

• 经验交流 •

血清 CA125 定量测定方法的建立及临床应用评价

宁 峰¹, 江泽友², 别明江³, 王保宁^{4△}

(1. 四川省食品药品安全监测及评审认证中心, 四川成都 610017; 2. 成都中医药大学附属医院, 四川成都 610072;

3. 四川大学华西附属第四医院, 四川成都 610041; 4. 四川大学华西基础医学与法医学院, 四川成都 610041)

摘要: 目的 建立定量测定人血清中糖类抗原 125(CA125)的化学发光免疫分析方法, 并与电化学发光法进行比对, 评估其临床应用价值。方法 用抗 CA125 单克隆抗体包被的免疫磁珠、辣根过氧化物酶标记的抗 CA125 单克隆抗体建立了磁粒子化学发光免疫分析体系, 并研究该体系的最低检测限、批内及批间变异系数(CV)、参考值、线性范围、回收率以及抗干扰能力等性能指标。与电化学发光法同步盲法测定 1 091 例血清样本, 对结果进行统计分析。结果 成功建立了磁粒子化学发光免疫分析法, 该法对 CA125 的最低检测限在 0.60 U/mL 以下。批间平均 CV 为 3.76%, 批内运行变异系数(CV_r)平均为 3.23%, 运行间变异系数(CV_{rr})平均为 5.39%, 运行日内变异系数(CV_d)平均为 2.22%, 运行日间变异系数(CV_{dd})平均为 6.80%。该方法在 CA125 浓度为 2.00~1 000.00 U/mL 的范围内线性良好($r \geq 0.9900$), 方法回收率为 102.85%。该方法对胆红素($\leq 500 \mu\text{mol/L}$)、血红蛋白($\leq 9.6 \text{ g/L}$)、乳糜($\leq 3.5\%$)、生物素($\leq 100 \text{ ng/mL}$)、肝素钠($\leq 30 \text{ IU/mL}$)、EDTA-Na₂($\leq 5 \text{ mg/mL}$)等干扰物质具有一定的抗干扰能力。该方法特异性较强, 甲胎蛋白、癌胚抗原、CA15-3、CA19-9、前列腺特异抗原不影响 CA125 测定。当 CA125 浓度达到 50 000 U/mL 时, 未出现钩状效应。该方法与电化学发光法的检测结果线性回归方程为 $Y = 0.984X - 0.258$ ($r = 0.993, n = 1 091$), 2 种方法检测结果具有可比性($P = 0.095$)。结论 建立的磁粒子化学发光免疫分析法测定人血清 CA125, 性能指标与电化学发光法具有良好的相关性, 能够满足临床应用要求。

关键词: 糖类抗原 125; 化学发光; 免疫**DOI:** 10.3969/j.issn.1673-4130.2014.12.066**文献标识码:**B**文章编号:** 1673-4130(2014)12-1654-02

早在 1981 年, 就有研究者建立了化学发光免疫分析法, 这种方法具有灵敏、快速、稳定、选择性强、重现性好、易于操作等优点。研究者从上皮性卵巢癌抗原测定出可被单克隆抗体 OC125 结合的一种糖蛋白, 即糖类抗原 125(CA125), 其相对分子质量可达 220 000~1 000 000, 是研究最多的卵巢癌标记物, 关于 CA125 在卵巢癌早期筛查、诊断、治疗及预后中的应用研究均有报道^[1-2]。目前, 虽已有多种电化学传感器被开发出来, 但均存在操作复杂、灵敏度低、成本高等弊端^[3]。常用的 CA125 免疫学检测方法有放射性免疫分析法、酶联免疫分析法以及化学发光免疫分析法等。放射性免疫分析法对人体及环境有危害, 已逐渐被淘汰, 酶联免疫分析方法灵敏度低, 不能满足临床测定的需要。化学发光免疫分析法操作简便、灵敏度高、无放射性危害、成本低, 在 CA125 的临床分析中具有明显的优势^[4-5]。本研究重点从实验室和临床两个方面对新建立的 CA125 磁粒子化学发光免疫分析法进行了评价, 报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 从各临床医院纳入研究对象共计 1 091 例, 分别采集血液样本, 研究对象平均(67±17)岁, 其中男性 302 例, 平均(66±15)岁, 女性 789 例, 平均(59±17)岁, 包括相关组织/器官恶性病变患者 241 例、其他组织/器官的恶性病患者及相关的良性疾病患者 702 例、健康人 148 例。

