

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 •

[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)

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,

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),

对检测系统进行校准;再用校准品进行检测,对各自检测结果与靶值进行比对,计算检测值与靶值的相对偏倚,计算公式:
 $Bias=(测定值-靶值)/靶值\times 100\%$ 。

1.3.4 线性范围验证 按照 CLSI EP6-A2 文件,选择 CA72-4 低浓度(L,0.37 U/mL)和高浓度(H,291.30 U/mL)患者标本各一份,L 和 H 按 5L、4L+1H、3L+2H、2L+3H、1L+4H、5H 的关系配制成 6 个浓度系列血清,将实测值与预期值进行比较,计算回归方程 $Y=bX+a$,验证检测项目的线性范围。

1.3.5 分析灵敏度验证 用去离子水作为零校准品连续测定 10 次,取其平均值,以 $\pm 2s$ 为检测项目的灵敏度。

1.3.6 生物参考区间验证 采集在本院体检者(血液生化、B 超和心电图检测均正常)空腹血清,按操作规程进行检测,要求 40 个检测数据只允许有 10% 数据在给定的生物参考区间之外,否则需要进行检测项目的生物参考区间建立。

1.3.7 血清标本 CA72-4 温度稳定性试验 取 5 份患者血清(CA72-4 浓度 1.50~291.30 U/mL),于采集后 1 h 检测血清 CA72-4,然后分别于常温 and 4℃ 冰箱保存,常温保存的于标本采集后 3、6、24、48、72 h 检测 CA72-4 值;4℃ 保存的于采集后 1、3、7、14、30 d 检测 CA72-4 值,然后,与采集后 1 h 的检测结果进行平均偏差大小的比较。

2 结 果

2.1 精密度验证结果 本次验证实验得到的低、高值质控品和 3 份患者血清批内(日间)精密度分别为 2.01%、1.88%、1.97%、1.53%、1.33%,批间精密度分别为 3.21%、3.11%、2.64%、2.77%、2.53%,均小于厂商提供的数据($\leq 10\%$),见表 1。

标本	批内			批间		
	平均值	标准差	CV(%)	平均值	标准差	CV(%)
PC TM1	3.69	0.07	2.01	3.74	0.12	3.21
PC TM2	38.54	0.72	1.88	38.61	1.20	3.11
HS1	2.69	0.05	1.97	2.65	0.07	2.64
HS2	26.60	0.41	1.53	27.08	0.75	2.77
HS3	128.10	1.70	1.33	130.82	3.31	2.53

2.2 准确度验证结果 与校准品相比,本次实验的检测结果的偏差为 0%~4%,见表 2。

表 2 准确度验证结果(U/mL)			
靶值	验证值	绝对偏差	相对偏差(%)
0.75	0.72	0.03	4.00
72	73.1	1.10	1.52

2.3 线性范围验证结果 对系列浓度样本检测结果和预期值进行多项式回归统计,预期值为 X,检测值为 Y,得直线方程 $Y=bX+a$,即 $Y=1.0138X+0.5497$,因 $b=1.0138$,在 0.97~1.03 之间; $a=0.5497$,接近于 0,故线性范围为 0.37~291.30 U/mL,见表 3。

2.4 分析灵敏度验证结果 将去离子水作为零校准品检测 CA72-4 10 次,结果均为小于 0.2 U/mL,与厂商提供的参数相符合。

2.5 生物参考区间验证结果 统计男、女各 20 份空腹血清标本,对 CA72-4 参考区间进行验证,除 1 人结果为 8.28 U/mL,超过范围外,其他结果均在的厂商提供的范围(0.0~6.9 U/mL)之内,提示该参考区间可接受。

表 3 线性范围验证结果(U/mL)						
组别	5L	4L+1H	3L+2H	2L+3H	1L+4H	5H
预期值	0.37	58.56	116.74	174.93	233.11	291.30
测定值	0.38	57.23	121.30	179.90	239.10	292.45

2.6 血清 CA72-4 温度稳定性试验 计算 10 份标本在不同温度、不同时间下,检测值与标本采集 1 h 后检测值相比,结果显示常温(20℃ 左右)保存 3、6、24、48、72 h 后,CA72-4 检测值平均偏差为 0.5%、1.5%、3.7%、5.9%、7.8%;4℃ 保存 1、3、7、14、30 d 后,平均偏差分别为 1.2%、1.1%、1.8%、2.5%、4.4%。如以偏差小于 5% 为标准,提示常温保存不宜超过 24 h,4℃ 可至少保存 30 d,与厂商提供的参数基本一致。

