

• 论 著 •

# 电化学发光免疫分析仪检测甲胎蛋白的性能验证

王 凡<sup>1</sup>, 蒋红君<sup>2</sup>

(1. 云南省第一人民医院检验科, 昆明 650032; 2. 昆明医学院附属昆华医院检验科 650032)

**摘 要:**目的 验证电化学发光免疫分析法(ECLIA)检测甲胎蛋白(AFP)的基本分析性能,同时探讨适用于 ECLIA 检测系统分析性能验证模式。方法 参照相关的文件,分别用 ECLIA 检测 AFP 的精密度、准确度、临床可报告范围和参考区间。结果 测定均值为 11.90 IU/mL 的样本,验证后批内精密密度为 0.28 IU/mL,总精密密度为 0.45 IU/mL;测定均值为 237.23 IU/mL 的样本,验证后批内精密密度为 2.85 IU/mL,总精密密度为 3.50 IU/mL,均与厂家声明一致;高、低浓度定植质控品检测结果与靶值的相对偏差均小于 5%,5 份室间质控品检测结果与靶值的相对偏倚为 -0.41%~6.61%;分析测量范围为 0.514~992.7 IU/mL (厂家线性范围 0.5~1 000 IU/mL),临床可报告范围 0.514~158 832 IU/mL;参考区间与厂家声明(0.0~5.8 IU/mL)一致。结论 罗氏 2010 电化学发光免疫分析仪测定 AFP 的主要分析性能均与厂家声明一致;厂家提供的参考区间可以接收;验证方案和实验方法简便、可行。

**关键词:** 甲胎蛋白类; 性能验证; 电化学发光免疫分析法

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.10.012

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2011)10-1047-03

## Performance verification of electrochemiluminescence immunoassay system in the detection of alpha fetoprotein

Wang Fan<sup>1</sup>, Jiang Hongjun<sup>2</sup>

(1. Department of Clinical Laboratory, the First People's Hospital of Yunnan Province, Kunming, Yunnan 650032, China;

2. Department of Clinical Laboratory, Kunhua Hospital Affiliated to Kunming Medical College, 650032, China)

**Abstract:** **Objective** To verificate the basic analytical performance of the electrochemiluminescence immunoassay(ECLIA) system in the detection of alpha fetoprotein (AFP) and explore a suitable verification mode of ECLIA. **Methods** The precision, accuracy, clinical reportable range and reference interval of Elecsys 2010 ECLIA system in the detection of AFP were analyzed according to related guidelines. **Results** The within-run precision, total precision were 0.28 and 0.45 IU/mL, according to the samples with AFP level of 11.90 IU/mL, and according to the samples with AFP level of 237.23 IU/mL, the two parameters were 2.85 and 3.50 IU/mL, all be consistent with manufacturer's claim. The relative bias between the ceasured results of controls at high and low level and each target value were both less than 5%, and the relative bias between the measured results of EQA controls at five levels and target values were -0.41%~6.61%. The verified analytical range was 0.514~992.7 IU/mL, within the manufacturer calimed liner range. The clinical reportable range was 0.514~158 832 IU/mL. The verified eference interval was 0.0~5.8 IU/mL and consistent with manufacturer's claimed. **Conclusion** The main analytical performance of Roche 2010 ELICA system in the detection of AFP were consistent with manufacturer's claim. The manufacturer claimed reference interval was acceptable. The performance verification procedure and experimental methods in this research are simple and practicable.

**Key words:** alpha-fetoproteins; analytical performance; electrochemiluminescence immunoassay

根据美国《临床实验室改进法案修正案》以及 2003 年国际标准化组织发布的《医学实验室认可标准 ISO15189》,均要求临床实验室在开展某一检测项目前,提供并保留相关的方法学验证实验数据,即某一检测项目在正式用来检测患者标本、发出检验报告前,实验室需对其相关方法学分析性能予以验证,对厂商提供的评价资料中的主要性能予以确认。对封闭系统只需做基本性能验证,即精密度、准确度、临床可报告范围和参考区间验证实验<sup>[1]</sup>。作者参照相关文件,对电化学发光检测甲胎蛋白(AFP)的上述 4 项性能进行验证,现报道如下。

### 1 材料与与方法

**1.1 样本** 英国朗道公司高、低值免疫质控品,批号分别为:637EC、642EC;2008 年卫生部临床检验中心第 2 次全国肿瘤标志物室间质评质控品,批号:200821~200825;混合高、低值 AFP 标本各 1 份;健康体检成人血清 20 份。