1.2 仪器与试剂 抗 CA125 免疫磁珠、酶标记的抗 CA125 抗体、洗涤液、底物缓冲液、校准品、质控物、全自动化学发光测定仪由四川省迈克生物科技股份有限公司提供; CA125 定量测定试剂盒(电化学发光法)以及罗氏电化学发光免疫分析系统, 由各临床医院提供。

1.3 方法 利用双抗原夹心法原理, 采用磁粒子化学发光免疫分析法, 包被抗 CA125 单克隆抗体的免疫磁珠, 37 °C 下孵育 15 min 后, 洗涤反应磁珠 3 次, 加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的抗 CA125 单克隆抗体, 两步反应形成双抗体夹心免疫复合物, 洗涤 3 次后加入发光底物并测定发光信号值, 根据发

光信号值与样本中 CA125 浓度呈正比, 计算样本中 CA125 浓度值。

1.4 性能评价

1.4.1 最低检测限 用 CA125 浓度为 0 U/mL 的校准品(主校准品 1), 按说明书操作步骤重复测定 20 次, 得出 20 次测定结果的相对发光(RLU)值, 计算其平均值(\bar{x})和标准差(s), 得出($\bar{x}+2s$)所对应的 RLU 值。根据主校准品 1 与相邻校准品(主校准品 2)之间的浓度-RLU 值结果进行两点回归拟合得出一次方程, 将($\bar{x}+2s$)所对应的 RLU 值代入上述方程中, 计算得出对应的 CA125 浓度, 即为最低检测限。

1.4.2 批间精密度 用 3 个批号的试剂盒分别测定 CA125 浓度为(30±6)U/mL 和(500±100)U/mL 的样本(样本 1 和样本 2), 每个批号各连续测定 10 次, 计算批间变异系数(CV)。

1.4.3 批内精密度 用同一批次试剂盒测定 CA125 浓度为(30±6)U/mL 和(500±100)U/mL 的样本(样本 1 和样本 2), 连续 20 d, 每天 4 次(上午、下午分别运行 1 次, 每次运行重复 2 次), 共 80 次, 记录其运行内/运行间、日内/日间的测定值, 分别计算运行内变异系数(CV_r)、运行间变异系数(CV_{rr})、日内变异系数(CV_d)、日间变异系数(CV_{dd})。

1.4.4 线性与准确度 用样本稀释液将浓度为 1 208.21 U/mL 的 CA125 样本稀释为 9 种浓度, 其中低值浓度的样本须接近测定范围的下限。每个浓度重复测定 3 次, 计算平均值, 用线性回归方法计算结果平均值和对应浓度的相关系数(r)。将 CA125 浓度为 600 U/mL 的样本加入到血清基质中, 加入体积宜为总体积的 10%, 按照说明书操作步骤进行测定, 计算回收率, 计算方法参照第 2 版《临床检验质量管理技术基础》^[6]。

1.4.5 分析特异性 在 CA125 浓度为 0 U/mL 的空白样本中, 分别加入甲胎蛋白(AFP)、癌胚抗原(CEA)、糖类抗原 15-3(CA15-3)、糖类抗原 19-9(CA19-9)、前列腺特异抗原(PSA), 使样本中的 $AFP \geq 500 \text{ IU/mL}$ 、 $CEA \geq 500 \text{ ng/mL}$ 、 $CA15-3 \geq 1 000 \text{ U/mL}$ 、 $CA19-9 \geq 1 000 \text{ U/mL}$ 、 $PSA \geq 100 \text{ ng/mL}$, 分别

