

9232.

[2] CLSI. EP-15A2 User demonstration of performance for precision and accuracy[S]. CLSI, 2004.

[3] Clinical and Laboratory Standards Institute. EP-17A Protocols for determination of limits of detection and limits of quantitation[S]. Wayne, PA: CLSI, 2004.

[4] 张秀明, 郑松柏, 庄俊华, 等. 临床化学发光免疫法检测 AFP 的分析性能验证与实验方法[J]. 中华检验医学杂志, 2007, 30(11): 1293-1297.

[5] 王凡, 蒋红君. 电化学发光免疫分析仪检测甲胎蛋白的性能验证[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(10): 1047-1049.

[6] 李观强, 叶有玩, 万彦彬, 等. 某型号免疫分析仪甲胎蛋白分析性能验证[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(13): 1502-1504.

[7] 杨有业, 张秀明. 临床检验方法学评价[M]. 北京: 人民卫生出版社出版, 2008: 142-167.

[8] Tang WH, Francis GS, Morrow DA, et, al. National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine Practice Guidelines: clinical utilization of cardiac biomarker testing in heart failure[J]. Clin Biochem, 2008, 41(4/5): 210-211.

[9] 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(1): 107.

(收稿日期: 2012-04-23)

• 检验仪器与试剂评价 •

### 3 种肌钙蛋白 I 试剂在自动生化仪上的分析性能验证

陈浩全<sup>1</sup>, 曾嫚妮<sup>2</sup>

(1. 广西玉林市骨科医院检验科, 广西玉林 537000; 2. 广西玉林市第一人民医院检验科, 广西玉林 537000)

**摘要:**目的 对 3 种应用于自动生化分析仪的胶乳增强免疫比浊法检测血肌钙蛋白 I(cTnI)试剂进行分析性能验证, 并初步应用于临床。方法 参考 CLSI EP6-A、EP15-A、EP7-P 方案对 3 种方法的精密度、线性范围、干扰因素(胆红素、血红蛋白、乳糜)进行评估, 并与美国贝克曼库尔特公司生产的化学发光免疫分析仪及配套试剂进行比对。参考 CLSI C28-A2 方案对试剂 A、B、C 的参考范围进行验证, 评估试剂 A、B、C 与贝克曼 ACCESS2 化学发光免疫分析仪判定 cTnI 异常的一致率。结果 试剂 A、B、C 的 CV 批内、CV 总均小于试剂盒声明不精密度, 定量测定下限可分别达 0.11、0.23、0.07 ng/mL, 基本满足检测要求, 线性范围分别为 0.12~26.3 ng/mL( $r=0.994$ ), 0.20~25.3 mg/L( $r=0.997$ ), 0.10~26.9 mg/L( $r=0.999$ ), 线性相关均良好。胆红素、血红蛋白、乳糜浊度分别不超过 684  $\mu\text{mol/L}$ 、3.88 g/L 及 1 240 FTU 时, 对试剂 A 检测结果无显著干扰, 试剂 B、C 后两项数值较试剂 A 高。乳糜血清标本高速离心后, 试剂 A、B、C 测定 cTnI 浓度较离心前的平均偏倚分别为 -7.31%、1.42%、1.02%。试剂 A、B、C 与 ACCESS2 化学发光免疫分析仪检测结果具有较好相关性和一致性。结论 应用于自动生化分析仪的 3 种胶乳增强免疫比浊法测定 cTnI 试剂盒, 具有较高的精密度和灵敏度, 与 ACCESS2 化学发光免疫分析仪结果相关良好; 可满足临床测试要求。但抗干扰能力存在差异, 部分试剂参考范围也有待进一步验证。

**关键词:** 肌钙蛋白 I; 指示剂和试剂; 胶乳增强免疫比浊法; 参考值

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2012.20.048 文献标识码: A 文章编号: 1673-4130(2012)20-2541-03

