

• 临床检验研究论著 •

# 超敏 C 反应蛋白试剂盒线性范围的验证

赵彩虹

(北京市门头沟区医院检验科生化室 102300)

**摘要:**目的 验证本科室使用的超敏 C 反应蛋白(hs-CRP)试剂盒的线性范围,对该试剂盒的性能进行初步评价。方法 根据临床和实验室标准化协会(CLSI)制定的 EP6-A2 文件,配制 6 个试验样本,按随机顺序对它们进行测定,每个样本重复测定 2 次。经离群点检查后,计算比例误差( $CV_r$ )、多项式回归系数( $b_i$ )、残差( $B_{ij}$ )、标准误( $S_{yx}$ )、线性偏离( $DL_i$ )。结果 所有测试结果未发现离群点, $CV_r$  为 0.40%,小于试剂盒说明书的批内不精密度要求。二次回归多项式非线性系数  $b_2$ 、三次回归多项式非线性系数  $b_3$  与 0 之间差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。二次回归多项式、三次回归多项式的  $S_{yx}$  分别为 0.029 3、0.018 7,三次回归多项式为最适多项式。6 个试验样本的  $DL_i$  最大值为 1.22%,小于美国临床病理学家协会(CAP)要求的非线性差异要求(2.5%)。结论 本科室使用的 hs-CRP 试剂盒在 0~20.5 mg/L 范围内呈线性,与试剂盒中明的线性范围相一致。

**关键词:** C 反应蛋白质; 线性模型; 试剂盒,诊断

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.15.012

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2012)15-1819-03

## Demonstration of linear range of high-sensitive C-reactive protein assay kit

Zhao Caihong

(Biochemical Laboratory, Clinical Laboratory, Hospital of Mentougou District, Beijing 102300, China)

**Abstract: Objective** To demonstrate the linear range of high-sensitive C-reactive protein(hs-CRP) assay kit used in this laboratory, and evaluate the performance of this kit preliminarily. **Methods** According to the EP6-A2 document, described by Clinical and Laboratory Standards Institute(CLSI), 6 samples were prepared, which were detected in duplicate in random order. After outlier test, the proportional error( $CV_r$ ), polynomial regression coefficients( $b_i$ ), residual( $B_{ij}$ ), standard error( $S_{yx}$ ) and deviation from linearity( $DL_i$ ) were calculated. **Results** No outlier was found in all test results, and the  $CV_r$  was 0.40%, less than the within-run imprecision requirements of kit instructions. There was a statistically significant difference between zero and nonlinear coefficient  $b_2$  in quadratic regression polynomial( $P < 0.05$ ), so was  $b_3$  in cubic regression polynomial( $P < 0.05$ ). The  $S_{yx}$  of quadratic regression polynomial and cubic regression polynomial were 0.029 3 and 0.018 7 respectively, and the cubic regression polynomial was optimal. The maximum  $DL_i$  was 1.22%, less than the nonlinear difference requirements of College of American Pathologists (CAP). **Conclusion** The hs-CRP assay kit used in this laboratory might be with linear range from 0 to 20.5 mg/L, in accordance with statement of kit instructions.

**Key words:** C-reactive protein; linear models; reagent kits, diagnostic

线性范围是试剂盒的重要性能指标之一,线性范围较窄的试剂盒在临床上的应用就会受到限制。EP6-A2 文件是 CLSI 在 EP6-A 文件的基础上制定出来的,专用于评价检测系统测定某项目的线性范围<sup>[1-2]</sup>。本研究即利用 EP6-A2 文件验证我科室 hs-CRP 试剂盒的线性范围,现报道如下。

### 1 材料与方 法

#### 1.1 材料

**1.1.1 高值样本(H)** 从患者样本中选择 1 个 hs-CRP 浓度较高的试验样本(测定结果为 20.5 mg/L),吸取其血清待用。

**1.1.2 仪器和试剂** 日本奥林巴斯公司生产的 Olympus AU640 全自动生化分析仪。国外某公司生产的 hs-CRP 试剂盒(颗粒增强免疫透射比浊法),批号为 16449/75460,配套标准品批号为 60064116,配套质控品批号为 14476。

