

Delta 特定蛋白分析仪检测 C-反应蛋白的性能验证

陆雪

作者单位: 200003 上海, 上海长征医院检验科

通讯作者: 陆雪, Email: luxue91120@foxmail.com

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7151.2017.04.002

【摘要】 目的 对 Delta 特定蛋白分析仪检测 C-反应蛋白(CRP)的性能进行验证。方法 参考美国临床和实验室标准协会(CLSI)和参考区间行业标准(WS/T)文件对 Delta 特定蛋白分析仪的精密度、携带污染率、准确度、功能灵敏度、临床报告范围、抗干扰能力、参考区间进行验证。结果 低、高两个浓度水平样本的批内变异系数(CV)分别为 2.43% 和 2.57%, 实验室内总 CV 分别为 3.24% 和 3.41%, 精密度验证均通过厂家声明; 携带污染率为 0.65%, 满足临床要求。两个不同批号仪器校准品的准确度验证相对偏差分别为 6.09% 和 4.87%, 参考物质的靶值在 95% 置信区间内。当功能灵敏度为 1.375 mg/L; 临床可报告范围为 1.375 ~ 12 457 mg/L, 满足临床需要。干扰试验显示含 246.7 $\mu\text{mol/L}$ 总胆红素的黄疸标本、含 4.15 mmol/L 三酰甘油的血脂标本和含 2.50 g/L 血红蛋白的溶血标本对 CRP 检测的影响度均 < 5%, 在可接受范围内; 参考区间的验证结果均在厂家提供的范围内。结论 Delta 特定蛋白分析仪采用散射免疫比浊法测定 CRP 的分析性能符合厂商声明的标准, 满足临床检测的要求。

【关键词】 Delta 特定蛋白分析仪; C-反应蛋白; 性能验证; 散射免疫比浊法

Performance verification of analyzing C-reactive protein by Delta specific protein analyzer

Lu Xue. Department of Clinical Laboratory, Changzheng Hospital, Shanghai 200003, China

Corresponding author: Lu Xue, Email: luxue91120@foxmail.com

【Abstract】 Objective To test and verify the performance of C-reaction protein (CRP) detected by Delta special protein analyzer. **Methods** The precision, carryover rate, accuracy, functional sensitivity, clinical reportable range, interference analysis and reference interval were verified according to American Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) and Chinese Healthcare Industry (WS/T) standards. **Results** The within-run precision variable coefficient (CV) of low and high concentrations was 2.43% and 2.57% respectively, while the overall precision CV was 3.24% and 3.41% respectively. Precision has been demonstrated to be consistent with the manufacturer's claim. The carryover rate was 0.65%. It can satisfy clinical requirements. The relative bias of accuracy in two different batches was 6.09% and 4.87% respectively, the target values of reference materials were both within the 95% confidence interval. The functional sensitivity was 1.375 mg/L. The clinical reportable range from 1.375 to 12 457 mg/L, can meet the clinical needs. Interference analysis showed the effect of 246.7 $\mu\text{mol/L}$ concentration of total bilirubin, 4.15 mmol/L concentration of triglyceride and 2.50 g/L concentration of hemoglobin on CRP detection was within acceptable range. The verification results of the reference interval were within the scope provided by the manufacturer. **Conclusion** The major performances of CRP detected by Delta special protein analyzer using nephelometry immunoassay, was in line with the manufacturer's statement. It can meet the clinical testing requirements.

【Key words】 Delta specific protein analyzer; C-reactive protein; Performance evaluation; Nephelometry immunoassay

C-反应蛋白(CRP)是机体感染和组织损伤的急性时相反应蛋白,在多种疾病的诊断中发挥重要作用^[1-2],其临床应用日渐广泛。上海长征医院检验科最近购置第二台 Delta 特定蛋白分析仪,该仪

器采用散射免疫比浊法进行 CRP 检测。根据美国临床和实验室标准协会(CLSI)和中国卫生行业标准(WS/T)文件,结合实验室自身情况,现对 Delta 特定蛋白分析仪的精密度、携带污染率、准确度、功能

灵敏度、临床报告范围、干扰试验和参考区间进行验证。

1 材料与方 法

1.1 仪器与试剂 Delta 特定蛋白分析仪及配套试剂(批号:20170609)、稀释液(批号:20170609)、校准品(批号为20170522,浓度22.0 mg/L;批号为20170317,浓度32.0 mg/L)。Randox 质控品(批号:浓度2为402LPC;浓度3为455LPC)