肌钙蛋白是心肌组织的 1 种特有调节蛋白<sup>[1]</sup>。肌钙蛋白 I(cTnI)是 1 种分布在心肌细胞内的蛋白, 肌钙蛋白复合物由 3 个亚单位组成: cTnC、cTnT、cTnI。cTnC 是钙离子结合位点, cTnT 能结合原肌球蛋白, cTnI 是抑制性亚单位<sup>[2]</sup>, 可抑制肌球蛋白与肌动蛋白结合, 调节心肌的收缩。cTnI 比 cTnT 特异性高<sup>[3]</sup>, 且在 AMI 早期, cTnI 水平变化幅度比 cTnT 大, 显示出较高的敏感性<sup>[4]</sup>。cTnI 作为心肌细胞损伤敏感性和特异性最强的标志物之一, 是公认的判断 AMI 患者心肌细胞损伤、危险分层和反映其预后的主要生化标志, 所以 cTnI 可作为心血管疾病有价值的诊断指标<sup>[5-6]</sup>。cTnI 测定方法很多, 化学发光法一般成本较高, 需要特定的化学发光免疫分析仪, 测试速度相对较慢, 不利于广泛应用, 而胶乳增强免疫比浊法用于一般生化仪即可测定, 操作简便, 具有更广阔的推广空间。本室在 HITACHI7180 自动生化仪上对 3 种胶乳增强免疫比浊法 cTnI 试剂盒的精密度、线性范围、灵敏度、抗干扰能力、参考范围验证等性能进行评价, 并与美国贝克曼库尔特公司的化学发光免疫分析仪 ACCESS2 进行了方法学比对, 结果报道如下。

#### 1 材料与与方法

**1.1 样本来源** (1)精密度验证混合血清: 将已知 cTnI 浓度的患者血清混合, 制备高、低浓度(约 11.01 ng/mL 和 1.03 ng/mL)两份混合血清, 各分装 20 份于 -20℃ 冻存用于精密度试验。(2)干扰试验血清: 收集高、低 cTnI 浓度两份患者混

合血清(约 6.01 ng/mL 和 0.65 ng/mL)用于干扰试验。(3)乳糜干扰血清: 留取 2011 年 6 月肉眼观察明显呈乳糜状态的门诊患者血清 36 份, 用于临床患者的乳糜血清标本对 cTnI 的干扰试验。(4)比对血清: 从 2011 年 6 月门诊患者血清标本中选取 90 份(其中 30 份来自心内科就诊的已明确诊断的患者), 用于 3 种胶乳增强免疫比浊法试剂与化学发光免疫分析仪比对及判断 cTnI 符合率初步评估。(5)参考范围验证血清: 参照 CLSI28-A2 文件<sup>[7]</sup>, 从 2011 年 6 月体检人群中选取肝功能正常的健康者 120 例, 其中男 60 例, 女 60 例, 年龄 20~83 岁, 用于参考范围验证试验。

#### 1.2 仪器与试剂

**1.2.1 仪器** HITACHI7180 全自动生化分析仪, Beckman Coulter 公司生产的化学发光免疫分析仪 ACCESS2。

**1.2.2 试剂** 试剂 A: 宁波美康; 试剂 B: 太原川至; 试剂 C: 四川迈克。化学发光试剂由 Beckman Coulter 公司提供。各公司的配套校准品。国际试剂株式会社出品的干扰物(批号 79371, 其中: 游离胆红素 3 300  $\mu\text{mol/L}$ , 结合胆红素 3 403  $\mu\text{mol/L}$ , Hb 4 850 mg/dL, 乳糜浊度 15 500 FTU)。日本第一化学药品株式会社出品的 TG(批号: 808RIG/812RKG)。

#### 1.3 方法

**1.3.1 精密度评价** 依据 CLSI EP15-A 文件所提供方案<sup>[8]</sup>, 用 3 种试剂分别测定高、低 2 个水平(cTnI 浓度约 11.01 ng/

mL 和 1.03 ng/mL) 的混合血清, 连续测 5 d, 每天测 4 次。计算各水平的  $CV_{\text{批内}}$ 、 $CV_{\text{总}}$ , 并确认其不精密度范围是否与厂商标注不精密度符合。

**1.3.2 灵敏度评价** 同一批内连续测定 0 水平校准品 10 次, 同时选择一低水平健康者标本连续测定 3 次, 记录反应吸光度, 并通过以下公式计算定量测定下限<sup>[9]</sup>。与试剂说明书提供的检测下限进行比较, 如高于试剂说明书提供的检测下限, 则根据临床需要判断是否可接受。