#### 1.2 方法

**1.2.1 配制试验样本** 以生理盐水作为低值样本(L),用高值样本、低值样本按 L、0.8L+0.2H、0.6L+0.4H、0.4L+0.6H、0.2L+0.8H、H 的比例配制 6 个试验样本。

**1.2.2 结果检测** 先进行室内质控,当质控品检测结果在控时再测定试验样本。按随机顺序测定上述 6 个试验样本的 hs-CRP,每个样本重复测试 2 次。

**1.2.3 离群点检查** 以实际浓度为横轴(x 轴),6 个试验样本

的测定结果为纵轴(y 轴)绘制散点图。目视检查该散点图是否存在明显的非线性,以及试验数据中是否存在离群点。

**1.2.4 计算  $CV_r$**   $CV_r = \sqrt{\frac{\sum[r_{i1} r_{i2} - ]^2}{2L}}$ ,  $r_{i1} = \frac{2A_{i1}}{A_{i1} + A_{i2}}$ ,  $r_{i2} = \frac{2A_{i2}}{A_{i1} + A_{i2}}$ ,  $A_{i1}$  为第 i 个样本第 1 次测定结果,  $A_{i2}$  为第 i 个样本第 2 次测定结果。 $CV_r$  可以用于判断随机误差对试验结果的影响。

**1.2.5 多项式回归分析** 对数据进行一次、二次、三次多项式回归分析,回归方程分别为  $Y = b_0 + b_1 X$ 、 $Y = b_0 + b_1 X + b_2 X^2$ 、 $Y = b_0 + b_1 X + b_2 X^2 + b_3 X^3$ ,式中  $b_i$  为回归系数。通过 t 检验,判断二次回归多项式的  $b_2$ 、三次回归多项式的  $b_2$ 、 $b_3$  与 0 之间的差异是否有统计学意义。如果二次回归多项式  $b_2$  与三次回归多项式  $b_3$  与 0 之间的差异均有统计学意义,需要选择最适多项式。

**1.2.6 选择最适多项式** 比较二次回归多项式和三次回归多项式的  $S_{yx}$ ,取  $S_{yx}$  较小的多项式为最适多项式。 $S_{yx}$  的计算方法如下:首先计算  $B_{ij}$ ,该值为测定值与回归曲线计算值之差;

然后根据  $B_{ij}$  计算  $S_{yx}$ :  $S_{yx} = \sqrt{\frac{\sum B_{ij}^2}{2N-2}}$ ,式中 N 为样本个数。

**1.2.7 计算  $DL_i$**   $DL_i$  为最适多项式计算值与一次回归多项

式计算值的绝对差值,计算公式为  $DL_i = p(x_i) - (b_0 + b_1 x_i)$ ;  $p(x_i)$  为最适多项式在点  $x_i$  处的计算值;  $b_0 + b_1 x_i$  为一次回归多项式在点  $x_i$  处的计算值。

**1.3 统计学分析** 采用 SPSS16.0 统计软件包进行多项式回归分析,采用 Excel 2003 绘制散点图,计算  $CV_r$ 、 $B_{ij}$ 、 $S_{yr}$ 、 $DL_i$ 。

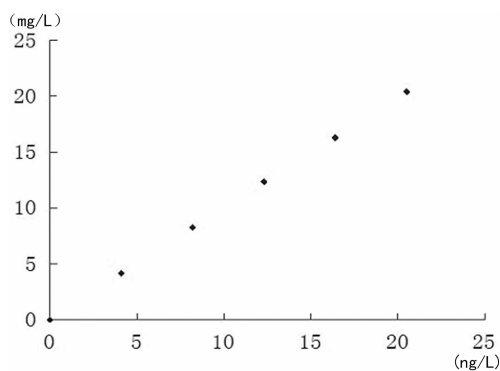
**2 结果**

**2.1 hs-CRP 的测定结果** 对配制好的 6 个试验样本进行 hs-CRP 测定,测得的结果见表 1。

**表 1 6 个试验样本的 hs-CRP 测定结果 (mg/L)**

样本号	实际浓度	第 1 次测定	第 2 次测定	均值	差值
1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2	4.10	4.17	4.21	4.19	-0.04
3	8.20	8.30	8.25	8.28	0.05
4	12.30	12.33	12.38	12.36	-0.05
5	16.40	16.33	16.27	16.30	0.06
6	20.50	20.39	20.43	20.41	-0.04

