

5 种免疫透射比浊法试剂盒检测特定蛋白钩状效应的性能评估*

杨杰¹, 李玲², 张瀚允¹, 张鹏¹, 曾方银^{2△}

(1. 南方医科大学南方医院检验科, 广东广州 510515; 2. 南方医科大学第五附属医院检验科, 广东广州 510900)

摘要:目的 评估 5 种免疫透射比浊法试剂盒在生化分析仪上检测特定蛋白钩状效应的性能。方法 应用北京九强生物技术股份有限公司(A)、四川迈克生物科技股份有限公司(B)、深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司(C)、宁波美康生物科技股份有限公司(D)和北京利德曼生化股份有限公司(E)5 种市场占有率较高的免疫透射比浊法试剂盒, 分别测定 6 个特定蛋白项目, 在分析测量范围已知的前提下, 配制一系列浓度梯度样品进行检测, 比较不同厂家试剂盒钩状效应的性能。结果 5 种试剂盒中, B 和 C 测定链球菌溶血素 O(ASO)、超敏 C 反应蛋白(hs-CRP)和 β 2-微球蛋白(β 2-MG) 3 个项目抗原过量的安全范围上限较大, 浓度分别在 10 000 IU/mL、1 000 mg/L 和 226 mg/L 左右未出现钩状效应。血清胱抑素 C(CysC)试剂盒中上限最大的是 C 和 E 试剂盒, 均大于 112 mg/L。除 D 试剂盒外, 其他厂家试剂检测视黄醇结合蛋白(RBP)的安全范围上限均在 700 mg/L 以上。尿微量清蛋白(mALB)试剂盒抗原过量安全范围上限最大的是 D, 浓度达 43 560 mg/L 左右仍未出现钩状效应。结论 不同厂家免疫透射比浊法试剂盒钩状效应性能不同, 实验室在使用之前应进行钩状效应性能验证, 选择防范钩状效应最好的试剂盒。

关键词:免疫透射比浊法; 钩状效应; 抗原过量; 安全范围

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2019.02.004

中图法分类号:R446.61

文章编号:1673-4130(2019)02-0140-04

文献标识码:A

Performance evaluation of the hook effect of five immunoturbidimetric
kits for the detection of specific proteins*

YANG Jie¹, LI Ling², ZHANG Hanyun¹, ZHANG Peng¹, ZENG Fangyin^{2△}

(1. Department of Clinical Laboratory, Nanfang Hospital of Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong 510515, China; 2. Department of Clinical Laboratory, the Fifth Affiliated Hospital of Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong 510900, China)

Abstract: **Objective** To evaluate the performance of hook effect of five immunoturbidimetric kits for the detection of specific proteins on biochemical analyzers. **Methods** Five immunoturbidimetric kits with higher market share that came from Beijing BSBE (A), Sichuan maccura (B), Shenzhen Mindray (C), Ningbo Medical System (D) and Beijing Leadman (E) were used to determine six specific proteins. A series of concentration gradient samples were prepared and tested to compare the performance of hook effect from different manufactures' kits when the analytical measurement ranges were known. **Results** In the five kits, the upper limits of the safe range of antigen excess about ASO, hs-CRP and β 2-MG were relatively higher in B and C. No hook effect occurred at the approximate concentration of 10 000 IU/mL, 1 000 mg/L and 226 mg/L respectively. The highest upper limits for CysC were C and E kits, and both were greater than 112 mg/L. The upper limits of the safety range for other manufacturers were more than 700 mg/L about RBP except for D. The maximum upper limit of mALB was D. Hook effect did not appear at the concentration of 43 560 mg/L approximately. **Conclusion** Different manufactures' immunoturbidimetric kits have different hook effect performance. The laboratories should verify the hook effect performance before using the kits, and select the most suitable kit to prevent hook effect.

