

· 论 著 ·

TRFIA 全血降钙素原检测试剂盒的性能评价^{*}

白 晶,王治海,杨大伟,刘向祎[△]

(首都医科大学附属北京同仁医院检验科,北京 100730)

摘要:目的 评价时间分辨免疫荧光法(TRFIA)全血降钙素原(PCT)检测试剂盒的分析性能。方法 采用 AQT90 FLEX 免疫分析仪,以 TRFIA 检测全血 PCT,评价该方法精密度、检测下限、功能敏感度、线性范围、干扰试验、携带污染率、方法比对和参考区间等性能指标;将其与罗氏 cobas 6000 电化学发光分析仪 PCT 检测试剂盒进行比较。结果 TRFIA 批内变异系数(CV)小于 5.5%,批间 CV 小于 6.0%,检测下限为 0.03 ng/mL,功能敏感度为 0.11 ng/mL,线性范围 0.072~100.000 ng/mL,干扰物对 PCT 检测无明显影响(干扰小于或等于±10%),携带污染小于 0.25 ng/mL,参考区间为 0.081~0.120 ng/mL。其与罗氏 cobas 6000 电化学发光分析仪 PCT 检测试剂盒有良好的相关性($R^2=0.995\ 3$)。结论 采用 TRFIA 的 AQT90 FLEX 免疫分析仪 PCT 检测试剂盒敏感度高,精密度好,线性范围宽,与罗氏 cobas 6000 电化学发光分析仪 PCT 检测试剂盒有良好的相关性,快速便捷,能更好地适用临床即时检验。

关键词:降钙素原; 时间分辨免疫荧光法; 评价

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2017.22.013 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2017)22-3313-03

Performance evaluation of whole blood procalcitonin detection reagent kit by time-resolved fluoroimmunoassay^{*}

BAI Jing, WANG Zhihai, Yang Dawei, LIU Xiangyi[△]

(Department of Clinical Laboratory, Beijing Tongren Hospital, Beijing 100730, China)

Abstract: Objective To evaluate the performance of time-resolved fluoroimmunoassay reagent kit for detecting whole blood procalcitonin(PCT). **Methods** The AQT90 FLEX immune analyzer was adopted. Whole blood PCT was detected by TRFIA. The performance indicators of precision, lower detection limit, function sensitivity, linear range, interference test, carryover rate, method comparison and reference interval were evaluated; then this kit was compared with the PCT detection reagent kit by the Roche Cobas 6000 electrochemical luminescence analyzer. **Results** In TRFIA for detecting whole blood PCT, the intra-batch CV was less than 5.5%, and inter-batch CV was less than 6%. The lower detection limit was 0.03 ng/mL. The function sensitivity was 0.11 ng/mL, the linearity range was 0.072—100.000 ng/mL, the interferent had no obvious influence on PCT detection($\leq \pm 10\%$), the carryover rate was less than 0.25 ng/mL, the reference interval was 0.081—0.120 ng/mL, which had good correlation with the PCT detection reagent kit by the Roche cobas 6000 electrochemical luminescence analyzer($R^2=0.995\ 3$). **Conclusion** Adopting the PCT detection reagent kit by AQT90 FLEX immune analyzer has high sensitivity, good precision, wide linearity range, and has good correlation with the PCT detection reagent kit of the ROCHE cobas 6000 electrochemical luminescence analyzer, using this kit is simple and rapid, can be better suitable for clinical point-of-care test(POCT).