**2.2 离群值检查** 绘制检测结果散点图,见图 1。由图 1 可知,本研究 12 个数据中没有数据明显偏离其他测定结果,且目视检查未发现明显的非线性,因此上述 12 个数据中没有离群点,可以进行下一步数据处理。



**图 1 检测结果散点图**

**2.3 计算  $CV_r$**  剔除第 1 号样本的数据,计算得到  $CV_r = 0.40\%$ ,小于试剂盒说明书的批内不精密度要求,因此本研究所使用的检测系统的随机误差对试验结果无显著影响,可以进行下一步数据处理。

**表 2 多项式回归分析结果**

多项式次数	系数符号	系数数值	系数标准误	t 检验统计量	自由度	P 值
1	b1	0.992 753	0.002 747	361.394	10	0.0000
1	b0	0.079 286	0.034 100	2.325	10	0.0424
2	b2	-0.001 020	0.000 344	-2.966	9	0.0158
2	b1	1.013 659	0.007 344	138.025	9	0.0000
2	b0	0.022 143	0.032 011	0.692	9	0.5066
3	b3	0.000 129	0.000 050	2.590	8	0.0321
3	b2	-0.004 986	0.001 555	-3.207	8	0.0125
3	b1	1.043 360	0.012 827	81.338	8	0.0000
3	b0	-0.004 524	0.027 076	-0.167	8	0.8715

**2.4 多项式回归分析** 一次、二次、三次多项式回归分析的具体结果见表 2。由表 2 可知,二次回归多项式的  $b_2$ 、三次回归多项式的  $b_3$  与 0 之间的差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),因此需要选择最适多项式。

**2.5 选择最适多项式** 计算二次回归曲线计算值、 $B_{ij}$ 、三次回

归曲线计算值、 $B_{ij}$ ,具体结果见表 3。根据  $B_{ij}$  计算得到二次回归多项式的  $S_{yr} = 0.029 3$ ,三次回归多项式的  $S_{yr} = 0.018 7$ ,因此三次回归多项式为最适多项式。

**表 3 回归曲线计算值与  $B_{ij}$  的计算结果 (mg/L)**

样本号	均值	二次回归曲线计算值	二次回归曲线 $B_{ij}$	三次回归曲线计算值	三次回归曲线 $B_{ij}$
1	0.00	0.02	-0.02	0.00	0.00
2	4.19	4.16	0.03	4.20	-0.01
3	8.28	8.27	0.01	8.29	-0.01
4	12.36	12.34	0.02	12.31	0.05
5	16.30	16.37	-0.07	16.33	-0.03
6	20.41	20.37	0.04	20.40	0.01

**2.6 计算  $DL_i$**  计算 6 个试验样本的  $DL_i$ ,具体结果见表 4。由表 3 可知,6 个试验样本的  $DL_i$  最大值为 1.22%,小于 CAP 要求的非线性差异指标 (2.5%),因此三次回归多项式的非线性程度临床可以接受。

**表 4  $DL_i$  的计算结果**

样本号	实际测定值 (mg/L)	三次回归曲线计算值 (mg/L)	一次回归曲线计算值 (mg/L)	$DL_1$ (mg/L)	$DL_1$ (%)
1	0.00	0.00	0.08	-0.08	-
2	4.10	4.20	4.15	0.05	1.22
3	8.20	8.29	8.22	0.07	0.85
4	12.30	12.31	12.29	0.02	0.16
5	16.40	16.33	16.36	-0.03	-0.18
6	20.50	20.40	20.43	-0.03	-0.15

-:无数据。

**3 讨论**

线性范围是指检测系统结果具有可接受线性的范围,即在此范围内非线性误差小于设定的标准<sup>[3]</sup>。这个概念与可报告范围、临床可报告范围有一定区别,可报告范围是指患者标本未经任何处理,由检测方法得到的可靠的结果范围;临床可报告范围是指某种方法能定量报告的分析值范围,允许样本稀释,通过预处理可延伸该方法的直接测定范围<sup>[4-6]</sup>。线性范围可以采用 EP6-A2 文件确定,而可报告范围、临床可报告范围则不可以。

