

· 论 著 ·

人癌胚抗原电化学发光免疫分析测定试剂盒的对比研究及应用*

李 忠, 何晓明, 李培敏, 温丽娟, 李 亚, 彭友海, 甘海鹰
(广东省东莞市石排医院检验科, 广东东莞 523330)

摘要:目的 探讨自建人癌胚抗原(CEA)电化学发光免疫分析法(ECLIA)检测结果与同类进口试剂检测结果的可比性。方法 选取 77 例不同浓度的患者新鲜血清分别使用 2 种 ECLIA 试剂盒进行 CEA 检测, 并采用 SPSS19.0 软件对结果进行分析。结果 各剂量之间的差异有统计学意义($P < 0.05$), 而 2 种试剂测定结果之间差异无统计学意义($P > 0.05$); 该方法的灵敏度为 0.3 ng/mL, 批内变异系数 4.58%~5.83%, 批间变异系数 5.07%~5.97%, 回收率为 99.13%~107.28%, 特异性鉴定显示与 CA199、AFP 无任何交叉反应。2 种试剂测定结果间相关系数均大于 0.95, 以进口试剂检测作为参照, 自建 ECLIA 检测 CEA 临床性能评价均可接受。结论 2 种 ECLIA 检测 CEA 的精密度符合临床要求, 临床性能评价均可接受, 具有可比性。

关键词: 癌胚抗原; 电化学发光免疫分析法; 进口试剂

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2015.19.034

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2015)19-2852-03

The contrast research and application of electrochemiluminescence immuno-assay determination kits of human embryonic antigen*

Li Zhong, He Xiaoming, Li Peimin, Wen Lixian, Li Ya, Peng Youhai, Gan Haiying
(Shipai Hospital of Dongguan City, Dongguan, Guangdong 523330, China)

Abstract: Objective To evaluate the comparability of test results of self-built human carcinoembryonic antigen(CEA) electrochemiluminescence immunoassay(ECLIA) and imported reagent. **Methods** A total of different concentrations 77 fresh serum specimens were collected and detected CEA by two kinds of ECLIA kit. The results were analyzed with Excel2003 and SPSS19.0 software. **Results** The difference between each dose was significant ($P < 0.05$), and the detection results between each had no significant difference ($P > 0.05$); the sensitivity of the assay was 0.3 ng/mL, the intra coefficient of variation was 4.58%—5.83%, the inter coefficient of variation was 5.07%—5.97%, the analytical recovery was 99.13%—107.28%, the specificity of the assay had no cross reaction with CA199 and AFP. The correlation coefficient between two kinds of reagents determination results was greater than 0.95, with imported reagent as reference test, self-built carcinoembryonic antigen ECLIA clinical performance evaluation was acceptable. **Conclusion** The precision of the two kinds of ECLIA in detection of CEA accord to clinical requirement. Comparability exists in evaluating the acceptability of clinical.

Key words: carcinoembryonic antigen; electrochemiluminescence immunoassay; imported reagents

癌胚抗原(CEA)检测被认为是诊断结肠癌的有效方法^[1-2], 研究表明 CEA 在胰腺癌等恶性肿瘤检测中均呈高水平表达^[3-4]。目前全自动电化学发光免疫检测系统已广泛应用于临床血清 CEA 水平检测。本研究旨在探讨自建 CEA 电化学发光免疫分析(ECLIA)法的灵敏度、精密度、特异度和准确度, 以及与同类进口试剂检测结果的相关性, 确定实验室正常参考值范围及其与同类进口试剂的差异。现将研究结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2014 年 1~6 月本院住院的肺癌患者 52 例, 年龄 25~78 岁, 其中男 35 例, 女 17 例; 肠癌患者 39 例, 年龄 45~76 岁, 其中男 21 例, 女 18 例。所有患者组均经病理学检测确诊。另选择 254 例本院体检健康职工, 年龄 35~60 岁, 其中男 136 例, 女 118 例。

1.2 试剂盒的制备 采用 1 株 CEA 单克隆抗体进行生物素标记, 另外 1 株配对的 CEA 单克隆抗体进行钆复合物标记, 加上亲和素包被的磁性微粒组成 ECLIA 法试剂盒, 并在罗氏全自动 ECLIA 仪上进行血清标本 CEA 的检测。