Key words: procalcitonin; time-resolved fluoroimmuno assay; evaluation

降钙素原(PCT)是降钙素的前肽物质,其为 116 个无激素活性氨基酸构成的糖蛋白,半衰期为 25~30 h^[1-2]。健康人血浆中 PCT 水平极低(小于 0.1 ng/mL),但在内毒素刺激下 2 h 内就可升高^[3-5]。PCT 作为新的炎性标志物,因其特异度高、敏感度高,易于检测,已广泛用于肺部、中枢神经等多种细菌感染性疾病的诊断、鉴别及病情严重程度的判断和预后评估,并可指导临床上的抗菌药物应用^[6-7]。目前,临床上常用的 PCT 检测方法主要包括乳胶增强免疫比浊法、酶联免疫吸附试验(ELISA)、胶体金法、电化学发光法等。胶体金免疫层析法只能定性或半定量地检测 PCT 水平,且敏感度低、干扰因素多、重复性差。乳胶增强免疫比浊法、ELISA 和电化学发光法则需要使用大型仪器设备,检测时间相对较长,费用较高,不适用于基层医疗机构和特殊环境下的快速检测。AQT90 FLEX 免疫分析仪 PCT 检测试剂盒采用时间分辨免疫荧光法(TRFIA)检测全血 PCT 水平,可用于床旁或实验室体外对人全血 PCT 水

平的定量检测,操作便捷,易于定量,能更好地适用于临床即时检验(POCT)。本研究对其主要分析性能进行验证或评价。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2015 年 9—10 月本院门急诊及住院患者 116 例,采集肝素锂全血和血浆标本各 1 例。其中,男 86 例,女 30 例;患者年龄 28~88 岁,中位年龄 51 岁。另选取同时期本院健康成年受试者,采集 252 例血浆和全血标本各 1 例。其中,男 124 例,女 128 例;患者 18~77 岁,中位年龄 49 岁。本试验采用人血浆和全血标本,全血标本贮存于室温 18~25℃,3 h 内完成检测。血浆标本在采集样品后立即分离血浆,冷藏于 2~8℃,24 h 内完成检测。样品运输要求低温冷藏。受试者均签署知情同意书,本研究经医院伦理委员会批准。

1.2 仪器与试剂 AQT90 FLEX 免疫分析仪购于雷度米特

^{*} 基金项目:首都临床特色资助项目(z141107006614007)。

作者简介:白晶,女,主治医师,主要从事临床生物化学及免疫方面的研究。 [△] 通信作者,E-mail:13693328516@163.com。

医疗设备(上海)有限公司,序列号为 393-838R0284N0010,采用其 PCT 检测试剂盒(批号 10935)及配套定标液、质控品。罗氏 cobas 6000 电化学发光分析仪购于德国罗氏诊断有限公司,序列号为 15A9-01,采用其 PCT 检测试剂盒(批号 184306-01)及配套定标液、质控品。严格按照 2 种检测方法的操作手册进行相关操作,并准确记录试验结果。采用 PCT(重组人)抗原(产品编号 61-4,GenWay Biotech,Inc,GWB-81D61A),血红蛋白(Sigma-Aldrich,产品编号 H7379),纤维蛋白原(Sigma-Aldrich,产品编号 F4883),清蛋白(Sigma-Aldrich,产品编号 A9511)。

1.3 方法

1.3.1 方法学原理 将特定试剂包被于检测杯中,生物素化的单克隆抗 PCT 抗体预先固化到聚丙烯的反应杯里。在捕获抗体表面分别加上分隔层和追踪抗体铈螯合物(分隔层预防储存期间捕获抗体接触追踪抗体)。反应前,使用分析液将标本按照 1:50 的比例稀释。分析过程中,稀释标本 180 μL 和分析液自动进入含特定试剂的试杯中。经孵育 15 min,追踪和捕获抗体把标本中的 PCT 夹在中间,形成三明治样结构。孵育结束后,分析液冲洗试杯并烘干,通过加热板加温到一定温度,利用风机吹出固定气体,干燥约 50 s。使用 TRFIA 方法,直接从检测杯的干燥表面检测用铈标记的追踪抗体信号。PCT 水平与铈的实测值呈正比。