Key words: immunoturbidimetry; hook effect; antigen excess; safety range

* 基金项目:广东省科技计划项目(2014A020215013)。

作者简介:杨杰,女,在读硕士研究生,主要从事临床生物化学检验方向研究。△ 通信作者, E-mail: zengfy@126.com。

本文引用格式:杨杰,李玲,张瀚允,等. 5 种免疫透射比浊法试剂盒检测特定蛋白钩状效应的性能评估[J]. 国际检验医学杂志, 2019, 40

免疫比浊测定是临床常用的检测技术,根据其方法原理的不同,可分为免疫散射比浊法和免疫透射比浊法;前者需要专用的散射免疫分析仪,而后者可在全自动生化分析仪上自动进行。采用全自动生化分析仪进行免疫透射比浊测定,具有分析速度快、检测成本低、自动化程度高的特点。近年来,随着胶乳增强技术的改进、试剂盒质量的提高、量值溯源的进步,临床上采用免疫透射比浊法测定血液、体液中的微量物质越来越普遍^[1-5]。但早在 1935 年 HEIDELBERGER 对沉淀素的研究时就发现抗原浓度与免疫复合物沉淀量之间呈非线性的关系:在恒定剂量的抗体溶液中加入不同剂量的抗原时,免疫复合物的生成量,起初随着抗原剂量的增加而逐步增加;当达到峰值后,生成量随着抗原剂量的进一步增加反而减少。1974 年 MILES 等^[6]根据剂量-效应测试曲线的形状,首次提出 hook 效应(即钩状效应)这一概念。目前钩状效应多指抗原过剩,准确来说应称为高剂量的钩状效应。如果标本中待测物浓度过高,免疫透射比浊法的结果会受到钩状效应的影响而出现假性低值;若检测者不能及时发现这一问题,则会发出错误报告,严重影响患者诊断和治疗^[7-8]。不同品牌的试剂,防范钩状效应的能力不尽相同,笔者选择了市场占有率比较高的 5 种试剂盒,以临床上易出现高值的 6 个特定蛋白项目为例,进行抗原过量性能对比实验,评估不同试剂盒应对钩状效应的性能,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 准备各项目的高浓度样本,链球菌溶血素 O(ASO)和尿微量清蛋白(mALB)高浓度样本来源于人高值血清混合物;超敏 C 反应蛋白(hs-CRP)、 β_2 -微球蛋白(β_2 -MG)、视黄醇结合蛋白(RBP)高值标本由人体液提取纯化的各自蛋白纯品组成;血清胱抑素 C(CysC)高值标本是重组人胱抑素 C 蛋白。以上 6 个项目的实验样本最高浓度至少不低于前期收集的临床样本最高可见浓度(数据未展示)。

1.2 仪器与试剂 深圳迈瑞 SAL 8000 生化免疫一体机。北京九强生物技术股份有限公司、四川迈克生物科技股份有限公司、深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司、宁波美康生物科技股份有限公司和北京利德曼生化股份有限公司(依次以 A、B、C、D、E 表示)各自生产的 ASO、hs-CRP、 β_2 -MG、CysC、RBP、mALB 免疫透射比浊法试剂盒,并提供对应配套的校准品和质控品(四川迈克生物科技股份有限公司目前无 RBP 试剂盒)。

1.3 方法

1.3.1 不同浓度梯度的样品制备 将上述各项目的高值样本用生理盐水进行不同比例的稀释(mALB 高值样本用尿液稀释),每个项目形成不同数量浓度梯度的样品,如 ASO 和 β_2 -MG 各有 30 和 27 个浓度梯度,理论样品浓度范围分别为 50~10 000 IU/mL 和

1.1~226.3 mg/L。

1.3.2 样品测试 在 SAL 8000 生化免疫一体机的 BS-2000 生化模块上按各厂家试剂盒说明书设定各项检测参数,再用各自配套的校准品对仪器进行校准,对高低 2 个浓度水平的质控品进行室内质控,确保室内质控在控的情况下测试每个项目不同浓度梯度的样品,每个样品重复检测 2 次。

1.4 数据处理 以每个样品 2 次检测结果均值为纵坐标,理论浓度为横坐标,绘制剂量-效应曲线,确定其后带限(剂量-效应曲线右侧与分析测量范围上限吸光度信号相等的浓度点),即抗原过量时检测的安全范围(分析测量范围上限至后带限之间的浓度范围)上限。

2 结果

2.1 5 种试剂盒不同项目的剂量-效应曲线 样品实测浓度起初随着配制浓度的升高而升高,在到达平衡点浓度之后实测值随样品浓度升高反而减少(图 1~6)。如图 1 中 A、B、C、D、E 5 种试剂测定 ASO 时,其抗原-抗体结合达到平衡点时的 ASO 浓度分别为 1 150、4 000、5 000、3 000、2 000 IU/mL 左右,超过以上浓度后剂量-效应曲线呈下降趋势。

