

脂联素水平与炎症营养状态相关性研究[J]. 重庆医学, 2015, 44(29): 4098-4101.

[10] 张祖隆, 王蕴倩. 辛伐他汀对维持性血液透析患者炎症因子的影响[J]. 现代预防医学, 2011, 38(4): 773-774.

[11] 常玲玲, 李秀丽, 杨淑玲, 等. 血液净化方式对终末期肾病患者抑郁相关因素的影响[J]. 中华行为医学与脑科学杂志, 2016, 25(1): 50-54.

[12] 陶瑾. 维持性血液透析患者微炎症状态的临床研究[J]. 中国现代医学杂志, 2014, 24(4): 84-87.

(收稿日期: 2017-05-12 修回日期: 2017-07-26)

• 临床研究 •

PCT 荧光免疫层析检测方法的建立及性能评价*

刘献文, 赵 盛

(美康生物科技股份有限公司, 浙江宁波 315104)

摘要:目的 建立一种荧光定量降钙素原(PCT)检测方法。方法 利用双抗体夹心法原理, 建立 PCT 免疫检测方法, 并对本方法进行了精密度、灵敏度、线性、相关性等性能指标的测定。结果 本检测方法的灵敏度为 0.04 ng/mL, 精密度 CV<10%, 线性范围为 0.04~51.14 ng/mL, 与罗氏 Cobas E601 PCT 相关系数 r 为 0.996。结论 本研究建立了 PCT 荧光免疫检测方法, 各项性能指标均达到临床检测要求, 可用于临床血清 PCT 浓度的检测。

关键词:干式荧光免疫分析仪; 免疫层析法; 降钙素原

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2017.23.039

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2017)23-3324-03

降钙素原(PCT)是无激素活性的降钙素的前体物质, 在健康人群体内主要由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^[1-2]。PCT 由 116 个氨基酸组成, 相对分子质量 13×10^3 , 在人体内的半衰期为 25~30 h, 稳定性好, 在健康人体内水平极低。PCT 在人体特殊蛋白酶的作用下分解成氨基端肽、活性降钙素和降钙蛋白三部分^[3-5]。

血中 PCT 的升高与细菌感染密切相关, 病毒感染及局部细菌感染而无全身表现的患者 PCT 仅轻度升高; 在全身系统性严重感染中, PCT 早期即可升高; 经抗菌药物治疗感染情况得到控制后, 血中 PCT 会下降^[6-7]。近年来, 越来越多的研究显示, PCT 在临床诊断感染时的特异度和灵敏度优于白细胞计数(WBC)和 C 反应蛋白(CRP)等指标, PCT 已被认为是全身严重感染或败血症时的一个重要的观察指标^[8]。PCT 在评估脓毒血症严重程度、病情进展情况、脓毒血症的预后判断、指导抗菌药物的使用等方面发挥了重要作用^[9-12]。

1 资料与方法

1.1 一般资料 本研究所用的 98 份样本均为 2016 年 8 月至 10 月期间于宁波李惠利医院检验科收集, 其中男 52 例, 女 47 例, 年龄 17~89 岁, 平均年龄 52 岁。

1.2 仪器与试剂 点膜喷金仪、裁纸机为韩国 ZETA 公司生产, 干式荧光免疫分析仪 FP100 为美康生物科技股份有限公司提供。PCT 化学发光检测试剂、PCT 校准品、PCT 特种蛋白质控为罗氏生产; 血红蛋白、乳糜、胆红素等试剂由美康生物科技股份有限公司提供。

1.3 方法

1.3.1 PCT 荧光定量快速检测方法的建立 (1) 荧光抗体的制备: 用 10 mmol/L pH=7.2 磷酸盐缓冲液将荧光胶乳微球稀释到浓度为 4 mg/mL。向 5 mL 稀释后的荧光胶乳溶液中加入 5 mg 的碳二亚胺(EDAC), 搅拌 1 h, 10 000 r/min 离心 30 min, 去上清, 沉淀悬浮于等体积的 10 mmol/L pH=7.2 的磷酸盐缓冲液中。加入 2 mg 的 PCT 单抗, 室温搅拌反应 1 h, 再加入浓度为 10 mg/mL 的牛血清白蛋白(BSA), 室温搅拌

