

• 检验仪器与试剂评价 •

甲胎蛋白和游离 β -绒毛膜促性腺激素双标记时间分辨荧光免疫滤纸干血片测定试剂盒的性能评价*

范春雪¹, 谭玉华^{1,2,△}, 汪勤¹, 霍道贵³, 吴泳⁴, 董梅⁵

(1. 广州市丰华生物工程有限公司体外诊断试剂研发中心, 广东广州 510730; 2. 广州医科大学免疫教研室, 广东广州 510120; 3. 中山大学第三附属医院产科实验室, 广东广州 510630; 4. 重庆医科大学附属成都市妇女儿童中心医院产前诊断中心, 四川成都 610091; 5. 中国人民解放军第三〇九医院检验科, 北京 100091)

摘要:目的 对研制的甲胎蛋白(AFP)和游离 β 人绒毛膜促性腺激素(β -hCG)双标记时间分辨荧光免疫分析(TRFIA)滤纸干血片测定试剂盒进行性能评价。方法 应用 TRFIA 法检测滤纸干血片中 AFP 和 β -hCG 的含量,并对干血片检测方法的精密密度、分析灵敏度、特异性、Hook 效应等进行评价,与同类试剂盒进行方法学对比试验。结果 待评价试剂盒 AFP 和 β -hCG 的剂量-反应曲线线性相关系数(r)可达 0.99 以上;批内、批间 CV(%)均小于 10.0%;AFP 和 β -hCG 的灵敏度均不高于 1.5 U/mL 和 2.0 ng/mL;与同类试剂对比,AFP 和 β -hCG 结果的线性 r 均可达 0.99 以上;临床研究评价一致程度百分比可达 100%。结论 待评价试剂盒具有灵敏度高,精密密度好,特异性强,样本需求量少的优点;与同类产品检测结果相关性好,能满足临床需要。

关键词: 甲胎蛋白; 绒毛膜促性腺激素, β 亚单位, 人; 荧光免疫测定

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.21.054

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2013)21-2899-03

应用孕妇血清学标志物筛查胎儿先天异常具有取材方便、安全、经济、有效且易被接受等优点^[1],特别是近年来国内孕妇血清学标志物检测试剂盒研制成功和上市,为国内产前筛查的普及起到了积极的推动作用^[2-4]。滤纸是血液的极好载体,国内已利用滤纸干血片技术成功建立了新生儿疾病筛查方法或系统^[5-7],并得到了广泛应用,使国内新生儿疾病筛查工作开展迅速。以此为经验,近年笔者为了解决了产前筛查标本的运输、保存等问题,进一步推动产前筛查的普及和加快样本的检测速度,经过多年研究,成功研制出了甲胎蛋白(alpha-fetoprotein, AFP)和游离 β 人绒毛膜促性腺激素(free β -human chorionic gonadotrophin, β -hCG)双标记时间分辨荧光免疫分析(time-resolved fluoroimmunoassay, TRFIA)滤纸干血片测定试剂盒,现将其性能评价报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 滤纸干血片标本和血清标本均来自孕周为 14~21 周的孕妇人群,均为单胎妊娠,自然受孕,无胰岛素依赖性糖尿病史等,均在羊膜穿刺术前采集(羊膜穿刺术后 AFP 的浓度会暂时性升高)。滤纸干血片标本直接以静脉血点制血片,或者使用一次性真空肝素抗凝采血管采集静脉血,摇匀后用微量加样器吸取 50 μ L 全血,滴于滤纸片上,要求每张滤纸片上至少采滴 2 个血斑样本,血斑直径不得小于 8 mm,使血滴平行浸透滤纸上并于室内自然风干后立刻于 2~8 $^{\circ}$ C 保存。样本按照《体外诊断试剂临床研究技术指导原则》、《胎儿常见染色体异常与开放性神经管缺陷的产前筛查与诊断技术标准》的要求,在中国人民解放军第三〇九医院(简称 309 医院)和中山大学第三附属医院(简称中山三院)2 家临床试验研究单位收集,分别收集了 388 例和 244 例。

