

· 论 著 ·

电化学发光免疫法检测 NT-proBNP 的分析测量范围和临床可报告范围研究*

阚丽娟, 张秀明[△], 王伟佳, 温冬梅, 李 飞, 严海忠, 索明环, 欧阳能良

(中山大学附属中山医院检验医学中心, 广州 528403)

摘要: 目的 对 Roche Cobas E601 电化学发光免疫系统检测 N 末端 B 型利钠肽原(NT-proBNP)的分析测量范围(AMR)进行验证性研究, 并建立临床可报告范围(CRR)。方法 参考美国临床与实验室标准化协会(CLSI)EP6-A 文件, 选用超出厂商声明的分析测量范围下限和上限浓度的样本, 按比例精确配成等间距的不同浓度样本, 每个浓度样本重复测定 2 次, 用多项式回归评价并验证厂商声明的 AMR; 选用 NT-proBNP 浓度在分析测量范围内的高值样本 5 份, 用稀释液作不同倍数稀释后测定, 计算稀释回收率, 确定最大允许稀释度, 并结合功能灵敏度建立 CRR。结果 NT-proBNP 的分析测量范围: 5~35 126 pg/mL, 最大允许稀释度 1:2。根据其功能灵敏度, 临床可报告范围: 8.82~70 252 pg/mL。结论 Roche Cobas E601 电化学发光免疫系统检测 NT-proBNP 在厂商声明的分析测量范围内线性良好, 所建立的临床可报告范围可以满足临床需要。

关键词: 研究; 分析测量范围; 临床可报告范围; 最大允许稀释度; 电化学发光免疫测定法; N 末端 B 型利钠肽原

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.10.001

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2011)10-1019-03

Investigation of the analytical measurement range and clinical reportable range of electrochemiluminescence immunoassay in the detection of NT-proBNP*

Kan Lijuan, Zhang Xiuming[△], Wang Weijia, Wen Dongmei, Li Fei, Yan Haizhong, Suo Minghuan, Ouyang Nengliang
(Center of Laboratory Medicine, Zhongshan Hospital of Sun Yat-sen University, Guangdong 528403, China)

Abstract: Objective To investigate the analytical measurement range(AMR) and establish the clinical reportable range(CRR) of Roche Cobas E601 electrochemiluminescence immunoassay(ECLIA) system in the detection of N-terminal proB-type natriuretic peptide(NT-proBNP). **Methods** Samples with equal interval, proportional prepared with samples at concentration levels, exceeding the low and high concentration limits claimed by manufacture, were detected twice each. The AMR claimed by manufacture was evaluated and verified by polynomial regression analysis. Five samples, at high concentration level and within the AMR, diluted to different dilution ratio, were detected, and the dilution recovery rate was calculated to determine the max allowable dilution rate and establish CRR by combining functional sensitivity. All of the detection and analysis mentioned above were performed according to clinical and laboratory standard institute (CLSI) document EP6-A. **Results** The AMR of NT-proBNP was 5~35 126 pg/mL, the max allowable dilution rate was 1:2, the CCR was 8.82~70 252 pg/mL. **Conclusion** There can be fine linearity within the AMR, claimed by manufacture, of Roche Cobas E601 ECLIA system in the detection of NT-proBNP and the CCR established in this research can meet the needs of clinical laboratory.

Key words: research; analytical measurement range; clinical reportable range; max dilution limit; electrochemical luminescence immunoassay; N-terminal pro B-type natriuretic peptide

