

• 论 著 •

免疫透射比浊法多点非线性校准在脂蛋白(a)测定中的应用

张汉园, 曹风华, 王 斌

(江苏省镇江市中西医结合医院检验科 212003)

摘要:目的 探讨免疫透射比浊法测定脂蛋白(a)中,采用2种多点非线性校准方法的测定结果,并确定最合适的校准曲线。方法 分别采用 $Y=aX^2+bX+c$ 和 Spline2 种方法在 AU680 生化仪上进行脂蛋白(a)校准。分别检测 200 例来自临床患者的血清标本和 4 个标准定值血清,200 例临床患者血清按照测定值高低分为 5 个不同梯度水平,分别统计 2 组数据的均值(\bar{x})、标准差(s),相关系数(r),相对误差(v),偏倚($\%$)。采用 SPSS19.0 软件对 2 组数据偏倚进行统计学分析,以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。结果 200 例临床患者数据表明,采用 $Y=aX^2+bX+c$ 曲线时,0~100、>400~600、>600~800 mg/L 组的脂蛋白(a)测定值比 Spline 曲线所得数值高;>100~200 mg/L 组和 >200~400 mg/L 组的脂蛋白(a)测定值相反,Spline 曲线所得数值较高。4 个标准定值血清的测定结果,Spline 曲线所得测定值更接近靶值;而 $Y=aX^2+bX+c$ 曲线所测定结果中,>100~200 mg/L 组和 >300~400 mg/L 组所得值偏低,>600~800 mg/L 组所得值偏高,这与临床患者的血清标本结果一致。结论 Spline 曲线更为客观,能更准确地体现免疫透射比浊法测定脂蛋白(a)整个反应过程。

关键词:非线性校准; 脂蛋白(a); 免疫透射比浊法

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.22.016

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2016)22-3137-03

Application of immune transmission turbidimetry multipoint nonlinear calibration in lipoprotein(a) determination

ZHANG Hanyuan, CAO Fenghua, WANG Bin

(Department of Clinical Laboratory, Zhenjiang Municipal Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Zhenjiang, Jiangsu 212003, China)

Abstract: Objective To adopt the results detected by the two kinds of multipoint nonlinear calibration method in immune transmission turbidimetry for detecting lipoprotein(a) and to ascertain the most suitable calibration curve. Methods The two kinds of method $Y=aX^2+bX+c$ and Spline were adopted to conduct the lipoprotein(a) calibration in the AU680 biochemical instrument. Two hundreds serum samples from clinical patients and 4 standard fixed value serum specimens were detected respectively. The sera from 200 cases of clinical patients were divided into 5 different gradient levels. The mean value(\bar{x}), standard deviation(s), correlation coefficient(r), relative error(v), bias($\%$) were respectively performed statistics. The biases in the two groups of data were statistically analyzed by using the SPSS19.0 software, with $P<0.05$ expressing that the difference having statistical significance. Results The data in 200 clinical patients indicated that using the curve of $Y=aX^2+bX+c$, the lipoprotein(a) detection values in the 0-100 mg/L group, 400-600 mg/L group and 600-800 mg/L group were higher than those by the Spline curve; while the detection values in the 100-200 mg/L group and 200-400 mg/L group were on the contrary, the values obtained by using the Spline curve were higher. In the detection results of 4 standard fixed value sera, the values detected by the Spline curve were more close to the target values; while in the results detected by using the curve of $Y=aX^2+bX+c$, the values in the 100 mg/L group and 300 mg/L group were on the low side and the values in the 600 mg/L group were on the high side, which were consistent with the serum specimen results from clinical patients. Conclusion The Spline curve is more objective and can accurately embody the whole reaction process of lipoprotein(a) detection by the immune transmission turbidimetry.

Key words: nonlinear calibration; lipoprotein(a); immune transmission turbidimetry

随着全自动生化分析仪技术日趋完善,免疫透射比浊法正逐渐成熟,应用越来越广泛。免疫透射比浊法中抗原抗体的结合需要经过 3 个阶段,导致吸光度变化与被测物水平变化呈非线性关系^[1]。多点非线性校准是采用多个水平的标准物质在特定波长下,测定出各自的吸光度值,采用不同水平和所测吸光度值之间的关系,绘制成非线性曲线^[2]。脂蛋白(a)作为心脑血管疾病的独立危险因素指标,需选择较可靠的检测方法,以保证结果的准确性^[3]。本院 Beckman AU680 生化仪上有 2 种多点非线性校准方法: $Y=aX^2+bX+c$ 和 Spline 曲线。本研究旨在建立更准确地体现免疫透射比浊法测定脂蛋白(a)整个反应过程的最佳曲线,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取临床患者血清标本 200 例,另采用 4 个标准定值血清(由试剂厂商提供)。