2.2 5 种试剂盒抗原过量安全范围上限 剂量-效应曲线的浓度变化和生产厂家宣称的分析测量范围上限进行比较,估计出抗原过量安全范围上限,见表 1。其中 B、C、D 3 种试剂盒测定 ASO 的安全范围上限最大,可达到 10 000 IU/mL 以上,A 和 E 则分别在理论浓度为 1 150 IU/mL 和 4 000 IU/mL 左右会发生钩状效应;B、C 试剂测定 hs-CRP 的安全范围上限超过 1 000 mg/L,A、E 分别为 750 mg/L 和 340 mg/L 左右,而 D 试剂盒宣称的 hs-CRP 分析测量范围上限为 15 mg/L,测试无意义;B、C 试剂盒测定 β_2 -MG 时,在 226 mg/L 左右仍未出现钩状效应,A 和 E 的安全范围上限分别为 204 mg/L 和 147 mg/L 左右,D 显示的安全范围上限最小,仅为 18 mg/L 左右;CysC 检测结果表明,C 和 E 试剂的安全范围上限最大,可达到 112 mg/L 以上,其次是 A 和 B,均在 11 mg/L 左右出现钩状效应,最小的是 D,仅在 9 mg/L 左右即出现钩状效应;A、C、E 3 种试剂盒检测 RBP 时的安全范围上限均在 700 mg/L 以上,D 在 550 mg/L 左右;对于 mALB 的测定,A 和 B 安全范围上限较低,分别在 6 534 mg/L 和 2 178 mg/L 左右,C 试剂盒在理论浓度 21 780 mg/L 左右会出现钩状效应,而 D 试剂安全范围上限可高达 43 560 mg/L 以上(配制的 mALB 样品从第 3 个浓度开始反应度超过 D 试剂盒最高浓度校准品反应度,结果用反应度和校准规则计算),E 试剂盒在检测高浓度 mALB 样本时出现干扰,结果不准确,不予分析。

