第 40 卷 第 4 期
2025 年 8 月

天津科技大学学报
Journal of Tianjin University of Science and Technology

Vol. 40 No. 4
Aug. 2025

DOI:10.13364/j.issn.1672-6510.20230236
网络首发日期：2024–11–08；网络首发地址：http://link.cnki.net/urlid/12.1355.n.20241108.0927.002

基于全自动生化分析仪检测(1,3)–β–D–葡聚糖的性能评估

武雅媚[1]，张 玉[1]，翟栓柱[1,3]，钱芃橙[3]，刘春龙[3]，钟 成[1,2]
（1. 天津科技大学生物工程学院，天津 300457；2. 工业发酵微生物教育部重点实验室，天津 300457；
3. 天津市侵袭性真菌病精准诊断技术企业重点实验室，天津 300467）

摘 要：血清(1,3)–β–D–葡聚糖检测是诊断侵袭性真菌感染(IFI)的重要指标。本研究开发了一款全自动生化分析仪和相应试剂，基于(1,3)–β–D–葡聚糖引发试剂中的酶促级联反应，产生游离的对硝基苯胺(pNA)引起吸光度变化，通过动态监测溶液中 pNA 吸光度变化率对(1,3)–β–D–葡聚糖浓度进行定量。该仪器体型较小，易于携带和操作，无须人工操作即可完成现场即时检测(POCT)，可以简化样本添加、混合和结果处理过程，提高(1,3)–β–D–葡聚糖的检测灵敏度和准确性。通过对 165 名男性和 135 名女性患者的血清或血浆样本进行测试，发现该方法具有良好的线性范围(31.25 ~ 1 000 pg/mL)、低空白限(14.17 pg/mL)和检出限(25.78 pg/mL)，准确度和精密度测试结果符合预期要求，干扰实验结果证明方法的稳定性和可靠性。该分析仪和试剂组合具备高效、准确、快速的检测能力，对于侵袭性真菌感染的早期快速诊断具有重要意义。

关键词：(1,3)–β–D–葡聚糖；即时检验；全自动生化分析仪；侵袭性真菌感染；早期快速诊断
中图分类号：R446.11 **文献标志码**：A **文章编号**：1672-6510(2025)04-0051-08

Performance Evaluation of a (1,3)-β-D-Glucan Detection Method Using an Automatic Biochemical Analyser

WU Yamei[1], ZHANG Yu[1], ZHAI Shuanzhu[1,3], QIAN Pengcheng[3], LIU Chunlong[3], ZHONG Cheng[1,2]
(1. College of Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China;
2. Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology, Ministry of Education, Tianjin 300457, China;
3. Enterprise Key Laboratory of Precision Diagnosis Technology for Invasive Fungal Diseases, Tianjin 300467, China)

Abstract: Serum (1,3)-β-D-glucan assay is an important indicator for the diagnosis of invasive fungal infections (IFI). In this study, a fully automated biochemical analyzer and corresponding reagents were developed to quantify the concentration of (1,3)-β-D-glucan by dynamically monitoring the rate of change in the absorbance of p-nitroaniline (pNA) in solution, based on an enzymatic cascade reaction in the reagents triggered by (1,3)-β-D-glucan to produce free p-nitroaniline (pNA) causing absorbance changes. The small size of the instrument makes it easy to carry and operate. It can be used to perform prompt on-site testing (POCT) without the need for manual operation, which can simplify the processes of sample addition, mixing and result processing, while improve the sensitivity and accuracy of the (1,3)-β-D-glucan detection. By testing serum or plasma samples from 165 male and 135 female patients, the method was found to have a wide linear range (31.25-1 000 pg/mL), a low blank limit (14.17 pg/mL) and a detection limit (25.78 pg/mL), and the results of the accuracy and precision tests met the expected requirements, and the results of the interference experiments proved the method's stability and reliability. The analyzer and reagent combination exhibits high efficiency, accuracy, and rapid detection cap-

收稿日期：2023–12–27；**修回日期**：2024–07–18
基金项目：天津市科委基金项目(22ZYQYSY00040)
作者简介：武雅媚(1998—)，女，山西太原人，硕士研究生；**通信作者**：钟 成，教授，czhong@tust.edu.cn

abilities, making it a valuable tool for the early and rapid diagnosis of invasive fungal infections.

Key words: (1, 3)-*β*-*D*-glucan; point of care testing; automatic biochemical analyzer; invasive fungal infections; early and rapid diagnosis

引文格式:

武雅媚, 张玉, 翟栓柱, 等. 基于全自动生化分析仪检测(1, 3)–*β*–*D*–葡聚糖的性能评估[J]. 天津科技大学学报, 2025, 40(4): 51–58.

WU Y M, ZHANG Y, ZHAI S Z, et al. Development and performance evaluation of a(1, 3)-*β*-*D*-glucan detection method using an automatic biochemical analyser[J]. Journal of Tianjin university of science and technology, 2025, 40(4): 51–58.