分析测量范围(AMR)和临床可报告范围(CRR)是反映分析方法及检测系统分析性能的重要指标。国际标准化组织颁布的《医学实验室质量和能力的专用要求》(ISO15189)和中国《医疗机构临床实验室管理办法》均要求, 实验室必须对引进或改变的检测系统或方法的主要分析性能进行验证或评价, 证实其能够达到临床检测所要求的标准后方可用于临床检测^[1]。N 末端 B 型利钠肽原(NT-proBNP)是目前诊断心力衰竭的重要标志物, 也是评价心功能的敏感指标, 在国际上, 专家和有关心力衰竭诊断和治疗指南中均肯定了 NT-proBNP 在心力衰竭诊断、预后判断和治疗监控中的作用^[2~6]。此外, 国外和中国有关学术组织均对 NT-proBNP 测定的分析性能提出了明确要求^[7]。本研究主要参考美国临床和实验室标准化协会(CLSI)发布的 EP6-A 文件《定量检验程序的线性评价:统计方法——批准指南》对 Roche Cobas E601 电化学发光免疫系统

检测 NT-proBNP 的分析测量范围进行验证确认, 并结合功能灵敏度建立其临床可报告范围^[8]。

1 材料与方法

1.1 检测系统 Roche Cobas E601 电化学发光分析仪及其配套的 NT-proBNP 试剂(批号 157123)、校准品(批号 156070)、质控品(批号 155039, 155040)和检验程序。

1.2 样本制备 (1) 分析测量范围实验样本: 分别收集 NT-proBNP 低浓度和高浓度的新鲜患者血清标本若干份, 要求外观澄清, 无溶血、无黄疸、无脂血, 将若干份低浓度样本和高浓度样本分别混合, 离心, 得到本实验所需的低值样本(L)和高值样本(H), 其浓度分别接近或超过厂商声明的分析测量范围下限和上限。H 和 L 按 8L、7L+1H、6L+2H、5L+3H、4L+4H、3L+5H、2L+6H、1L+7H 和 8H 混合配制, 形成系列浓度过实验样本, 并按样本号将各浓度实验样本编号作为相对浓

* 基金资助: 广东省医学科研基金课题(A2009763); 广东省中山市科技局资助课题(20091A038)。

△ 通讯作者, E-mail: zxm0760@163.com。

度。(2)临床可报告范围验证实验样本:选择分析测量范围内 NT-proBNP 高浓度样本(10 000~35 000 pg/mL)5 份,要求外观澄清,无溶血、无黄疸、无脂血,用 NT-proBNP 专用稀释液分别对每份样本作 2、5、10 倍稀释。

1.3 分析测量范围验证实验 (1)按照 EP6-A 文件确定分析总误差的要求,并根据有关专业组织要求 NT-proBNP 检测不精密度 $CV \leqslant 10\%$ 的质量目标,确定本实验室的重复性和线性允许误差范围分别为 5% 和 10%。(2)依照厂商要求和操作规程,对 Roche Cobas E601 电化学发光分析仪进行维护、保养、校准和质量控制,质控在控条件下,将配制好的系列浓度实验样本上机检测,每个浓度重复测量 2 次。(3)计算系列浓度血清 2 次测量结果的重复测量误差,判断不精密度是否符合实验要求。(4)在不精密度符合实验要求的条件下,进行多项式回归分析,将测定数据分别拟合为一次多项式模型 $Y = b_0 + b_1 X$ 、二次多项式模型 $Y = b_0 + b_1 X + b_2 X^2$ 和三次多项式模型 $Y = b_0 + b_1 X + b_2 X^2 + b_3 X^3$,用 t 检验判断拟合二次回归多项式模型的非线性系数 b_2 及三次回归多项式模型的非线性系数 b_2 和 b_3 与 0 的差异是否有统计学意义。如有,则判断为非线性,否则为线性。当存在非线性时,根据回归标准误的大小,以最小者确定为最适拟合模型。(5)实验数据判断为非线性时,计算线性偏离: $DL_i = P(X_i) - (b_0 + b_1 X_i)$, $P(X_i)$ 为最适多项式在每个稀释浓度处的预期值。将每个浓度的线性偏离百分比与线性允许误差相比较,若在线性允许误差范围内,则引入的误差不超过临床允许误差目标,实验室按线性关系来处理;若在线性允许误差范围外,则舍去某组数据。缩小分析测量范围后,再次进行多项式回归分析,若多项式回归有明显改善,非线性系数或线性允许误差均符合要求,则缩小的分析测量范围是真实的分析测量范围。