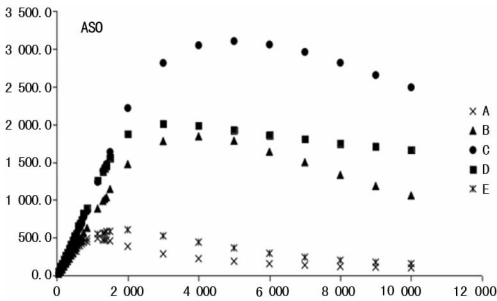


图 1 ASO 剂量-效应曲线

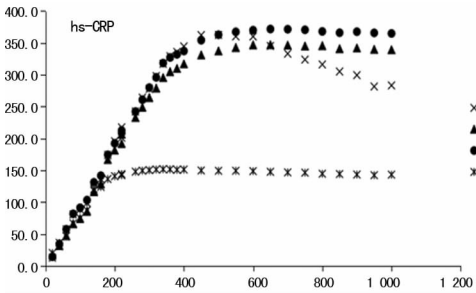


图 2 hs-CRP 剂量-效应曲线

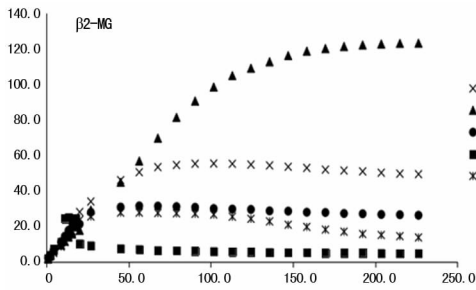


图 3 beta2-MG 剂量-效应曲线

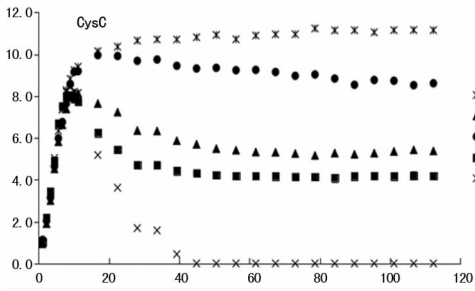


图 4 CysC 剂量-效应曲线

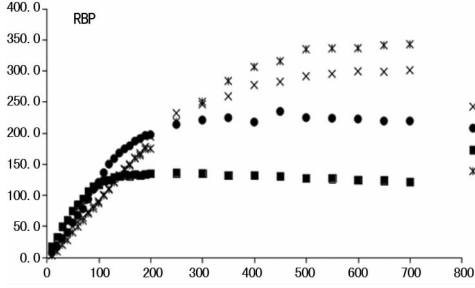


图 5 RBP 剂量-效应曲线

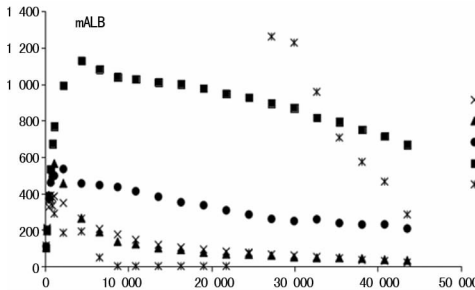


图 6 mALB 剂量-效应曲线

表 1 5 种试剂盒对应 6 个项目的分析测量范围上限和抗原过量安全范围上限

项目	A		B		C		D		E	
	m	hook	m	hook	m	hook	m	hook	m	hook
ASO(IU/mL)	1 200	1 150	1 000	>10 000	1 000	>10 000	800	>10 000	400	4 000
hs-CRP(mg/L)	320	750	320	>1 000	320	>1 000	15	—	160	340
beta2-MG(mg/L)	50	204	80	>226	18	>226	18	18	20	147
CysC(mg/L)	8	11	7.8	11	8	>112	8	9	8	>112
RBP(mg/L)	250	>700	—	—	150	>700	126	550	100	>700
mALB(mg/L)	200	6 534	400	2 178	300	21 780	300	>43 560	1 000	—

注：m 表示试剂宣称的分析测量范围上限；hook 表示抗原过量安全范围上限；—表示无数据

3 讨 论

临床上经常测定的多种血浆蛋白类物质如 CysC、mALB、ASO、RBP、hs-CRP 等病理浓度分布范围宽广，在疾病重症状态下其浓度显著升高，可达到异常高值甚至超过正常参考区间上限的百倍以上。其临床可见的浓度越高，超过检测系统分析测量范围上限而出现钩状效应的风险越大。因此，及时发现检测过程中出现的钩状效应，防止报告偏低甚至错误的测定结果仍是临床需要高度重视的问题。

本研究以 5 种免疫透射比浊法试剂盒检测 6 种特定蛋白项目为例，进行了钩状效应的对比实验，结

果发现不同厂家试剂能达到的抗原过量安全范围有很大差异，如 B、C、D，3 种试剂盒测定 ASO 时，抗原过量安全范围上限均大于 10 000 IU/mL，而 A 仅为 1 150 IU/mL 左右，B 试剂盒测定 beta2-MG 的安全范围上限在 226 mg/L 以上，而 D 仅为 18 mg/L 左右，结果较易受到钩状效应的影响。抗原过量的安全范围主要与试剂的质量有关，试剂盒的配方至关重要，包括抗体质量（纯度、效价）、抗体浓度、缓冲体系、聚乙二醇(PEG)的分子大小和浓度选择、胶乳交联技术等多个方面^[9-10]。配方好的试剂盒若其分析测量范围足够宽，可以覆盖所有临床可见的样本浓度，就不会存

在钩状效应。研究表明, IgM 试剂盒中抗体浓度越高, 所能准确检测到的抗原浓度越高, 安全报告范围也越宽, 钩状效应出现得越少^[11]。在其他条件已然优化的情况下, 要拓宽分析测量范围的关键是添加足够的抗体, 但这势必会大幅度提高试剂的成本, 医疗机构和患者需要随之付出更大的成本。因此, 试剂盒的设计需要在成本和临床性能之间达成一个平衡, 才能以经济有效的方法保证结果的准确性。

试剂盒的配方优化是防范钩状效应的一个有效手段, 但并非万能。要防止因钩状效应的出现而发出错误报告, 还需要结合分析仪器的测量程序。不同品牌的全自动生化分析仪, 其加样、加试剂的步骤和时间、吸光度的测试时间点等差异较大, 需要结合生化分析仪的具体性能, 综合应用多种方法, 如反应曲线特征识别和报警、样品预稀释、抗原或抗体二次添加等^[12-16]。而反应曲线特征识别和报警, 不同厂家的报警参数算法也可能不同, 对于采用开放系统的实验室检测人员, 需要向厂家工程技术人员详细了解其算法, 根据预试验的结果合理设置报警参数, 并进行验证, 才能在出现钩状效应时及时给出有效提示。