近些年, 由于广谱抗菌药物、免疫抑制剂和各种抗肿瘤药物的广泛应用以及各种导管的留置和呼吸机的普及, 临床上侵袭性真菌感染(invasive fungal infections, IFI)的患病率明显上升[1–2]。IFI 已经成为导致实体器官和骨髓移植受者、血液病患者、人类免疫缺陷病毒(HIV)患者、免疫功能受损者被真菌感染并危及生命的重要原因之一[3]。目前深部真菌感染仍然以体液或血液标本镜检和培养作为诊断金标准, 但该方法取材繁琐且容易受污染, 培养周期长, 诊断敏感度低。血浆(1, 3)–*β*–*D*–葡聚糖〔(1, 3)-*β*-*D*-glucan, BDG〕试验(G 试验)因其无创、快捷、敏感等特征成为较为流行的真菌感染早期诊断手段[2]。

BDG 是真菌细胞壁的特异性成分, 占其干质量的 80% ~ 90%, 而 BDG 是由 *D*–葡聚糖合成的细胞壁多聚糖, 占真菌细胞壁成分的 50% 以上[3]。BDG 是大多数真菌细胞壁的组成部分, G 试验可用于检测念珠菌、曲霉、毛孢子菌、镰刀菌、耶氏肺孢子菌等引起的 IFI, 但不能检测接合菌(毛霉、根霉、横梗霉)和隐球菌[4-6]。

BDG 的检测基于特异性显色鲎试剂[7-9]。鲎试剂是由海洋节肢动物鲎的血液变形细胞溶解物制成的无菌冷冻干燥品, 含有一种特殊的凝固酶原, 能被微量细菌内毒素和真菌葡聚糖激活, 使鲎试剂能够准确、快速地定性或定量检测样品中是否含有细菌内毒素和 BDG[7]。鲎试剂广泛用于制药、临床以及科研等领域, 具有灵敏度高且操作相对简单的优点, 然而鲎试剂也存在一些缺点。首先, 试剂的梯度配制和移液操作比较繁琐, 容易产生误差并且重复性不佳。其次, 大容量的试剂盒缺乏灵活性, 在样本量较少时, 分装和冻存过程中可能会造成浪费。此外, 根据鲎试剂的特性, 需要使用特制管材和经过特殊表面处理的耗材, 以更好地保护试剂, 降低与试剂的相互作用和污染风险。这样可以提高实验的准确性和可靠性, 更好地满足科研、制药和临床等领域的需求。

即时检验(point-of-care testing, POCT)是指在病床旁或采样现场进行的快速临床检测, 只需简单的操作, 在采样现场即刻进行分析[10–11], 可以减少患者的等待时间, 省去第三方送检的复杂处理程序, 是一种快速得到检验结果的新方法[12]。早期 POCT 多应用于血糖和早期妊娠的检测, 随着检测技术的不断进步, POCT 的应用领域变得更加广泛, 主要包括儿科疾病、心血管疾病、传染病、内分泌疾病、妊娠期检测、食品安全监控、毒品/酒精检测、过敏原检测等各个方面[13]。

本研究通过自主研发的 POCT 型全自动生化分析仪和配套试剂, 对样本中的真菌葡聚糖浓度进行检测。该方法可缩短检测时间, 提高自动化程度, 从而降低污染风险并提高准确度, 以满足临床需求。

1　材料与方法

1.1　研究对象

实验样本来自天津市胸科医院患者, 共 300 例, 男性 165 例, 女性 135 例, 患者年龄范围 20 ~ 80 岁。其中, 冠心病 57 例、肺阴影 43 例、肺阴影待查 38 例、肺癌 47 例、肺纤维化 51 例、肺炎 64 例。采集时间为 2022 年 2 月至 2022 年 5 月。将血清或血浆样品离心分离(3 000*g* 离心 10 min), 4 ℃保存备用。所有样本的信息均进行匿名处理, 且通过伦理委员会审查(批件号为 2018KY–009–01)。

1.2　样本入选与排除标准

1.2.1　入选标准

临床诊断为真菌感染患者的样本、有真菌感染症状或疑似真菌感染患者的样本、无任何真菌感染症状患者或健康人群的样本、容易产生交叉反应的样本。

1.2.2　排除标准

排除保存条件不符合要求的样本、样本量不足的样本、冻融 4 次以上的样本、污染的样本、样本信息缺失的样本, 以及有明显溶血、浑浊和沉淀的样本。

1.3　试剂与仪器

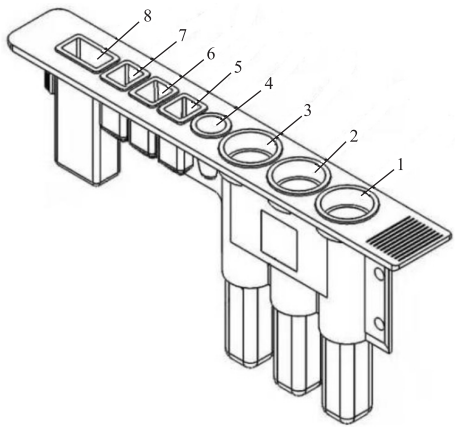
全自动生化分析仪及其配套的试剂盒和检测卡由丹娜(天津)生物科技股份有限公司自制；KOH、KCl、Tris、HCl，西格玛公司；显色基质，上海科肽生物科技有限公司；干扰物质血红蛋白、胆红素、甘油三酯，北京普天同创生物科技有限公司。

