

半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 透射比浊检测试剂盒性能验证

何国坚, 胡劲辉, 肖 庆 (广东省深圳市龙岗中心医院 518116)

【摘要】 目的 在 Olympus Au600 全自动生化仪上采用透射比浊法检测半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C(Cys-C), 评价 Cys-C 试剂盒性能指标。**方法** 参考美国临床和实验室标准化协会 EP 系列文件, 对 Cys-C 试剂盒性能指标作出评估。**结果** 透射比浊法有较好的稳定性, 本实验的检出限为 $0.11 \mu\text{g/mL}$; 3 种不同浓度的定值质控血清在准确度评估中相对偏差(Bias)均小于 8%; 3 种不同浓度的临床患者混合血清及 3 种不同浓度的定值质控血清评估精密批内、批间变异系数(CV)均小于 5%; 在线性范围评价中均未发现离群点, 线性回归方程为 $Y=0.017\ 934+0.993\ 2X$, $r=0.993$ 。稀释变异 P 为 $0.42(P_{0.05}=0.684\ 1)$, $P<0.05$, 稀释变异可接受, 线性失拟检查 $G=3.12(F_{0.05}=3.29)$, $G<F_{0.05}$, 线性良好; 干扰试验以 $\text{Bias}<8\%$ 为医学决定水平, 间接胆红素浓度小于 $28.2 \mu\text{mol/L}$, 直接胆红素浓度小于 $29.1 \mu\text{mol/L}$, 血红蛋白浓度小于 9.7 g/L , 乳糜浊度小于 $2\ 583 \text{ FTU}$, Cys-C 相对偏差尚在可接受范围内。**结论** Cys-C 试剂盒稳定性、准确度、精密度、线性范围、抗干扰能力均符合临床检验要求。

【关键词】 半胱氨酸蛋白酶抑制剂; 透射比浊法; 性能评估

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2013.23.033 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2013)23-3155-03

Cysteine protease inhibitor C turbidimetric assay kit Performance verification HE Guo-jian, HU Jin-hui, XIAO Qing (Longgang Central Hospital of Shenzhen, Shenzhen, Guangdong 518116, China)

【Abstract】 Objective To evaluate the cysteine protease inhibitor(Cys-C) kit performance indicators by turbidimetric method, using the Olympus Au600 automatic biochemical analyzer. **Methods** The Cys-C kit performance index was evaluated according to the EP series files of US national clinical and laboratory standardization association (NCCLS). **Results** Turbidimetric method had good stability. The experimental detection limit was $0.11 \mu\text{g/mL}$. The relative deviation(Bias) of three kinds of different concentration of fixed value quality control serum in accuracy evaluation were all lower than 8%. The coefficient of variation(CV) for within-run and between-run assays of three kinds of different concentration of clinical patients mixed serum and three kinds of different concentration of fixed value quality control serum evaluation precision were lower than 5%. In the linear range of the evaluation had been found from the group of point, and the linear regression equation was $Y=0.017\ 934+0.993\ 2X$, $r=0.993$. Dilution variation P was $0.42(P_{0.05}=0.684\ 1)$, $P<0.05$. The dilution variation can be accepted. The linear loss of quasi check was $G=3.12(F_{0.05}=3.29)$, $G<F_{0.05}$. The linear was good. Interference test with relative deviation lower than 8% was the medical decision level, IBil concentration was lower than $28.2 \mu\text{mol/L}$, DBil concentration lower than $29.1 \mu\text{mol/L}$, Hb concentration lower than 9.7 g/L , chyle turbidity lower than 2583, and Cys-C relative deviation was still in the acceptable range. **Conclusion** The Cys-C kit stability, accuracy, precision, linearity and anti-interference ability are all in line with the requirements of clinical testing.