**1.2 仪器及试剂** 罗氏 Elecsys 2010 全自动电化学发光免疫分析仪。罗氏电化学发光 AFP 试剂盒,批号:152172;配套校准品,批号:181641;通用稀释液。

**1.3 方法** 按照操作说明书的要求对仪器进行常规的保养和维护,每天进行常规质控(2 个浓度水平),质控在控后进行验证实验。

**1.3.1 精密度验证实验** 按照 EP10-A<sub>2</sub>《临床实验室定量方法的初步评价》对 AFP 测定的精密度进行验证,通过实验得到估计的批内标准差( $s_{批内}$ )和总的标准差( $s_{总}$ ),并与厂家声明的批内标准差和总标准差比较<sup>[2]</sup>。

**1.3.2 准确度的验证** 通过对英国朗道公司高、低浓度的定植质控品进行检测,查询质控品说明书,选择罗氏 Elecsys 2010 仪对应的靶值及允许范围,并分别计算绝对偏差和相对偏差;对 2008 年卫生部临床检验中心第 2 次全国肿瘤标记物室间质评质控品进行检测,检测值与已知的“靶值”和可接受限进行比较。

**1.3.3 临床可报告范围的验证** 参照杨志钊等<sup>[3]</sup>对白细胞线性范围的验证,收集高浓度的患者血清,要求外观澄清,浓度接近或超过厂商提供测量范围高限。将几份血清混和离心,形成高值样品(H),同样方法收集 AFP 低值样品(L),其中 L 测定

值为 3.3 IU/mL, H 的测定值为 993.9 IU/mL。H 和 L 按 20 L、19L+1H、18L+2H、14L+6H、10L+10H、8L+12H、6L+14H、4L+16H、2L+18H、20H 的关系配制, 形成系列浓度血清。将制备好的系列浓度血清在罗氏 Elecsys 2010 全自动电化学发光仪上重复测定 2 次, 记录结果; 将 H 进行 2、10、20、40、80、160 倍稀释, 同时, 取 1 份蒸馏水作为空白对照, 重复测定 2 次, 记录结果。

**1.3.4 参考范围的验证** 选择 20 份健康成人的血清对其 AFP 进行测定。

2 结 果

**2.1 精密度** 罗氏公司声明 Elecsys 2010 电化学发光法检测 AFP 的批内精密密度为 3%, 总精密密度为 6%, 因为  $s_{\text{批内}} < 2/3s_{\text{总}}$ , 所以作者每天分析 2 个浓度水平的室内质控品, 每个浓度重复测定 4 次, 连续 5 d<sup>[1]</sup>。结果见表 1、2。

表 1 电化学发光法检测 AFP 精密密度验证  
低值样品 (IU/mL)

| 组别   | 第 1 天 | 第 2 天 | 第 3 天 | 第 4 天 | 第 5 天 |
|------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 重复 1 | 12.00 | 11.80 | 12.00 | 11.98 | 11.97 |
| 重复 2 | 12.10 | 11.90 | 12.02 | 12.02 | 11.86 |
| 重复 3 | 11.70 | 11.71 | 11.80 | 12.59 | 11.83 |
| 重复 4 | 12.00 | 11.27 | 11.81 | 11.96 | 11.64 |

对 L 测定均值为 11.90 IU/mL, 厂家声明的  $s_{\text{批内}} < 0.36$  IU/mL,  $s_{\text{总}} < 0.71$  IU/mL。验证的  $s_{\text{批内}} = 0.28$  IU/mL,  $s_{\text{总}} = 0.45$  IU/mL, 均处于厂家声明的允许范围内。

表 2 电化学发光法检测 AFP 精密密度验证  
高值样品 (IU/mL)

| 组别   | 第 1 天  | 第 2 天  | 第 3 天  | 第 4 天  | 第 5 天  |
|------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 重复 1 | 236.60 | 237.30 | 237.70 | 239.50 | 238.10 |
| 重复 2 | 235.30 | 234.10 | 236.50 | 242.50 | 237.90 |
| 重复 3 | 235.20 | 236.10 | 236.20 | 241.10 | 235.30 |
| 重复 4 | 236.20 | 234.80 | 235.40 | 243.10 | 235.60 |