1.2 主要试剂与仪器 待评价试剂盒为 AFP 和 β -hCG 双标记片测定试剂盒(TRFIA 法)、对照试剂盒为 AFP 测定试剂盒(TRFIA 法)[注册号:粤食药监械(准)字 2012 第 2400576 号]和 β -hCG 测定试剂盒(TRFIA 法)[注册号:粤食药监械(准)字 2010 第 2400456 号]、FWZ-I 型微量振荡仪、DEM-III 型全自动酶标洗板、筛查分析软件[注册号:粤食药监械(准)字 2011 第 2700880 号]和质控品[注册号:粤食药监械(准)字

2012 第 2400274 号]均由广州市丰华生物工程有限公司提供;Victor™2D1420 型 TRFIA 仪购于芬兰 Wallac Oy 公司[注册号:国食药监械(进)字 2011 第 2402642 号]。

1.3 待评价试剂盒的检验方法 用 3 mm 实验血片打孔器在滤纸校准品、质控品或样本上围绕血斑圆心与边缘的中心处打下直径约 3 mm(1/8 inch)的校准品、质控品以及样本(打下纸片须被血液浸透),依次放置于微孔反应板中,每孔 1 片。加入已配好的标记物工作液 200 μ L/孔,于室温下缓慢振荡孵育 2.5 h(或者室温下快速振荡 15 min 后,放置于 2~8 $^{\circ}$ C 冰箱过夜,取出后再于室温下缓慢振荡 1 h),洗板 6 次,拍干,加入增强液 200 μ L/孔,于室温下缓慢振荡 5 min 后于 1420 Victor™2D 荧光免疫分析仪上检测分析。

1.4 对照试剂盒的检验方法 按说明书严格操作,在配套的 1420 Victor2 D 荧光免疫分析仪上检测。仪器按操作规程运行。

1.5 产前筛查风险评估 将待评价试剂和对照试剂盒的检测结果分别用产前筛查风险评估软件进行筛查风险率分析,风险评估标准^[8-10]:筛查风险率高于 1/270,唐氏综合征阳性,唐氏综合征高风险妊娠;筛查风险率高于 1/350,提示为 18-三体综合征阳性,提示为 18-三体综合征高风险妊娠。一般 AFP 浓度小于 0.4 中位数倍数(multiple of the median, MOM)提示为唐氏综合征高危妊娠,大于 2.5 MOM 提示为神经管缺陷高危妊娠; β -hCG 大于 2.5 MOM 或小于 0.5 MOM 提示为高风险妊娠。对于高风险妊娠的孕妇,建议进一步的检查,在孕妇知情同意的情况下,选择适宜手段(超声诊断或羊膜腔穿刺)进行产前诊断,最后予以确诊。

1.6 方法评价 参考文献^[11]方法对待评价试剂盒的主要性能指标(剂量-反应曲线、分析灵敏度、精密密度、特异性和 Hook 效应等)进行评价,并进行临床对比试验。

1.7 统计学处理 剂量-反应曲线由仪器自动给出;不精密密度采用变异系数(coefficient of variation, CV)表示;利用相关系数描述待评价试剂盒与对照试剂盒定量测定结果的标准效率,并对相关系数进行 t 检验,以 $\alpha=0.05$ 为检验水准,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。以待评价试剂盒与对照试剂盒的产前

* 基金项目:国家高技术研究发展(863 计划)资助项目(2011AA02A112)。△ 通讯作者, E-mail: tanywhy@aliyun.com。

筛查风险率对比结果建立四方格表,采用符合率和 Kappa 指数描述待评价试剂盒与对照试剂盒的结果在产前筛查风险率评估中的一致性。

2 结果

2.1 待评价试剂盒的剂量-反应曲线 X 轴为校准品浓度值,

表 1 待评价试剂盒 AFP、 β -hCG 的批内、批间不精密度

血片质控	AFP			β -hCG		
	总平均值(U/mL)	批内 CV(%)	批间 CV(%)	总平均值(U/mL)	批内 CV(%)	批间 CV(%)
C1	14.8	8.3	8.7	13.4	7.9	8.5
C2	70.2	5.4	6.8	69.8	6.2	4.8