1 h, 10 000 r/min 离心 30 min, 去上清, 沉淀悬浮于等体积的 10 mmol/L pH=7.2 的磷酸盐缓冲液中, 4 ℃ 保存备用。(2) 荧光抗体垫的制备: 在三维喷点平台上将荧光抗体涂于玻璃纤维垫上, 37 ℃ 干燥 1 h, 铝箔袋密封, 室温存放备用。(3) 硝酸纤维素膜(NC 膜)包被抗体: 用生理盐水稀释 PCT 单抗和羊抗鼠 IgG 抗体到适当浓度。在三维喷点平台上将 PCT 单抗和羊抗鼠 IgG 抗体喷点在硝酸纤维素膜上适当位置形成条带状, 37 ℃ 干燥 1 h, 铝箔袋密封, 室温存放备用。(4) PCT 荧光定量检测卡的组装: 按 NC 膜、样本垫、荧光抗体垫、吸水纸顺序黏贴到 PVC 塑料背垫上 NC 膜两边, 首尾相互连接, 制作成半成品大板, 然后用裁纸机将半成品大板切成 4 mm 宽的试纸条。装上塑料外壳, 即为完整检测卡。(5) 校准曲线的建立和样本检测: 将 PCT 系列校准品(浓度分别为 0、5、10、20、50 ng/mL) 用样本稀释液稀释 100 倍, 吸取稀释后的校准品各 100 μL, 加入检测卡加样孔中, 计时 3 min, 计时结束后立即在干式荧光免疫分析仪 FP100 上检测, 读取检测线和质控线的荧光信号值。以校准品浓度为纵坐标, 以检测线峰信号值为横坐标, 制作校准曲线, 进行四参数 logistic 回归, 可得到校准曲线方程。将样本检测荧光信号值代入校准曲线方程进行计算, 得到样本浓度值。

1.3.2 检测方法性能评估 (1) 精密度测试: 随机抽取同批次的 PCT 荧光定量检测卡 20 份, 分别在干式荧光免疫分析仪 FP100 上对自制空白血清样本进行测定, 重复 20 次, 计算检测限($\bar{x} \pm s$)。本实验随机抽取同批次的 PCT 荧光检测卡 20 份, 在荧光检测仪上分别对低值和高值 PCT 特种蛋白质控进行测定, 每个浓度重复 20 次, 计算批内精密度。(2) 线性范围测试: 以稀释液空白代替低浓度样本, 与 PCT 浓度值 >50 ng/mL 的高浓度患者标本和稀释液进行倍比稀释得到 6 个浓度水平的系列样本, 每个标本重复测 3 次。(3) 与对比试剂相关性: 以罗氏 Cobas E601 PCT 检测试剂(电化学发光法)检测结果为对照, 考核自制 PCT 荧光定量检测卡, 检测结果的回归分析采用一元直线回归分析。

* 基金项目: 宁波市鄞州区“重大科技创新专项”项目(2011A210086)。

1.4 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件处理,组间数据比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。一元直线回归分析计算决定系数 (R^2), $R^2 > 0.975$ 表示相关性良好。

2 结果

2.1 空白限和精密度评价 本研究自制 PCT 试剂的检测限为 0.04 ng/mL。自制 PCT 荧光定量检测卡对低值和高值质控品分别重复检测 20 次,精密度均 $< 10\%$,各浓度分别测定 20 次的结果符合正态分布 ($P > 0.05$),且 *t* 检验显示各年度测试结果的偏倚在可接受范围内 ($P > 0.05$)。

表 1 批内精密度和准确度结果分析 ($n=20$)

项目	空白样品	样品 1	样品 2
平均值 (ng/mL)	0.02	0.49	4.05
最大值 (ng/mL)	0.04	0.59	4.54
最小值 (ng/mL)	0.00	0.41	3.44
SD (ng/mL)	0.01	0.04	0.29
CV (%)	36.17	8.00	7.08