1.2 标本 采集本院门诊和住院患者乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝全血标本。标本无黄疸、溶血、脂血。

1.3 干扰物质 罗氏 E601 免疫分析仪检测总胆红素(TBil)含量为493.4 μmol/L 的黄疸标本(无脂血、溶血);三酰甘油(TG)含量为8.3 mmol/L 的脂血标本(无黄疸、溶血);按 CLSI EP7-A2《临床化学干扰试验标准》文件附录制备血红蛋白(Hb)含量为5.00 g/L 的溶血标本(无黄疸,无脂血)作为干扰物质。其 CRP 水平均在正常范围内。

1.4 方 法

1.4.1 精密度验证 参考 CLSI EP15-A《精密度和正确度性能的用户验证》和 WS/T 492-2016《临床检验定量测定项目精密度与正确度性能验证》,对仪器的精密度进行验证。方法:高、低两个浓度 CRP 质控品,每天一个批次,连续检测 5 d,每天每个浓度水平同一样品重复检测 4 次。分别计算批内标准差($s_{\text{批内}}$)、实验室内总标准差($s_{\text{室内}}$),与厂家声明的批内标准差($\sigma_{\text{批内}}$)和总标准差($\sigma_{\text{总}}$)进行比较。

1.4.2 携带污染率验证 选取高值和低值样品各 1 例,先测定高值样品 3 次(H1、H2、H3),再检测低值样品 3 次(L1、L2、L3)。携带污染率=(L1-L3)/(H3-L3)×100%,其中 L1 为低值标本中的测定高值, L3 为低值标本中的测定低值, H3 为高值标本中的测定高值)。结果应≤2%

1.4.3 准确度验证 参考 CLSI EP15-A《精密度和正确度性能的用户验证》和 WS/T 492-2016《临床检验定量测定项目精密度与正确度性能验证》,选择两个不同批号的仪器配套校准品,其校准值可溯源至 CRM470,重复检测 2 次,连续检测 5 d,计算均值、标准差,与靶值进行比较,计算相对偏差。试验期间保证机器状态正常,保证试验当日室内质控在控。

1.4.4 功能灵敏度 将校准品浓度(22 mg/L)倍比稀释至接近厂家提供的检测下限浓度 0.42 mg/L,将每个浓度样品装入 EP 管密封后 -20 ℃保存。累积检测 10 d,记录检测数据,计算均值、标准差和变异

系数(CV), CV 最接近 20% 所对应的浓度即为功能灵敏度。

1.4.5 临床可报告范围 先进行最大稀释度验证试验,选择 2 份接近定标上限高值的 CRP 标本,原样本用初始稀释度 1:40 倍稀释,检测浓度为 100.64 mg/L 和 116.52 mg/L,用稀释液按 5、10、20、50、100 倍稀释,并将每个浓度梯度平行测定 2 次,计算出实测均值后与预期值做比较。计算回收率[回收率=(实测均值/预期值)×100%]。回收率在 80%~120% 间的结果为可接受,从而确定标本稀释最大倍数。根据灵敏度和最大稀释倍数,确定临床可报告范围。

1.4.6 抗干扰能力验证 参考 CLSI EP7-A2《临床生化干扰测试》文件,选择约 80 mg/L 新鲜血清(无溶血、黄疸和脂血)的 CRP 作为分析样本,并将干扰物分别以 10H、7.5H+2.5L、5H+5L、2.5H+7.5L、10L 的比例与分析样本 1:1 混合,每个浓度重复检测 3 次,计算 CRP 均值以及干扰效果[干扰效果=(加入后测定值-加入前测定值)/加入前测定值×100%]。

1.4.7 参考区间验证 参考 CLSI C28-A2《临床实验参考值范围的定义与确认》,选取本院体检中心健康个体 20 例,要求所有指标正常,参考个体能合理的代表本实验室选择的健康总体。依照标准操作规程检验以上 20 个样本后,剔除离群值,如有 2 个以下参考个体数据在参考区间外,则该区间为可接受。