【Key words】 cysteine protease inhibitors; transmission turbidimetry; performance evaluation

临床测定半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C(Cys-C)方法有多种, 诸如单向免疫扩散(SRID)、放射免疫测定(RIA)、荧光免疫测定(FIA)、酶联免疫吸附试验(ELISA)等^[1]。颗粒增强透射免疫比浊法(PETIA)是一种基于多克隆抗体的免疫比浊法, 具有一定的灵敏度, 且所受影响因素较少, 适合于大型生化仪批量操作。本文在 Olympus Au600 全自动生化仪上采用透射比浊法检测 Cys-C, 参考美国临床和实验室标准化委员会(NCCLS) EP 系列文件^[2], 对 Cys-C 试剂盒性能指标作出评估, 现报道如下。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 Olympus Au600 全自动生化分析仪, 试剂由广东虹业科技有限公司提供, R1 为 $10 \text{ mmol/L pH}7.4$ 的磷酸盐缓冲液(PBS), 含 3% 聚乙二醇 8000(PEG8000), R^2 为 Cys-C 抗体, 试剂批号为 20100504、20100505, 使用厂家提供标

准品(纯度大于 95%)及质控品。干扰试剂盒采用 Inter check A plus79370(日本国际试药株式会社), 批号 ZS5001。

1.2 分析参数 采用 2 点法分析, 分析点选择 16、34, 以 340 nm 为主波长, 600 nm 为副波长, 反应温度为 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

1.3 方法 参考 NCCLS EP 系列文件, 对试剂盒稳定性、准确度、精密度、线性范围及干扰试验作出性能评估。

1.3.1 稳定性 以蒸馏水代替标本监测试剂空白吸光值(Abs1)评价试剂稳定性, 连续测定 1 个月, 评价标本稳定性。选择 8 份在试剂盒线性范围内($0\sim6 \mu\text{g/mL}$)的不同浓度临床血清标本, 注意排除溶血及黄疸标本, 连续测定 Cys-C 2 次, 取平均值, 置于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存 7 d; 解冻连续测定 Cys-C 2 次, 取平均值。

1.3.2 准确度 采用 3 种不同浓度的定值质控血清各重复测定 3 次, 计算各浓度 $\bar{x}\pm s$ 及相对偏差(Bias), 以 $\text{Bias}<8\%$ 为医

学决定水平评价试剂盒准确度。

1.3.3 精密度 以 3 种不同浓度的临床患者混合血清及 3 种不同浓度的定值质控血清为检测对象,每日检测 2 次(间隔时间大于 2 h),连续检测 10 d,评价方法的批内及批间变异系数(CV)。

1.3.4 线性范围评价 以 25 次试剂空白均值+3s 计算检出限,在试剂盒标定的线性范围(0~6 $\mu\text{g/mL}$)取高浓度血清标本(5.87 $\mu\text{g/mL}$)为 5 号标本及低浓度标本血清(0.12 $\mu\text{g/mL}$)为 1 号标本,二者 3:1 混合为 2 号标本,等份混匀为 3 号,1:3 混合为 4 号,2~4 号标本浓度计算公式:标本浓度=(C1V1+C5V5)/(V1+V5),C 为浓度,V 为体积。随机排列,每个标本测定 4 次,当天完成测定,检查离群点。

1.3.5 干扰试验 Inter check A plus79370 试剂盒含间接胆红素(IBil)浓度 112.9 $\mu\text{mol/L}$,直接胆红素(DBil)浓度 116.4 $\mu\text{mol/L}$,血红蛋白(Hb)浓度 48.58 g/L,乳糜浊度(15 500 度),将干扰物与临床血清(浓度 2.34 $\mu\text{g/mL}$)按 1:1、1:2、1:3、1:4、1:5、1:6 混合制成不同浓度血清干扰物混合物,检测相对偏差,评价不同干扰物浓度对试剂盒检测的影响。

1.4 统计学方法 采用 SPSS12.0 统计软件及 Excel 软件对

数据进行分析处理。计数资料采用 χ^2 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 稳定性 Abs1 均值为 0.042,s 为 0.002, $n=25$ 次,采用 t 检验比较各标本 2 次均值差异无统计学意义($P>0.05$),透射比浊法具有较好的稳定性。

2.2 准确度 3 种不同浓度定值质控血清测定准确度结果见表 1,不同浓度 3 种定值 Bias<8%,试剂盒测试准确度评估合格。

2.3 精密度 见表 2,参照 NCCLS 机构 EP 文件要求,批内、批间不精密度小于 5%,试剂盒检测精密度符合要求。

2.4 线性范围评价 本研究方法检出限为 0.11 $\mu\text{g/mL}$,离群点检查 $P_{0.05}=0.765$,本组数据均未发现离群点,采用线性回归分析,线性回归方程为 $Y=0.017\ 934+0.993\ 2X$, $r=0.993$,稀释变异 $P=0.42(P_{0.05}=0.684\ 1)$, $P<0.05$,稀释变异可接受,线性失拟检查 $G=3.12(F_{0.05}=3.29)$, $G<F_{0.05}$,线性良好。