2.2 分析灵敏度 待评价试剂盒 AFP、 β -hCG 的分析灵敏度分别不高于 1.5 U/mL、2.0 ng/mL。

2.4 特异性 用待评价试剂盒检测 100 mg/L 清蛋白(albumin, ALB)或 500 ng/mL 癌胚抗原(carcinoembryonic antigen, CEA),AFP 表观浓度均小于 1.0 U/mL;检测 250 U/L 人促黄体生成素(human luteinizing hormone, hLH)、500 μ U/mL 人促甲状腺激素(human thyroid stimulating hormone, hTSH)、250 U/L 人卵泡刺激素(human follicle stimulating hormone, hFSH)和 1 000 U/L hCG 的表观浓度分别小于 0.5 ng/mL、0.5 ng/mL、0.5 ng/mL 和 2.0 ng/mL。

2.5 Hook 效应 用待评价试剂盒测定浓度为 5 000 U/mL 的 AFP,其荧光计数值仍高于 500 U/mL AFP 校准品的荧光计数。测定浓度为 1 000 ng/mL 的 β -hCG,其荧光计数值高于 200 ng/mL β -hCG 校准品的荧光计数。

2.6 方法学比对 待评价试剂盒在 2 家临床试验研究单位进

行临床考核,待评价试剂盒与对照试剂盒的 AFP、 β -hCG 的定量结果的线性相关系数均大于 0.99,结果见表 2。待评价试剂盒测定结果与对照试剂盒测定结果经产前筛查风险评估软件分析后,唐氏综合征筛查高风险符合率为 100%,唐氏综合征筛查低风险符合率为 100%,结果见表 3。神经管缺陷筛查高风险符合率为 100%,神经管缺陷筛查低风险符合率为 100%,见表 4。待评价试剂盒与对照试剂盒在 309 医院和中山三院的临床试验中,唐氏综合征和神经管缺陷皆高于截断值样本,均为 0 例;18-三体综合征高于截断值,分别为 3 例和 2 例,其筛查风险总符合率为 100%。待评价试剂盒与对照试剂盒在唐氏综合征、神经管缺陷、18-三体综合征风险筛查对比结果的 Kappa 指数均为 1。在 309 医院和中山三院临床试验中,高风险妊娠孕妇经产前诊断技术确诊为唐氏综合征阳性的样本分别为 3 例和 2 例。

2.2 精密度 待评价试剂盒的 AFP、 β -hCG 的批内、批间 CV 均不高于 10.0%(n=10),结果见表 1。

表 2 待评价试剂盒与对照试剂盒的 AFP、 β -hCG 的定量结果的线性相关系数

研究单位	n	AFP		β -hCG	
		线性回归方程	t 检验	线性回归方程	t 检验
309 医院	388	$Y=1.004 1X+0.476 5, r=0.990 3$	$t=139.68, P<0.05$	$Y=1.007 3X+0.042 2, r=0.992 3$	$t=157.10, P<0.05$
中山三院	244	$Y=1.017 1X-0.430 7, r=0.993 8$	$t=137.70, P<0.05$	$Y=1.006 4X+0.254 2, r=0.994 3$	$t=138.82, P<0.05$

表 3 2 家临床试验研究单位对待评价试剂盒的唐氏综合征筛查临床考核结果(n)

待评价试剂盒	对照试剂盒				合计
	309 医院		中山三院		
	高风险	低风险	高风险	低风险	
高风险	52	0	40	0	92
低风险	0	336	0	204	540
合计	52	336	40	204	632

表 4 2 家临床试验研究单位对待评价试剂盒的神经管缺陷筛查临床考核结果(n)

待评价试剂盒	对照试剂盒				合计
	309 医院		中山三院		
	高风险	低风险	高风险	低风险	
高风险	28	0	0	0	28
低风险	0	360	0	244	604
合计	28	360	0	244	632

