

基于微流控技术的血清淀粉样蛋白 A 和 C-反应蛋白 检测试剂性能评价

沃燕波*

(阿里生物技术泰州有限公司, 泰州 225300)

摘要: 目的 评价基于微流控技术的血清淀粉样蛋白 A 和 C-反应蛋白检测试剂的分析性能, 以判断其是否能满足临床需求。**方法** 参照 CLSI EP 方案对检测试剂的精密度、准确度、线性范围和干扰试验等技术指标进行测定。**结果** 血清淀粉样蛋白 A 检测试剂测定高、低浓度样本的批内变异系数分别为 0.54% 和 1.79%, 批间变异系数分别为 0% 和 1.20%, C-反应蛋白检测试剂测定高、低浓度样本的批内变异系数分别为 0.30% 和 2.28%, 批间变异系数分别为 0.17% 和 0%; 两者方法学比对实验结果分别为 $Y = -0.0609 + 0.9871X$, $R^2 = 0.9975$ 和 $Y = 0.3354 + 0.9857X$, $R^2 = 0.9990$, 允许误差均大于预期偏差可信区间的上限, 偏倚均可接受; 血清淀粉样蛋白 A 检测试剂的线性范围为 3~100.0 mg/L, C-反应蛋白检测试剂的线性范围为 3~150.0 mg/L。**结论** 基于微流控技术的血清淀粉样蛋白 A 和 C-反应蛋白检测试剂分析性能可满足临床实验室需求。

关键词: 血清淀粉样蛋白 A; C-反应蛋白; 微流控; 分析性能评价

Evaluation of the performance of serum amyloid A analyze performance evaluation and C-reactive protein detection reagents based on microfluidic technology

WO Yan-Bo*

(Ali Biotechnology Taizhou Co., Ltd., Taizhou 225300, China)

ABSTRACT: Objective To evaluate the analytical performance of serum amyloid A protein and C-reactive protein detection reagents based on microfluidic technology, so as to determine whether they can meet clinical requirements. **Methods** The precision, accuracy, linear range, interference test and other technical indicators of the detection reagent were determined according to the CLSI EP scheme. **Results** The intra-batch coefficients of variation of high and low concentration samples were 0.54% and 1.79%, and the inter-batch coefficients of variation were 0% and 1.20%, respectively, for the serum amyloid A detection reagent; the intra-batch coefficients of variation of high and low concentration samples were 0.30% and 2.28%, and the inter-batch coefficients of variation were 0.17% and 0%, respectively, for the C-reactive protein detection reagent; the experimental results of the methodological comparison of the two methods were $Y = -0.0609 + 0.9871X$, $R^2 = 0.9975$ and $Y = 0.3354 + 0.9857X$, $R^2 = 0.9990$, respectively, and the allowable errors were greater than the upper limit of the expected bias confidence interval, and the biases were acceptable; the linear range of the serum amyloid A detection reagent was 3~100.0 mg/L, and the linear range of the C-reactive protein detection reagent was 3~150.0 mg/L. **Conclusion** The analytical performance of serum amyloid A and C-reactive protein detection reagents based on microfluidic

* 通信作者: 沃燕波, 博士, 高级工程师, 研究方向为医疗器械体外诊断。E-mail: peggywyb@aliyun.com

*Corresponding author: WO Yan-Bo, Ph.D, Senior Engineer, Ali Biotechnology Taizhou Co., Ltd., Taizhou 225300, China. E-mail: peggywyb@aliyun.com

technology can meet the needs of clinical laboratories.

KEY WORDS: serum amyloid A protein; C-reactive protein; microfluidic technology; analyze performance evaluation

0 引言

血清淀粉样蛋白 A (Serum amyloid A, SAA), 是一种急性时相反应蛋白, 在机体受到感染时最快 4 小时就能明显升高, 当病原体清除后 SAA 能够迅速下降到正常水平。SAA 对病毒感染有着非常高的敏感性, 目前临床上常用于感染性疾病的早期诊断, 鉴别诊断, 病情监测及预后评估等方面^[1-3]。C-反应蛋白 (C-reactive protein, CRP) 是机体受到微生物入侵或组织损伤等炎症性刺激时由肝脏合成的急性相蛋白, 是细菌类感染典型指标, 病毒感染时 CRP 一般不升高^[4]。SAA 和 CRP 联合检测可早期识别病毒和细菌感染, 当两者同时升高时, 提示可能是细菌感染, 如果 SAA 升高而 CRP 不升高, 提示可能是病毒感染^[5-6]。本文依照临床检验方法的评价 (CLSI-EP) 系列文件^[7-9], 对基于微流控技术的 SAA 和 CRP 二联检测试剂的分析性能进行了评估, 以期为其临床应用提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

