3 mg/dL，乳糜≤1 450 FTU，类风湿因子≤750 IU/mL 对测定结果的干扰率均在 10%以下。随着 NT-proBNP 项目在国内临床检测中不断的开放，检测量也会随之增长。美康生物 NT-proBNP 试剂配合美康干式荧光分析仪，操作简单便捷，与化学发光试剂相比较具有检测时间短，操作简便，更适合急诊、床旁检测以及基层社区医院检测的特点，检测结果和目前市场上认可的进口化学发光试剂具有较高的相关性，可以广泛应用于临床检测。

参考文献

[1] Lainchbury JG, Gampbell E, Frampton CM, et al. Brain natriuretic peptide and N-terminal brain natriuretic peptide in the diagnosis of heart failure in patients with acute shortness of breath[J]. J Am Coll Cardiol. 2013, 42(7): 728-735.

[2] Bayes-Genis A, Sabtaki-Bel M, Zapico-Muniz E, et al. N-terminal probrain natriuretic peptide(NT-proBNP) in the emergency diagnosis and inhospital monitoring of patients with dyspnoea and ventricular dysfunction [J]. Eur J Heart Fail. 2004, 6(2): 301-308.

[3] Jannuzzi JL Jr, Camargo CA, Anwaruddin S, et al. The N-terminal Pro-BNP investigation of dyspnea in the emergency department(PRIDE) study[J]. Am J Cardiol. 2005, 95(9): 948-954.

[4] Jannuzzi JL, van Kimmenade R, Lainchbury J, et al. NT-proBNP testing for diagnosis and short-term prognosis in acute destabilized heart failure; an international pooled analysis of 1256 patients. The international Collaborative of NT-proBNP Study[J]. Eur Heart J. 2006, 27(3): 330-337.

[5] 丛辉, 吴珊, 储海丹, 等. BNP、NT-proBNP 在心力衰竭患者中的应用价值再评估[J]. 国际检验医学杂志, 2016, 37(7): 954-956.

[6] NT-proBNP 临床应用中国专家共识小组. NT-proBNP 临床应用中国专家共识[J]. 中国心血管病研究, 2011, 9(6): 401-408

[7] 桂瑞丰, 李超伟, 郭华国, 等. 心力衰竭患者血浆 NT-proBNP 水平与心功能的研究[J]. 国际检验医学杂志, 2015, 36(1): 85-86.

[8] 江涛, 王昌富. NT-proBNP 在心力衰竭诊断和预后评估中的应用[J]. 国际检验医学杂志, 2014, 35(2): 194-196.

(收稿日期: 2016-12-06 修回日期: 2017-01-28)

• 临床研究 •

Th17 和 IL-17 对绝经后妇女骨质疏松发病的影响

余勇彬¹, 严 瑾²

(黄梅县人民医院: 1. 骨科; 2. 消化内科, 湖北黄冈 435500)

摘要:目的 探讨辅助性 T 细胞 17(Th17)和白介素-17(IL-17)对绝经后妇女骨质疏松发病的影响。方法 收集 2012 年 6 月至 2015 年 8 月来该院就诊的绝经后骨质疏松的患者 68 例为试验组, 同时选取同时期来该院体检的绝经后骨质正常的 68 例为对照组, 分别通过流式细胞仪及酶联免疫吸附测定法(ELISA 法)来检测两组研究对象外周血中 Th17 细胞的水平及 IL-17 蛋白的水平, 然后用统计学方法来分析绝经后骨质疏松患者的血清钙及骨密度与患者外周血中 IL-17 水平的关系。结果 绝经后妇女骨质疏松患者外周血中 Th17 细胞的比例及 IL-17 蛋白的水平均明显高于对照组; 绝经后妇女骨质疏松患者骨密度 BMD 值及血清钙的水平均明显低于对照组; 绝经后妇女骨质疏松患者血清中 IL-17 与血清钙及骨密度均呈负相关性。结论 Th17 和 IL-17 能明显提升绝经后女性发生骨质疏松的概率, 对绝经后外周血中 Th17 细胞的水平及 IL-17 蛋白的水平高的患者在临床工作中要警惕骨质疏松的发生。

关键词:绝经; 骨质疏松; 白介素-17; 辅助性 T 细胞
DOI:10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2017. 07. 048 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2017)07-0986-03

骨质疏松症在临床上是一种常见的疾病, 是以骨组织微结构退化和骨量减少为主要特征, 以骨的脆性增加、容易发生骨折为最终结果的骨骼代谢疾病的一种^[1]。我国骨质疏松症的发病率随着人均寿命的延长及人口老龄化的不断加剧有逐年上升的趋势, 目前, 骨质疏松症已成为我国最常见的一种老年性疾病^[2]。有研究结果显示 4/5 的骨质疏松症患者都是围绝经期的女性, 这是由于绝经后的女性雌激素水平下降, 而雌激素是维持骨量的关键激素, 因此, 绝经后的女性更容易导致骨密度的减少及骨结构的改变^[3-4], 又有研究显示有 90% 以上的大于 75 岁的绝经女性都会发生骨质疏松症^[5]。骨质疏松症的严重致死及致残率都给患者的生活质量、家庭甚至社会带来了沉重的负担。本研究选取 68 例绝经后骨质疏松的患者与 68 例绝经后骨质正常的人为研究对象, 来探讨 Th17 和 IL-17 对绝经后妇女骨质疏松发病的影响。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2012 年 6 月至 2015 年 8 月来本院就诊的绝经后骨质疏松的患者 68 例为试验组, 同时选取同时期来该院体检的绝经后骨质正常的 68 例为对照组。两组研究对象入选标准: (1) 所选均是自然绝经 1 年以上的患者; (2) 所选

患者的年龄在 50~65 岁, 平均年龄(60.9±2.3)岁; (3) 所选患者均没有各种骨软化、肾小管酸中毒及维生素 D 缺乏症; (4) 所选患者均没有甲状腺功能亢进症状; (5) 所选患者均没有骨髓瘤及恶性肿瘤骨转移; (6) 所选患者均没有脊髓血管瘤或化脓性脊髓炎。排除标准: (1) 患有内分泌及慢性内科疾病所引起的继发性的骨质疏松的患者; (2) 患有严重限制运动疾病的患者; (3) 近期服用肝素、雌激素及二磷酸盐等与骨质疏松有关系药物的患者。两组患者在年龄、绝经时间、孕次及产次等一般临床资料上的差异无统计学意义($P>0.05$), 具有可比性。本研究经我院医学伦理委员会的研究并审核, 本研究中所有患者均有签署之情同意书。

1.2 方法 用流式细胞仪来检测两组患者外周血 Th17 细胞的水平, 具体方法: 采集 5 mL 清晨空腹外周血, 迅速加入 EDTA 抗凝剂及红细胞裂解液, 再加入 1640 培养液, 调节细胞浓度到 1×10^6 细胞/mL, 3 000 r/min、离心 10 min, 将沉淀物重悬于 100 μ L 的 PBS 液中, 然后加入 eBioscience 公司提供 PE 标记的 CD3-APC(0.25 mg/mL) 与 PE 标记的 CD4-FITC(0.2 mg/mL) 抗体, 混匀室温避光孵育 0.5 h, PBS 缓冲液冲洗 2 遍, 然后加入 1 mL 的破膜固定液放入 4 $^{\circ}$ C 冰箱中孵育 0.5 h。