

· 论 著 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2021.20.005

微流控技术在急诊降钙素原检测中的应用*

金 宁,朱 驰,马 俊[△]

同济大学附属东方医院检验科,上海 200120

摘要:目的 分析一种微流控免疫荧光法与罗氏电化学发光法定量测定降钙素原(PCT)的结果一致性。方法 以罗氏电化学发光法为对照方法,微流控技术为实验方法,分别检测来自 140 例患者的血液标本,对照方法检测标本类型为血浆,实验方法检测标本类型为血浆、同源全血、同源血清和同源末梢血,对检测结果进行相关性和一致性分析。以罗氏电化学发光法检测结果为金标准,不同 PCT 质量浓度作为医学决定水平,分析微流控技术检测的灵敏度和特异度。结果 对照方法检测血浆和实验方法检测血浆、同源全血、同源血清和同源末梢血的线性相关系数 r^2 分别为 0.982、0.988、0.983、0.975,平均偏倚分别为 -0.29、-0.21、-0.14、-0.11 ng/mL;实验方法检测血浆和同源全血、同源血清、同源末梢血的 r^2 分别为 0.995、0.992、0.983,平均偏倚分别为 0.32、0、0.23 ng/mL;以 0.5 ng/mL 的 PCT 为决定水平时,实验方法检测血浆、同源全血、同源血清、同源末梢血的灵敏度分别为 97%、91%、98%、83%,特异度分别为 95%、95%、100%、100%,一致性分析 Kappa 值分别为 0.914、0.868、0.970、0.885;以 2.0 ng/mL 的 PCT 为决定水平时,实验方法检测血浆、同源全血、同源血清、同源末梢血的灵敏度分别为 100%、100%、98%、100%,特异度分别为 91%、89%、100%、88%,一致性分析 Kappa 值分别为 0.940、0.905、0.939、0.906。结论 微流控技术与罗氏电化学发光法检测结果具有良好的一致性,可为临床提供更加快速、准确、标本类型更为多样化的 PCT 即时检测方法,缩短急诊检验的报告时间。

关键词:微流控技术; 降钙素原; 急诊检验; 免疫荧光法; 即时检测

中图法分类号:R446.1

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2021)20-2946-04

Application of microfluidic technique in detection of procalcitonin in emergency*

JIN Ning, ZHU Chi, MA Jun[△]

Department of Clinical Laboratory, East Hospital Affiliated to Tongji

University, Shanghai 200120, China

Abstract: Objective To analyze the consistency between a microfluidic immunofluorescence method and Roche electrochemical luminescence method for the quantitative determination of procalcitonin (PCT). **Methods** Blood samples from 140 patients were tested by Roche electrochemical luminescence method (control method) and microfluidic technique (experimental method) respectively. Plasma was detected with the control method, and plasma, homologous whole blood, homologous serum and homologous peripheral blood were detected with the experimental method. The correlation and consistency of the test results were analyzed. In addition, the sensitivity and specificity of microfluidic detection were analyzed with Roche electrochemical luminescence method test results as the gold standard and PCT of different mass concentrations as the medically determined level. **Results** The r^2 of control method in detection plasma and experimental method in detection homologous whole blood, homologous serum and homologous peripheral blood were 0.982, 0.988, 0.983 and 0.975 respectively, and the mean bias was -0.29, -0.21, -0.14 and -0.11 ng/mL respectively. The r^2 of experimental method in detection plasma and homologous whole blood, homologous serum, and homologous peripheral blood were 0.995, 0.992 and 0.983 respectively, and the mean bias was 0.32, 0 and 0.23 ng/mL respectively. When 0.5 ng/mL PCT was used as the determination level, the sensitivity of plasma, homologous whole blood, homologous serum and homologous peripheral blood was 97%, 91%, 98% and 83% respectively, the specificity was 95%, 95%, 100% and 100%, respectively, and the consistency analysis Kappa value was 0.914, 0.868, 0.970 and 0.885 respectively. When 2.0 ng/mL PCT was used as the determine the level, the sensitivity of plasma, homologous whole blood, homologous serum and homologous peripheral blood was 100%, 100%, 98% and 100% respectively, the specificity was 91%, 89%, 100% and 88% respectively, the