1.4 临床可报告范围验证实验 依照厂商要求和操作规程对 Roche Cobas E601 电化学发光分析仪进行维护保养。校准和质量控制,质控在控条件下,将制备好的实验样本在 Roche Cobas E601 电化学发光分析仪上检测,检测结果与稀释后的预期值进行比较,计算稀释回收率:稀释回收率 = (实测值/预期值) × 100%。参考仪器说明书和有关文件,稀释回收率 90%~110% 为可接受性的判断标准,从而确定标本稀释的最大倍数,结合功能灵敏度,确定临床可报告范围。

1.5 统计学处理 所有数据在 Excel 2003 办公软件及 SPSS 11.5 统计软件上完成。

2 结 果

2.1 分析测量范围 9 个系列浓度样本 NT-proBNP 的重复测量结果见表 1。每个浓度 2 次测量结果的重复测量误差 $CV = 0.6\%$, 小于设定的允许不精密度 5%, 重复测定误差符合实验要求。实验数据进行多项式回归分析,结果见表 2。将统计结果进行 t 检验,结果三次多项式模型非线性系数 b_2 和 b_3 与 0 比较,差异无统计学意义;二次多项式模型非线性系数 b_2 和 0 比较,差异有统计学意义,且有最小回归标准误,所以本实验测量数据的最适模型为二次多项式。根据测量均值计算二次多项式和一次多项式的预期值及线性偏离(DL),结果显示,除低浓度样本(1 号管) DL 值大于设定的允许误差范围外,其他 8 个系列浓度水平样本的 DL 值均小于设定的线性允许误差 10%。故分析测量范围上限可确定为 35 126 pg/mL。

2.2 临床可报告范围实验结果 NT-proBNP 稀释回收率测定结果,见表 3。回收率 90%~110% 为可接受,5 份样本的最大稀释度均为 1:2,分析测量范围上限乘以最大稀释度即为

临床可报告范围上限($35 126 \times 2 = 70 252 \text{ pg/mL}$),实验所得 NT-proBNP 的功能灵敏度为 8.82 pg/mL,故本检测系统测定 NT-proBNP 的临床可报告范围为 8.82~70 252 pg/mL。

表 1 NT-proBNP 测量结果 (pg/mL)

样本号	测量结果 1	测量结果 2	测量均值	差值
1	4.78	4.89	4.835	0.11
2	3 606	3 554	3 580	52
3	7 291	7 373	7 332	82
4	11 404	11 328	11 366	76
5	16 016	15 832	15 924	184
6	20 865	20 914	20 889.5	49
7	24 836	24 797	24 816.5	39
8	30 359	29 991	30 175	368
9	35 120	35 132	35 126	12

表 2 NT-proBNP 多项式回归分析结果

阶别	系数符号	系数值	系数 SE	t 检验	自由度	回归标准误
1	b_0	-5 484.198 3	531.795	-10.313	16	732.012 9
	b_1	4 412.702 7	94.502 5	46.694	16	—
2	b_0	-3 580.688 8	340.870 2	-10.505	15	267.891 7
	b_1	3 374.424 7	156.514 3	21.56	15	—
	b_2	103.827 8	15.264 5	6.802	15	—
3	b_0	-3 165.206	591.399 9	-5.352	14	273.532 5
	b_1	2 976.568 5	484.942 9	6.138	14	—
	b_2	198.255 7	109.779 9	1.806	14	—
	b_3	-6.295 2	7.244 5	-0.869	14	—