对 H 测定均值为 237.23 IU/mL, 厂家声明的  $s_{\text{批内}} < 7.11$  IU/mL,  $s_{\text{总}} < 14.23$  IU/mL。验证的  $s_{\text{批内}} = 2.85$  IU/mL,  $s_{\text{总}} = 3.50$  IU/mL, 均小于厂家声明的允许范围。

表 3 AFP 测定值与预期值结果 (IU/mL)

| 系列浓度血清  | 检测结果 1  | 检测结果 2 | 平均值       | 预期值    |
|---------|---------|--------|-----------|--------|
| 空白      | 0.507   | 0.52   | 0.513 5   | —      |
| 20L     | 3.570   | 3.42   | 3.495 0   | 3.30   |
| 19L+1H  | 56.250  | 57.00  | 56.625 0  | 52.83  |
| 18L+2H  | 109.800 | 106.90 | 108.350 0 | 102.36 |
| 14L+6H  | 317.600 | 313.60 | 315.600 0 | 300.48 |
| 10L+10H | 507.500 | 505.70 | 506.600 0 | 498.60 |
| 8L+12H  | 614.700 | 623.50 | 619.100 0 | 597.66 |
| 6L+14H  | 724.200 | 718.90 | 721.550 0 | 696.72 |
| 4L+16H  | 833.400 | 843.10 | 838.250 0 | 795.78 |
| 2L+18H  | 926.800 | 931.00 | 928.900 0 | 894.84 |
| 20H     | 995.900 | 989.50 | 992.700 0 | 993.90 |

—: 无数据。

**2.2 准确度** 对英国朗道公司高、低浓度定植质控品进行检测, 查询质控品说明书, 选择罗氏 Elecsys 2010 仪对应的靶值及允许范围, 并分别计算: 绝对偏差 = 测定值 - 靶值, 相对偏差 = 绝对偏差 / 靶值  $\times 100\%$ 。结果显示, 低浓度质控品的 AFP 测定值与厂家给出靶值的绝对偏差为 0.3 IU/mL, 相对偏差为 2.5%; 高浓度质控品的 AFP 测定值与厂家给出靶值的绝对偏差为 2.23 IU/mL, 相对偏差为 0.95%, 均明显小于根据生物学变异导出的总允许误差 5.0%。对 2008 年卫生部临床检验中心第 2 次全国肿瘤标记物室间质评质控品进行回顾性检测, 检测值与已知的“靶值”和可接受限进行比较, 偏倚 = (验证结果 - 靶值) / 靶值  $\times 100\%$ , 偏倚为:  $-0.41\% \sim 6.61\%$ , 均在可接受范围内。从表 1、2 可知, 对于 H、L, 验证的 AFP 测定批内精密密度及总精密密度均与厂家声明一致。

**2.3 临床可报告范围** 罗氏公司声明的电化学发光法测定 AFP 的线性范围为 0.5~1 000 IU/mL, 为验证其分析测量范围, 对配制好的系列浓度血清进行双份检测, 其中 L 测定值为 3.3 IU/mL, H 的测定值为 993.9 IU/mL, 同时取 1 份蒸馏水作为空白对照, 结果见表 3。

预期值为 X, 测量均值为 Y, 作散点图, 目测呈 1 条直线, 在 Microsoft Excel 2000 上作直线回归, 预期值与测量均值的散点图见图 1。

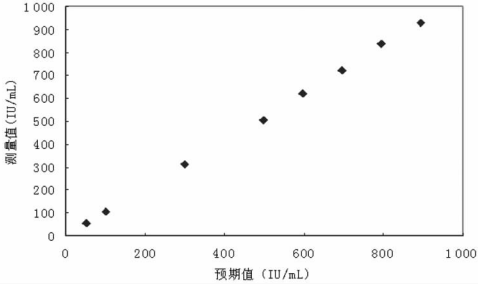


图 1 AFP 预期值与测量均值散点图

为评估 AFP 的临床可报告范围, 对每份倍比稀释样品重复测定 2 次, 计算稀释回收率, 稀释回收率 = (测定值 / 预期值)  $\times 100\%$ 。按仪器要求, 回收率 90%~110% 时, 结果可接受, 见表 4。