2.2 线性范围测试 以空白稀释液代替低浓度样本,将 PCT 浓度值 > 50 ng/mL 的高浓度患者标本稀释得到 6 个浓度水平的系列样本,每个标本重复测定 20 次。6 个线性评价样本的测定结果的范围是 0.04~51.14 ng/mL,用统计学软件对结果进行多项式回归统计分析,各指标 b_2 、 b_3 与 0 比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$),回归方程为线性,回归方程为 $Y = 49.44X - 1.038$, $R^2 = 0.996$,具有统计学意义 ($P < 0.05$)。统计分析显示自制的 PCT 荧光定量检测卡在 0.04~51.14 ng/mL 范围内呈线性关系 (见图 1)。

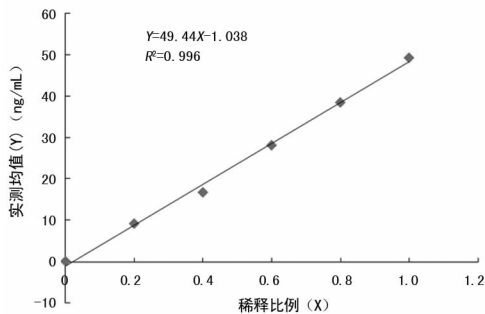


图 1 自制 PCT 试剂线性范围

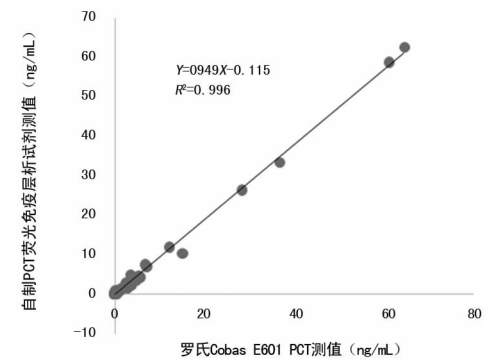


图 2 自制 PCT 试剂与对比试剂的血清相关性

2.2 与对比试剂相关性检测 分别通过罗氏 Cobas E601 PCT 检测试剂 (电化学发光法) 和 PCT 荧光定量检测卡 (荧光免疫层析法),对 98 份人血清样本进行测定,对测定结果做相关性分析。结果见图 2,本检测方法和对照试剂的相关性分析回归方程 $Y = 0.949X - 0.115$,相关系数 $r = 0.996$,差异有统

计学意义 ($P < 0.05$),线性回归的 Cusum 检验偏倚无统计学意义 ($P > 0.05$)。该结果表明本研究自制 PCT 荧光定量检测卡与对照试剂在测定值之间相关性良好。

3 讨论

PCT 是无激素活性的降钙素前肽物质,是由 116 个氨基酸组成,相对分子质量为 13×10^3 的糖蛋白。PCT 在人体内的半衰期为 25~30 h,体外稳定性好。机体严重细菌、真菌、寄生虫感染及脓毒血症和多脏器功能衰竭时,PCT 水平会显著升高^[1]。

免疫层析快速检测技术是近年发达国家发展起来的一种快速免疫分析技术。其原理是样本液通过毛细迁移作用在硝酸纤维素膜上迁移,待测物与膜上一定区域的抗体 (抗原) 结合,通过有色标记物,十几分钟甚至几分钟内即可得到肉眼可见的直观结果。免疫层析快速检测技术不需将游离的抗体 (抗原) 和形成复合物的抗体 (抗原) 进行分离,省去了繁琐洗涤步骤,因而操作便捷,出报告时间短,在基层医疗机构、急诊、现场、家庭等场所得到了广泛的应用。以胶体金为标记物的第一代免疫层析技术已发展了 30 多年,目前仍广泛应用,但由于其只能用于定性或半定量的检测,难以满足临床对微量、超微量分析物定量检测的要求,而以荧光微球为标记物的免疫层析快速检测技术克服了胶体金标记免疫层析技术灵敏度差、不能定量检测的缺陷。

本研究以荧光微球为标记物,建立了 PCT 荧光免疫层析检测方法,并对检测方法进行了性能评估。经评价,本研究建立的 PCT 荧光免疫层析检测试剂具有较好的精密度 (批内精密度 $< 10\%$),检测灵敏度 LOB 为 0.04 ng/mL,在 0.04~51.14 ng/mL 范围内呈线性关系,能够较好地满足临床需要。本研究建立的 PCT 荧光免疫层析检测方法与罗氏 Cobas E601 PCT 检测试剂的决定系数 R^2 为 0.996。本研究建立的 PCT 荧光免疫层析检测方法配合美康干式荧光免疫分析仪,操作简单便捷,检测时间短,适合急诊、床旁检测以及基层社区医院检测,可以广泛应用于临床。