**1.3.3 线性范围评价** 用一份低浓度混合血清(L)、一份高浓度混合血清(H)及生理盐水(S), 按以下比例 0.25L+0.75S、0.5L+0.5S、1.0L、0.1H+0.9L、0.2H+0.8L、0.3H+0.7L、0.4H+0.6L、0.5H+0.5L、0.6H+0.4L、0.7H+0.3L、0.8H+0.2L、0.9H+0.1L、1.0H 配成 13 个浓度梯度的混合血清。其预期浓度按公式:  $X = (CL \times VL + CH \times VH) / (VL + VH)$  计算。3 种试剂对混合血清按浓度从低到高各测 3 次, 记录测定结果。按照 CLSI EP6-A 文件<sup>[10]</sup>提供的方案初步检查数据, 检查离群值, 判断重复性, 之后进行多元线性回归, 将结果分别拟合 1 次、2 次、3 次多项式, 并绘制散点图进行评价。

**1.3.4 干扰试验** 参考 CLSI EP7-P 文件提供的方案<sup>[11]</sup>, 进行部分调整后, 将国际试剂株式会社干扰物进行配制, 分别加入到高、低浓度 cTnI 的两份混合血清中, 制成含特定量干扰物的低 cTnI 浓度和高 cTnI 浓度的干扰血清, 以便同时观察干扰物对不同浓度 cTnI 的干扰。两组干扰血清胆红素终浓度分别为 0.342、410、479、547、616、684  $\mu\text{mol/L}$ , Hb 终浓度分别为 0、1.94、2.91、3.88、4.85、6.79、9.7 g/L, 乳糜浊度分别为 0.620、1.240、1.860、2.480、3.100、6.200 FTU。用试剂 A、B、C 分别测定每个浓度混合血清各 2 次, 求均值, 计算添加干扰物后与干扰物为 0 时的偏倚。以超过  $\pm 10\%$  为标准判断是否存在干扰。

**1.3.5 临床患者乳糜血清标本对 cTnI 检测的干扰试验** 留取临床患者乳糜血清标本 36 份, 测定乳糜血清中 TG 含量, 同时应用试剂 A、B、C 分别测定 cTnI 浓度。对乳糜血清标本采用高速离心(12 000 $\times$ g)15min 处理后, 再应用试剂 A、B、C 分别测定下层清亮血清中的 cTnI 浓度。计算离心前后测定的 cTnI 平均偏倚。

**1.3.6 与化学发光法比对试验** 90 份比对血清标本分别用试剂 A、B、C 及贝克曼免疫化学发光仪进行 cTnI 浓度测定。参考 CLSI EP9-A2 文件提供的方案<sup>[12]</sup>, 分别以化学发光仪测定结果为 X, 以试剂 A、B、C 测定结果分别为 Y, 绘制散点图, 目测评价, 显示回归方程  $Y = a + bX$ , 同时计算 3 种试剂与试剂 A、B、C 结果的平均偏倚。

**1.3.7 参考范围验证** 使用试剂 A、B、C 分别测定 120 份参考范围验证血清中 cTnI 浓度, 参考 CLSI28-A2 进行评价<sup>[7]</sup>。应用 SPSS 软件对数据进行正态性检验, 评估 95%CV, 作为初步评估建立的参考范围, 以  $CV \leq 15\%$  为标准比较评估的参考范围与试剂说明书提供参考范围比较。

**1.3.8 与化学发光法的一致率比较** 为比较试剂 A、B、C 与贝克曼免疫化学仪判定患者 cTnI 的结果异常的一致性, 将上述比对试验中 90 例患者的检测结果, 分别按照各试剂提供的参考范围以及本室初步评估建立的参考范围上限为标准, 高于标准为阳性, 低于标准为阴性, 将患者结果判为阳性或阴性。比较试剂 A、B、C 与贝克曼免疫化学仪结果的一致率, 并进行 Kappa 一致性检验。