* 基金项目:上海市公共卫生体系建设三年行动计划(2020-2022年)(GWV-10.1-XK04)。

作者简介:金宁,女,主管技师,主要从事临床血液学检验研究。△ 通信作者, E-mail: sl1840816@hotmail.com。

本文引用格式:金宁,朱驰,马俊.微流控技术在急诊降钙素原检测中的应用[J].检验医学与临床,2021,18(20):2946-2949.

Kappa value of consistency analysis was 0.940, 0.905, 0.939 and 0.906 respectively. **Conclusion** Microfluidic technique has good consistency with Roche electrochemical luminescence method, which could provide a more rapid, accurate and diversified real-time detection method for clinical practice, greatly reduce the report time of emergency PCT test, and facilitate the early and rapid diagnosis of sepsis.

Key words: microfluidic technique; procalcitonin; emergency test; immunofluorescence assay; point of care testing

降钙素原(PCT)是诊断细菌感染的理想生物标志物^[1],不仅可用于感染性和非感染性疾病的鉴别,而且在感染性疾病的早期诊断、病情评估和合理用药方面均具有一定的指导意义^[2]。目前对 PCT 定量测定的方法包括放射免疫分析法、免疫荧光法、双抗体夹心免疫化学发光法、酶联免疫吸附测定法(酶免法)等^[3],其中罗氏诊断生产的 PCT 检测试剂盒(电化学发光法)在全自动电化学发光免疫检测仪上实现了 PCT 检测的自动化和快速化,干扰因素少,可满足临床检测需求^[4]。但是,罗氏电化学发光法要求标本必须来源于静脉血,且通常为批量上机检测,报告时间相对较长,不适合用于急诊的即时检测和儿科门急诊的末梢血检测^[5]。因此,一种可利用末梢血检测 PCT 的即时检测技术的应用迫在眉睫。微流控技术是微尺度下的流体控制,其研究对象是微米级通道操控纳升级以下微量液体的系统,而体外诊断是典型的流体操控过程,不仅需要操作便利,而且要求分析结果准确,因此,微流控芯片的应用是体外诊断技术发展和进步的重要途径^[6]。本文将 PCT 的新型微流控检测技术与常规的罗氏电化学发光法比较,验证微流控技术在 PCT 临床检测中的可行性,以期为临床提供一种快速、准确、标本类型多样的 PCT 即时检测方法,从而降低急诊检验的报告时间。

1 材料与方法

1.1 标本来源 标本来源于 2019 年 5 月 7—21 日在本院进行 PCT 检测的门诊和住院部疑似细菌感染、有早期脓毒症症状的患者。

1.2 标本采集 全血和血浆采集:采用乙二胺四乙酸二钾(EDTA-K₂)抗凝采血管采集静脉血,离心分离后取血浆。血清的收集:采血后尽快以 3 000 r/min 离心 10 min,分离血清。末梢血的采集:用一次性采血针穿刺无名指,将血液收集在 0.5 mL EDTA-K₂ 抗凝离心管中。在标本入组时排除重复检测的病例标本,采用以上方法共收集 140 例患者的血浆标本,其中 67 份为与血浆标本来自同一患者的全血标本(同源全血),69 份为与血浆标本来自同一患者的血清标本(同源血清),以及 26 份为与血浆标本来自同一患者的末梢血标本(同源末梢血),合计 302 份标本。全部标本的检测均在采集当天完成。