1.3.2 性能评价 (1)精密度的选取 5 个水平(0.32、0.51、1.90、7.50、55.00 ng/mL)全血标本,每个水平重复检测 5 次为 1 个批次,共检测 5 个批次。每个批次之间的时间间隔为 40 min。连续测 20 d,每个水平的检测在 3 h 内完成(PCT 在全血中稳定存在 3 h)。计算批内和批间变异系数(CV)和偏倚情况。(2)检测下限:每天测 4 个批次的分析缓冲液,每个样品重复 5 次,连续测 3 d,得出 60 次测量结果的相对发光值(RLU 值),计算其 $\bar{x}$ 和 s ,根据 A 点的 $\bar{x}+2s$ 的 RLU 值和 B 点相邻校准品水平的 RLU 值结果,进行两点回归拟合并得出方程,将 $\bar{x}+2s$ 的 RLU 值带入上述方程中,求出对应的水平值,该水平即为检测下限。(3)功能敏感度:选取水平范围为 0.05~0.30 ng/mL 的 15 例标本用于数据分析,连续进行 10 d,每个标本重复测量 40 次。日间重复 CV 为 20%时,将对应检测样品具有的平均水平定为功能敏感度。样品的水平范围(0.05~0.30 ng/mL)假定为检验下限的 1~10 倍(参考试剂说明书),所有标本检测均在 3 h 内完成。(4)线性范围:选择低水平(0.12 ng/mL)和高水平(100.00 ng/mL)全血标本(参考试剂说明书),按高、低水平水平标本,按 10:0.9:1、8:2、7:3、6:4、5:5、4:6、3:7、2:8、1:9、0:10 的比例,配制成具有梯度水平的全血标本。每个全血标本在检测系统上重复检测 3 次,记录结果。将实测值与预期值比较,以相对偏差小于 10%作为标准,并得出线性范围。(5)干扰试验:参考试剂说明

书,在全血 PCT 高水平(接近医学决定点 2.00 ng/mL)和低水平(接近临界值下限 0.50 ng/mL)中加入不同水平干扰物质(纤维蛋白原 10.00 g/L、血红蛋白 2.00 g/L、清蛋白 60.00 g/L),并检测干扰(以干扰小于±10%为验收标准)。(6)携带污染:用全血进行 10 次携带污染试验运行,测量 1 例高水平样品(约1 600 ng/mL)和 10 例低水平样品(未加入 PCT 抗原),参考试剂说明书最大残留量小于 PCT 临界值下限(0.50 ng/mL)的 50%(0.25 ng/mL)。(7)参考区间:PCT 水平在人群中呈偏态分布,故参考区间采用 95%百分位数法表示,检测全血平均水平的第 95 百分位数。(8)方法比对:采用临床常规使用的罗氏 cobas 6000 电化学发光分析仪 PCT 检测试剂盒作为对照试剂,将其和 AQT90 FLEX 免疫分析仪 PCT 试剂盒分别检测 116 例血浆标本,并用 AQT90 FLEX 免疫分析仪 PCT 试剂盒检测 116 例全血标本。PCT 水平为 0.072~0.500 ng/mL 和 0.500~100.000 ng/mL,标本比例应不低于 30%。对 AQT90 FLEX 免疫分析仪 PCT 试剂盒和对照试剂检测的 2 组数据结果进行相关性统计评价。

1.4 统计学处理 采用 SPSS20.0 统计学软件进行数据处理。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验。计数资料以例数或率表示,组间比较采用 χ^2 检验。线性及比对数据进行相关系数及线性回归分析。以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 精密度 将 1 个批次、5 个水平的全血 PCT 标本复检测 5 次。间隔 40 min 循环检测 5 次,批内 CV 小于 5.5%,批间 CV 小于 6.0%。见表 1。

2.2 检测下限 全血 PCT 最低检出限为 0.03 ng/mL。

2.3 功能敏感度 功能敏感度(线性范围的下限)为 0.12 ng/mL。

2.4 线性 通过试验,得到回归方程为 $Y=0.05X+0.4776$ ($R^2=0.9996, P<0.05$)。表明检测在 0.072~100.000 ng/mL 内呈线性。