EP6-A2 文件对确定线性范围的试验设计有着严格的要求<sup>[7-10]</sup>。在试验前,需根据试验目的确定试验样本数目、浓度范围、重复测定次数,本研究的目的是验证 hs-CRP 试剂盒的线性范围,EP6-A2 文件要求在这样情况下,样本数目可控制在 5~7 个,试验样本的浓度范围覆盖试剂盒说明书申明的线性范围,重复测定次数为 2 次。本研究选择配制 6 个试验样本,测试样本 hs-CRP 浓度范围为 0~20.5 mg/L,覆盖试剂盒申明的线性范围 0.05~20 mg/L,每个样本重复测定 2 次。对试验测得的结果,EP6-A2 文件的处理步骤如下:首先,绘制散点图,检查离群点并初步目测线性,如果试验数据存在 1 个离群点时可以剔除,如果存在 2 个以上的离群点或明显的非线性时须查找原因并纠正。本研究中,散点图未见离群点与明显的非线性,因此可以进行下一步数据处理。其次,EP6-A2 文件对  $CV_r$  有一定的要求。 $CV_r$  主要反映的是随机误差对线性评价实验的影响,它来源于检测系统的随机变异,可降低 EP6-A2 文件检测非线性的能力<sup>[11-12]</sup>。如果  $CV_r$  过大,那必须查找检测系统精密密度偏低的原因,纠正该原因后重新进行实验。本研

究计算得到的  $CV_r$  为 0.40%，小于试剂盒说明书的批内不精密度要求，因此本研究中随机误差对试验结果无显著影响。再次，EP6-A2 文件要求对试验数据进行一次、二次、三次多项式回归分析，并判断非线性系数与 0 是否有统计学差异。如果非线性系数与 0 无统计学差异，那么一次回归多项式就是最适多项式，试验结果在测试样本浓度范围内呈线性；如果非线性系数与 0 有统计学差异，那么试验结果在测试样本浓度范围内呈非线性，但这不能说明非线性已经影响到患者的结果。本研究中，二次回归多项式非线性系数  $b_2$ 、三次回归多项式非线性系数  $b_3$  与 0 之间差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )，此时需比较二次回归多项式和三次回归多项式的  $S_{yr}$ ，取  $S_{yr}$  较小的多项式为最适多项式。本研究计算得到二次回归多项式、三次回归多项式的  $S_{yr}$  分别为 0.029 3、0.018 7，因此三次回归多项式为最适多项式。最后，EP6-A2 文件要求计算最适多项式的  $DL_i$ ，如果  $DL_i$  均小于规定的标准，说明非线性度可以接受，可以认为试剂盒在试验样本的浓度范围内仍然呈线性。本研究中，6 个试验样本的  $DL_i$  最大值为 1.22%，小于 CAP 要求的非线性差异指标 2.5%，因此三次回归多项式的非线性度临床可以接受。综上所述，本科室使用的 hs-CRP 试剂盒在 0~20.5 mg/L 范围内呈线性，与试剂盒申明的线性范围相一致。

参考文献

[1] Clinical and Laboratory Standards Institute. EP6-A2, Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures; a statistical approach[S]. Wayne PA: CLSI, 2003.

[2] 吕赛平, 刘琴, 邹学森. 应用 EP6-A2 方法验证血糖试剂盒的线性范围[J]. 实验与检验医学, 2011, 29(1): 45-46, 59.

[3] 冯仁丰. 临床检验质量管理技术基础[M]. 2 版. 上海: 上海科学技术文献出版社, 2007: 39-50.

[4] Clinical and Laboratory Standards Institute. EP9-A2, Method Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples: a statistical approach[S]. Wayne PA: CLSI, 2002.

[5] Kroll MH, Praestgaard J, Michaliszyn E, et al. Evaluation of the extent of nonlinearity in reportable range studies[J]. Arch Pathol Lab Med, 2000, 124(9): 1331-1338.

[6] Brady GR, Fienup JR. Measurement range of phase retrieval in optical surface and wavefront metrology[J]. Appl Opt, 2009, 48(3): 442-449.

[7] 吕赛平, 邹学森. 定量检测系统线性评价方法-EP6-A 法[J]. 实验与检验医学, 2009, 27(3): 303-304, 334.

[8] 杨志钊, 缪丽韶, 黄福达. CD3700 测定白细胞线性范围的验证[J]. 国际检验医学杂志, 2009, 30(4): 326-327.

[9] 张蓓, 何乐春. 对用增量法检测尿微量白蛋白测定试剂盒线性范围的探讨[J]. 中国医药导报, 2012, 9(12): 118-119.