参考文献

- [1] 郭靓,王占科.降钙素原生化特征及其临床应用[J].现代诊断与治疗,2009,20(4):217-219.
- [2] 王常田,景华.降钙素原在体外循环炎性反应中的研究[J].医学研究生学报,2004,17(11):1037-1040.
- [3] 牛军.降钙素原的临床应用[J].临床军医杂志,2013,41(8):871-873.
- [4] Pacifico L, Osborn JF, Natale F, et al. Procalcitonin in pediatrics[J]. Adv Clin Chem, 2013, 59: 203-263.
- [5] Hammer S, Meisner F, Dirschel P, et al. Procalcitonin in new marker for diagnosis of acute rejection and bacterial infection in patients after heart and lung transplantation [J]. Trans Immunol, 1998, 6(2): 235-241.
- [6] 降钙素原急诊临床应用专家共识组.降钙素原 (PCT) 急诊临床应用的专家共识[J].中华急诊医学杂志,2012,21(9):944-948.
- [7] 朱星成.降钙素原与感染性疾病的临床研究进展[J].医学综述,2014,20(2):231-233.
- [8] 李洪祥. C-反应蛋白、降钙素原与脓毒症的诊断及指导抗生素治疗的临床研究[D]. 长春:吉林大学,2015.
- [9] 王一琳. C 反应蛋白、降钙素原及白介素-6 在肺部细菌性感染中的诊断价值及抗生素应用指导的研究[D]. 长春:

吉林大学, 2016.

[10] 王敏, 贾延伟, 钱建新, 等. 降钙素原在诊断早期细菌感染中的价值分析[J]. 临床诊断, 2013, 8(17): 90-91.

[11] 王欢, 沈定霞, 张有江, 等. 降钙素原与血培养诊断血流感染比较[J]. 军医进修学院学报, 2010, 31(7): 695-697.

[12] 涂波, 张昕, 李丰衣, 等. 降钙素原在真菌感染诊断中的临床价值[J]. 中国真菌学杂志, 2012, 7(5): 309-311.

(收稿日期: 2017-05-17 修回日期: 2017-07-30)

• 临床研究 •

血清 TBA 与传统肝功能酶学指标在肝病中的临床价值分析

皮红泉, 卢盛祥, 陈超群, 陈昌达, 宋茂舟

(广东省东莞市常平医院检验科, 广东东莞 523573)

摘要:目的 分析血清总胆汁酸(TBA)与传统肝功能酶学指标在急性肝炎、肝硬化、肝癌等肝病中的临床价值。方法 入选 2014 年 11 月至 2016 年 11 月该院收治的肝病患者 96 例, 其中急性肝炎、肝硬化和肝癌患者分别为 32 例, 另外选择健康体检者 32 例为对照组。比较急性肝炎组、肝硬化组、肝癌组和对照组 TBA 与传统肝功能酶学指标, 包括丙氨酸氨基转移酶(ALT)、碱性磷酸酶(ALP)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)和 γ -谷氨酰基转移酶(GGT)水平。结果 急性肝炎组、肝硬化组和肝癌组的 TBA、ALT、ALP、AST 和 GGT 水平均明显高于对照组, 差异有统计学的意义($P < 0.05$)。急性肝炎组、肝硬化组和肝癌组的 TBA 的阳性率均高于传统肝功能酶学指标, 差异有统计学的意义($P < 0.05$)。结论 TBA 是反映肝病情况的重要指标, 在诊断肝病时的灵敏度优于传统肝功能酶学指标, 具有重要的临床价值。