1.3 仪器与试剂 以进口罗氏全自动 ECLIA 仪检测血清标本 CEA 测量值为参考, 链霉亲和素包被的磁性微粒由罗氏公司提供。配对的 CEA 抗体(鼠)由深圳菲鹏生物股份有限公司提供, 生物素标记蛋白试剂盒 EZ-link Sulfo-NHS-LC-Biotin 由 Thermo Scientific 公司提供, 按试剂盒说明进行生物素化的抗

CEA 单克隆抗体标记, 检测浓度 3.0 mg/L, 含 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液, 适量表面活性剂和蛋白稳定剂, pH6.0, 含防腐剂。钆复合物按文献[4]合成, 并标记配对的 CEA 单克隆抗体。钆复合物标记的抗 CEA 单克隆抗体检测浓度 4.0 mg/L、含 0.1 mol/L 的磷酸盐缓冲液, pH6.5, 适量表面活性剂和蛋白稳定剂, 含防腐剂。E411 型 ECLIA 仪和配套的吸头、孵育杯、清洁液、发光液均为罗氏公司产品。对照的进口 CEA ECLIA 法试剂盒为德国罗氏公司产品, 配套标准品和质控品, 并按照操作说明准确操作。

1.4 方法 采取空腹静脉血约 4 mL 于干燥试管, 检测前 3 000 r/min 离心 10 min 后取上清液待测, 3 h 内检测完毕。依据生物素化抗 CEA 单克隆抗体与钆复合物标记配对的抗 CEA 抗体形成的双抗体夹心法原理, 由仪器分别取 10 μ L 检测样品(标准品和质控品), 生物素化的 CEA 抗体约 70 μ L 和钆复合物标记的 CEA 抗体约 60 μ L 加入孵育杯内混匀, 37 $^{\circ}$ C 孵育 9 min。再加入链霉亲和素磁性微粒缓冲液约 50 μ L, 再孵育 9 min。然后将反应混合液吸入到测量池中, 微粒被电磁铁吸附到电极上, 通过清洗液洗去未结合的物质, 电极加压后产生化学发光, 通过光电倍增管进行测定。每个测试过程 18 min 完成。检测结果与罗氏公司 CEA ECLIA 法试剂盒(含标准品、质控品)检测结果进行检测性能和相关性分析。应用 Beckman 和 Abbott 不同水平的质控物, 每天选取高、中、低 3

* 基金项目: 2014 年东莞市医疗卫生科技计划一般项目(2014105101238)。 作者简介: 李忠, 男, 副主任技师, 主要从事临床检验研究。

个浓度患者 CEA 混合血清标本和 2 水平罗氏质控品各 1 份(3 mL 以上),0.3 mL 分装后 -20 °C 冻存。按照美国临床和实验室标准化协会(CLSI)Ep5-A 文件要求(每天 5 次,20 d, n=100),记录相关数据,分别计算批内变异系数(CV)值和批间 CV 值。灵敏度=真阳性例数/(真阳性例数+假阴性例数)×100%,特异度=真阴性例数/(真阴性例数+假阳性例数)×100%,精密度的计算方法 $X=A-B$ (X 为精密度;A 为单次测量的数值;B 为这一系列数的平均值),本文采用测定回收率的方法来评价定量分析结果的准确度。

1.5 临床判断标准 根据临床使用要求,批间允许误差不超过评价标准的 ±20%^[5];在两系统之间数据比较时预期偏倚(SE)和相对偏倚(SE%)分别用以下公式计算 $SE=|Y-X|$, $SE\%=(SE/XC) \times 100\%$ ^[4]。以 25 ng/mL 和 250 ng/mL 为血清 CEA 参考值上限。

1.6 统计学处理 采用 Excel2000 和 SPSS19.0 统计学软件

进行数据处理及统计学分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验,多个样本均数比较采用方差分析,系统差异性采用秩和 Wilcoxon 检验^[5], $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。任意两系统之间进行线性回归分析,计算方程 $Y=aX+b$ 。

2 结 果

2.1 ECLIA 检测试剂盒方法学试验结果

2.1.1 灵敏度 同时测得 30 个零标准的 CEA 浓度,以 $\bar{x} \pm 2s$ 计算灵敏度为 0.3 ng/mL。

2.1.2 精密度 批内 CV=4.58%~5.83%;批间 CV=5.07%~5.97%。2 种质控物 CEA 测定结果的批内 CV 值和批间 CV 值均小于评价标准 ±20% 的允许范围。各剂量对照组之间质控物浓度两两比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),各系统测定结果之间差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1~2。