GL–21M 型冷冻高速离心机，湖南湘仪离心机仪器有限公司；DE100 型高剪切分散乳化机，南通克莱尔设备有限公司；LY0–0.5 型真空冷冻干燥机，上海东富龙科技股份有限公司；LC200 型滴珠点胶机，厦门武门自动化科技有限公司。

1.4　方法

1.4.1　真菌葡聚糖检测方法

参考丹娜(天津)生物科技股份有限公司已有的检测(1,3)–β–D–葡聚糖的方法[14]，基于鲎试剂光度法原理，制备全自动生化分析仪配套试剂，并将试剂集成于特制的检测试剂卡中，检测卡外观如图 1 所示。检测时只需加入样本，样本中的(1,3)–β–D–葡聚糖引发试剂中的酶促级联反应，最终通过全自动生化分析仪，动态检测溶液吸光度变化率，对真菌葡聚糖浓度进行定量。



注：1—3 为 200 μL 枪头，4 为样本位，5 为样本处理液，6 为主剂复溶液，7 为主剂微芯，8 为检测位。

图 1　检测卡设计

Fig. 1　Design of the detection card

1.4.2　配套试剂的制备

马蹄蟹血细胞裂解液的制备：从马蹄蟹的种属之一东方鲎采血，加抗凝剂后得到鲎全血，1 000 r/min 离心 5 min，弃去蓝色上清液，收集鲎血细胞，–20 ℃保存。此过程制备工艺成熟，由丹娜(天津)生物科技股份有限公司生产部完成。实验时将鲎血细胞原料在室温(18 ~ 28 ℃)自然融化后，使用除热原处理转头的乳化机对原料进行乳化(20 000 r/min，2 min)，使其充分破裂待用。

样本处理液的制备：将 0.05 mol/L KOH 溶液和 0.1 mol/L KCl 溶液等体积混合，即得样本处理液。

主剂是指药物或化学制剂中起主要作用的成分或组分。该试剂中的主剂为鲎血细胞裂解液。

主剂复溶液的制备：取一定量的 Tris 和 HCl 溶液，配制成 Tris 终浓度为 0.15 mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液(pH = 7.0 ± 0.1)，所得溶液为主剂复溶液。

主剂微芯的制备：将制备好的鲎血细胞裂解液、显色基质(Boc-Leu-Gly-Arg-pNA)以及筛选优化后的冻干辅料混合，经滴珠点胶机滴珠后，再经真空冷冻干燥，形成主剂微芯。

1.4.3　真菌葡聚糖检测体系的操作流程

打开全自动生化分析仪预热 30 min，扫描试剂盒上的二维码，导入标准曲线等信息。将待测样本条形码对准扫描窗口扫描，完成样本信息的导入，也可手动导入样本信息。使用移液器/定量滴管移取 40 μL 样本加到试剂卡的样本孔中。点击软件上的“样本检测”，选择“手动填写”或“扫码上样”模式，选择样本类型之后点击“开始检测”启动测试[15]。仪器检测波长 405 nm，30 min 检测完成后，软件自动计算样本中(1,3)–β–D–葡聚糖的含量。

1.4.4　统计学方法

实验数据采用 Origin Pro 9.0 软件绘图并采用 SPSS 11.0 软件进行正态检验。空白限采用非参数分析法，检出限采用 Cochran 检验法进行方差齐性检验，线性范围通过最小二乘法拟合，精密度采用双因素方差分析。

1.5　性能评估

1.5.1　空白限和检出限的测定

空白限(LoB)的测定：参考《临床试验测量程序检测能力评估》(EP17-A2)[16]的方法，5 个空白样本用 3 批试剂盒检测 3 d，每天每个批次试剂的每个样本平行测定 4 次。空白样本每个批次的检测结果从小到大排序，记做 $X_1 \sim X_{60}$，经软件检验呈非正态分布，采用非参数分析法，将 60 次检测结果从小到大排列。空白限(LoB，用符号 $P_{ct_{B100-\alpha}}$ 表示)按照式(1)计算。

$$P_{ct_{B100-\alpha}} = \frac{N_B \times 95}{100} + 0.5 \quad (1)$$

其中：$P_{ct_{B100-\alpha}}$ 为空白样本第 95 百分位数的值；N_B 为检测的总次数，$N_B = 60$；LoB 为第 57.5 位上的结果，即第 57 位和 58 位结果的平均值。

使用该文件数据处理方法取 X_{57} 和 X_{58} 的均值为

该批次的空白限的估算值，最终 3 个批次中数值最大的为空白限报告值。

检出限（LoD）的测定：参考 EP17-A2[16]的方法，5 个低浓度临床样本用 3 批试剂盒检测 3 d，每天每个批次试剂的每个样本平行测定 4 次。经软件检验呈正态分布，且经方差齐性检验差异显著。