关键词:血清总胆汁酸; 传统肝功能酶学指标; 急性肝炎; 肝硬化; 肝癌

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.23.040

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2017)23-3326-02

肝病是一种危害性较大的疾病, 临床发病率较高, 常见的肝病包括急性肝炎、肝硬化和肝癌等, 病情严重者会危及生命。因为肝脏是机体的重要的代谢器官, 有很强的代偿和再生的能力, 临床上对肝脏疾病的诊断十分重要。诊断指标通常为传统肝功能酶学指标, 但是诊断的灵敏度较低, 特别是慢性肝脏疾病, 可能会延误疾病治疗的最佳时机, 影响患者的治疗效果^[1-2]。血清总胆汁酸(TBA)是反映肝脏功能的重要指标, 其生成与代谢均与肝脏相关。本研究对比了血清 TBA 与传统肝功能酶学指标在急性肝炎、肝硬化、肝癌等肝病中的临床价值, 血清 TBA 的检测灵敏度更高^[3]。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2014 年 11 月至 2016 年 11 月在广东省东莞市常平医院住院的肝病患者 96 例, 其中急性肝炎、肝硬化和肝癌患者分别为 32 例, 排除精神异常、其他脂肪肝、酒精肝等肝脏的疾病和代谢异常的患者。另外选择本院健康体检者 32 例为对照组。急性肝炎组中男患者 15 例, 女患者 17 例, 年龄为 21~68 岁, 平均(46.8±2.1)岁。肝硬化组中男患者 17 例, 女患者 15 例, 年龄 22~67 岁, 平均(44.7±3.4)岁。肝癌组中男患者 16 例, 女患者 16 例, 年龄 23~66 岁, 平均(45.3±1.9)岁。对照组中男患者 16 例, 女患者 16 例, 年龄为 24~69 岁, 平均(45.2±2.7)岁。急性肝炎组、肝硬化组、肝癌组和对照组一般资料之间比较, 差异没有统计学的意义($P > 0.05$)。

1.2 方法 采集急性肝炎组、肝硬化组和肝癌组中患者与对照组健康体检者的空腹静脉血 5 mL, 收集的静脉血置于抗凝

的采样管中, 3 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 分离血清后待测。应用循环酶法检测 TBA 水平, 以速率法检测丙氨酸氨基转移酶(ALT)、碱性磷酸酶(ALP)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)和 γ -谷氨酰基转移酶(GGT)的水平, TBA、ALT、ALP、AST 和 GGT 分别与相应检测方法中的试剂反应后用罗氏 P800 全自动化分析仪测定各指标, TBA 检测试剂由上海执诚生物科技有限公司提供, ALT、ALP、AST、GGT 检测试剂使用罗氏原装试剂, 各项目检测前均进行室内质量控制。对测定结果进行分析与比较。

1.3 评价指标 肝病评价指标选择血清 TBA 和传统肝功能酶学指标^[4], 传统肝功能酶学指标包括 ALT、ALP、AST 和 GGT。TBA 的正常值范围为 0~10 μ mol/L, ALT 的正常值范围为 5~40 U/L, ALP 的正常值范围为 40~150 U/L, AST 的正常值范围为 8~40 U/L, GGT 的正常值范围为 7~50 U/L。

1.4 统计学处理 应用统计学的软件 SPSS18.0 对结果进行统计学分析, 计量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间的比较采用 t 检验; 计数资料用百分率(%)表示, 组间比较采取 χ^2 校验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组 TBA 和传统酶学指标检测结果 检测急性肝炎组、肝硬化组、肝癌组和对照组的 TBA、ALT、ALP、AST 和 GGT, 结果可见, 急性肝炎组、肝硬化组和肝癌组各指标水平均明显高于对照组, 差异有统计学的意义($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 各组的 TBA、ALT、ALP、AST 和 GGT 检测结果($\bar{x} \pm s$)

组别	TBA(μ mol/L)	ALT(U/L)	ALP(U/L)	AST(U/L)	GGT(U/L)
急性肝炎组	124.6±24.8	205.38±39.27	95.25±26.18	194.36±38.54	65.43±12.36
肝硬化组	85.9±19.3	55.16±13.09	154.12±34.28	48.15±3.87	97.54±15.63
肝癌组	38.5±15.2	50.23±11.43	428.56±57.13	163.21±31.15	287.45±45.67
对照组	5.2±1.3*	19.42±5.91*	79.42±15.27*	13.28±5.73*	21.07±11.23*

注:与急性肝炎组、肝硬化组和肝癌组比较, * $P < 0.05$