1.2 仪器与试剂 检测仪器为 Beckman AU680 型全自动生化分析仪。脂蛋白(a)检测试剂盒及配套标准品均由万泰生物技术有限公司提供。

1.3 方法 按照脂蛋白(a)试剂说明书中的反应参数对 AU680 生化分析仪进行设置。分别采用 $Y=aX^2+bX+c$ 和 Spline 曲线对患者血清标本进行 5 个水平的多点定标,得出标准曲线。此外,采用上述 2 种曲线对 4 个标准定值血清分别进行测定。计算 2 组数据的均值(\bar{x})、标准差(s),相关系数(r),

相对误差(v), 偏倚($\%$)。

1.4 统计学处理 采用 SPSS19.0 软件对偏倚进行统计学分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 计数资料以率表示, 以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 $Y = aX^2 + bX + c$ 和 Spline 曲线图 见图 1、2(拍摄于 AU680 生化分析仪操作电脑)。

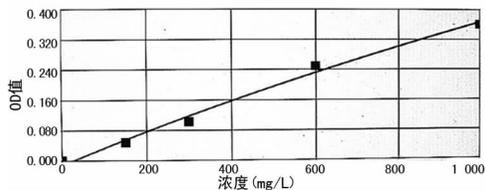


图 1 $Y = aX^2 + bX + c$ 曲线

2.2 2 组数据对比 见表 1、2。

2.3 结果分析 2 个曲线图充分反映 2 种非线性多点校准方法间的差异。从 AU680 自动生化分析仪的多点非线性校准中得知, Spline 计算公式为 $Y = a_n X^3 + b_n X^2 + c_n + d_n$, 采用最小二乘法的三次曲线拟合而成, 可得出光滑曲线, 也能将测定误差拟合到曲线中, 属于函数逼近的范围。Spline 曲线将每个转折点的数据作为非线性曲线的 1 个数据点, 充分满足统计数据

中的数值。 $Y = aX^2 + bX + c$ 曲线 2 次函数的拟合曲线, 属于线性或很近似线性的计算方法, 其尽量满足统计数据中的数值, 在非线性分析中应用十分广泛。

2 个表格显示了实际临床应用中所得数据的不同之处。采用 $Y = aX^2 + bX + c$ 曲线时, 0~100 mg/L 组、>400~600 mg/L、>600~800 mg/L 组的脂蛋白(a)测定值比 Spline 曲线所得值高; >100~200 mg/L 组和 >200~400 mg/L 组的脂蛋白(a)测定值却恰恰相反, 采用 Spline 曲线所得值较高。4 个标准值血清在 2 种多点定标方式条件下分别进行测定, Spline 曲线的测定值更接近靶值; 而 $Y = aX^2 + bX + c$ 曲线所得值中, >100~200 mg/L 组和 >200~400 mg/L 组所得值偏低, >600~800 mg/L 组所得值偏高, 这与表 1 临床患者血清标本结果一致。

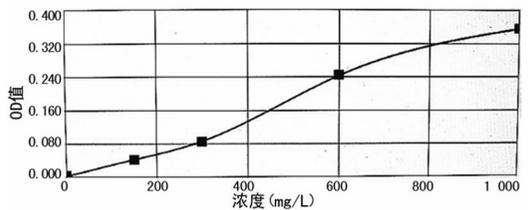


图 2 Spline 曲线

表 1 血清脂蛋白(a)对比

项目	0~100 mg/L	>100~200 mg/L	>200~400 mg/L	>400~600 mg/L	>600~800 mg/L
Spline 取值(mg/L)	67.1±21.3	135.4±25.9	293.3±53.6	469.2±72.5	692.4±83.9
$Y = aX^2 + bX + c$ 取值(mg/L)	74.0±15.7	121.5±20.8	270.7±56.6	499.5±74.3	731.5±87.1
r	0.932	0.944	0.965	0.977	0.982
$v(\%)$	9.32	10.30	8.49	6.40	5.60

表 2 4 个标准值血清脂蛋白(a)对比

项目	150 mg/L	300 mg/L	600 mg/L	1 000 mg/L
spline 取值(mg/L)	148.2	305.0	612.0	1 005.0
$Y = aX^2 + bX + c$ 取值(mg/L)	138.0	273.0	636.0	1 010.0
Spline 偏倚($\%$)	-1.2	1.6	2.0	0.5
$Y = aX^2 + bX + c$ 偏倚($\%$)	-8.0	-9.1	7.2	1.0