2 结 果

2.1 精密度验证结果 低浓度水平质控品 $s_{\text{批内}}$ 和 $s_{\text{室内}}$ 分别为 1.29 mg/L 和 1.72 mg/L, $CV_{\text{批内}}$ 和 $CV_{\text{总}}$ 分别为 2.43% 和 3.24%;高浓度水平质控品 $s_{\text{批内}}$ 和 $s_{\text{室内}}$ 分别为 1.98 mg/L 和 2.63 mg/L, $CV_{\text{批内}}$ 和 $CV_{\text{总}}$ 分别为 2.57% 和 3.41%。

精密度声明的验证:厂家声明的验证值[验证值 $V = s_{\text{声明}} \times \sqrt{C/T}$ (T 为有效自由度, C 为对选择水平提供 5% 假失控率 χ^2 分布的选择百分点)分别为 11.12 mg/L 和 16.11 mg/L。实验室估计的室内不精密度分别为 1.72 mg/L 和 2.63 mg/L,低于厂家声明的验证值,说明本实验室通过厂家声明的验证。见表 1。

2.2 携带污染率验证结果 携带污染率为 0.6528% (H1=97.65, H2=89.02, H3=102.96; L1=2.74, L2=2.53, L3=3.39),小于 2%,满足临床要求。

2.3 准确度验证结果 两个批号校准品的验证值和靶值的相对偏差分别为 6.09% 和 4.87%，计算的 95% 置信区间分别为 21.05 ~ 25.63 mg/L 和 30.62 ~ 36.25 mg/L，包含靶值 22.0 mg/L 和 32.0 mg/L，通过验证。

2.4 功能灵敏度的确认 以日间 CV 20% 对应的检出限浓度水平 1.375 mg/L 作为本实验室 Delta 检测系统检测 CRP 的功能灵敏度。见表 2。

表 2 CRP 功能灵敏度试验

序号	靶值(mg/L)	均值(mg/L)	CV(%)
S1	2.200	2.330	18.463 25
S2	1.375	1.527	19.380 31
S3	1.000	1.177	25.264 28

2.5 临床可报告范围验证结果 稀释倍数为 5 ~ 100 倍时，稀释回收率在可接受范围内。散射免疫比浊法仪器在初始稀释度 1 : 40 时的分析测量范围由定标品定值范围决定，为 1.36 ~ 124.57 mg/L。临床可报告范围为 1.375 ~ 12 457 mg/L。见表 3。

2.6 抗干扰能力验证结果 加入不同浓度干扰物后 CRP 检测结果及影响度的结果表明，总胆红素(TBil)浓度范围为 0 ~ 246.7 μmol/L 的黄疸标本，TG 浓度范围为 0 ~ 4.15 mmol/L 的血脂标本，Hb 浓度范围为 0 ~ 2.50 g/L 的溶血标本对 Delta 特定蛋白分析仪检测 CRP 的影响均较小，影响度均 < 5%。见表 4。

表 3 最大稀释度验证试验结果

稀释倍数	100.64 mg/L CRP 标本		
	实测均值(mg/L)	预期值(mg/L)	回收率(%)
5	18.21	20.128	90.470 99
10	8.95	10.064	88.930 84
20	4.37	5.032	86.844 20
50	2.31	2.013	114.765 50
100	0.82	1.006	81.478 54

稀释倍数	116.52 mg/L CRP 标本		
	实测均值(mg/L)	预期值(mg/L)	回收率(%)
5	21.33	23.304	91.529 35
10	10.78	11.652	92.516 31
20	4.85	5.826	83.247 51
50	2.67	2.330	114.572 60
100	0.98	1.165	84.105 73

2.7 参考区间验证结果 厂家提供的健康人群 CRP 参考区间为 0 ~ 8 mg/L，20 例样本结果全部在该参考区间内。

3. 讨论

CRP 是一种急性时相反应蛋白，对感染、炎症及组织损伤和坏死的鉴别和诊断、病情监测、抗菌药物疗效观察和预后判断有重要临床意义^[3]。健康人群大规模的流行病学研究发现，超敏 CRP (hs-CRP) 有望成为未来心血管疾病风险强有力的独立预测因子^[4-5]，美国心脏病学会和疾病控制中心(AHA/CDC)制定的标准显示，CRP 在 1 mg/L 以