检出限（用符号 D_L 表示）通过以下公式进行计算。

$$D_L = P_{ct_{B100-\alpha}} + c_p\sigma_L \tag{2}$$

$$\sigma_L = \sqrt{\left[\sum(n_i-1)\sigma_i^2\right]/\sum(n_i-1)} \tag{3}$$

$$c_p = 1.645/\left[1-1/(4L-4J)\right] \tag{4}$$

其中：c_p 为校正因子，σ_L 为低浓度样本检测的估计标准差，J 为低浓度样本个数，L 为检测结果总数，σ_i 为第 i 个低水平样本的标准差，n_i 为第 i 个低水平样本的检测结果数。

取 3 批中 LoD 的最大值为最终结果。

1.5.2　空白限和检出限的验证

2 份空白限/检出限验证浓度样本用 3 个批次试剂盒分别检测 3 d，每天每份空白样本进行 4 个重复，获得 72 个结果。

分别计算空白限 72 个检测值≤报告值 LoB 和检出限 72 个检测值≥LoD 报告值结果所占的比例，如果计算比例≥90%，则上述报告值合格，验证通过。

如果计算比例＜90%，则验证失败；回顾实验结果，检查可能引起失败的原因；根据实验结果，选择重复验证或重新评估 LoB/LoD。

1.5.3　线性范围的测定

参考《定量测量程序的线性评估：统计学方法》（EP06-A）[17]的方法，取接近线性区间下限的低浓度（L）样品和接近线性区间上限的高浓度（H）样品按等间距稀释的方法配制成 11 个稀释浓度（x_i），分别为 L、0.9L+0.1H、0.8L+0.2H、0.7L+0.3H、0.6L+0.4H、0.5L+0.5H、0.4L+0.6H、0.3L+0.7H、0.2L+0.8H、0.1L+0.9H、H，每一个浓度重复检测 4 次，分别计算每个浓度检测结果的平均值（y_i）。将测定浓度的平均值与理论浓度（c_i）用最小二乘法进行拟合，并计算线性相关系数 R^2（R^2＞0.990 证明线性良好）。

1.5.4　准确度的测定

参考《利用患者样本进行测量程序比对和偏差估计》（EP09-A3）[18]的方法进行回收实验，将标准品溶液按照体积比 1∶9 加入阴性样本基质中，重复检测 3 次，取平均值，计算回收率（临床试验中回收率可接受的范围在 80% ~ 120% 之间）。回收率按照式（5）计算。

$$R = \frac{\rho\times(V_0+V)-\rho_0\times V_0}{V\times\rho_S}\times 100\% \tag{5}$$

其中：R 为回收率，ρ 为阴性样本基质中加入标准品溶液后的质量浓度，V_0 为阴性样本基质的体积，V 为加入标准溶液的体积，ρ_0 为阴性样本基质的检测质量浓度，ρ_S 为标准品溶液的质量浓度。

1.5.5　精密度的测定

参考《定量测量程序精密度评估：批准指南》（EP05-A3）[19]的方法，取高、中、低 3 个不同浓度的样本，分别使用 3 个批次的试剂盒，在 3 个不同的地点，连续检测 5 d，每天每个样品进行 5 个重复。计算各样本的重复性、室内精密度和批间精密度。参考文件要求并结合临床需求，将精密度评估范围设为小于 10%。

1.5.6　干扰实验

参考《临床化学中的干扰实验》（EP07-A3）[20]推荐的干扰物质，向健康人血清样本和已知质量浓度的阳性样本〔样本中（1，3）–β–D–葡聚糖的质量浓度约为 200 pg/mL〕中直接添加血红蛋白、胆红素、甘油三酯，分别使血红蛋白终质量浓度为 1、3、5、7、9 mg/mL，胆红素终质量浓度为 50、110、170、230 mg/L，甘油三酯的终浓度为 1.5、2.5、5、6 mmol/L。分别用 3 批试剂盒检测以上添加不同浓度血红蛋白、胆红素、甘油三酯的两种样本，若添加干扰物质后样本的检测结果与未添加干扰物质样本的检测结果的相对偏差小于 10%，则该浓度的干扰物质对检测结果不存在干扰。

1.5.7　临床效果评估

本次临床评估随机选取上述 300 例中的 130 例血清样本，与已上市的湛江安度斯生物有限公司的 1，3–β–D–葡聚糖（光度法）试剂盒进行比较，评价考核试剂与对比试剂的一致性。

参考 EP09-A3[18]中的方法，以考核试剂与对比试剂检测结果的均值为 X 轴，考核试剂与对比试剂检测结果的比值为 Y 轴，绘制偏倚分析图，并以考核试剂与对比试剂检测结果比值平均值的 95% 区间作为两个检测试剂一致性的界限。