2.5 干扰试验 潜在干扰物(达到表中所列水平时)对 PCT 检测无明显影响(干扰小于或等于±10%)。见表 2。

表 1 全血中 PCT 的精密度的结果

平均水平 (ng/mL)	批内		批间	
	s (ng/mL)	CV(%)	s (ng/mL)	CV(%)
0.32	0.019	5.2	0.019	5.8
0.51	0.020	3.9	0.020	4.0
1.90	0.070	3.4	0.070	3.6
7.50	0.140	1.9	0.140	1.9
55.00	1.300	2.4	1.300	2.4

表 2 内源物质干扰

干扰物	试验水平(g/L)	低水平 PCT			高水平 PCT		
		受试品 CV(%)	对照品 CV(%)	干扰(%)	受试品 CV(%)	对照品 CV(%)	干扰(%)
纤维蛋白原	10.00	4.3	4.7	—5	2.4	2.5	—10
血红蛋白	2.00	4.8	3.3	4	3.3	1.5	2
人血清蛋白	60.00	6.0	3.7	10	3.5	1.8	4

注:干扰验收标准为±10%

2.6 携带污染 根据检测,10 次高 PCT 值标本(约 1 600 ng/mL)到相邻阴性标本的最大携带污染水平为 0.21 ng/mL,小于 0.25 ng/mL(PCT 临界值下限的 50%),因此不会导致假阳性结果。

2.7 参考区间 参考区间为 0.081~0.120 ng/mL。男性与女性的结果差异无统计学意义($P<0.05$),95%置信区间(CI)相近且重叠。2 个年龄组的结果彼此接近,所有 95%CI 均重叠。检测 PCT 第 95 百分位水平为 0.094 ng/mL 且与性别、年龄无关。见表 3。

表 3 各人群的 PCT 第 95 百分位水平、95%CI			
项目	n	第 95 百分位(ng/mL)	95%CI
受试者	252	0.094	0.081~0.120
女性	128	0.094	0.075~0.140
男性	124	0.100	0.082~0.170
<50 岁	127	0.094	0.077~0.190
≥50 岁	125	0.097	0.081~0.120

2.8 与临床常规方法的比对 TRFIA 检测全血 PCT 试剂盒与罗氏 cobas 6000 电化学发光分析仪 PCT 检测试剂盒有良好的相关性($R^2=0.995\ 3$),线性回归方程为 $Y=0.886\ 3X+0.330\ 1$ 。

3 讨 论

PCT 是区别脓毒血症患者和非感染原因导致全身炎症反应患者的重要生物标志物^[8-9],需要相对简便、快速、重复性好的定量检测方法进行检测。TRFIA 是近年来新发展起来的超微量标记分析技术,该技术具有敏感度高、操作简便、易自动化、不受样品自然荧光干扰、无放射性等特点,是目前最灵敏的微量分析技术之一^[10-12]。TRFIA 的敏感度和准确性方面明显高于 ELISA,且特异度明显高于 PCR,敏感度达到甚至超过放射免疫分析的水平。AQT90 FLEX 免疫分析仪采用 TRFIA 检测全血 PCT 水平,其设备便携,占用空间小,可在患者床旁简便操作,结果可靠,无需进行样品前处理,全程无污染,检测周期更短,可为临床提供快速、及时的检测服务。