表 1 采用 Beckman 作为质控物 CEA 测定结果的比较

检测方法	Beckman 1 (ng/mL)	批内 CV(%)	Beckman 2 (ng/mL)	批内 CV(%)	Beckman 3 (ng/mL)	批内 CV(%)	批间 CV(%)
自建试剂盒	31.21±1.41	4.58	42.36±2.62*	5.26	86.84±5.96*	5.76	5.97
进口试剂盒	32.19±1.43	4.44	43.29±2.71	5.17	87.68±5.83	5.68	5.19

*: $P < 0.05$,与进口试剂盒比较。

表 2 采用 Abbott 作为质控物 CEA 测定结果的比较

检测方法	Abbott 1 (ng/mL)	批内 CV(%)	Abbott 2 (ng/mL)	批内 CV(%)	Abbott 3 (ng/mL)	批内 CV(%)	批间 CV(%)
自建试剂盒	31.27±1.37	4.76	42.28±2.57	5.01	86.08±5.94	5.83	5.07
进口试剂盒	32.17±1.41	4.69	43.31±2.61	4.89	87.11±5.85	5.72	4.96

2.1.3 特异度 用零标准品对高浓度的 CA199、AFP 进行系列稀释(10~500 ng/mL),并作为样品在罗氏 e 全自动 ECLIA 仪中测定,结果显示 CA199、AFP 在浓度低于 500 ng/mL 时无任何交叉反应。

2.1.4 准确度 取 3 份不同 CEA 浓度的血清样品分别加入一定量的 CEA 标准品,对 CEA 的回收率进行测量,本方法回收率为 99.13%~107.28%。见表 3。

表 3 CEA-ECLIA 回收试验结果

期望值(ng/mL)	测定值(ng/mL)	回收率(%)
31.44	33.73	107.28
42.91	45.16	105.24
86.34	85.59	99.13

2.2 2 种试剂盒检测结果中位数比较 自建试剂盒、进口试剂盒 CEA 中位数(范围)分别为 32.27(4.61~322.66)、33.25(5.09~327.79)ng/mL,秩和 Wilcoxon 检验对标本间中位数进行比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.3 2 种试剂盒相关性比较和可接受性能评价 以进口试剂盒检测作为参照,与自建试剂盒检测进行比较,得线性回归方程 $Y_{自建}=1.038X_{进口}-3.247$, $r^2=0.9607$, $r^2 > 0.95$ 说明 2 种试剂盒检测结果存在线性相关。以进口试剂盒检测作为参照,计算自建试剂盒与进口试剂盒之间的 SE 与 SE%,与评价标准(±20%)进行比较,以 3 U/mL 为 CEA 参考值,SE 为 3.07 U/mL,SE% 为 9.53%;以 30 U/mL 为参考值,SE 为 13.68 U/mL,SE% 为 6.39%,自建试剂盒临床可接受性能评价均为可接受。

2.4 2 种试剂盒对临床患者测定结果的对照 分别对 77 例癌症患者、254 例本院体检健康职工进行 CEA 测定,癌症患者 CEA 采用进口试剂盒检测结果为(29.63±1.91)U/mL,采用自建试剂盒检测结果为(30.11±2.03)U/mL,两者之间比较差异无统计学意义($t=1.61, P > 0.05$);健康志愿者 CEA 采用进口试剂盒检测结果为(3.73±0.43)U/mL,采用自建试剂盒检测结果为(3.81±0.46)U/mL,两者之间比较,差异无统计学意义($t=1.61, P > 0.05$),说明自建试剂是可用的。

3 讨 论

血清 CEA 作为胰腺癌、胆管癌、胃癌、食道癌、肺癌、乳腺癌和泌尿系统肿瘤等肿瘤标志物^[6]。CEA 测定常用的方法有 ELISA、芯片法和 ECLIA 法等^[7]。ELISA 检测外周血 CEA 试剂成本低,适于手工批量定性检测^[8]。芯片法通量高。ECLIA 法已普及到大中型医学实验室。但试剂成本昂贵。本实验室在得到电化学发光核心材料钌复合物后,利用现有的仪器条件,用生物素和钌复合物标记 2 对 CEA 单克隆抗体(毫克量),经初选后系统地分析其中 1 对 CEA 单克隆抗体的检测性能。