以考核试剂检测结果为 Y 轴，对比试剂检测结果为 X 轴，绘制散点图，计算相关系数 R^2（R^2＞0.975 可体现一致性良好）。

2　结果与分析

2.1　空白限和检出限的确定

共测试 3 批次试剂盒，由于样本数量大于 50，根

据表 1 数据，采用 K-S 检验计算可得 $P_1 = 0.002$，$P_2 = 0.011$，$P_3 = 0.003$，均小于 0.05，因此 3 批试剂空白限检验均为非正态分布，后续采用非参数分析法确定空白限。经计算，3 批试剂空白估算值分别为 14.17 pg/mL、13.52 pg/mL、13.76 pg/mL，3 批试剂中空白估算最高值为 14.17 pg/mL。检出限方差齐性检验结果见表 2，$P>0.05$，证明各低浓度样本间方差具有齐性。由表 3 的结果可以得出，各空白样本、低浓度样本之间离散程度较小，分布相对集中；在不同批次、不同试验日的条件下重复性较好。检出限估算值由式(2)—式(4)计算得到，3 批试剂中检出限最高为 25.78 pg/mL。

表 1　试剂空白评估结果

Tab. 1　Reagent blank evaluation results　pg/mL

批号	试验日	重复	空白样本 1	空白样本 2	空白样本 3	空白样本 4	空白样本 5
1	1	1	8.95	9.97	10.89	9.94	15.97
		2	9.86	12.89	11.02	9.89	13.87
		3	9.92	11.86	9.95	8.97	11.94
		4	7.89	13.86	13.75	10.01	12.96
	2	1	10.01	9.89	10.91	9.98	11.93
		2	10.85	11.91	9.90	7.01	10.91
		3	9.01	10.86	9.01	12.86	9.96
		4	11.86	9.89	8.87	11.02	11.97
	3	1	7.87	11.92	10.01	8.90	14.95
		2	9.015	14.47	10.92	9.85	11.85
		3	8.04	12.90	8.01	11.96	10.91
		4	10.87	9.97	10.93	10.99	9.88
2	1	1	9.47	9.64	12.52	11.62	10.47
		2	10.59	10.48	12.51	12.50	9.61
		3	10.65	11.55	11.59	11.64	12.58
		4	11.61	11.59	10.63	9.53	10.63
	2	1	8.54	12.60	9.45	8.56	14.46
		2	10.48	10.56	11.63	11.48	8.49
		3	11.63	9.45	10.45	12.45	10.46
		4	12.51	8.45	12.52	14.89	11.64
	3	1	10.48	11.47	13.86	11.54	11.58
		2	11.53	12.59	11.54	10.65	12.59
		3	13.17	10.48	10.58	10.53	12.61
		4	10.46	10.65	10.52	12.59	9.50
3	1	1	10.72	10.82	11.73	11.89	12.80
		2	10.85	11.70	12.83	10.72	11.72
		3	11.77	9.76	10.81	12.70	11.75
		4	9.76	11.80	13.83	12.71	12.83
	2	1	7.87	10.84	11.70	11.78	9.71
		2	10.71	15.78	10.82	11.85	11.78
		3	12.74	12.79	12.70	10.77	10.82
		4	11.72	11.77	14.71	11.75	10.76
	3	1	10.83	11.85	10.77	10.80	11.75
		2	12.89	13.68	8.73	10.71	12.70
		3	11.72	10.73	11.86	11.74	9.76
		4	10.76	12.82	12.75	12.88	10.73

参考 EP 文件和临床实际情况，并由表 3 结果可得空白限验证实验中所有检测值均小于空白限报告

表 2　检出限方差齐性检验结果

Tab. 2　Homogeneity of variance test results for the limit of detection　pg/mL

试验日	重复	低浓度样本 1	低浓度样本 2	低浓度样本 3	低浓度样本 4	低浓度样本 5
1	1	15.12	20.71	26.74	33.74	40.71
	2	14.34	19.84	27.41	31.42	38.95
	3	13.16	21.56	25.26	33.27	38.41
	4	14.65	20.45	27.41	32.75	40.12
2	1	14.41	18.47	28.63	30.85	40.15
	2	15.21	22.45	25.41	31.74	39.71
	3	14.07	21.47	25.62	32.04	38.51
	4	13.78	21.63	24.17	32.85	39.62
3	1	13.74	22.52	23.89	30.62	41.72
	2	15.36	20.96	24.15	30.74	40.21
	3	14.25	20.41	25.32	30.62	41.26
	4	16.28	20.37	25.87	29.73	42.18

表 3　空白限和检出限分布结果

Tab. 3　Distribution results of blank limit and detection limit

性能指标	质量浓度/(pg/mL)		
	批次 1	批次 2	批次 3
LoB	10.79 ± 1.83	11.18 ± 1.40	11.62 ± 1.32
LoD	17.45 ± 3.21	19.27 ± 2.85	20.36 ± 2.42

表 4　空白限和检出限验证结果

Tab. 4　Limit of blank and limit of detection validation results

试剂盒批次	试验日	重复	LoB/(pg/mL)		LoD/(pg/mL)	
			LoB-1	LoB-2	LoD-1	LoD-2
1	1	1	13.25	13.17	27.42	28.54
		2	13.42	12.35	27.36	27.56
		3	13.64	12.89	28.34	27.98
		4	13.85	13.12	28.62	28.53
	2	1	12.18	12.53	29.54	29.21
		2	13.71	13.04	28.37	28.42
		3	11.89	12.45	28.45	28.57
		4	11.72	12.36	27.89	28.32
	3	1	13.25	12.88	27.56	28.12
		2	12.56	12.24	27.48	27.36
		3	12.34	12.63	28.75	28.34
		4	11.75	11.71	25.47	26.53
2	1	1	11.25	11.35	27.85	28.13
		2	11.42	11.52	26.84	25.35
		3	13.24	13.42	27.36	27.42
		4	13.65	13.52	28.53	28.45
	2	1	13.52	13.89	28.64	28.51
		2	12.41	12.24	28.51	28.43
		3	14.01	13.53	28.39	28.46
		4	12.04	11.78	29.42	29.13
	3	1	13.42	12.96	29.12	29.37
		2	13.24	12.85	28.17	28.46
		3	13.78	13.54	28.34	27.86
		4	13.25	13.12	28.57	28.65