3 讨论

运用 AFP、 β -hCG 作为孕妇血清标志物进行孕中期唐氏综合征或神经管缺陷筛查已开展多年。从 2008、2009、2010 年卫生部产前筛查室间质评结果中,TRFIA 参与的实验室有 150 多家,占整个产前筛查市场的 80% 以上,从室间质评统计结果看,无论是实验室间变异系数还是室间质评成绩符合率都明显优于其他方法学试剂,特别是进口 TRFIA 双标产前筛查试剂是主流的产前筛查试剂,为广大客户所充分接受。

随着国产试剂的投入使用和市场跟踪表明,虽然国民对产前筛查的意识不断提高和国家对产前筛查的投入力度的加大,产前筛查的发展相当迅猛,但此现象仅局限于经济发达和经济相对发达的地区。在一些乡镇级乃至边远县级医院由于经济、效益等因素,无法有效利用现行试剂盒进行产前筛查,而目前市场上的产前筛查试剂仅局限于血清检验,血清作为筛查标本存在需抽取静脉血、血标本不易保存、运送血标本具有潜在生物安全隐患等问题,很难进行医院间合作筛查,影响了产前筛查的大规模开展^[12]。

考虑到市场需要,方便在经济相对落后、样本数量较少、医院分散的地区普及产前筛查的需求,笔者经过多年研究,成功研制了 AFP 和 β -hCG 双标记 TRFIA 滤纸干血片测定试剂盒,用于唐氏综合征和开放性神经管缺陷的筛查。滤纸干血片

筛查法的优点具有血样采集简单,样本需求量极少,样本不需要离心,减少了溶血和样本降解;增强了样本在高温情况下的稳定性;提高了对生物有害物的管理;保存运输方便,减少了运输和贮存费用等。这使各级医院均有实现产前筛查开展的可能。

本研究中的 AFP 和 β -hCG 测定试剂盒应用滤纸干血片和双标记 TRFIA 技术,具有灵敏度高,精密度好,特异性强,样本需求量少的优点;与测定血清样本的对照试剂盒比对,待评价试剂定量结果与对照试剂定量结果相关性好;在 2 家临床试验研究单位的临床考核评价中,待评价试剂与对照试剂的唐氏综合征筛查风险总符合率、神经管缺陷筛查风险总符合率和 18-三体综合征筛查风险总符合率均达到 100%,待评价试剂与对照试剂在产前筛查风险评估中具有等效性,试剂盒将有很好的应用前景,值得推广应用。

参考文献

- [1] 方群. 妇产科检验诊断学[M]. 北京:人民卫生出版社,2004:65-68.
- [2] 谭玉华,霍道贵,廖思红,等. 时间分辨荧光免疫法定量测定孕妇血清中甲胎蛋白含量[J/CD]. 中华临床医师杂志:电子版,2010,4(10):1784-1788.
- [3] 谭玉华,廖思红,霍道贵,等. 孕母血清游离 β 绒毛膜促性腺激素时间分辨荧光免疫试剂盒的研制与评价[J]. 中华核医学杂志,2010,30(2):75-79.

• 检验仪器与试剂评价 •

电化学发光法检测血清 CA72-4 的方法学性能评价

马 莉,张 凯,程建平,张建明,金 跃

(江苏省淮安市第二人民医院检验科,江苏淮安 223002)

摘要:目的 对电化学发光法检测血清糖链抗原 72-4(CA72-4)进行方法学验证。方法 参考美国临床实验室标准化协会(CLSI)系列文件和相关文献,设计验证方案,对 CA72-4 项目的精密度、准确度、线性范围、分析灵敏度、生物参考区间和温度稳定性进行验证。结果 实验结果显示,CA72-4 批内总不精密度小于 3%,批间不精密度小于 4%,准确度在 $\pm 4\%$ 以内,线性范围为 0.37~291.30 U/mL,参考区间为 0.0~8.2 U/mL,分析灵敏度小于 0.2 U/mL,均与厂商提供的参数接近。血清标本 CA72-4 常温可稳定 24 h,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存可稳定 1 个月以上。结论 电化学发光法检测 CA72-4 各项参数与厂商声明基本一致,符合相关质量要求,可应用于临床标本检测。