3 讨 论

CA72-4 是一种相对分子量较高的类黏蛋白——肿瘤相关糖蛋白 72(tumor-associated glycoprotein 72, TAG72),在多种胃肠道腺癌患者的血清中可以检出。Roche Cobas E601 电化学发光分析仪测定 CA72-4 是利用 2 种单克隆抗体 B72-3(针对转移性乳腺癌)和 CC49(特异性针对高纯度的 TAG72)^[1-2]按双抗体夹心法原理进行测定的。CA72-4 以往常用酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)等方法检测,其灵敏度、特异性和稳定性都不理想,目前大、中型医院很多采用了电化学发光法检测 CA72-4,但目前国内临床上尚缺少对其进行系统的验证实验。

一个检测系统的分析性能能够满足临床的要求是医学实验室认证和“检验结果互认”的基本保证^[3]。根据 1988 年美国临床实验室改进修正案(Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988, CLIA'88)、ISO 15189 医学实验室认可、卫生部《三级综合医院评审标准实施细则》、《医院检验科管理规范》等文件的要求,检测系统在用于临床之前,必须对其主要分析性能进行验证,包括不精密度、不准确度、线性范围、临床可报告范围、分析灵敏度以及生物参考区间等指标。

Roche Cobas E601 电化学发光分析技术是继放射免疫、酶免疫、荧光免疫、化学发光之后发展起来的新一代的更灵敏、更准确的小分子标记免疫分析技术。电化学发光免疫分析法,无论是灵敏度、准确性、精密度均优于放射免疫分析法(radioimmunoassay, RIA)和 ELISA,并且克服了前带、倒钩等假阴性现象。本研究对 Roche Cobas E601 电化学发光分析仪检测系统测定血清 CA72-4 的分析性能进行验证,为该项目在本院的临床应用提供依据,也为临床化学发光免疫检验的方法学性能验证提供简便易行的验证方案和实验方法,同时也能供其他定量检验方法学性能验证用作参考。

方法学验证最重要的指标是精密度和准确度。精密度是指在规定的条件下,各独立的检测结果之间的一致程度,是反映仪器整体性能的指标,亦是进行其它方法学验证的前提。精密度的评价通常采用 CLSI EP5-A 文件,本研究参考 CLSI EP5-A 文件,以 2 个水平配套质控品和低、中、高浓度 3 份患者样本为实验材料,批内检测在 1 d 内连续测定 6 次,连续 10 d,得到总的不精密度,方法简便,适合临床应用。实验结果显示,CA72-4 浓度在 2.69~128.10 U/mL 时,批内总不精密度的

1.33%~2.01%,批间不精密度为 2.53%~3.21%,与厂商提供的批内不精密度(1.8%~2.4%),批间不精密度(2.9%~4.9%)接近,达到国际公认的质量要求。准确度是通过测定值的质控品和校准品进行测定,并计算其偏倚,与参考系统或其他标准方法进行方法比对和偏倚评估。本科对检测系统进行校准,再用校准品进行检测,对各自检测结果与靶值进行比对,计算检测值与靶值的相对偏倚,结果表明,2 份标准品与靶值的偏倚为 $\pm 4\%$ 以内,均在 CLIA'88 规定的允许误差范围内。

经过验证,该检测系统在本科测定 CA72-4 的分析测量范围(analytical measurement range, AMR)为 0.37~291.30 U/mL,与厂商提供的线性范围(0.20~300.00 U/mL)相适;分析灵敏度的验证结果不超过 0.2 U/mL,也在厂商提供的范围内;男、女各 20 份健康人血清标本 CA72-4 浓度为 0.31~8.28 U/mL,除 1 人偏高外,均在仪器说明书的参考区间 0.0~6.9 U/mL 之内,按照 CLSI C28-A 的要求,可直接使用厂商提供的参考区间。与惠进林^[3]研究结果(参考区间调整为 0.0~8.5 U/mL)有一定差异,可能与不同地区人群以及本科样本数稍少有一定关系。

此外,本研究还对血清 CA72-4 的温度稳定性做了研究。按厂商说明书要求,如果样本在 2℃~8℃下可保存 30 d,-20℃可保存 3 个月。本研究结果显示在常温(20℃)保存 24 h 后,CA72-4 检测值平均偏差接近 5%,4℃保存 30 d