2.5 干扰试验 见表 3。以 Bias<8% 为医学决定水平,IBil<28.2 $\mu\text{mol/L}$,DBil<29.1 $\mu\text{mol/L}$,Hb<9.7 g/L,乳糜浊度小于 2 583 FTU,Cys-C 的 Bias 尚在可接受范围。

表 1 3 种不同浓度定值质控血清测定准确度结果

质控品	第 1 次($\mu\text{g/mL}$)	第 2 次($\mu\text{g/mL}$)	第 3 次($\mu\text{g/mL}$)	均值($\mu\text{g/mL}$)	靶值($\mu\text{g/mL}$)	Bias(%)
低值	1.23	1.26	1.25	1.247	1.21	2.48
中值	2.95	2.91	3.01	2.957	2.84	4.12
高值	4.35	4.40	4.41	4.387	4.22	3.96

表 2 临床混合血清、定值质控血清重复性试验标准差、变异系数结果

血清		Cys-C($\mu\text{g/mL}$)						
		检测次数	均值	批内 s	批内 CV(%)	批间 s	批间 CV(%)	总计 s
临床混合血清	低值	20	1.04	0.029	2.79	0.038	3.65	0.042
	中值	20	1.38	0.048	3.48	0.056	4.06	0.060
	高值	20	2.94	0.084	2.17	0.081	2.76	0.091
质控定值血清	低值	20	1.25	0.031	2.48	0.046	3.68	0.056
	中值	20	2.96	0.068	2.30	0.084	2.84	0.092
	高值	20	4.39	0.098	2.23	0.127	2.89	0.135

表 3 干扰试剂盒实验结果

IBil 浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	Cys-C 的 Bias(%)	DBil 浓度($\mu\text{mol/L}$)	Cys-C 的 Bias(%)	Hb 浓度 (g/L)	Cys-Cr Bias(%)	乳糜浊度 (FTU)	Cys-C 的 Bias(%)
56.5	9.2	58.2	8.6	24.3	12.3	7 750	14.6
37.6	8.4	38.8	8.1	16.2	10.6	5 167	12.8
28.2	7.8	29.1	7.7	12.1	9.3	3 875	10.1
22.6	5.9	23.3	5.6	9.7	8.0	3 100	8.6
18.8	4.8	19.4	4.9	8.1	6.5	2 583	7.4
16.1	4.1	16.6	4.4	6.9	3.5	2 214	6.4

3 讨 论

透射免疫比浊法测定 Cys-C 的主要原理是利用 Cys-C 的

多克隆 IgG 抗体共价结合于 Intex 颗粒,与 Cys-C 发生免疫沉淀反应,特定波长比浊,通过标准曲线定量^[3-4]。在检测方法学

的评价中,良好的准确度及精密度是评价的基础,方法学的线性范围、干扰因素及操作易推广性也是重要条件之一,透射免疫比浊法比较适合于 Cys-C 检测的常规方法。

本文对 Cys-C 试剂盒及透射免疫比浊法进行了方法学评估,试剂用量的设置严格按照说明书设置,尽量避免因试剂用量设置不合理造成对方法学精密度、准确度及线性范围的影响。临床患者血清标本于 4℃ 保存,方法学有较好的稳定性,检出限依据试剂空白均值计算得出,低于国外文献[5]报道的参考下限,符合临床应用标准。采用定值血清检测的 Bias 评价准确度均在 8% 以内,检测的准确度良好。精密度评估中考虑临床血清标本与质控定值血清的差异性,采取两组标本不同时间段不同试剂批号检测评估方法学的精密度,其中批内、批间及总 CV 均在允许范围内,批间 CV 稍高于批内 CV,均在可接受范围内。EP-6 文件定义线性范围为系统最终输出值(浓度或活性)与被分析物的浓度呈正比。本研究线性范围评估良好,未发现离群点,测定标本拟合度 $r=0.983$,大于试剂盒要求的 0.97,稀释变异 P 小于 $P_{0.05}$ 界限值,稀释变异尚处于可接受范围,线性良好。干扰试验主要是评估偏倚和不精密度作用,临床标本主要干扰一般为溶血、黄疸及脂血,干扰效果可随干扰物浓度不同发生变化^[6-7]。本文对 IBil、DBil、Hb、乳糜浊度与临床血清标本进行不同比例混合,以 Bias<8% 为医学决定水平^[8],IBil<28.2 μmol/L, DBil<29.1 μmol/L, Hb<9.7 g/L,乳糜浊度小于 2 583 FTU, Cys-C 的 Bias 尚在可接受范围内。