关键词:电化学发光; CA72-4; 方法学验证; 血清

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.21.055

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)21-2901-03

按照《医疗机构临床实验室管理办法》和卫生部《三级综合医院评审标准实施细则》,检验项目在引入临床实践前应进行方法学性能评价或验证,内容包括厂商声明的精密度、准确度、灵敏度、线性范围、干扰及参考范围设定等各项技术参数。采用瑞士 Roche Cobas E601 电化学发光分析仪的增强化学发光酶免疫分析(enhanced chemiluminescence enzyme immunoassay, ECLIA)技术检测血清糖链抗原 72-4(carbohydrate antigen 72-4, CA72-4)为本科新开展的项目,本研究对其方法学性能进行验证,现报道如下。

1 材料与与方法

1.1 主要仪器与试剂 主要仪器为瑞士 Roche Cobas E601 电化学发光分析仪,主要试剂包括 Roche Cobas E601 电化学发光分析仪配套试剂、校准品和质控品。

1.2 标本 高、中、低浓度血清标本来自本院 2013 年 3 月就诊的患者,参考值验证血清标本来自正常体检者[血糖,血脂,

- [4] 谭玉华,孙勇,何海荣,等. 血清甲胎蛋白和游离 β 绒毛膜促性腺激素双标记时间分辨荧光免疫试剂盒的研制与评价[J]. 现代检验医学杂志,2011,26(3):119-122.
- [5] 谭玉华,冯健明,卢顺舵,等. 新生儿促甲状腺素的时间分辨荧光免疫分析方法及其试剂盒研制[J]. 现代检验医学杂志,2009,24(4):79-81.
- [6] 谭玉华,刘海平,张正武,等. 自建新生儿苯丙氨酸荧光定量检测系统的应用评价[J]. 现代检验医学杂志,2010,25(2):66-68.
- [7] 谭玉华,季涛,李贵情,等. 新生儿苯丙氨酸荧光分析法的建立及其试剂盒的临床评价[J/CD]. 中华临床医师杂志:电子版,2011,5(6):1592-1596.
- [8] 赖有行,周才,周永贤,等. 孕中期检测母血清标记物在唐氏综合征筛查中的应用[J]. 中国社区医师:医学专业半月刊,2008,10(7):92.
- [9] 陆丹. 孕妇产前筛查及产前诊断 35 961 例[J]. 实用医学杂志,2010,26(8):1433-1435.
- [10] 蒋涛,孙亦骏,徐倩君,等. 中孕期唐氏综合征筛查的结果分析及策略探讨[J]. 中华围产医学杂志,2011,14(2):74-77.
- [11] 徐伟文. 体外诊断试剂研制常用技术指标之分析性能评估[J]. 分子诊断与治疗杂志,2010,2(2):140-144.
- [12] 刘霞,周玉侠,张莉,等. 滤纸干血片法筛查孕中期唐氏综合征的可行性[J]. 山东大学学报:医学版,2009,47(12):86-90.

(收稿日期:2013-05-29)

肝、肾功能、B超和心电图检查均无异常,男、女各 20 例,平均年龄(38.5 \pm 6.8)岁]。

1.3 检测方法

1.3.1 标本检测 按仪器操作规程,常规保养仪器并做好质量控制,收集并分离血清(或质控品、校准品)进行检测。

1.3.2 精密度验证 参考美国临床实验室标准化协会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)修改协议 EP5-A 文件,选择 Roche 公司生产的低值(PC TM1: LOT 16995700)和高值质控血清(PC TM2: LOT 16995800)和 3 个患者标本(分别为 CA72-4 低、中、高浓度,编号为 HS1、HS2、HS3)作为精密度评价的样本,按标本检测程序进行测定,每天 6 次,持续 10 d,进行批内、批间精密度验证,计算均值(\bar{x})、标准差(s)和变异系数(coefficient of variation, CV)。

1.3.3 准确度验证 参考 CLSI EP9-A2 文件,先用校准品(LOT:00169337),CA72-4 浓度分别为 0.75、72.00 U/mL),