[10] 林英辉, 吴敬林. 拓展生化仪检测试剂线性范围的探讨[J]. 广西医学, 2002, 24(12): 2094-2095.

[11] 谢永富, 孙红勋. 临床生化检测线性范围的应用及临床意义[J]. 河北医药, 2008, 30(1): 79-80.

[12] 马斌荣. 医学统计学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2008.

(收稿日期: 2012-01-09)

(上接第 1818 页)

界值对深部真菌感染的诊断敏感度、特异度、阳性预测值、阴性预测值和准确率分别为 70.14%、87.23%、65.16%、89.56% 和 82.89%，提示其与痰涂片查真菌或痰培养一致性较好，对深部真菌感染的早期诊断有意义。

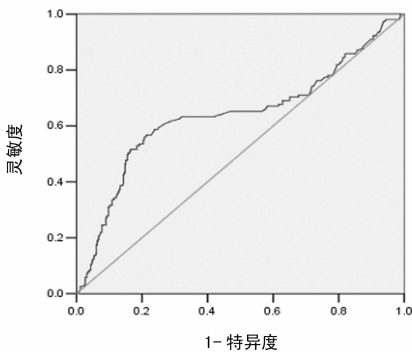


图 1 真菌 G 实验结果和痰涂片查真菌或痰培养结果 ROC 曲线

3 讨论

3.1 本研究能对深部真菌感染早期诊断提供依据，有效避免了真菌培养需要时间较长，涂片查真菌敏感性较差等缺点，对真菌感染的早期诊断与治疗具有重要意义。

3.2 本研究属于回顾性试验，受每日质控水平和操作水平影响较小，纳入标本量大，结果可靠。人体成分错综复杂且瞬时变化，加上检测误差等等因素使得检验结果呈现出统计分布特点，通过回顾比对将临床信息、检验信息和患者信息联系起来，对本身具有统计分布属性的检验结果进行数据挖掘，提炼成为有临床价值的重要信息是检验医学临床实践的关键<sup>[7-10]</sup>。

3.3 在进行数据挖掘过程中，数据的采集、纳入标准、排除标

准、项目取舍、预测、诊断、评估模型的适用范围显得非常重要，否则将会导致错误结论。

参考文献

[1] 王应芳, 朱金芬, 李恕君, 等. 深部真菌感染高危因素调查分析[J]. 国际检验医学杂志, 2009, 30(7): 717-719.

[2] Presterl E, Parsehalk B, Bauer E, et al. Invasive fungal infections and (1,3)-beta-D-glucan serum concentrations in long-term intensive care patients[J]. Int J Infect Dis, 2009, 13(6): 707-712.

[3] 刘佳庆, 张丽霞, 刘雅, 等. (1,3)-β-D 葡聚糖在侵袭性肺部真菌感染的诊断价值[J]. 中国医学检验杂志, 2010, 11(1): 10-12.

[4] 左向华, 陈建魁, 于农, 等. 侵袭性真菌感染患者 (1,3)-β-D 葡聚糖检测的临床价值[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(3): 220-223.

[5] 吕沛华, 赵蓓蕾, 施毅, 等. (1,3)-β-D 葡聚糖检测诊断侵袭性真菌感染的临床价值[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2007, 30(1): 31-34.

[6] 刘鹏江, 邓琦, 李玉明. G 试验阴性的急性白血病合并侵袭性真菌感染 3 例报告[J]. 山东医药, 2011, 51(9): 116.

[7] 郑旅芳, 王开正. 血清胃肠肿瘤标志物诊断大肠癌的数据挖掘[J]. 现代检验医学杂志, 2010, 25(2): 270-272.

[8] 王开正, 陶华林. 检验医学信息学[M]. 成都: 四川科学技术出版社, 2004: 180-185.

[9] 胡琼英, 彭瑛, 王开正, 等. 鳞癌与腺癌患者血清差异蛋白质组分析[J]. 山东医药, 2011, 51(15): 22-24.

[10] 丁银环, 胡琼英, 梁双花, 等. 运用内标校准法提高表面增强激光解吸电离飞行时间质谱检测中的重复性[J]. 中华检验医学杂志, 2009, 32(3): 337-339.

(收稿日期: 2011-12-05)