续表

试剂盒批次	试验日	重复	LoB/(pg/mL)		LoD/(pg/mL)	
			LoB-1	LoB-2	LoD-1	LoD-2
3	1	1	13.25	12.96	28.42	28.57
		2	13.75	13.72	28.62	28.35
		3	12.42	12.53	28.57	28.17
		4	12.75	12.48	28.36	27.95
	2	1	11.78	12.01	29.45	28.34
		2	12.45	12.23	29.36	28.75
		3	12.36	12.01	29.76	28.69
		4	12.68	12.36	25.38	26.11
	3	1	13.24	13.21	27.58	28.34
		2	13.29	13.12	27.35	28.34
		3	13.42	13.56	25.12	26.67
		4	12.89	12.72	28.35	28.53

值，检出限验证实验中共有 68 例检测值大于检出限报告值，占比 94.4%。因此，最终确定空白限为 14.17 pg/mL，检出限为 25.78 pg/mL。

2.2　线性范围

通过绘制散点图对线性范围测定数据进行初步检查，实验过程中无任何操作错误，且采用格拉布斯(Grubbs)法未发现离群点。线性范围评估如图 2 所示。由图 2 可知，线性拟合方程为 $y = 1.007\,1x - 3.786\,6$，其线性相关性在 30 ~ 1 000 pg/mL 的线性范围内较好，线性相关系数 $R^2 = 0.999 > 0.990$。根据设备的实际需求，最终将线性范围定为 31.25 ~ 1 000 pg/mL。对线性范围进行方差分析，在 0.05 的水平下，斜率显著不为 0。样本检测浓度均值与理论浓度二者之间的平均值差异具有统计学意义。

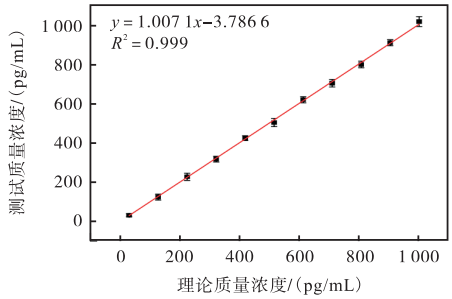


图 2　线性范围评估

Fig. 2　Linear range assessment

2.3　准确度评估

准确度是通过回收实验所得到的检测值与理论值(真实质量浓度)的接近程度。实验过程中无任何操作错误，且仪器处于正常运行状态。所测的 5 个样本回收率均处于 80% ~ 120% 之间(表 5)，符合临床试验要求。

2.4　精密度评估

精密度是在规定条件下所得检测结果的一致性，一般使用标准偏差(SD)和变异系数(CV)表示[19]。经检查，实验数据未出现离群值。由表 6 结果可知，低、中、高 3 个不同浓度的样本检测的重复性、室内精密度和批间精密度的 CV 值均小于 10%，满足预设的要求。

2.5　干扰实验结果

EP07-A3[20]中推荐的胆红素的最高质量浓度为 150 mg/L，甘油三酯的最高浓度为 2.83 mmol/L。干扰实验结果(表 7)表明，样本中血红蛋白质量浓度达到 9 mg/mL，胆红素质量浓度达到 230 mg/L，甘油三酯浓度达到 6 mmol/L 时，两种添加干扰物质的样本与未添加样本的检测结果相对偏差均小于 10%。因此，常见的干扰物质对真菌葡聚糖的检测结果无干扰。

表 5　回收率检测结果

Tab. 5　Recovery rate test results

样本	质量浓度/(pg/mL)				回收率/%
	阴性基质	标准品	检测值	理论值	
1	40.65	802.17	112.52	116.80	96.3%
2	42.74	783.54	114.24	116.82	97.8%
3	48.23	842.31	134.41	127.71	105.3%
4	45.98	825.32	126.24	123.91	101.9%
5	50.26	793.86	119.43	124.62	95.8%

表 6　精密度检测结果

Tab. 6　Precision test results

样本	检测总均值/(pg/mL)	重复性		室内精密度		批间精密度	
		SD	CV	SD	CV	SD	CV
低值样本	60.24	1.62	2.69%	1.83	3.04%	2.52	4.18%
中值样本	224.12	6.45	2.88%	5.65	2.52%	7.24	3.23%
高值样本	500.42	8.42	1.68%	9.52	1.90%	9.21	1.84%