3 讨论

国内外已有电泳法、散射和透射免疫比浊法等多种方法测定脂蛋白(a), 其中免疫透射比浊法快速、准确、精密, 且适合于各种类型生化自动分析仪, 特别适用于大批量标本的测定^[4], 本研究拟在现有试剂盒基础上, 对标准方式作进一步探讨。免疫透射比浊法反应体系中, 待测成分作为抗原出现, 与反应体系中的相应抗体发生反应, 形成抗原-抗体复合物。同时, 试剂中的聚乙二醇可消除抗原-抗体蛋白的水化层, 加速抗原-抗体复合物的形成, 增加其稳定性。通过仪器进行透射光强度测定, 可取得水平和吸光度数据的相关关系。由于抗原与抗体结合过程中吸光度与水平间不呈线性关系, 标准曲线拟合即或使用数学方法体现上述相关关系, 其关键在于选择拟合曲线类型, 需要根据标准水平和吸光度值, 建立 1 条曲线, 使所有点在总体上尽量接近^[5]。

此前的生化分析仪比色系统基于朗伯-比尔定律, 校准曲

线往往为直线, 不具备非线性拟合能力。而现代全自动生化分析仪功能相当完善, 其校准曲线拟合功能齐全, 往往具备多种数学函数方程供非线性拟合时使用^[6], 如线性函数、多项式函数、指数函数、对数函数、样条函数、多参数的对数值对数函数等^[7]。测定结果的准确与否很大程度上取决于是否采用适当的曲线拟合。采用合适的曲线拟合, 能大大改善检验结果的准确性。

本研究结果显示, Spline 曲线更客观, 能更准确地体现免疫透射比浊法测定脂蛋白(a)的整个反应过程。脂蛋白(a)水平升高与冠状动脉粥样硬化的发生有着密切的关系, 是当前心、脑血管疾病极有价值的危险性预测指标^[8], 需选择较可靠的检测方法, 以保证结果的准确性。有研究建立芯片电泳分离血清脂蛋白及其亚型的方法并初步探讨其临床应用价值, 结果表明基于纳米技术的芯片电泳可快速、简便地测定脂蛋白及其亚型^[9], 对评价心、脑血管疾病的危险因素, 实现对冠状动脉粥样硬化的早期检测、预防及有效制订防治策略具有重大意义^[10]。

参考文献

[1] 彭凤. 免疫透射比浊测定技术的进展和分析特性[J]. 检验医学, 2012, 27(4): 252-256.
 [2] 肖友益. 化学发光免疫分析标准曲线拟合模式选择[J]. 现代检验医学杂志, 2009, 24(5): 157. (下转第 3141 页)

见图 1。

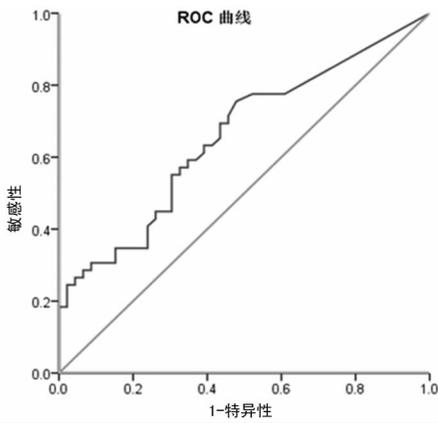


图 1 ET 水平 ROC 曲线分析

3 讨论

本研究比较 3 组 ET 水平和阳性率,结果表明革兰阴性杆菌感染组水平最高(与理论相符合),革兰阳性球菌感染组较对照组高,可能因为革兰阳性球菌感染的患者使用了某些广谱抗菌药物治疗细菌感染,诱导了肠道菌群失调,使得条件致病菌选择为肠道优势菌群,加剧肠道细菌易位,引起肠源性感染^[4],最终又诱导了肠源性 ET 血症^[5]。

本研究中 3 组 PCT 水平差异无统计学意义,革兰阴性杆菌感染组和革兰阳性球菌感染组的阳性率差异无统计学意义,2 组显著高于对照组。由于 PCT 水平与炎症反应程度呈正相关关系,某些轻微的细菌局灶性感染可使 PCT 的水平正常或仅轻度升高,因此笔者认为本研究中大部分肺炎患者可能由于炎症反应并不重,导致 3 组的 PCT 水平差异无统计学意义。虽然有研究表明,LPS 能在短时间内大量诱导 PCT 产生,使患者体内 PCT 水平快速升高^[2],但本研究中革兰阴性杆菌感染组虽然 ET 水平较高,但是 PCT 水平并没有较其他组增高,推断革兰阴性杆菌感染组的 ET 水平可能还不足以诱导患者体内表达大量的 PCT。