1.3 方法 实验方法:采用上海速创诊断产品有限公司生产的 PCT 测定试剂盒(免疫荧光法)及配套 MI300 型号干式荧光免疫分析仪。主要反应原理是将 PCT 荧光标记检测抗体、PCT 捕获抗体和非特异性抗体分别固定在微流控检测卡的通道内,待检标本

在通道内流动中分别完成与荧光标记的检测抗体和捕获抗体的反应,反应结束后通过短时离心去除废液,读取检测反应区荧光信号自动拟合标准曲线算法后可得到标本中 PCT 的水平。对照方法:采用罗氏诊断生产的 PCT 检测试剂盒(电化学发光法)及配套 Cobas e411 型电化学发光分析仪。采用双抗体夹心二步法,待检标本与生物素化的单克隆 PCT 抗体以及钌复合物标记的单克隆 PCT 抗体一起孵育,形成抗原抗体夹心复合物;加入包被链霉亲和素的磁珠微粒进行孵育,复合体与磁珠通过生物素和链霉素的作用结合;通过电磁作用将磁珠吸附在电极表面,给电极加一定的电压,使复合体化学发光,并通过光电倍增器测量发光强度,发光强度与 PCT 水平成正比。试验方法与对照方法均严格按照说明书进行操作,实验前各自进行校准和质控,以保证检测结果的可靠性。

1.4 统计学处理 相关性分析:对 2 种方法检测结果及实验方法中不同标本类型的检测结果做相关分析和回归分析, $r \geq 0.975$ 或 $r^2 \geq 0.95$ 则可认为选择的数据范围适合,数据满足要求。偏倚分析:采用 Bland-Altman 方法,以 2 种方法测定结果的均值作为 X 轴、差值为 Y 轴,计算所有差值的平均值(A)及标准差(SD),并根据公式 $A \pm 1.96SD$ 得到覆盖 95%CI 的一致性界限,根据一致性界限统计离群值和离群值比例。相对灵敏度、相对特异度和总体符合率:以对照方法检测结果作为金标准,计算实验方法检测结果在医学决定水平 0.5 ng/mL 和 2.0 ng/mL 的相对灵敏度和相对特异度,并应用 Kappa 一致性检验判定两种检测方法的一致性。以 Kappa 值 ≥ 0.75 表示一致性较好, $0.40 \leq \text{Kappa 值} < 0.75$ 表示一致性一般, Kappa 值 < 0.40 表示一致性较差。

2 结果

2.1 相关性及偏倚分析 对照方法检测血浆和实验方法检测血浆、同源全血、同源血清和同源末梢血结果两两比较,得到的一元回归方程和线性相关系数 r^2 见表 1。通过分析,2 种方法间及实验方法不同标本类型间 $r^2 \geq 0.975$,表明相关性较好。对照方法检测血浆和实验方法检测血浆、同源全血、同源血清、同源末梢血结果的 Bland-Altman 分析显示,对照方法检测血浆与实验方法检测血浆、同源全血、同源血清、同源末梢血结果计算平均偏倚分别为 -0.29 、 -0.21 、 -0.14 、 -0.11 ng/mL,一致性界限为 $-3.30 \sim 2.71$ 、 $-3.33 \sim 2.92$ 、 $-1.07 \sim 0.80$ 、 $-1.37 \sim 1.16$ ng/mL,离群值比例分别为 9/140、5/67、5/69、3/26。

实验方法血浆与同源全血、同源血清、同源末梢血结果计算平均偏倚分别为 0.32、0、0.23 ng/mL；一致性界限为 -1.60~2.23、-0.68~0.68、-1.48~1.94 ng/mL，离群值比例分别为 4/67、4/69、2/26。结果显示，对照方法与实验方法间、实验方法检测不同标本类型间一致性较好，离群点个数占总体标本比例在合理范围内。