表 7　不同干扰物质对检测结果的影响

Tab. 7　Influence of different interfering substances on test results

干扰物质	浓度	健康人血清样本检测均值/(pg/mL)	相对偏差	真菌感染阳性血清样本检测均值/(pg/mL)	相对偏差
血红蛋白(mg/mL)	0	50.24	/	436.25	/
	1	51.25	5.84%	442.25	6.22%
	3	50.26	4.72%	426.85	3.85%
	5	52.02	6.27%	440.12	4.52%
	7	53.20	3.84%	435.28	4.12%
	9	49.25	3.57%	432.75	3.27%
胆红素(mg/L)	0	51.23	/	425.12	/
	50	53.14	4.71%	424.32	4.21%
	110	54.14	5.10%	421.15	3.89%
	170	50.36	3.68%	430.25	3.27%
	230	52.01	5.24%	432.96	5.68%
甘油三酯(mmol/L)	0	50.36	/	437.85	/
	1.5	52.01	4.88%	436.95	4.27%
	2.5	55.23	4.25%	432.67	5.36%
	5	54.01	6.12%	430.67	5.68%
	6	51.23	5.36%	425.96	5.13%

2.6　效果评估结果

考核试剂与对比试剂检测结果偏倚分析图如图 3 所示。由图 3 可知，130 例样本中界外点共有 6 例，占比为 4.6%，因此 95%以上的考核试剂与对比试剂检测结果比值在一致性界限内。图 4 中考核试剂与对比试剂检测结果的线性相关系数 R^2>0.975，表明两种检测试剂具有较好的一致性。

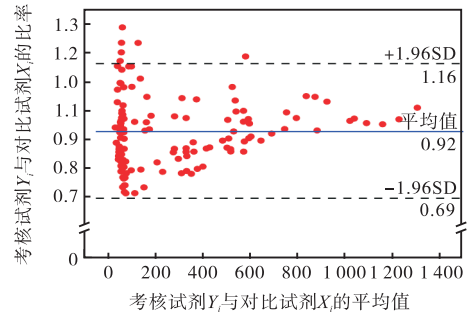


图 3　考核试剂与对比试剂检测结果偏倚分析图

Fig. 3　Bias analysis of the test results of the assessment and comparison reagents

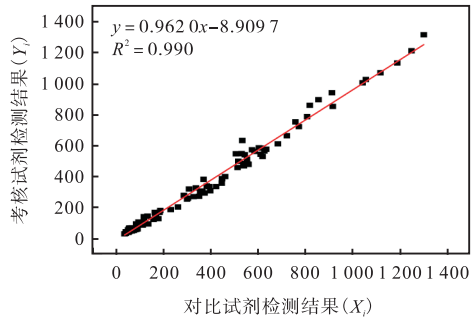


图 4　考核试剂与对比试剂检测结果相关性分析图

Fig. 4　Correlation analysis of test results between the assessment reagents and comparison reagents

3　结　语

本研究基于自主研发的全自动生化分析仪以及配套试剂对(1,3)-β-D-葡聚糖进行了检测，该方法相比于传统检测方法操作更简便，准确度更高，更快得到检测结果，可以做到单人单检、随到随检。该方法可以实现临床早期快速诊断，为危重患者提供更多的抢救时间。

本文所使用的(1,3)-β-D-葡聚糖检测方法线性范围为 31.25～1 000 pg/mL，回收率在 80%～120%之间，符合临床检验的标准；该方法精密度较好，重复性、室内精密度和批间精密度均小于 10%；空白限为 14.17 pg/mL，检出限为 25.78 pg/mL，有较好的灵敏度；干扰实验结果表明，常见的干扰物质对 1,3-β-D-葡聚糖的检测无干扰。偏倚分析和相关性分析显示出本方法与湛江安度斯试剂盒具有良好的一致性。

血浆 1,3-β-D-葡聚糖虽然能判断有无侵袭性真菌感染，但是不能确定是哪种真菌，并且存在假阳性和假阴性的情况，明确病原菌及药敏试验仍需依靠真菌培养，这是该方法存在的缺陷之一。该检测方法可作为 IFI 治疗疗效的监测指标，但为了确定感染菌种应同时结合真菌培养结果，为临床 IFI 的诊断和治疗提供更准确的依据。

参考文献：

[1] 郭景景，李钦峰，吴海华，等. (1,3)-β-D-葡聚糖、半乳甘露聚糖联合降钙素原检测对侵袭性真菌感染的诊断价值[J]. 国际免疫学杂志，2020，43(1)：31-36.

[2] 申旺，叶丽燕，杨文丽，等. 血浆(1,3)-β-D-葡聚糖在侵袭性真菌感染临床诊治中的应用评价[J]. 中华医院感染学杂志，2018，28(9)：1288-1291.

[3] KIDD S E，CHEN S C，MEYER W，et al. A new age in molecular diagnostics for invasive fungal disease：are we ready？[J]. Frontiers in microbiology，2020，10：2903.

[4] 温冬华，刘钰华，谭坚，等. 动态监测血浆(1,3)-β-D-葡聚糖含量对评价侵袭性真菌感染患者药物疗效的价值[J]. 中国医药导报，2017，14(35)：110-113.