综上所述, Cys-C 透射比浊检测试剂盒的各项性能均符合要求,适合于生化仪的大批量操作,对临床相关疾病的诊断、评估有重要临床意义。

参考文献

[1] 侯振江,魏明.胱抑素 C 及其检测方法研究进展中华心

(上接第 3154 页)

血管病杂志[J]. 国际检验医学杂志, 2007, 28(11): 1013-1015.

信息、国际或国家参考物质、室间质量评价计划或有经验分析人员的判断来定量确定不确定度分量,利用 CV 来定量确定标准不确定度。根据上述分析及目前水平,本实验室的不确定度来源分为批内 CV、批间 CV、偏倚的不确定度 3 个方面进行计算^[9]。本研究对 19 项临床生物化学检测项目的不确定度进行了评估,19 项中低浓度 ALT、ALP、P 及高浓度 ALP 的扩展不确定度值均大于 10,由此可见检测结果与真实值的差波动较大,需进行质量改进。

参考文献

通过不确定度评价,分析主要不确定度分量产生的原因,尽可能降低该类不确定度分量,做到检验工作的持续改进,这也是不确定度评价的目的之一。目前,以室内质量控制及室间质评数据评价实验室检验项目测量不确定度的方法简单、实用,适合于临床实验室。

[2] 吴斌,李一松,贺勇,等. 25 项临床生物化学指标测量不确

- [2] National Committee for Clinical Laboratory Standards. EP9-A method comparison using patient samples[S]. PA, USA: NCCLS, 1995.
- [3] 李海霞,张春丽,徐园宾,等. 健康人群血清半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 与肌酐分布及其评价慢性肾脏病患者肾小球滤过功能的比较研究[J]. 中华检验医学杂志, 2006, 29(11): 970-973.
- [4] 王建琼,牛华,刘莉,等. 透射比浊法和散射比浊法测定血清胱抑素 C 的方法学评价[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(3): 340-343.
- [5] Stowe H, Lawrence D, Newman DJ, et al. Analytical performance of a particle-enhanced nephelometric immunoassay for serum cystatin C using rate analysis[J]. Clin Chem, 2001, 47(8): 1482-1485.
- [6] 叶应妩,王毓三,申子瑜. 全国临床检验操作规程[M]. 3 版. 南京: 东南大学出版社, 2006: 470-471.
- [7] 孙晓慧. 血清胱抑素 C 测定在疾病监测中的应用[J]. 医学综述, 2006, 12(7): 443-445.
- [8] 韩平治,丁进芳,张狮,等. 兰州市健康人血清胱抑素 C 浓度参考范围的调查[J]. 国际检验医学杂志, 2006, 27(2): 176-178.

(收稿日期: 2013-03-20 修回日期: 2013-07-10)

定度的评估[J]. 临床检验杂志, 2012, 30(5): 378-379.

- [3] 胡丽涛,何法霖,王薇,等. 临床检验测量不确定度的评定[J]. 临床检验杂志, 2011, 29(9): 658-659.
- [4] 雷名禄. 临床生化检验测量不确定度的评估[J]. 当代医学, 2013, 19(7): 23-24.
- [5] 陈文祥. 临床检验测量不确定度[J]. 临床检验杂志, 2011, 29(5): 321.
- [6] White GH, Farrance I. Uncertainty of measurement in quantitative medical testing[J]. Clin Biochem Rev, 2004, 25(4): S1-24.
- [7] 鲁涛,李江,赵兴波,等. 临床生物化学实验室测量不确定度的评估[J]. 临床检验杂志, 2010, 28(3): 224-226.
- [8] 陈辉,邓小玲,毕小云,等. 人血清胆固醇常规测量不确定度的研究[J]. 临床检验杂志, 2010, 28(5): 372-374.
- [9] 陈孝红,杨红英,邵文琳. 利用室内质控和室间质评资料计算测量不确定度[J]. 国际检验医学杂志, 2009, 30(2): 194-195.

(收稿日期: 2013-05-01 修回日期: 2013-08-05)