表 1 对照方法和实验方法的一元回归方程和线性相关系数

评估对象	一元回归方程	r ²
对照方法血浆 vs. 实验方法血浆结果	Y=1.088X-0.002	0.982
对照方法血浆 vs. 实验方法同源全血结果	Y=1.061X-0.176	0.988
对照方法血浆 vs. 实验方法同源血清结果	Y=1.071X+0.033	0.983
对照方法血浆 vs. 实验方法同源末梢血结果	Y=1.017X+0.060	0.975
实验方法检测血浆 vs. 同源全血结果	Y=0.970X-0.112	0.995
实验方法检测血浆 vs. 同源血清结果	Y=0.961X+0.058	0.992
实验方法检测血浆 vs. 同源末梢血结果	Y=0.853X+0.208	0.983

2.2 一致性统计结果 以 0.5 ng/mL 和 2.0 ng/mL 为医学决定水平进行统计分析，分别计算实验方法相对于对照方法的相对灵敏度和相对特异度，结果见表 2、3。结果显示，实验方法检测血浆、同源全血、同源血清的相对灵敏度和相对特异度均较高，Kappa 值均 >0.75，实验方法和对照方法一致性较好。

表 2 以 0.5 ng/mL 为医学决定水平的相对灵敏度、相对特异度和 Kappa 值

标本类型	n	相对灵敏度(%)	相对特异度(%)	Kappa 值
血浆	140	97	95	0.914
同源全血	67	91	95	0.868
同源血清	69	98	100	0.970
同源末梢血	26	83	100	0.885

表 3 以 2.0 ng/mL 为医学决定水平的相对灵敏度、相对特异度和 Kappa 值

标本类型	n	相对灵敏度(%)	相对特异度(%)	Kappa 值
血浆	140	100	91	0.940
同源全血	67	100	89	0.905
同源血清	69	98	100	0.939
同源末梢血	26	100	88	0.906

3 讨 论

脓毒症是机体对感染的反应失调而导致危及生命的器官功能障碍，其病情进展快、病死率高、后遗症多发，早期诊断并及时治疗可提高患者生存率以及改善预后^[6]。PCT 是临床评估感染严重程度和脓毒症的重要生物标志物，在严重细菌感染或脓毒症时，PCT 比其他炎症因子出现得早，且不受其他非炎症指标干扰^[7]，在临床检测中已广泛应用，且效果较好^[8]。PCT 检测方法较多，常用罗氏电化学发光法对标本

PCT 水平进行分析，这类检测方法具有自动化程度高和检测精密度高的特点，但标本类型要求为静脉血，且处理及检测耗时较长，不能够满足临床快速获取可靠检测结果的需求^[9]。在此背景下，采用末梢血全血进行 PCT 检测备受关注^[10]。与电化学发光法比较，微流控技术具有标本使用方便、标本消耗量少、出报告时间短等特点，适用于儿科和门、急诊等即时检测需求，可帮助临床对感染性疾病进行快速诊断与鉴别诊断，极大地满足临床检测要求。

本研究主要分析新型微流控技术检测不同标本类型中 PCT 水平与罗氏电化学发光法检测是否一致，并评估了微流控技术检测不同标本类型中的 PCT 水平间的相关性和偏倚。罗氏电化学发光法检测标本为血浆，而微流控技术除评估检测血浆标本外，还分别收集了同源全血、同源血清和部分同源末梢血检测。本研究结果表明，微流控技术检测血浆、同源全血、同源血清和同源末梢血结果与罗氏电化学发光法检测结果间的一元直线回归方程相关性好，离群值在合理范围内。以罗氏电化学发光法为金标准，计算微流控方法在 0.5 ng/mL 和 2.0 ng/mL 的医学决定水平的符合率较高，Kappa 一致性评判结果较好。因此，该微流控技术与罗氏电化学发光法一致性较好，符合临床检测需求。