SAA 测定试剂盒 (批号: 2022082301, 阿里生物技术泰州有限公司); CRP 测定试剂盒 (批号: 2022101703, 阿里生物技术泰州有限公司)。

1.2 实验方法

(1) 精密度试验

参照 EP5-A2 文件^[7], 每天取 SAA 和 CRP 高、低浓度混合样本进行测定, 每个样本重复测定 2 次, 连续测定 20 天, 分别计算批内、批间、日间和室内的精密度标准差及变异系数。

(2) 准确度试验

按 EP-9A 文件评价^[8], 取浓度在线性范围内均匀分布的 SAA 和 CRP 临床样本各 40 份, 每天测定 8 份, 连续测定 5 d, 每个标本均按正反顺序重复测定 2 次, 将检测结果与全自动生化分析仪试剂检测结果进行统计分析, 计算回归方程和相关系数, 并对两方法的偏倚进行评估。

(3) 线性评价

按 EP-6A 文件评价^[9], 将接近线性范围上限的高浓度样本和接近线性范围下限的低浓度样本按比例混合, 共稀释成 11 个梯度浓度。从低浓度样本开始, 每个稀释浓度采用 SAA 和 CRP 二联检测试剂进行测定, 重复 5 次。计算线性回归方程及相关系数。

1.3 统计学处理

采用 Excel 软件对所有数据进行统计处理及作图分析。

2 结果与分析

2.1 精密度试验

实验结果如表 1-2 所示, 结果显示, SAA 测定高、低浓度样本的批内精密度变异系数 (Coefficient of Variation, CV) 分别为 0.54% 和 1.79%; 批间精密度 CV 分别为 0% 和 1.20%, 测定高浓度样本的批间精密度为 0, 说明高浓度的批间变异几乎都由批内变异形成; 日间精密度 CV 分别为 0.07% 和 0.56%; 室内精密度 CV 分别为 0.54% 和 2.23%。CRP 测定高、低浓度样本的批内精密度 CV 分别为 0.30% 和 2.28%; 批间精密度 CV 分别为 0.17% 和 0%, 测定低浓度样本的批间精密度为 0, 说明低浓度的批间变异几乎都由批内变异形成; 日间精密度 CV 分别为 0.14% 和 0.69%; 室内精密度 CV 分别为 0.37% 和 2.35%。CV 均在 10% 的可接受范围内, 说明课题组研制开发的 SAA 和 CRP 检测试剂精密度较好, 可为临床接受。

表 1 SAA 和 CRP 二联检测试剂精密度实验检测结果

Table 1 Test results of the precision experiment of SAA and CRP dual detection reagents

项目 编号 组别	SAA				CRP			
	低值 (mg/L)		高值 (mg/L)		低值 (mg/L)		高值 (mg/L)	
	第一批 均值	第二批 均值	第一批 均值	第二批 均值	第一批 均值	第二批 均值	第一批 均值	第二批 均值
1	16.8	16.2	80.3	80.6	18.2	18.6	158.4	158.0
2	16.2	16.7	81.3	81.0	19.1	18.7	157.1	156.8
3	16.8	16.5	80.9	80.2	18.2	18.5	157.2	157.2
4	16.9	17.0	80.3	80.5	18.8	18.1	157.9	157.9
5	16.6	16.9	80.0	80.5	18.4	18.5	157.8	157.8
6	16.3	17.0	80.3	80.5	18.8	19.0	156.8	157.6
7	17.1	16.6	80.1	81.1	17.7	18.2	157.5	157.8
8	16.6	16.2	80.6	80.5	18.9	18.5	157.6	157.1
9	16.7	16.3	81.0	80.5	18.8	18.5	157.4	156.7
10	15.8	16.5	80.7	80.8	19.0	18.7	158.4	157.8
11	16.4	16.7	80.5	81.2	18.4	18.7	156.6	157.8
12	16.3	16.1	80.2	80.6	18.7	18.3	157.4	157.4
13	16.3	16.1	80.7	80.5	18.2	18.6	157.1	157.7
14	16.2	16.9	80.4	80.8	18.7	18.3	157.6	157.3
15	16.6	16.6	80.6	80.9	19.0	18.0	158.1	157.9
16	16.6	16.4	80.4	80.5	18.6	18.6	157.1	157.6
17	16.1	16.1	80.5	80.3	18.7	18.6	158.5	157.5
18	16.2	16.8	80.8	80.4	18.2	17.9	156.9	157.4
19	16.2	16.4	80.2	80.2	18.6	18.4	157.8	157.7
20	16.3	16.7	80.5	80.4	18.2	18.7	156.8	158.1

表2 SAA和CRP二联检测试剂精密度实验统计结果
Table 2 Statistical results of the precision experiment of SAA and CRP dual detection reagents