—: 表示无数据。

表 3 NT-proBNP 稀释回收率测定结果

样本浓度 (pg/mL)	稀释倍数	实测值 (pg/mL)	预测值 (pg/mL)	回收率 (%)
11 548	1:2	5 725	5 774	99.2
	1:5	2 396	2 309.6	103.7
	1:10	1 183	1 154.8	102.4
22 358	1:2	10 406	11 179	93.1
	1:5	4 140	4 471.6	92.6
	1:10	1 988	2 235.8	88.9
29 662	1:2	13 528	14 831	91.2
	1:5	5 175	5 932.4	87.2
	1:10	2 425	2 966.2	81.8
33 080	1:2	14 778	16 540	89.3
	1:5	5 253	6 616	79.4
	1:10	2 675	3 308	80.9
34 812	1:2	15 791	17 406	90.7
	1:5	5 768	6 962.4	82.8
	1:10	2 808	3 481.2	80.7

3 讨 论

AMR 是指患者标本不经稀释或浓缩等任何处理,由检验方法或检测系统得到可靠测量结果的范围^[9]。它是反映仪器及分析方法分析性能的重要指标,也是保证临床检测结果准确、可靠的前提,更是建立临床可报告范围的基础。目前,评价 AMR 的方法主要有目测法、平均斜率法和 CLSI 评价方案^[9-10]。其中 CLSI EP6-A 方案采用多项式回归分析方法评价线性,使用二元一次直线回归、二次与三次的曲线回归统计处理,以统计估计值与真实检测值的差异(统计误差)来判断,统计误差最小的为最适直线或曲线。EP6-A 文件不仅在分析过程中利用统计理论保证了结果的准确性和代表性,而且将线性评价与临床目标紧密结合,通过设定方法学允许偏倚,可以在临床可接受范围内扩大对分析方法呈线性的认可范围,大大提高了临床实验室对检测项目评价的有效性。因此,被公认为目前评价 AMR 最好的方法,故本研究选用 EP6-A 文件进行 AMR 评价。

本文应用 EP6-A 文件进行 AMR 验证,从统计学理论得出各浓度点的最适多项式为二次多项式,进而计算线性偏离程度,发现 1 号样本(测量浓度均值为 4.835 pg/mL)的线性偏差远远超出所设定的线性允许误差 10% 的要求,理论上表现为非线性。但 EP6-A 文件计算线性偏离时是采用最适多项式与直线回归估计值(而非测量均值)的差值来表达。如本文结果所示,呈曲线关系的数据采用直线回归时,降低了斜率并且增加了截距,从而使低值水平的数据点处在回归直线之下,直线回归的估计值明显偏高,导致该数据点的最适多项式与直线回归估计值的差异明显增大,以致超出所设定的线性允许误差,理论上得出非线性的结论,此现象为业界证实并公认的 EP6-A 文件本身所存在的统计方法的缺陷。此外,NT-proBNP 的医学决定限为 125 pg/mL,在低值情况下(如本文中 4.835 pg/mL 的浓度点)无重要临床意义,在低值时仍按线性来处理,所产生的误差不会对临床诊断和治疗产生明显影响。因此,本实验得出的 AMR 为 5~35 126 pg/mL,厂商声明的 AMR 依然得到验证确认。

Rawlins 等^[1]对 Roche E170 电化学发光免疫系统测定 NT-proBNP 的 AMR 进行了评价,用专用稀释液将浓度为 20 974 pg/mL 的 NT-proBNP 校准验证品稀释成系列浓度,实测值和预期值进行相关分析与回归分析,结果在 42~20 974 pg/mL 范围内实测值和预期值的相关系数大于 0.99,实测值与预期值的平均回收偏差小于 10%。Yeo 等^[2]对 Roche E1010、E2010 和 E170 电化学发光免疫检测系统的多中心评价结果显示,NT-proBNP 在精密度 6.1% 的条件下,采用直线回归分析方法,得出的 AMR 为 30~35 000 pg/mL,回归方程为 $Y=1.07X-193.2$,相关系数(r)=0.99。本文结果显示,AMR 为 5~35 126 pg/mL,上限浓度与 Yeo 等^[2]的报道一致。