本研究结果发现，微流控技术检测血浆 PCT 与罗氏电化学发光法检测结果具有较高的相关性，即在缩短了检验报告等待时间的同时，也满足了临床高精密度的要求。另外，血浆、全血、血清、末梢血等标本类型在应用于微流控技术检测方法中的一致性较高，大大降低了临床采集标本的要求；针对难以采集静脉血的患者，微流控技术的末梢血模式可减轻该类患者的痛苦，减少报告时间，有利于临床对感染性疾病的快速诊断，从而有效防止脓毒症的发生、发展。PCT 水平在临床治疗方面具有一定的指导作用。目前，国际上已基本确立了 PCT 指导抗菌药物治疗的具体流程^[11]，当 0.5 ng/mL < PCT ≤ 2.0 ng/mL 时，提示为脓毒症、中度全身炎症反应，有高度器官功能紊乱风险；当 2.0 ng/mL < PCT ≤ 10.0 ng/mL 时，提示为严重脓毒症，常伴器官功能障碍，有死亡风险。本研究根据此类医学决定水平的分层，以罗氏电化学发光法为金标准，微流控技术为实验方法，一致性比较发现，不同标本类型的微流控技术检测结果相对灵敏度及特异度均较高，可满足临床要求。

此外，微流控技术的应用有利于实现 PCT 的动态检测，进一步指导临床抗菌药物的应用。脓毒症与脓毒性休克处理国际指南中建议动态监测 PCT 水平，这有助于缩短脓症患者抗菌药物的使用疗程，且对于初始怀疑脓毒症、之后感染证据却不足的患者，PCT 水平可作为终止经验性抗菌药物使用的证据^[12]。由此发现，PCT 作为血清标志物，在指导脓毒症的抗菌药物治疗方面有着重要作用。另外，动态监测血浆 PCT 水平的变化可准确反映感染的存在^[13]，

并使抗菌药物疗程明显缩短,有利于改善病情和预后,避免抗菌药物滥用,减少抗菌药物耐药及相关不良反应发生。动态监测 PCT 水平可通过评估病情,减少住院时间,降低医疗费用,从而减轻患者的经济负担。因此,微流控技术的末梢血检测技术减少了患者静脉采血频次,减轻了患者动态监测 PCT 水平时的采血痛苦,为临床动态监测 PCT 水平提供了可操作性及便捷性。

综上所述,微流控技术不仅在早期快速诊断脓毒症血症方面具有明显的效益,在临床应用抗菌药物治疗方面的动态监测上也具有更高的可操作性及便捷性。总的来说,微流控技术是一种快速、准确、标本类型多样化的即时检测方法,可大大降低 PCT 急诊检验的报告时间,减少患者静脉采血的痛苦。然而,本研究也有一定的局限性,在分析微流控技术的灵敏度和特异度时,是以罗氏电化学发光法为金标准,未以患者是否为血流感染为金标准,具有一定的局限性;另外,本次标本量偏少,亟需扩大标本量的前瞻性研究进行验证。

参考文献

[1] 陆一鸣. 降钙素原 PCT 感染诊治新技术[J]. 国际检验医学杂志, 2013, 34(20): 2641-2642.
 [2] 苏维. 降钙素原在感染性疾病中应用的研究进展[J]. 中国当代医药, 2019, 26(21): 27-29.
 [3] 朱美英, 曹鄂洪. 降钙素原的检测和应用:《感染相关生物标志物临床意义解读专家共识》解读[J]. 上海医药, 2018, 39(1): 14-18.
 [4] 范华杰, 张鹏, 唐古生, 等. Roche 降钙素原电化学发光法

定量检测试剂盒的临床性能评价[J]. 检验医学, 2010, 25(8): 654-658.