表 1 两种不同浓度 CRP 质控品的精密度验证试验结果

时间	低浓度 CRP 质控品 (mg/L)				高浓度 CRP 质控品 (mg/L)			
	重复 1	重复 2	重复 3	重复 4	重复 1	重复 2	重复 3	重复 4
第 1 天	51.79	50.30	49.45	52.75	76.40	80.85	77.80	79.95
第 2 天	51.98	53.66	55.23	53.94	78.55	78.38	81.56	79.65
第 3 天	52.81	51.66	52.40	51.35	75.89	76.43	76.89	74.41
第 4 天	53.43	54.70	55.75	52.43	75.70	77.46	73.45	72.18
第 5 天	55.67	53.44	52.64	53.32	77.92	79.85	75.92	73.84

$\bar{x}=52.94, s_{\text{批内}}=1.29, s_{\text{批间}}=1.31$ $\bar{x}=77.15, s_{\text{批内}}=1.98, s_{\text{批间}}=1.99$
 $s_{\text{室内}}=1.72, CV_{\text{批内}}=2.43\%, CV_{\text{室内}}=3.24\%$ $s_{\text{室内}}=2.63, CV_{\text{批内}}=2.57\%, CV_{\text{室内}}=3.41\%$
 厂家声明验证值: T 值=10.44, C 值=20.48, 验证值=11.12 厂家声明验证值: T 值=10.57, C 值=20.48, 验证值=16.11

表 4 加入不同干扰物后各标本 CRP 检测结果及影响度

稀释倍数	TBil 干扰			TG 干扰			Hb 干扰		
	加入 TBil (μmol/L)	CRP 均值 (mg/L)	影响度 (%)	加入 TG (mmol/L)	CRP 均值 (mg/L)	影响度 (%)	加入 Hb (g/L)	CRP 均值 (mg/L)	影响度 (%)
10H	246.70	53.88	4.64	4.15	53.98	4.84	2.500	40.98	-4.56
7.5H+2.5L	185.03	53.00	2.93	3.11	51.33	-0.31	1.875	42.84	-0.23
5H+5L	123.35	52.63	2.21	2.08	52.96	2.85	1.250	42.84	-0.23
2.5H+7.5L	61.68	49.48	-3.90	1.04	53.71	4.31	0.625	41.73	-2.82
10L	0	51.49	0	0	51.49	0	0	42.94	0

下为低度危险, 1~3 mg/L 为中度危险, 3 mg/L 以上为高度危险^[6]。而 CRP 水平亦能反映心血管疾病患者的病情, 预测患者预后, 研究表明, 急性冠脉综合征患者经积极治疗后, CRP 水平明显降低^[7]。

目前 CRP 检测方法主要有免疫荧光法、放射免疫法、酶联免疫吸附试验(ELISA)、免疫比浊法等, 其中免疫比浊法包括透射免疫比浊和散射免疫比浊, 因其较好的稳定性、灵敏度、精确度, 成为目前临床广泛应用的两种方法。而 hs-CRP 检测需要更高的灵敏度, 通常采用胶乳增强的免疫比浊法, ELISA 可使其检测下限达到 0.005~0.100 mg/L^[8]。近几年, 出现了方法各异的即时检测小型全血 CRP 测定仪, 该类仪器操作简单、快速, 适合床旁检测, 显示出良好的应用前景。有文献表明, 在基层医疗机构, 即时检测小型全血 CRP 测定仪的使用, 能帮助减少呼吸道感染患者抗菌药物滥用的情况, 并提高患者质量调整生命年(QALY)^[9]。

Delta 特定蛋白分析仪采用散射免疫比浊法, 在方案设计上先进行精密度验证实验和标本携带污染实验, 确认检测系统有良好的重复性且无携带污染后, 再进行准确度的验证^[10]。本试验检测系统的批内不精密度和批间不精密度均在厂家声明的范围内, 精密度验证实验室总不精密度低于厂家声明值, 故精密度通过验证。准确度评估一般采用与参考方法比较、应用参考物质、回收实验等方式进行。本实验采用有溯源性的参考物质方法, 参考物质指定值在 95% 置信区间内, 说明准确度通过验证。

功能灵敏度相对检测下限(LOQ)更适合作为临床可报告范围的下限^[11]。因本系统初始稀释度设定为 1:40, 故本实验测定初始稀释度下的功能灵敏度为 1.375 mg/L, 当结果低于该浓度时, 建议报告 <1.375 mg/L。