测定样本中的 CA125 浓度。

1.4.6 钩状效应 将浓度为 50 000 U/mL 的 CA125 血清样本用样本稀释液稀释为 8 种浓度的样本, 每一浓度重复测定 2 次, 计算平均值, 评估钩状效应对检测结果的影响。

1.4.7 抗干扰能力 采用适量未溶血的血清样本混合成为基质血清, 重复测定基质血清 10 次, 并计算其均值。将干扰物质(加入体积不超过总体积的 10%)加入基质血清, 分别得到不同浓度干扰物的血清样本, 每个样本重复测定 2 次, 比较测定值与基质血清均值, 计算干扰率。若干扰率在 -10.0%~10.0% 内则表示本方法对含有该浓度的干扰物质有抗干扰能力, 反之, 则不具有抗干扰能力。

1.5 临床验证评价 在临床医院用本方法和罗氏电化学发光免疫分析系统同步盲法进行临床性能比对。将本方法测定的结果与电化学发光法测定的结果进行相关性分析, 作线性相关图, 获得回归方程, 并进行统计处理。

1.6 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件进行统计学分析, 应用线性回归对本方法所测得的结果与电化学发光法所测结果做相关性分析, 并进行总体回归系数 β 的 95% 置信区间估计, 再对试验系统(本方法)和对照系统(电化学发光法)结果作配对 t 检验, 以 $\alpha=0.05$ 为检验水准, 以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 最低检测限 分别用 3 批试剂对主校准品 1 和主校准品 2 进行测定, 结果分别为 0.14、0.20、0.20 U/mL, 均值为 0.18 U/mL。最低检测限计算结果不高于 0.60 U/mL。

2.2 批间精密度 用 3 批试剂分别对样本 1 和样本 2 进行测定, 精密度的平均 CV 为 3.10%, 批间差的平均 CV 为 3.76%。

2.3 批内运行精密度 用同一批试剂分别对样本 1 和样本 2 进行测定, CV_r 为 3.23%, CV_{rr} 为 5.39%, CV_d 为 2.22%, CV_{dd} 为 6.80%。

2.4 线性和准确度 将已知浓度的样本分别按照不同比例(不稀释、1:2、1:4、1:12、1:24、1:60、1:120、1:400、1:800)进行稀释后, 用 3 批试剂分别测定, 结果线性范围为 2.00~1 000.00 U/mL, $r \geq 0.990$, 平均回收率为 102.85%。

2.5 分析特异性 样本中的 AFP ≥ 500 IU/mL、CEA ≥ 500 ng/mL、CA15-3 $\geq 1 000$ U/mL、CA19-9 $\geq 1 000$ U/mL、PSA ≥ 100 ng/mL, 分别测定空白样本中的 CA125 浓度, 结果均小于 2.00 U/mL。

2.6 钩状效应 将浓度为 50 000 U/mL 的 CA125 血清样本用样本稀释液稀释为 8 种浓度的样本。每个浓度的样本重复测定 2 次, 发光度均值分别为 1 277、6 603、7 6440、736 924、3 951 866、4 973 306、5 913 835、6 791 588 RLU/s。结果呈线性, 无钩状效应出现。

2.7 抗干扰能力 血清样本中胆红素浓度小于或等于 500 $\mu\text{mol/L}$ 、血红蛋白浓度小于或等于 9.6 g/L、乳糜小于或等于 3.5%、生物素浓度小于或等于 100 ng/mL、肝素钠浓度小于或等于 30 IU/mL、EDTA-Na₂ 浓度小于或等于 5 mg/mL 时, 对 CA125 测定结果的干扰率小于 9%, 干扰率低于产品标准, 对测定结果无明显影响。

2.8 临床验证评价 采用同步盲法, 在 3 家医院分别采用本方法与罗氏公司(Roche)电化学发光法共测定 1 091 例血清样本, 2 种方法检测结果具有相关性, 线性回归方程为 $Y = 0.984X - 0.258$ ($r = 0.993$, 总体回归系数 β 的 95% 置信区间为 0.977~0.991)。配对 t 检验结果显示, $t = 1.670$, $P = 0.095$ ($P > 0.05$), 故认为两种方法测定结果差异无统计学意义。采用本方法检测 CA125 的正常参考区间为 CA125 \leq