**2.4 参考区间** 罗氏公司提供欧美人群的 AFP 测定参考区间为 0.0~5.8 IU/mL, 作者选择 20 例健康成人个体 (男、女各 10 例) 作为参考个体, 比较小样本参考区间和厂家提供参考区间之间的可比性。如果 20 例参考个体中不超过 2 例 (或 10% 的结果) 的观察值在厂家提供的参考区间之外, 厂家提供的 95% 参考区间可以接受, 也就是说, 可以直接引用厂家提供的参考区间<sup>[4-5]</sup>。测量结果见表 5。

结果显示, 20 例参考个体, 仅有 1 例的 AFP 检测结果大于 5.8 IU/mL, 为 6.5 IU/mL, 所以, 可以直接引用厂家提供的参考区间作为实验室的 AFP 测定的参考区间。

从上述直线回归结果得知,  $r^2 = 0.998 5$ , 说明组成回归线的所有数据点紧紧贴近回归线, 预期值与测量值之间相关性极好; 斜率为 1.019, 在 0.97~1.03 之间, 从经验上判断, 斜率与 1 之间无差异<sup>[6]</sup>; 截距为 6.44, 与线性范围上限 995.9 相比, 值很小, 作截距与 0 差异的 t 检验 ( $P < 0.05$ ), 截距是由统计时引入的, 实际的标准曲线能够通过原点。取蒸馏水空白的平均测定值 0.514 IU/mL 为分析测量范围的下限, 高值血清的平均测定值 992.7 IU/mL, 为分析测量范围的上限, 电化学发光法

检测 AFP 的分析测量范围为 0.514~992.7 IU/mL,与厂家声明的分析测量范围非常接近。

表 4 稀释回收率测定结果

| 稀释比例  | 测量值 1<br>(IU/mL) | 测量值 2<br>(IU/mL) | 平均值<br>(IU/mL) | 预期值<br>(IU/mL) | 回收率<br>(%) |
|-------|------------------|------------------|----------------|----------------|------------|
| 1:2   | 537.50           | 535.70           | 536.600        | 498.600 000    | 107.621 30 |
| 1:10  | 109.80           | 106.90           | 108.350        | 102.360 000    | 105.851 90 |
| 1:20  | 54.30            | 56.0             | 55.150         | 52.830 000     | 104.391 40 |
| 1:40  | 25.23            | 25.44            | 25.335         | 24.847 500     | 101.96 20  |
| 1:80  | 11.86            | 12.29            | 12.075         | 12.423 750     | 97.192 88  |
| 1:160 | 5.78             | 5.36             | 5.570          | 6.211 875      | 89.666 97  |

表 5 20 例参考个体的 AFP 测量结果(IU/mL)

| 性别 | 1    | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    | 7    | 8    | 9    | 10   |
|----|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 男  | 5.69 | 0.68 | 6.50 | 2.27 | 2.27 | 0.83 | 3.47 | 3.87 | 1.02 | 1.21 |
| 女  | 2.14 | 2.74 | 5.56 | 3.30 | 1.28 | 1.14 | 3.48 | 1.22 | 2.84 | 1.83 |

3 讨 论

临床实验室修正规(CLIA)规定了检测系统性能评估的最基本要求为精密度、准确度、可报告范围和参考区间,即医学实验室至少必须对所选用的检测系统的上述 4 项性能指标进行验证<sup>[7]</sup>。临床实验室的验证实验不同于厂家在建立检测系统时进行的建立实验,也不同于厂家确认其检测系统性能时的确认实验,要求使用简便、快捷、便于操作的方法来验证厂家已经声明的性能参数。

对于精密度的验证,目前国内主要参考 CLSI EP6-A,准确度的验证主要参考 EP9-A<sub>2</sub>。精密度性能是检测系统的基本分析性能之一,也是其他方法学评价的基础,国内临床实验室对样品只作单次测量便发出报告,所以精密度性能更是至关重要。EP10-A<sub>2</sub>《临床实验室定量方法的初步评价》使用户通过最小的努力即可核实厂家声明的精密度性能,使用该方案对电化学发光测定 AFP 的批内不精密度和总不精密度进行验证,厂家声明的批内不精密度为 3%,总不精密度为 6%。表 1、2 结果显示,低 AFP 测定值样本验证的  $s_{批内}$  为 0.28 IU/mL,  $s_{总}$  为 0.45 IU/mL;高 AFP 测定值样本验证的  $s_{批内}$  为 2.85 IU/mL,  $s_{总}$  为 3.5 IU/mL,均小于厂家声明值。所以对于高值和低值样本,验证的 AFP 测定批内精密度及总精密度均符合厂家声明的范围。