**1.4 统计学处理** 应用 Microsoft Excel 2003 及 SPSS 16.0 软件进行统计学分析。采用 K-S 正态分布检验检查数据正态

性,  $P > 0.05$  表示数据呈正态分布。相关性分析采用 Pearson 相关分析, 线性回归采用简单线性回归分析, 采用 Wilcoxon 秩和检验比较各试剂检测离心前后血清中 cTnI 结果差异, 以上统计分析显著性水准均为  $\alpha = 0.05$ 。采用 Kappa 一致性检验比较各试剂与化学发光法判定 cTnI 异常时的一致性, 以 Kappa 值大于或等于 0.75 表示两者一致性为优。

## 2 结 果

**2.1 精密度试验** 试剂 A、B、C 的  $CV_{\text{批内}}$  分别为 2.08%~2.20%、2.30%~3.15% 和 1.48%~1.63%,  $CV_{\text{总}}$  分别为 2.29%~2.44%、2.65%~3.18% 和 1.57%~1.49%, 均小于试剂盒声明不精密度。

**2.2 灵敏度评价** 试剂 A、B、C 各自试剂说明书提供的定量下限分别为 0.1、0.33、0.08 ng/mL 本试验中计算得到试剂 A、B、C 对于 cTnI 测定结果的定量下限分别为 0.11、0.53、0.07 ng/mL, 试剂 B 高于厂商标示灵敏度较多。

**2.3 线性范围的评价** 试剂 A、B、C 评价的样品浓度范围分别为 0.12~26.3 ng/mL, 0.20~25.3 ng/mL, 0.10~26.9 ng/mL, 数据组中无明显离群值, 最佳拟合为一次多项式。采用 Pearson 相关分析, 试剂 A、B、C 预期值与实测值拟合相关方程中斜率(b)在 0.95~1.02 之间, 截距(a)与 0 差异无统计学意义( $P > 0.05$ ), 相关系数(r)分别为 0.996、1.023、0.996, 均大于 0.975, 故试剂 A、B、C 的线性范围均良好<sup>[13]</sup>。

**2.4 干扰试验** 以  $\pm 10\%$  为判断标准, 胆红素小于或等于 684  $\mu\text{mol/L}$ 、Hb  $\leq 6.79$  g/L 及乳糜浊度小于或等于 6 200 FTU 时对试剂 C 无显著干扰(小于  $\pm 10\%$ ); 胆红素小于或等于 684  $\mu\text{mol/L}$ 、Hb  $\leq 9.7$  g/L 及乳糜浊度小于或等于 6 200 FTU 时对试剂 B 无显著干扰; 胆红素小于或等于 684  $\mu\text{mol/L}$ 、Hb  $\leq 3.88$  g/L 及乳糜浊度小于或等于 1 240 FTU 时, 对试剂 A 无显著干扰。试剂 A 在测定 cTnI 浓度较低的标本时受 Hb 及乳糜浊度负干扰较为明显。

**2.5 临床患者乳糜血清标本对 cTnI 检测的干扰试验** 患者乳糜血清标本中 TG 平均含量为  $(12.36 \pm 5.6)$  mmol/L。应用 SPSS 软件进行 K-S 正态分布检验, 试剂 A、B、C 测定 36 份标本 cTnI 浓度不服从正态分布( $P < 0.05$ )。应用 Wilcoxon 秩和检验比较各试剂检测离心前后血清中 cTnI 结果的差异, 试剂 A 高速离心前后结果差异有统计学意义( $P = 0.000$ ), 且离心后较离心前平均低 7.31%。试剂 B 离心前后相比差异无统计学意义( $P = 0.856$ ), 平均偏倚为 1.42%。试剂 C 离心前后结果差异亦有统计学意义( $P = 0.015$ ), 但平均偏倚为 1.02%。

**2.6 与贝克曼免疫化学仪比对** 应用 SPSS 软件对试剂 A、B、C 与贝克曼免疫化学仪 cTnI 测定结果进行简单线性回归分析。试剂 A、B、C 与贝克曼免疫化学仪测定结果呈良好的线性关系( $P = 0.001$ ), 但平均偏倚较大, 分别为 25.3%、23.5%、27.6%, 均超过 10%。