36.93 U/mL。

3 讨 论

发光反应体系的选择是化学发光法检测的关键。鲁米诺(5-氨基-邻苯二甲酰肼)属于酰肼类有机化合物, 其性质稳定、结构简单、易于合成、无毒、不污染环境、水溶性较好, 是使用最早、应用最广泛的化学试剂之一, 它在强碱性溶液中可以被氧化剂氧化而处于激发态, 激发态发射蓝光同时回到基态, 它可与各种氧化剂如过氧化氢、氧气、次氯酸盐、碘、铁氰化钾、高锰酸钾等反应产生化学发光^[5-8]。本研究采用鲁米诺作为发光反应体系, 成功建立了定量测定人血清中 CA125 的磁粒子化学发光免疫分析法, 经过验证, 该方法适用于临床, 与罗氏电化学发光法进行临床比对试验时, r 达到 0.993, 与罗氏电化学发光法检测结果具有可比性($P=0.095$)。本方法的最低检测限低于罗氏电化学发光的 0.60 U/mL。重复性和精密度 CV 均小于 10%。正常参考区间为 CA125 ≤ 36.93 U/mL, 与罗氏电化学发光法以及第 3 版《全国临床检验操作规程》中的正常参考区间 CA125 ≤ 35 U/mL 保持一致^[9]。

与传统的定性方法相比, 本研究所建立的磁粒子化学发光免疫分析法属于定量测定, 应用于临床, 更具有参考价值。其次, 酶联免疫-双抗夹心法结合化学发光体系, 不仅缩短了时间, 而且让试验操作变得简便、易于控制^[10]。配套全自动化学发光测定系统后, 经全封闭式处理所得结果更具有真实性和可靠性。相信随着研究工作的不断深入, 新的发光试剂的推出, 仪器的更新换代, 免疫学技术的发展会促使越来越多的特异性好的单克隆抗体出现, 化学发光免疫分析技术将更好地应用于临床中^[11]。

参考文献

- [1] Bast RC, Feeney M, Lazarus H, et al. Reactivity of a monoclonal antibody with human ovarian carcinoma[J]. J Clin Invest, 1981, 68(5):1331-1337.
- [2] Kabawat SE, Bast RC, Bhan AK, et al. Tissue distribution of a coelomic-epithelium-related antigen recognized by the monoclonal antibody OC125[J]. Int J Gynecol Pathol, 1983, 2(3):275-285.
- [3] Bast RC, Klug TL, St John E, et al. A radioimmunoassay using a monoclonal antibody to monitor the course of epithelial ovarian cancer[J]. N Engl J Med, 1983, 309(15):883-887.
- [4] 马文丽, 郑文岭. 分子肿瘤学[M]. 北京: 科学出版社, 2003.
- [5] 林金明. 化学发光基础理论与应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004:1-28.
- [6] 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, 2007:42-44.
- [7] 吴广平, 巴静, 王恩华, 等. 检测胸水 CEA、CA125、CA153、CA199 对肺癌的诊断价值[J]. 中国肿瘤学杂志, 2004, 7(1):35-37.
- [8] Dabrowska M, Grubek-Jaworska H, Domagala-Kulawik J, et al. Diagnostic usefulness of selected tumor markers (CA125, CEA, CYFRA 21-1) in bronchoalveolar lavage fluid in patients with non-small cell lung cancer[J]. Pol Arch Med Wewn, 2004, 111(6):659-665.
- [9] 叶应妩, 王毓三, 申子瑜. 全国临床检验操作规程[M]. 3 版. 南京: 东南大学出版社, 2006:694-696.
- [10] Chou SF, Hsu WL, Hwang JM, et al. Development of an immunoassay for human ferritin, a nonspecific tumor marker, based on surface plasmon resonance[J]. Biosens Bioelectron, 2004, 19(9):999-1005.
- [11] 沈霞, 李稻. 临床免疫学与免疫学检验新技术[M]. 北京: 人民军医出版社, 2002:34-42.