项目	组别	批内		批间		日间		室内	
		Sr	CV%	Srr	CV%	Sdd	CV%	ST	CV%
SAA	高浓度	0.44	0.54	0	0	0.05	0.07	0.43	0.54
	低浓度	0.30	1.79	0.20	1.20	0.09	0.56	0.37	2.23
CRP	高浓度	0.48	0.30	0.26	0.17	0.22	0.14	0.59	0.37
	低浓度	0.42	2.28	0	0	0.13	0.69	0.43	2.35

2.2 准确度试验

以全自动生化分析仪测定结果为参考方法，结果如表3所示，SAA和CRP测定两方法间的线性回归方程分别为 $Y=-0.0609+0.9871X$ 和 $Y=0.3354+0.9857X$ ，相关系数R分别为0.9975和0.9990，说明课题组研制开发的试剂与参考方法全自动生化分析仪法的结果相关性良好，试剂准确度能为临床所接受。

预期偏倚及可信区间比较结果见表4。当SAA的浓度为10 mg/L时，计算得预期偏差95%可信区间上限和下限分别为0.4835 mg/L和-0.8642 mg/L，允许偏倚为0.5 mg/L，允许误差大于预期偏差可信区间的上限，偏倚可接受；当CRP的浓度为20 mg/L时，计算得预期偏差95%可信区间上限和下限分别为0.6556 mg/L和-0.5581 mg/L，允许偏倚为1 mg/L，允许误差大于预期偏差可信区间的上限，偏倚可接受，本课题组研制开发的试剂准确度较好，符合EP-9A文件对临床检测试剂的要求。

表3 SAA和CRP二联检测试剂准确度试验结果
Table 3 Accuracy of SAA and CRP dual detection reagent

项目	Y=a+bX	r
SAA	$Y=-0.0609+0.9871X$	0.9975
CRP	$Y=0.3354+0.9857X$	0.9990

表4 SAA和CRP二联检测试剂预期偏倚及可信区间比较
Table 4 Expected bias and confidence intervals of SAA and CRP dual detection reagent

项目	允许偏倚 (mg/L)	预期偏差95%可信区间 (mg/L)		偏倚评估
		上限	下限	
SAA	0.5	0.4835	-0.8642	可接受
CRP	1	0.6556	-0.5581	可接受

2.3 线性评价

结果如图1-2所示，当SAA浓度在3~100 mg/L范围时，计算得线性相关系数 $R^2=0.9995$ ，线性相关方程为 $Y=1.0027X+0.5141$ ；当CRP浓度在3~150 mg/L范围时，计算得线性相关系数 $R^2=0.9993$ ，线性相关方程为 $Y=0.9942X+1.0112$ ，

本课题组研制开发的试剂可满足临床实验室日常检测需求。

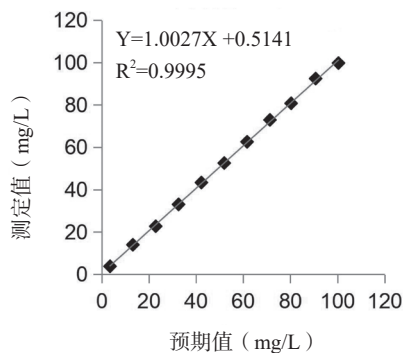


图1 SAA检测试剂线性范围实验结果
Fig.1 Linear range of SAA detection reagent

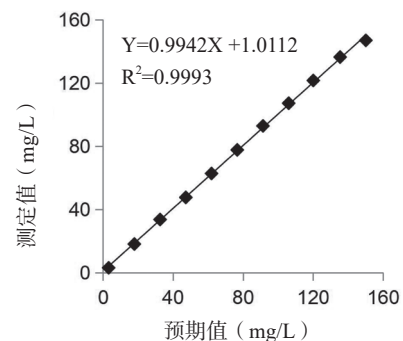


图2 CRP检测试剂线性范围实验结果
Fig.2 Linear range of CRP detection reagent

3 讨论与结论

感染是对人类健康造成威胁的重要病因之一，目前临床常以SAA和CRP作为早期诊断感染性疾病的检测指标。当二者含量同时升高时，提示机体发生细菌感染的可能；而当仅SAA显著升高，CRP不升高或小幅升高时，说明机体处于病毒感染的早期。因此，临床采用SAA与CRP联合检测来早期鉴别细菌或病毒感染，从而为进一步治疗提供参考^[5-6]。目前临床主要采用以下两种方法对其进行测定：1. 采用化学发光法和免疫比浊法在大型设备上对SAA和CRP进行定量测定，但该方法因涉及到大型设备的采购、使用和维护等，基层医疗机构没有能力开展，限制了其临床应用^[10-12]；2. 采用荧光免疫层析技术对SAA和CRP进行半定量测定，受自身方法学的局限，其结果与中心实验室的结果在准确度和精密度方面有一定的差距^[13]。近年来，随着检验技术的进步，便携式的体外诊断产品得到了飞速的发展。结合微流控芯片技术的POCT分析仪兼具低成本，高准确度，操作简单等优点，非常适合在基层医疗机构开展应用，其出现开创了POCT发展的新局面，将体外诊断产品的发展推进到了快车道^[14-15]。