CRP 是非特异性炎症指标,本研究中,肺炎患者 CRP 水平比对照组显著增高。CRP 在诊断肺炎时比 PCT 和 ET 有更高的敏感性,但在鉴别诊断细菌性肺炎和病毒性肺炎时无特异性。此外,本研究分析得出 CRP 与 PCT 呈正相关关系,这与相关研究结果一致^[6-7],而与 ET 无相关关系。

综上所述,PCT 和 CRP 在鉴别诊断革兰阴性杆菌和革兰阳性球菌感染的肺炎时并没有特异性,而革兰阳性球菌感染的肺炎患者可能因为其具有不可觉察的肠源性 ET 血症,要通过 ET 水平鉴别 2 种类型肺炎相对困难。本研究通过 ROC 曲线分析获得 1 个可用以鉴别 2 种类型肺炎的 ET 阈值(ET = 0.115 U/mL),但特异性仍不高(仅为 52.1%)。因此,临床上在鉴别诊断革兰阴性杆菌和革兰阳性球菌感染的肺炎时不能仅依靠 ET 水平,仍然要同时进行细菌培养鉴定。由于抗菌药物滥用导致肠源性 ET 血症发生,给进一步治疗带来了困难,因此,临床医师在保证有效杀菌的前提下,应尽可能选择诱导 ET 释放少的抗菌药物。

参考文献

- [1] 何池英.降钙素原、C 反应蛋白和白细胞计数在新生儿感染性疾病诊断中的应用[J].实用预防医学,2012,19(10):1558-1559.
- [2] Oberhoffer M, Stonans I, Russwurm S, et al. Procalcitonin expression in human peripheral blood mononuclear cells and its modulation by lipopolysaccharides and sepsis-related cytokines in vitro[J]. J Lab Clin Med, 1999, 134(1): 49-55.
- [3] Charles PE, Ladoire S, Aho S, et al. Serum procalcitonin elevation in critically ill patients at the onset of bacteremia caused by either gram negative or gram positive bacteria [J]. BMC Infect Dis, 2008, 8(1): 1-8.
- [4] 刘绍泽,陈德昌,马丽琼.广谱抗生素对脓毒症大鼠肠道革兰阴性杆菌的选择作用[J].解放军医学杂志,2007,32(11):1122-1125.
- [5] 张永一,郭昌星.抗生素诱导内毒素血症研究进展[J].中华全科医学,2008,6(12):1297-1298.
- [6] 蔡木发,易伟莲,吴显劲.感染性疾病 PCT 与 CRP 相关性分析[J].齐齐哈尔医学院学报,2011,32(5):696-697.
- [7] 王会芳,于彩霞,刘鹏年,等.血清降钙素原、C-反应蛋白和白细胞介素-6 在不同年龄细菌性肺炎患者中的研究[J].中国卫生检验杂志,2016,26(1):81-86.

(收稿日期:2016-05-11 修回日期:2016-07-18)

(上接第 3138 页)

- [3] Khara AV, Everett BM, Caulfield MP, et al. Lipoprotein (a) concentrations, rosuvastatin therapy, and residual vascular risk: an analysis from the Jupiter trial[J]. Circulation, 2013, 128(22): 635-642.
- [4] 陈磊,张静兰,陈敏.应用动力学分析提高透射比浊法检测脂蛋白(a)的精密度[J].国际检验医学杂志,2012,66(1):83-85.
- [5] 骆春艳.不同标准曲线拟合模式对化学发光免疫分析测定结果的影响[J/CD].世界最新医学信息文摘(电子版),2013,13(5):40.
- [6] 董晓妮,张文灏.关于免疫透射比浊法测定波长选择的探讨[J].检验医学,2013,28(3):210.

- [7] 李东风,郑忠国.最优线性回归的计算方法[J].数理统计与管理,2008,27(1):87-95.
- [8] Hoover-Plow J, Huang MG. Lipoprotein(a) metabolism: potential sites for therapeutic targets [J]. Metabolism, 2013, 62(4): 479-491.
- [9] 汪骅,韩崇旭,王惠民,等.基于纳米技术的芯片电泳快速检测脂蛋白及其亚型的研究[J].检验医学,2013,28(3): 225-228.
- [10] Mearns BM. Valvular disease: lipoprotein(a) link to calcification[J]. Nat Rev Cardiol, 2013, 10(4): 180-181.

(收稿日期:2016-04-17 修回日期:2016-06-23)