对于多点定标(至少 3 个)的检测项目无需进行分析测量范围(AMR)的验证实验, 此时该系统的测量范围由定标品定值范围决定。对于临床可报告范围大于 AMR 的检测项目, 需进行最大稀释度验证实验^[10]。本试验结果表明在分析测量范围内验证最大稀释倍数 100 时稀释回收率均在可接受范围内, 结合功能灵敏度决定本实验室检测 CRP 的临床可报告范围为 1.375~12 457 mg/L。

关于抗干扰能力, 有文献表明, 透射免疫比浊法的抗干扰能力较强, 而散射免疫比浊法对较大颗粒

的乳糜、严重溶血时的 Hb 的干扰存在不足^[12]。本试验结果表明, TBil 浓度为 246.7 μmol/L、TG 浓度为 4.15 mmol/L、Hb 浓度为 2.50 g/L 时, 对本系统检测 CRP 影响均较小, 说明本系统有一定的抗干扰能力, 能够基本满足日常检测的需求。但对低值 CRP 浓度范围标本的抗干扰能力仍有待考察, 对乳糜和严重溶血的抗干扰能力也有待进一步验证。

研究表明, 健康人群 CRP 浓度水平呈偏态分布, 有学者表明健康人群 CRP 浓度分布与性别和年龄相关, 建议根据不同性别和年龄建立相应的参考区间^[13]。本实验采用厂商给定的参考区间进行验证, 结果符合临床要求。

综上所述, Delta 特定蛋白分析仪采用散射免疫比浊法测定 CRP 的主要分析性能符合厂商声明的标准, 能满足临床检测的要求。

参考文献

- 冯秀兰, 古杰超. 炎症指标在社区获得性肺炎诊断中的表达水平及其相关性分析[J]. 实用检验医师杂志, 2016, 8(3): 146-148.
- 史金伟, 岳天霞. 慢性心衰患者 C-反应蛋白、心肌肌钙蛋白 I 及糖类抗原 CA125 的检测结果[J]. 实用检验医师杂志, 2016, 8(4): 212-214.
- 杨春燕, 杨玉军, 李宝云, 等. 超敏 C-反应蛋白与白蛋白比值对早产儿早发型感染的诊断价值[J]. 中华危重病急救医学, 2016, 28(2): 173-177.
- Ridker PM, Rifai N, Clearfield M, et al. Measurement of C-reactive protein for the targeting of statin therapy in the primary prevention of acute coronary events [J]. N Engl J Med, 2001, 344(26): 1959-1965.
- 范振符, 徐东, 陈智周. 高灵敏度 CRP 测定在心血管疾病中的应用[J]. 标记免疫分析与临床, 2003, 10(4): 239-242.
- 李月海, 宛长宏. 飞测 II 型免疫荧光检测仪检测 C-反应蛋白性能验证[J]. 国际检验医学杂志, 2017, 38(7): 1003-1005.
- 符显昭, 许靖, 李春燕, 等. 活血解毒降糖方对糖尿病急性冠脉综合征非血运重建患者促炎/抗炎因子平衡的影响[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2016, 23(1): 6-10.
- 麻雅婷, 李新军, 杨明, 等. C 反应蛋白的研究进展及临床应用[J/CD]. 临床检验杂志(电子版), 2015, 4(4): 997-1002.
- Hunter R. Cost-effectiveness of point-of-care C-reactive protein tests for respiratory tract infection in primary care in England [J]. Adv Ther, 2015, 32(1): 69-85.
- 毕波, 吕元. 定量检测方法学性能验证的系统设计[J]. 中华检验医学杂志, 2007, 30(2): 143-145.
- 李俊立, 唐全, 王昌富, 等. 雌二醇定量检测的可报告范围评价[J]. 中国卫生检验杂志, 2014, 24(7): 967-969.
- 彭凤, 徐晓萍, 王琳, 等. 免疫透射比浊法和免疫散射比浊法检测特定蛋白的抗干扰能力比较[J]. 检验医学, 2013, 28(2): 142-145.
- 袁宝军, 张会芬, 邹吉敏, 等. 健康成人血清中 C 反应蛋白的分布[J]. 临床检验杂志, 2005, 23(3): 236-237.

(收稿日期: 2017-10-25)

(本文编辑: 张耘菲 杨程伍)