[5] PASCALE G D，POSTERARO B，D'ARRIGO S，et al. (1,3)-β-D-glucan-based empirical antifungal interruption in suspected invasive candidiasis：a randomized trial[J]. Critical care，2020，24(1)：550.

[6] ALANIO A，GITS-MUSELLI M，GUIGUE N，et al. Prospective comparison of (1,3)-β-D-glucan detection using colorimetric and turbidimetric assays for diagnosing invasive fungal disease[J]. Medical mycology，2021，59(9)：882-889.

[7] 尚元元，喻楠，董灵娣，等. 血浆(1,3)-β-D-葡聚糖对院内侵袭性真菌感染诊断的临床价值[J]. 中国真菌学杂志，2018，13(3)：168-172.

[8] TAMURA H，TANAKA S，ODA T，et al. Purification and characterization of a(1,3)-beta-D-glucan-binding protein from horseshoe crab(*Tachypleus tridentatus*) amoebocytes[J]. Carbohydrate research，1996，295：103-116.

[9] TAKAKI Y，SEKI N，KAWABATA S，et al. Duplicated binding sites for(1,3)-beta-D-glucan in the horseshoe crab coagulation factor G：implications for a molecular basis of the pattern recognition in innate immunity[J]. The journal of biological chemistry，2002，277(16)：

14281–14287.

[10] SIOPI M, KARAKATSANIS S, ROUMPAKIS C, et al. Evaluation of the Dynamiker® fungus (1, 3)-*β*-*D*-glucan assay for the diagnosis of invasive aspergillosis in high-risk patients with hematologic malignancies[J]. Infectious disease therapy, 2022, 11(3): 1161–1175.

[11] WHITE P L, PRICE J S, POSSO R B, et al. An evaluation of the performance of the Dynamiker® fungus (1, 3)-*β*-*D*-glucan assay to assist in the diagnosis of invasive aspergillosis, invasive candidiasis and pneumocystis pneumonia[J]. Medical mycology, 2017, 55(8): 843–850.

[12] SZARPAK L, NUCERA G, PRUC M, et al. Point-of-care testing as the future of pre-hospital emergency medicine: an overview[J]. Signa vitae, 2022, 18(3): 153–157.

[13] 包杰, 杨永俊, 陈予梅, 等. 探讨 POCT 技术的应用现状与发展前景[J]. 中国医学创新, 2016, 13(30): 138–141.

[14] 王保学, 苗苗, 钱芃橙, 等. 一种(1, 3)–*β*–*D*–葡聚糖标准物质的制备方法及其产品和应用: 114384189B[P]. 2022–08–30.

[15] 王保学, 丁真真, 苗苗, 等. 一种生化分析仪: 111537757A[P]. 2020–08–14.

[16] Clinical and Laboratory Standards Institute. Protocols for determination of limits of detection and limits of quantitation: approved guideline: EP17-A2: 2012[S]. [2024–07–18]. https://webstore.ansi.org/standards/clsi/CLSIEP17A2.

[17] Clinical and Laboratory Standards Institute. Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures: a statistical approach; approved guideline: EP06-A: 2003[S]. [2024–07–18]. https://webstore.ansi.org/standards/clsi/CLSIEP06A.

[18] Clinical and Laboratory Standards Institute. Method comparison and bias estimation using patient samples: approved guideline-second edition: EP09-A3: 2013[S]. [2024–07–18]. https://webstore.ansi.org/standards/clsi/CLSIEP09A3.

[19] Clinical and Laboratory Standards Institute. Evaluation of precision performance of quantitative measurement methods: approved guideline-second edition: EP05-A3: 2014[S]. [2024–07–18]. https://webstore.ansi.org/standards/clsi/CLSIEP05A3.

[20] Clinical and Laboratory Standards Institute. Interference testing in clinical chemistry: approved guideline: EP07-A3: 2018[S]. [2024–07–18]. https://webstore.ansi.org/standards/clsi/CLSIEP07A3.

责任编辑: 郎婧

(上接第 41 页)

35(5): 901–913.

[23] KUMAR S, STECHER G, LI M, et al. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms[J]. Molecular biology and evolution, 2018, 35(6): 1547–1549.

[24] LIU M, GRKOVIC T, LIU X, et al. A systems approach using OSMAC, logP and NMR fingerprinting: an approach to novelty[J]. Synthetic and systems biotechnology, 2017, 2(4): 276–286.

[25] PU H, JIANG T, PENG D, et al. Degradation of mirubactin to multiple siderophores with varying Fe(Ⅲ) chelation properties[J]. Organic & biomolecular chemistry, 2022, 20(25): 5066–5070.

[26] YOSHIDA S, AOYAGI T, TAKEUCHI T. Benadrostin, new inhibitor of poly(ADP-ribose) synthetase, produced by *Actinomycetes* Ⅱ. structure determination[J]. The journal of antibiotics, 1988, 41(8): 1009–1014.

[27] KEPPLINGER B, WEN X, TYLER A R, et al. Mirubactin C rescues the lethal effect of cell wall biosynthesis mutations in *Bacillus subtilis*[J]. Frontiers in microbiology, 2022, 13: 1004737.

责任编辑: 郎婧