[5] 杨丹, 叶志成, 徐锦. 两种检测降钙素原方法的比较研究[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(5): 588-594.
 [6] 杨润, 王洁敏, 皋源. 微流控技术在脓毒症诊治中的应用进展[J]. 中华危重病急救医学, 2019, 31(6): 789-792.
 [7] DE FONSEKA D, MASKELL N A. The role of procalcitonin in the management of pleural infection[J]. Curr Opin Pulm Med, 2018, 24(4): 380-383.
 [8] 邢宝宝. 重症细菌感染性疾病早期诊断中血清降钙素原与 C-反应蛋白以及血常规联合检测的应用研究[J]. 中国实用医药, 2019, 14(3): 52-54.
 [9] 张晓洁, 张美娟. 两种方法检测末梢血和血清降钙素原的相关性研究[J]. 江苏医药, 2016, 11(42): 2369-2370.
 [10] 张知洪, 曹东林, 李丽娟, 等. 末梢血降钙素原检测的临床价值分析[J]. 国际检验医学杂志, 2017, 38(8): 2267-2268.
 [11] SCHUETZ P, ALBRICH W, MUELLER B. Procalcitonin for diagnosis of infection and guide to antibiotic decisions: past, present and future[J]. BMC Med, 2011, 9: 107.
 [12] RHODES A, EVANS L E, ALHAZZANI W, et al. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of sepsis and septic shock; 2016 [J]. Intensive Care Med, 2017, 43(3): 304-377.
 [13] 慕婉晴, 周燕南, 胡延妍, 等. 降钙素原(PCT)在脓毒症临床诊断治疗中作用的研究进展[J]. 复旦学报(医学版), 2019, 46(1): 103-107.

(收稿日期: 2021-01-03 修回日期: 2021-07-11)

(上接第 2945 页)

组分的关系研究[J]. 中国实验诊断学, 2018, 22(3): 422-425.
 [8] OMUSE G, ICHIHARA K, MAINA D, et al. Determination of reference intervals for common chemistry and immunoassay tests for Kenyan adults based on an internationally harmonized protocol and up-to-date statistical methods[J]. PLoS One, 2020, 15(7): e0235234.
 [9] 霍雯, 杨岚, 刘宇, 等. 血清总胆红素、直接胆红素、间接胆红素生物参考区间的建立[J]. 国际检验医学杂志, 2017, 38(3): 391-392.
 [10] RAI P S, SHETTY S, BHANDARY R, et al. Reference interval of serum bilirubin panel in healthy individuals of attending tertiary care hospital: a cross sectional study [J]. Int J Clin Biochem Res, 2017, 4(1): 73-76.
 [11] 詹晓华, 宋永顺, 阿依古丽, 等. 健康成人血清总胆红素和直接胆红素参考区间的建立[J]. 国际检验医学杂志, 2017, 38(2): 265-266.
 [12] YANG S, QIAO R, LI Z R, et al. Establishment of reference intervals of 24 chemistries in apparently healthy ad-

ult Han population of Northern China [J]. Clin Biochem, 2012, 45(15): 1213-1218.

[13] 王黎, 杨成新, 李清华, 等. 乌鲁木齐市汉族和维吾尔族健康人群胆红素水平调查[J]. 检验医学与临床, 2020, 17(6): 744-747.
 [14] 李天渝, 葛森, 李小平, 等. 男性血清胆红素参考值与地理因素的岭回归分析[J]. 暨南大学学报(自然科学与医学版), 2018, 39(4): 324-331.
 [15] LO SASSO B, VIDALI M, SCAZZONE C, et al. Reference interval by the indirect approach of serum thyrotropin (TSH) in a Mediterranean adult population and the association with age and gender[J]. Clin Chem Lab Med, 2019, 57(10): 1587-1594.
 [16] 朱学彤, 王凯瑾, 周琪, 等. 基于实验室信息系统建立甲状腺激素参考区间[J]. 中华内科杂志, 2020, 59(2): 129-133.
 [17] 沈隽霏, 宋斌斌, 潘柏申. 间接法建立生物参考区间[J]. 检验医学, 2015, 30(4): 391-396.

(收稿日期: 2021-01-26 修回日期: 2021-06-29)