本文参考临床检验方法的评价(CLSI-EP)系列文件^[7-9]，对课题组研制开发的基于离心式微流控技术的SAA和CRP检

测试剂进行了分析性能的系统评价,结果表明 SAA 检测试剂测定高、低浓度样品的批内变异系数分别为 0.54% 和 1.79%, 批间变异系数分别为 0% 和 1.20%, CRP 检测试剂测定高、低浓度样品的批内变异系数分别为 0.30% 和 2.28%, 批间变异系数分别为 0.17% 和 0%, 精密度可为临床接受;方法比对实验结果显示, SAA 和 CRP 检测试剂的允许误差均大于预期偏差可信区间的上限, 偏倚均可接受;线性范围结果显示, SAA 和 CRP 的线性范围分别为 3~100.0 mg/L 和 3~150.0 mg/L, 可满足临床实验室日常检测需求。基于微流控技术的 SAA 和 CRP 二联检测试剂分析性能良好, 可满足临床实验室需求。

参考文献

- [1] 刘锦燕, 赵珺涛, 项明洁. 血清淀粉样蛋白 A 在疾病中的作用机制及应用研究进展 [J]. 检验医学, 2021, 36(07): 756-760.
- [2] 林华兰, 林美玫, 吴明, 等. 儿童感染性腹泻病原菌类型及血清 SAA, CRP 水平对感染的鉴别价值分析 [J]. 中国病原生物学杂志, 2023, 18(08): 961-964.
- [3] 周鹏, 付安, 林艳, 等. 血清 25-羟维生素 D₃、白细胞介素-6 及血清淀粉样蛋白 A 在儿童肺炎中的应用研究 [J]. 检验医学与临床, 2023, 20(06): 721-724.
- [4] 尹琳琳, 朱一堂, 王文龙. 降钙素原、C 反应蛋白、血清淀粉样蛋白 A 在儿童细菌性与非细菌性医院获得性肺炎中的鉴别诊断价值 [J]. 医学综述, 2022, (02): 406-410,416.
- [5] 徐雪萍, 杨茜岚, 谢丹, 等. 维生素 A, SAA 和 CRP 联合检验在儿童感染性疾病中的诊断价值 [J]. 中国医药科学, 2022, 12(21): 11-14.
- [6] 张玉鹄. 联合检测 SAA, CRP 和血常规在儿童上呼吸道感染性疾病鉴别诊断中的应用 [J]. 医药卫生, 2022, (05): 0203-0206.
- [7] NCCLS. Evaluation of precision performance of clinical chemistry devices: Approved Guideline [S]. Wayne, PA: NCCLS, 1999
- [8] NCCLS. Method Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples; Approved Guideline [S]. Wayne, PA: NCCLS, 2002.
- [9] NCCLS. Evaluation of the linearity of quantitative analytical methods: A Statistical Approach; Approved Guideline [S]. Wayne, PA: NCCLS, 2003.
- [10] 邵燕, 刘淑明, 周小凤, 等. 一种血清淀粉样蛋白 A 试剂在雅培 C16000 生化分析仪上的性能验证 [J]. 标记免疫分析与临床, 2020, 27(11): 1990-1994.
- [11] 刘爱玲, 刘爱胜, 凌秀婷, 等. GP 1200 干式荧光免疫定量分析仪检测 PCT、SAA 及 IL-6 项目性能评价 [J]. 生物医学工程与临床, 2023, 27(05): 675-679.
- [12] 赵晓君, 朱宇清, 陈子齐, 等. 免疫散射比浊法检测血清淀粉样蛋白 A 的性能验证及评价 [J]. 国际检验医学杂志, 2023, 44(S01): 78-82.
- [13] 吴萌, 魏治静. 人血清淀粉样蛋白 A 荧光免疫层析检测试剂盒的研制 [J]. 现代医药卫生, 2020, 36(14): 2170-2173.
- [14] MOU L, JIANG X. Materials for Microfluidic Immunoassays: A Review [J]. Adv Healthc Mater, 2017, 6(15): 1601403.
- [15] JUNG W, HAN J, CHOI J W, *et al.* Point-of-care testing (POCT) diagnostic systems using microfluidic lab-on-a-chip technologies [J]. Micro Eng, 2015, 132(jan.):46-57.

作者简介

沃燕波, 博士, 高级工程师, 研究方向为医疗器械体外诊断。