• 检验仪器与试剂评价 •

后,平均偏差达 4.4%,如以偏差小于 5%为标准,提示常温保存不宜超过 24 h,4℃可以保存 1 个月,与厂商要求接近。

综上所述,本研究对 Roche Cobas E601 电化学发光分析仪检测血清 CA72-4 的验证结果与厂商提供的分析性能基本一致,为临床应用该项目提供了详实、准确、可靠的依据,对规范化学发光免疫检验,提高发光免疫检验质量具有重要意义,使本科的管理水平和技术力量均上升了一个台阶,也可为医学实验室认可提供帮助。因时间有限、试剂及标准品成本较高、缺少第三方定值质控品等诸多因素,本研究还有许多待完善之处,将在下一步的研究中加以改进和提高。

参考文献

- [1] Byrne DJ, Browning MC, Cuschieri A. CA72-4: a new tumour marker for gastric cancer[J]. Br J Surg, 1990, 77(9): 1010-1013.
- [2] Johnson VG, Schlom J, Paterson AJ, et al. Analysis of a human tumor-associated glycoprotein (TAG-72) identified by monoclonal antibody B72.3[J]. Cancer Res, 1986, 46(2): 850-857.
- [3] 惠进林. 肿瘤抗原 CA72-4 电化学发光法参考范围的建立[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 31(11): 1316-1317.

(收稿日期: 2013-05-17)

溶血标本使用国产 HBsAg 酶免试剂可用于常规分析

桂万羊, 邓宇峰, 程二银

(安徽铜陵市立医院检验科, 安徽铜陵 244000)

摘要:目的 观察标本不同程度溶血对国产两步法乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂检测结果的影响。方法 收集 HBsAg 阴性和阳性已确定的血液标本各 3 例,并将其分别作为 HBsAg 阴性组和阳性组。标本人为处理为无、轻、中、重度溶血,用 3 种国产 HBsAg ELISA 试剂对其进行重新检测,分析溶血后标本吸光度值与临界值的比值(S/CO 值)的变化。结果 在 HBsAg 阴性标本中,不同浓度的溶血标本未检出阳性, S/CO 值无明显改变($P>0.05$);在 HBsAg 阳性标本中,不同浓度的溶血标本和无溶血的标本比较, S/CO 值也无明显变化($P>0.05$)。结论 国产两步法 HBsAg ELISA 试剂可用于溶血标本的常规检测。

关键词:酶联免疫吸附测定; 肝炎表面抗原,乙型; 溶血

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.21.056

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2013)21-2903-02

溶血是临床检验中最常见的一种干扰和影响因素,关于溶血对乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)检测结果的影响,文献报道结果不一致^[1-3]。实际工作中,为防止溶血干扰检测结果,往往拒收溶血标本,并让患者重新采血进行检测,从而增加了患者的痛苦,造成血液浪费。为了解溶血对国产试剂 HBsAg 检测结果的影响,笔者收集了溶血标本,人为处理为无、轻、中、重度溶血,用 3 种国产试剂对处理的溶血标本重新检测,无溶血的样本吸光度(sample absorbance, S)值与临界(cut-off, CO)值的比值(S/CO 值)进行比较,分析溶血对检测结果的影响。

1 资料与方法

1.1 一般资料 血液标本来自本院 2012 年 12 月至 2013 年 1 月收治的住院患者。标本经检测已确定 HBsAg 阴性和阳性,且检测后剩余标本足够应用于实验。收集的 HBsAg 阴、阳性标本各 3 例,并将其分别作为 HBsAg 阴性组和阳性组。

1.2 主要仪器和试剂 主要仪器为 Sysmex KX-21N 血细胞分析仪、KWP-100A 洗板机(深圳市凯特生物医疗电子科技有限公司)、上海科华 KHB ST-360 酶标仪。诊断 HBsAg 的国

产酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂分别为试剂 A、试剂 B 及试剂 C。

1.3 检测方法 将收集的每位患者的标本分为 4 管,分别加入一定量的红细胞,使血红蛋白浓度分别为 0、1、5、10 g/L。密封后放入冰箱中冷冻,使其发生溶血。标本检测按照使用说明书进行操作,测定时,设定酶标仪波长 450 nm/630 nm,进行双波长检测,采用 S/CO 值作为每份标本的检测结果。

1.4 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件进行统计学分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间两两比较采用 t 检验,同一试剂检测的不同溶血组间的结果比较采用方差分析,以 $\alpha=0.05$ 为检验水准,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

分别采用试剂 A、试剂 B 及试剂 C 对阴性标本及阳性标本检测后,不同血红蛋白浓度的血液获得的 S/CO 值见表 1、2。在阴性标本中,不同浓度的溶血标本未检出阳性, S/CO 值无明显改变($P>0.05$);在阳性标本中,不同浓度的溶血标本和无溶血的标本比较, S/CO 值也无明显变化($P>0.05$)。