一些厂家的免疫比浊试剂盒说明书上会宣称抗原过量的安全范围, 如罗氏诊断和西门子医疗 ASO 试剂说明书宣称其分别在 4 000 IU/mL 和 8 500 IU/mL 时未出现钩状效应, 而很多厂家仅声明了分析测量范围的上限, 未对钩状效应的限值作出说明。因此, 实验室在采购试剂的时候, 应该关注厂家的性能宣称, 重视试剂的质量。临床使用前, 应该根据项目的病理生理浓度分布宽度进行钩状效应性能的验证, 验证试剂盒抗原过剩区是否与蛋白的病理生理浓度兼容, 选择防范钩状效应性能最好的试剂盒, 防止发出错误报告, 减少标本的复测, 降低检测成本并提高工作效率。

4 结 论

本实验发现不同厂家免疫透射比浊法试剂盒检测特定蛋白时抗原过量安全范围有较大的差异, 实验室在选择试剂盒时对其防范钩状效应性能进行验证很有必要; 若结合测量程序的报警参数优化, 可有效降低发出错误报告的风险。

参考文献

[1] 曾华, 罗玲, 何桂儿, 等. 透射比浊法和散射比浊法测定免疫球蛋白和补体的评价[J]. 国际检验医学杂志, 2013, 34(20): 2733-2734.

[2] 戴婉如, 周欢, 林燕辉, 等. 免疫透射比浊法在 AU5800 全

自动生化分析仪检测降钙素原的方法学评价[J]. 检验医学与临床, 2015, 12(10): 1447-1448.

[3] 卢玲玲, 郑国军, 涂斐佩, 等. 基于胶乳增强免疫比浊法的食物过敏原检测试剂盒方法学的建立及临床应用评价[J]. 中国免疫学杂志, 2016, 32(3): 377-381.

[4] 刘雯, 龚玲, 曹伟, 等. 免疫透射比浊法与散射比浊法检测血清胱抑素 C 的方法学比较[J]. 中国现代医生, 2017, 55(21): 96-98.

[5] 方亮, 王芬, 刘献文, 等. 血清和尿液中黄醇结合蛋白胶乳增强免疫比浊试剂盒的制备及性能评价[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(1): 103-106.

[6] MILES L E, LIPSCHITZ D A, BIEBER C P, et al. Measurement of serum ferritin by a 2-site immunoradiometric assay[J]. Anal Biochem, 1974, 61(1): 209-224.

[7] 康红, 王兰兰. 免疫比浊法中钩状效应的防范[J]. 国外医学临床生物化学与检验学分册, 2004, 25(6): 551-552.

[8] MURATA K, CLARK R J, LOCKINGTON K S, et al. Sharply increased serum free light-chain concentrations after treatment for multiple myeloma[J]. Clin Chem, 2010, 56(1): 16-18.

[9] 方清. 双粒径胶乳免疫比浊法在测定 D-二聚体中的应用[J]. 检验医学, 2016, 31(9): 801-806.

[10] 程帅, 赵淑荣, 崔鹏飞, 等. 聚乙烯基萘纳米微球制备及在胶乳增强免疫比浊法检测中的应用[J]. 天津医科大学学报, 2014, 20(6): 441-444.

[11] BLIRUP-JENSEN S. Protein standardization III: method optimization basic principles for quantitative determination of human serum proteins on automated instruments based on turbidimetry or nephelometry[J]. Clin Chem Lab Med, 2001, 39(11): 1098-1109.

[12] SKOUG J W, PARDUE H L. Kinetic turbidimetric method for the immunochemical quantification of immunoglobulins, including samples with excess antigen[J]. Clin Chem, 1988, 34(2): 309-315.

[13] 夏勇, 陈璇, 薛灏, 等. 类风湿因子在全自动生化分析仪上检测的钩状效应研究[J]. 检验医学与临床, 2016, 13(11): 1512-1514.

[14] 滕晓梅. 免疫比浊法用于全自动生化分析仪中产生钩状效应的防范[J]. 国际检验医学杂志, 2015, 36(12): 1649-1650.

[15] 李慧, 高致远. 电化学发光免疫法检测甲胎蛋白出现钩状效应一例[J]. 检验医学, 2012, 27(9): 706.

[16] 张杰良, 黄雪珍, 莫和国, 等. 尿微量清蛋白抗原再添检测技术与前带检查研究分析[J]. 重庆医学, 2017, 46(28): 3962-3964.

(收稿日期: 2018-05-29 修回日期: 2018-09-24)