ECLIA 试剂中抗体工作液最适体系配制是研制难点。以进口 ECLIA 仪检测血清标本 CEA 测量值作为本研究的参考值,链霉菌亲和素包被的磁性微粒、配对的 CEA 抗体(鼠)、生物素标记蛋白试剂盒 EZ-link Sulfo-NHS-LC-Biotin 均由相应公司提供,按试剂盒说明进行操作。钌复合物按文献合成并标记配对的 CEA 单克隆抗体^[9]。E411 型 ECLIA 仪和配套的吸头、孵育杯、清洁液、发光液均由 Roche 公司提供。本研究所对照的进口 CEA 电化学发光免疫检测法试剂盒(含标准品和质控品)均由德国 Roche 公司提供。

不断优化自建 ECLIA 法试剂中 2 种抗(下转第 2856 页)

再灌注后仍面临着很多不确定因素,后续的跟进治疗非常关键。因此尽早发现相对高风险人群,及时加强干预对于提高此类患者的预后意义重大。RDW 和 SUA 联合评估 PCI 术后 ACS 患者预后,目前尚鲜有报道。除证实 RDW 和 SUA 呈线性相关及二者的预后价值外,本文发现 $RDW \geq 14.5\%$ 且 $SUA \geq 402 \mu\text{mol/L}$ 的 ACS 患者死亡风险和心脏事件发生率均明显增加。2 项指标的联合应用对尽早筛选出 PCI 术后的高危患者,及时优化干预策略具有重要价值。受条件所限本研究入选的样本量较小,随访时间也只有 30 d,可能会对本研究的结果产生一定的影响,有待进一步扩大样本量和追踪远期预后后的更多研究加以佐证。

参考文献

- [1] Tonelli M, Sacks F, Arnold M, et al. Relation between red blood cell distribution width and cardiovascular event rate in People with coronary disease[J]. Arch Pathol Lab Med, 2008, 117(2): 163-168.
- [2] Azab B, Torbey E, Hatoum H, et al. Usefulness of red cell distribution width in predicting All-Cause Long-Term mortality after Non-ST-Elevation myocardial infarction[J]. Cardiology, 2011, 119(2): 72-80.
- [3] Felker GM, Allen LA, Pocock SJ, et al. Red cell distribution width as a novel prognostic marker in heart failure: data from the CHARM Program and the Duke Databank[J]. Coron Artery Dis, 2007, 50(1): 40-47.
- [4] 侯巍, 吴军. 红细胞分布宽度 (RDWC) 对冠心病患者预后的影响[J]. 中国实验诊断学, 2011, 13(2): 266-268.

- [5] Chu NF, Wang DJ, Liou SH, et al. Relationship between hyperuricemia and other cardiovascular disease risk factors among adult males in Taiwan[J]. Eur J Epidemiol, 2000, 16(1): 13-17.
- [6] 王瑜敏, 陈洁, 王晓慧, 等. 体检人群高尿酸血症与非高密度脂蛋白胆固醇和血浆致动脉硬化指数相关性研究[J]. 中华检验医学杂志, 2009, 32(2): 195-197.
- [7] Sevket B, Mehmet A, Omer K, et al. Red cell distribution width as a novel, simple, inexpensive predictor of mortality in patients with chronic heart failure[J]. Inter J Card, 2013, 168(3): 1114-1116.
- [8] 孙星河, 杜昕. 红细胞分布宽度-易被忽视的预后标志物[J]. 心血管病杂志, 2014, 33(3): 449-452.
- [9] Wang YL, Hua Q, Bai CR, et al. Relationship between Red Cell Distribution Width and Short-term Outcomes in Acute Coronary Syndrome in a Chinese Population[J]. Intern Med, 2011, 50(24): 2941-2945.
- [10] Levine W, Dyer AR, Shekelle RB, et al. Serum uric acid and 11.5-year mortality of middle-aged women: findings of the Chicago Heart Association Detection Project in Industry[J]. J Clin Epidemiol, 1989, 42(3): 257-267.
- [11] Freedman DS, Williamson DF, Gunter EW, et al. Relation of serum uric acid to mortality and Ischemic heart disease[J]. Am J Epidemiol, 1995, 141(7): 637-644.
- [12] 胡大一, 马长生. 心脏病学实践 2014[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2014: 162-165.