临床可报告范围是指样本通过稀释、浓缩或其他的预处理,由检验方法或检测系统得到准确测量结果的范围。本文临

床可报告范围的实验结果显示,在 AMR 内,原始样本浓度越高,稀释回收率随稀释倍数的增大而明显降低,此现象可能系稀释后的基质效应所致。本研究结果显示,最大允许稀释度为 1:2,与厂商推荐的稀释度一致。此外,5 个浓度水平在 1:2 稀释的等同条件下所得的稀释回收率虽在 90% 以上,但随着浓度增高,稀释回收率有下降趋势。在临床应用中,NT-proBNP 的高值更具诊断、监测和治疗意义,对于 2~4 级的心力衰竭患者,NT-proBNP 浓度很可能大于 35 000 pg/mL,必须经过稀释才能得到准确结果;但当原始浓度大于 35 000 pg/mL 时,即使进行 1:2 稀释,所得结果也将产生约 10% 的负偏差,若进行 1:10 的稀释,结果将产生约 20% 的负偏差,在临床应用时必须引起注意。

参考文献

- [1] 张秀明,郑松柏,庄俊华,等.临床化学发光免疫法检测 AFP 的分析性能验证方案与实验方法[J].中华检验医学杂志,2007,30(11):1293-1297.
- [2] 汪隆海,张平,陈启松.定量检测 N 末端脑钠肽对心衰的诊断价值[J].国际检验医学杂志,2009,30(1):23-25.
- [3] 陈恺杰,揭育丽,陈建英.心血管疾病患者血中 N 末端 B 型脑钠肽水平的检测及临床意义[J].国际检验医学杂志,2010,31(5):482-484.
- [4] Abelardo MR, Richards AM, Jone CB, et al. Biology of the natriuretic peptides[J]. Am J Cardiol, 2008, 101(3A):3-8.
- [5] Apple FS, Wu AH, Jaffe AS, et al. National academy of clinical biochemistry and IFCC committee for standardization of markers of cardiac damage laboratory medicine practice guidelines: analytical issues for biomarkers of heart failure[J]. Circulation, 2007, 116(5):e95-98.
- [6] 中华医学会心血管病学分会,中华心血管病杂志编辑委员会.急性心力衰竭诊断和治疗指南[J].中华心血管病杂志,2010,38(3):195-208.
- [7] 中华医学会检验分会.冠状动脉疾病和心力衰竭时心脏标志物临床检测应用建议[J].中华检验医学杂志,2006,29(9):774-778.
- [8] Clinical and Laboratory Standards Institute. EP-6A User demonstration of performance for precision and accuracy[S]. Wayne, PA: CLSI, 2004.
- [9] 杨有业,张秀明.临床检验方法学评价[M].北京:人民卫生出版社,2008:168-195.
- [10] 郑松柏,张秀明,庄俊华,等.化学发光免疫法检测甲胎蛋白临床可报告范围的建立[J].中国现代医学杂志,2008,14(18):2069-2071.
- [11] Rawlins M, Owen WE, Roberts WL. Performance characteristics of four automated natriuretic peptide assays[J]. Am J Clin Pathol, 2005, 123(3):439-445.
- [12] Yeo KT, Wu AH, Apple FS, et al. Multicenter evaluation of the Roche NT-proBNP assay and comparison to the biosite triage BNP assay[J]. Clin Chim Acta, 2003, 338(1/2):107-115.

(收稿日期:2011-01-09)

参数与统计量

描述总体特征的数值为参数,通常是未知的,一般用希腊字母表示,如 μ 、 σ 、 π 等。描述样本特征的数值为统计量,是已知的或可计算获得的,用英文字母表述,如 S 、 P 等。从总体中随机抽样可获得样本,以样本为基础、通过统计推断(参数估计、假设检验)可获得对总体的认识。