**2.7 参考范围验证** 应用 SPSS 软件对 120 例测定结果进行 K-S 正态分布检验, cTnI 结果呈正态分布(P 值分别为 0.658、0.325、0.421)。以  $(\bar{x} \pm 2s)$  作为各试剂初步评估建立的参考范围。根据是否超出原参考范围  $\pm 15\%$  为限, 试剂 A 和 C 初步评估建立的参考范围上限均明显高于说明书提供的参考范围上限, 试剂 B 与说明书提供的参考范围无差异。

**2.8 与化学发光法的一致率比较** 分别以厂商说明书提供的参考范围和本室临床初步评估建立的参考范围为标准。试剂 A、B、C 与贝克曼免疫化学仪测定结果一致率分别为 93%、100%、97%, 经 Kappa 检验, Kappa 值分别为 0.814 ( $P =$

0.000)、1.000( $P=0.000$ )、0.912( $P=0.000$ ),试剂 B 和试剂 C 与化学发光法一致性较好。若采用本室临床初步评估建立的参考范围上限重新评估,试剂 A 判定一致率可提高至 97.6%,Kappa 值为 0.953( $P=0.000$ ),较使用厂商参考范围时显著升高;试剂 C 判定一致率提高至 99%,但试剂 B 和 C 较使用厂商参考范围判定符合率差异无统计学意义,Kappa 值分别为 0.923( $P=0.000$ )、0.923( $P=0.000$ )。

### 3 讨 论

肌钙蛋白作为判断 AMI 重要的生化指标,已被心血管医生广泛接受,但由于肌钙蛋白在外周血中既有游离形式,又有不同复合物的形式(cTnI-cTnC、cTnI-cTnT、cTnT-cTnI-cTnC)<sup>[14]</sup>,不同厂家的抗血清和这些形式中的 cTnI 反应程度有明显差异,导致测定结果不一致<sup>[15]</sup>。c 本室参考 CLSI 文件进行部分调整后对 3 种胶乳增强免疫比浊法试剂的精密性、线性范围、灵敏度、抗干扰能力、参考范围等性能进行了分析评价,并与美国贝克曼库尔特公司的化学发光免疫分析仪 ACCESS2 进行了方法学比对,结果显示 3 种免疫比浊法试剂精密性、线性范围、灵敏度等基本检测性能参数接近化学发光法试剂,满足临床检测需求。

本研究应用外源添加的胆红素、Hb 及乳糜 3 种常见干扰物对试剂进行了干扰测试,发现 3 种试剂的抗干扰能力存在一定差异。胆红素对此方法干扰较小,而 Hb 和乳糜浊度会在一定程度上干扰某些试剂的测定,尤其是乳糜浊度。因此,临床上测定 cTnI 的标本,应避免使用溶血及乳糜血标本。由于 3 种试剂的检测原理均为比浊法,血浆的乳糜浊度会直接影响检测本底,理论上会对结果产生负干扰。添加外源乳糜试验发现 3 种试剂抗乳糜干扰的能力不一,除试剂 B 在低 cTnI 组呈正干扰外,其他结果均符合负干扰,试剂 B、C 抗干扰能力较强(偏差均小于  $\pm 10\%$ ),试剂 A 受外源乳糜负干扰最为显著。为进一步验证此结果并为临床乳糜标本测定 cTnI 提供解决方案,我们采用了对临床患者乳糜标本进行高速离心的处理方式,预期能减少乳糜微粒(主要成分为 TG)对 cTnI 检测的影响,离心后 cTnI 结果应高于离心前。从试验结果看,对 36 份乳糜标本离心后,应用试剂 C 的 cTnI 结果略高于离心前,符合试验预期,且离心前后结果无显著差异,平均偏倚较小;试剂 B 测定结果有升有降,部分标本偏倚较大,平均偏倚较小,离心前后结果无显著性差异。结合外源乳糜干扰试验结果,可得出试剂 C 的抗乳糜干扰能力最佳,试剂 B 抗乳糜干扰能力较强的结论。而试剂 A 试验结果却很特别:外源添加的乳糜对试剂 A 呈负干扰,患者乳糜标本经高速离心处理后,cTnI 结果反而更低,与试验预期结果恰好相反。分析原因,可能与试剂 A 抗体包被的微粒颗粒的大小有关,或者外源性乳糜颗粒与内源性乳糜的成分及颗粒大小不同有关。试验中还发现,乳糜血清中的 TG 浓度,与浊度对试剂 A 的干扰程度无明显线性规律,这是由于乳糜微粒的构成不完全是 TG。