(收稿日期: 2015-05-28)

(上接第 2853 页)

体的最适工作浓度和条件。试剂配方中自选理化指标(钾钠氯离子和清蛋白浓度等)基本接近同类进口试剂。差异部分有待于通过增加配对抗体标记测试数量, 筛选到最接近进口试剂检测性能的抗体。自建试剂用国产 CEA 单克隆抗体进行标记和检测, 使发光试剂产业化具有了可能性。

在实用型化学发光类仪器中, 进口仪器自动化和集成化程度高, 使用起来高效、便利, 已打开了国内外市场。国产半自动 ECLIA 仪推广有难度。国内全自动 ECLIA 试剂和仪器处于研发初级阶段^[10]。本研究对 CEA 等单克隆抗体进行的生物素和钆复合物标记工艺流程和配方的探索是十分必要的。

本研究表明, 使用自建试剂盒、进口试剂盒在罗氏全自动 ECLIA 仪的检测精密密度基本一致, 检测结果的可靠性较高。其中各剂量对照之间的差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 而 2 种检测方法测定结果之间差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 2 种检测方法的差异性比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 数据分析结果显示 2 种检测方法相关性较好(其线性回归方程为 $Y_{\text{自建}} = 1.038X_{\text{进口}} - 3.247$, $r^2 = 0.9607$); 且批内 CV 值和批间 CV 值均在评价标准 ($\pm 20\%$) 的允许范围之内, 自建试剂盒 ELISA 法检测临床评价可接受。

综上所述, 在 CEA 评价标准为 $\pm 20\%$ 的前提下, 以进口 CEA 检测试剂盒(德国罗氏公司产品, 含标准品和质控品)为参照, 自建试剂盒检测临床性能评价可接受, 测定结果差异不明显, 具有可比性。

参考文献

- [1] 廖琳. CEA、CA19-9 与 CA72-4 联合检测对结肠癌的临床应用

[J]. 中国实用医药, 2013, 8(34): 3-4.

- [2] Hao TT, Guo ZY, Du SP, et al. Ultrasensitive detection of carcinoembryonic antigen based on electrochemiluminescence quenching of Ru (bpy) $32+$ by quantum dots [J]. Sensors & Actuators: B. Chemical, 2012, 21(171/172): 803-809.
- [3] Pandey B, Alexei VD, Keith JS, et al. Nanoporous Gold as a solid support for protein immobilization and development of an electrochemical immunoassay for prostate specific antigen and carcinoembryonic antigen[J]. Microchimica Acta, 2012, 179(1): 71-81.
- [4] 朱珊玲, 王浩. CA724、CA125、CA199、CEA 在结直肠癌诊断中的价值[J]. 海南医学院学报, 2014, 20(1): 87-89.
- [5] 牟晓峰, 周爱凤, 赵白云, 等. 高通量 ELISA 法与电化学发光法测定血清癌胚抗原的比较[J]. 国际检验医学杂志, 2014, 22(22): 3088-3089.
- [6] 潘俊辉, 邱海山. 血清 CEA、SCC、CYFRA21-1、ProGRP 联合检测在肺癌诊断中的价值[J]. 中华肺部疾病杂志: 电子版, 2014, 7(4): 40-43.
- [7] 彭文忠, 余高冰. ELISA 与 ICA 对癌胚抗原检测的比较[J]. 中外医学研究, 2013, 21(21): 147-148.
- [8] 潘小萍. 电化学发光法与 Elisa 法检测癌胚抗原比较[J]. 内蒙古中医药, 2013, 32(2): 92-93.
- [9] Seiler M, Durr H, Willner E, et al. Photo-induced electron transfer in supra-molecular assemblies composed of dialkoxybenzene-tethered Ruthenium (II) trisbipyridine and bipyridinium salts[J]. J Am Chem Soc, 1994, 116(19): 3399-3404.
- [10] 张玫, 施绍瑞, 张林, 等. 电化学发光免疫分析法检测人胰岛素原方法的建立[J]. 中华检验医学杂志, 2009, 32(9): 1015-1018.

(收稿日期: 2015-06-15)