为充分了解 AQT90 FLEX 免疫分析仪检测全血 PCT 水平的性能,本研究参照文献[4]对其进行了相对系统和全面的评价。本研究精密度结果表明,其批内 CV 小于 5.5%,批间 CV 小于 6.0%,表明 TRFIA 的 CV 优于 ELISA(CV 为 7%~10%),这与文献[13]报道的结果一致。TRFIA 的检测下限为 0.03 ng/mL,功能敏感度为 0.11 ng/mL,符合临床验收的标准(检测下限 0.05 ng/mL,功能敏感度 0.12 ng/mL),具有良好的分析敏感度。干扰物质纤维蛋白原 10.00 g/L、血红蛋白 2.00 g/L、清蛋白 60.00 g/L 对其干扰小于或等于±10%表明其已达到常规方法抗干扰能力。TRFIA 携带污染小于 0.25 ng/mL,表明其能较少地出现假阳性结果,提高了全血检测的特异度。TRFIA 检测的线性范围为 0.072~100.000 ng/mL($R^2=0.999\ 6$),参考区间为 0.081~0.120 ng/mL,线性范围较宽,且没有性别和年龄的影响,能极大地满足临床检测需求。AQT90 FLEX 免疫分析仪 PCT 试剂盒与罗氏 cobas 6000 电化学发光分析仪 PCT 检测试剂盒有良好的相关性($R^2=0.995\ 3$)。TRFIA 检测全血 PCT 水平时,患者只需抽取少量血液,标本无需进行离心分离等前处理,检测时间缩短至 15 min,且随时可对病情变化进行监测。

综上所述,AQT90 FLEX 免疫分析仪采用 TRFIA 检测全血 PCT,无污染,操作简便,全血标本不需任何前处理,检测用量少,检测时间短,是敏感度高、重复性好、特异度高、便捷、快速的 PCT 测量方法。其适用于临床急诊的快速检测,并可极大地降低检测成本,有效提高感染性疾病诊断的准确率,对临床医师诊断及用药治疗有重要临床应用价值。但本研究仍存在不足:某些非特异性干扰对高水平标本稀释后的标本检测结果有一定的影响,此后需进一步优化完善运行条件,稳定缓冲系统。

参考文献

[1] 谢文锋,严海燕,黄松音,等.降钙素原在感染性疾病中的临床应用价值[J].国际检验医学杂志,2011,32(13):1427-1428.

[2] 李丰尧.PCT 检测在感染性疾病中的临床诊断价值[J].中国实用医药,2013,8(10):136-137.

[3] Chen J,Wang Y,Shen Z,et al. Early diagnostic value of plasma PCT and BG assay for CRBSI after OLT[J]. Transplant Proc,2011,43(5):1777-1779.

[4] Qi YZ. Prognostic values of serum procalcitonin level and pediatric critical illness score in children with sepsis[J]. Chin J Contemp Pediatr,2014,16(2):190-193.

[5] 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):944-951.

[6] Yan L,Liao P,Xu LL,et al. Usefulness of procalcitonin in elderly patients with bacterial infection[J]. Clin Lab, 2014,60(1):139-142.

[7] 姚圣,刘灿辉,董国华,等.降钙素原值与体外循环术后炎症反应严重程度的相关性研究[J].医学研究生学报, 2012,25(8):801-804.

[8] Jain S,Sinha S,Sharma SK,et al. Procalcitonin as a prognostic marker for sepsis;a prospective observational study[J]. BMC Res Notes,2014,7(7):458-460.

[9] Meisner M. Update on procalcitonin measurements[J]. Ann Lab Med,2014,34(4):263-273.

[10] Cai YY,Ee J,Liew YX,et al. A procalcitonin-based guideline promotes shorter duration of antibiotic use safely in acute pancreatitis[J]. J Infect,2014,69(4):412-415.

[11] 戴婉茹,周欢,林燕辉,等.免疫投射比浊法在 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.

[12] Lee J,Kim M,Chae H,et al. Evaluation of enzymatic BM test HbA1c on the JCA-BM6010/C and comparison with Bio-Rad Variant II Turbo,Tosoh HLC 723 G8,and auto lab immunoturbidimetry assay[J]. Clin Chem Lab Med, 2013,51(11):2201-2208.

[13] 鲁燕飞,姚尧.人降钙素原定量检测方法学评价[J].现代检验医学杂志,2015,30(5):129-131.