在评估参考范围时,本室初步评估建立的参考范围与试剂说明书提供的参考范围存在一定差异,贝克曼试剂说明书中提到,其参考范围的建立是通过非参数方法计算分布于中间 95%区间的测试人群而得到。但本室 120 例健康者血清 cTnI 水平呈正态分布,因此本室使用( $\bar{x} \pm 2s$ )来评估试剂的参考范

围,国外文献中也有使用( $\bar{x} \pm 2s$ )来验证参考范围的做法<sup>[16]</sup>。此外,实验发现 cTnI 与性别关系不大,而对年龄因素较敏感,本室初步评估建立的参考范围,较说明书提供的参考范围偏高,也可能与验证人群的年龄偏高有关。

在方法学比对试验中,各试剂与化学发光法有很好线性关系,但其偏倚较大,均超过 10%,各试剂相关方程中的斜率(b)及截距(a)之间也均存在显著差异。所以,各试剂与化学发光法结果并不等效。而应用初步验证建立的参考范围来计算与化学发光法在判断 cTnI 异常时的一致率,可使试剂 A 的一致率大大提高,进而也验证了本室初步评估建立的参考范围的适用性。因此在临床应用中,实验室应验证试剂的参考范围,必要时建立自己的参考范围。

### 参考文献

- [1] Bodor GS,porter S,Landt Y,et al. Development of monoclonal antibodies for an assay of cardiac troponin I and preliminary results in suspected cases of myocardial infarction[J]. ClinChem,1992,38(11):2203-2214.
- [2] 何勤,郭呈香. 心肌肌钙蛋白 I 的检测与临床意义[J]. 标记免疫分析与临床,2002,9(2):104-107.
- [3] 杨振华. 生化标志物在缺血性心脏病诊断中的临床价值[J]. 中华医学检验杂志,1997,20(6):330-334.
- [4] 冯品宁,刘敏,崔颖鹏,等. 急性心肌梗死临床应用价值的比较分析[J]. 中国实验诊断学,2008,12(10):1256-1258.
- [5] 李翠. 心肌肌钙蛋白 I、肌红蛋白结合心肌酶谱诊断和监测急性心肌梗死的意义[J]. 现代中西医结合杂志,2008,17(22):3512-3513.
- [6] 张宗英,侯振江,李爱华. 肌钙蛋白及其在心血管疾病诊断中的应用[J]. 现代诊断治疗,1995,7(1):30-32.
- [7] CLSI. C28-A2 How to define and determine reference intervals in the clinical Laboratory; Approved Guideline[S]. 2nd ed. Wayne, PA:CLSI,2000.
- [8] CLSI. EP15-A User demonstration of performance for precision and accuracy; Approved Guideline[S]. Wayne,PA:CLSI,2001.
- [9] 邱玲,程歆琦,鄢盛恺,等. 临床化学方法验证与表格化管理[J]. 现代检验医学杂志,2006,21(4):12-14.
- [10] CLSI. EP6-A Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures[S]. Wayne,PA:CLSI,2003.
- [11] CLSI. EP7-P Interference testing in clinical chemistry; Proposed Guideline[S]. Wayne,PA:CLSI,1986.
- [12] CLSI. EP9-A2 Method comparison and bias estimation using patient samples[S]. Wayne,PA:CLSI,2002.
- [13] 丛玉隆,冯仁丰,陈晓东. 临床实验室管理学[M]. 北京:中国医药科技出版社,2004:96-108.
- [14] 潘柏申. 心肌肌钙蛋白 I 的一些生化特点及其影响测定的因素[J]. 中国临床医学,2001,8(3):309-310.
- [15] 腾万钟. 心脏标志物研究与应用进展[J]. 宁夏医学杂志,2000,22(11):643-645.
- [16] Laterza OF,Price CP,Scott MG. Cystatin C:an improved estimator of glomerular filtration rate? [J]. Clin Chem,2002,48(5):699-707.

(收稿日期:2012-05-09)