准确度性能是检测系统或方法重要的分析性能之一。在方法学性能评价实验中的重要性仅次于精密度评价实验,是临床可报告范围、分析灵敏度及参考区间等评价实验的基础。对于准确度,CLIA 要求可以通过检测商品化的校准品或定植质控品、具有确定值的能力比对实验调查样本或有参考方法检测结果的患者标本等来评估准确性<sup>[8]</sup>。本研究通过对英国朗道公司高、低值定植质控品进行检测显示,低值质控品的 AFP 测定的相对偏差为 2.5%,高值质控品的相对偏差为 0.95%,明显小于生物学变异导出的总允许误差 5.0%。表 4 结果显示,通过对 2008 年卫生部临床检验中心第 2 次全国肿瘤标记物室间质评质控品进行回顾性检测,AFP 检测值与已知的“靶值”和可接受限进行比较,均在可接受范围内。两种方法对 AFP 检测的准确度验证均核实,AFP 测定结果的准确性是符合要

求的。

分析测量范围即定量检测项目的线性检测范围是 1 个很重要的仪器及方法学性能指标。临床可报告范围是一检测方法所能定量报告的分析物值的范围,它允许对样本进行稀释、浓缩或其他预处理,扩展了患者结果可报告范围。本研究首先通过一系列浓度的血清验证 AFP 测量的线性范围,然后通过倍比稀释实验确定 AFP 的临床可报告范围。厂家声明的线性范围为 0.5~1 000 IU/mL,从表 3 结果显示,系列血清的测量值与预期值线性良好,  $Y=1.02X+6.44(r^2=0.998\ 5)$ ,验证后确定电化学发光法测定 AFP 在 0.514~992.7 之间线性良好,与厂家声明基本一致。表 4 结果显示,对于倍比稀释血清,随着稀释倍数的增加,回收率逐渐降低,当稀释倍数为 160 倍时,回收率为 89.667%,已经低于 90.0%,结果不可靠。当患者标本 AFP 检测结果高于 992.7 IU/mL 时,必须对样本稀释重做,但最大稀释度不宜超过 160 倍,即电化学发光法测定 AFP 的临床可报告范围为 0.514~158 832 IU/mL。

临床实验室为所开展的检测项目确定可靠的参考区间是其重要任务之一,也是实验室质量管理和实验室认可的基本要求。罗氏 Elecsys 2010 电化学发光免疫分析仪产自瑞士并提供试剂,同时提供了欧美人群的 AFP 参考区间,但既往的研究和文献报道,均未提示 AFP 的参考区间在不同人种间有差异。所以只需要选择 20 例参考个体的样本进行验证。从表 5 结果显示,20 例样本 AFP 的检测结果显示仅有 1 例超出参考区间,为 0~5.8 IU/mL,其余均在此范围内,所以作者可以引用此参考区间作为本实验室 AFP 的参考区间。

上述结果显示,罗氏 2010 电化学发光免疫分析仪测定 AFP 的精密度、准确度、分析测量范围性能均与厂家声明一致<sup>[9]</sup>;厂家提供的参考区间可以接收;AFP 的临床可报告范围为 0.514~158 832 IU/mL。此验证方案和实验方法简便可行,可用于其他项目的性能验证。

参考文献

[1] 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,2008:1.

[2] 毕波,吕元. 定量检测方法学性能验证的系统设计[J]. 中华检验医学杂志,2007,30(2):143-145.

[3] 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.

[4] 周琦,李少男,李小鹏,等. 利用美国国家临床实验室标准化委员会 EP6-A 指南判定线性[J]. 中华检验医学杂志,2006,29(1):85-86.

[5] 郑松柏,张秀明,庄俊华. 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,2008,18(14):2069-2071.

[6] 张秀明,庄俊华,郑松柏,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.

[7] 黄志基,黄铭颖,岑屹,等. 罗氏电化学发光检测系统检测泌乳素的方法学评价及参考区间的建立[J]. 检验医学,2007,22(6):623-626.

[8] 冯仁丰. 临床检验质量管理技术基础[M]. 3 版. 上海:上海科学技术文献出版社,2007:1.

[9] 杨志钊,缪丽韶,杨山虹,等. 利用 CLSI EP15-A 指南验证精密度和准确度[J]. 国际检验医学杂志,2010,31(3):231-232.