

• 论 著 •

免疫比浊法检测血清游离轻链的方法学评价^{*}陈建平¹, 杨曙梅¹, 丁 烨², 王惠民¹, 鞠少卿¹, 丛 辉^{1△}

(1. 南通大学附属医院检验科, 江苏南通 226001; 2. 南通大学公共卫生学院医学检验系, 江苏南通 226019)

摘要:目的 对 Beckman Immage 800 全自动特种蛋白分析仪检测血清游离 κ 、 λ 轻链(sFLC)进行方法学评价。方法 通过 Beckman Immage 800 定量测定 sFLC, 探讨其精密度、正确度、分析测量范围、干扰和携带污染率, 同时对其参考区间进行验证。结果 κ FLC 低、高值批内精密度的变异系数(CV)分别为 7.84%、2.95%, 批间精密度的 CV 分别为 7.38%、5.57%; λ FLC 低、高值批内精密度(CV)分别为 4.59%、3.94%, 批间精密度 CV 分别为 3.97%、2.01%; 测定 κ FLC、 λ FLC 定值质控血清与靶值的偏倚小于 5%; κ FLC、 λ FLC 分析测量范围分别为 10.8~128.0 mg/L、10.1~121.0 mg/L 时, a 值在 0.95~1.05, $r^2 \geq 0.98$; κ FLC、 λ FLC 携带污染率分别为 0.411%、0.216%; 干扰试验结果显示游离胆红素 $\leq 342.0 \mu\text{mol/L}$ 、结合胆红素 $\leq 342.0 \mu\text{mol/L}$ 、血红蛋白 $\leq 5 \text{ g/L}$ 和乳糜 ≤ 2400 浊度时, 对 sFLC 结果无明显影响; 40 例健康体检者中有 1 例 κ FLC 测定结果超出厂家推荐的参考区间, 40 例 λ FLC 检测值均在厂家推荐的参考区间内。结论 Beckman Immage 800 全自动特种蛋白分析仪检测 sFLC 的主要分析性能符合质量目标的要求, 能够为临床提供科学、准确的诊疗依据。

关键词:全自动特种蛋白分析仪; 方法学评价; 血清游离轻链

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.15.004

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2016)15-2058-03

Methodological evaluation on serum free light chains detected by immunoturbidimetry^{*}CHEN Jianping¹, YANG Shumei¹, DING Ye², WANG Huimin¹, JU Shaoqing¹, CONG Hui^{1△}

(1. Department of Clinical Laboratory, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong, Jiangsu 226001, China; 2. Department of Laboratory Medicine, School of Public Health, Nantong University, Nantong, Jiangsu 226019, China)

Abstract: Objective To perform the methodological evaluation on Beckman Immage 800 automatic special protein analyzer for determining serum free κ , λ light chains (sFLC). **Methods** The Beckman Immage 800 automatic special protein analyzer was used to quantitatively detect sFLC values for investigating its precision and accuracy, analyzing its detecting range, interference and residual contamination rate, meanwhile verifying its reference intervals. **Results** The low and high values of within-run precision coefficients of variation(CV) for κ sFLC were 7.84% and 2.95% respectively; which of between-run precision CV were 7.38% and 5.57% respectively. The within-run precision CV for λ FLC were 4.59% and 3.94% respectively, which of between-run precision CV were 3.97% and 2.01% respectively; bias for detecting the κ FLC and λ FLC fixed quality serum and the target values was less than 5%, when the analytical detection ranges of κ FLC and λ FLC were 10.8~128.0 mg/L and 10.1~121.0 mg/L, a value was 0.95~1.05, $r^2 \geq 0.98$; the carry-over rates of κ FLC and λ FLC were 0.411% and 0.216% respectively. The interference test results showed that when free hemoglobin $\leq 342.0 \mu\text{mol/L}$, conjugated bilirubin $\leq 342.0 \mu\text{mol/L}$, hemoglobin $\leq 5 \text{ g/L}$ and chyle ≤ 2400 turbidness, which had no influence on sFLC results; among 40 healthy subjects undergoing the physical examination, 1 case of κ FLC detection results exceeded the reference interval recommended by the manufacturer, while the λ FLC detection values in these 40 cases were all within the reference interval recommended by the manufacturer. **Conclusion** The main analytical performance of the Beckman Immage 800 automatic special protein analyzer for detecting sFLC meets the requirements of quality objectives and can provides the scientific and precise evidence of diagnosis and treatment for clinic.

Key words: full automatic special protein analyzer; methodology evaluation; serum free light chains

血清游离轻链(sFLC)包含游离 κ 、 λ 轻链, 是判断患者体内是否存在克隆性浆细胞的高度敏感指标。定量检测 sFLC 以及计算游离 κ / λ 的比值有助于多发性骨髓瘤(MM)、原发性淀粉样变(AL)、未定性单克隆丙种球蛋白病(MGUS)等疾病的诊断、疗效判断及预后评估^[1]。血清 κ 、 λ 轻链和免疫固定电泳在一定程度上有助于 MM 的诊断, 但均有一定的方法学局限性, 如血清轻链测定的是血清中总轻链量, 敏感性差; 免疫固定电泳的敏感度也仅有 150~500 mg/L, 从而易致患者的漏诊。2006 年, 国际骨髓瘤协作组(IMWG)将患者 sFLC 水平引入 MM 的评定标准中, 作为完全缓解(sCR)的疗效分类标准,

确立了 sFLC 定量检测在临床应用中的地位和价值^[2]。近年来, sFLC 的检测得到了国内越来越多临床医生的重视和患者的高度关注^[3]。目前, 我国临床实验室测定 sFLC 主要采用免疫比浊法, 关于 Beckman Immage 800 全自动特种蛋白仪测定 sFLC 方法学评价的文献较少见。本次试验参考美国临床实验室标准化委员会(NCCLS)的相关文件及文献, 探讨了 Beckman Immage 800 散射比浊法检测 sFLC 的方法学评价。

1 材料与方法

1.1 一般资料 选取 2015 年 1~10 月南通大学附属医院门诊和病房多发性骨髓瘤确诊患者 40 例及体检中心健康体检者

* 基金项目:江苏省卫生厅项目(H201526);江苏省“六大人才高峰”基金项目(WS-066)。

作者简介:陈建平,女,主管检验技师,从事临床免疫检验工作。△ 通讯作者, E-mail: huicjs@163.com。

血清 40 例。静脉抽血 5 mL, 4 000 r/min 离心 10 min, 分离血清备用。

1.2 仪器与试剂 美国 Beckman Coulter Immage 800 全自动特种蛋白分析仪; 英国 Binding Site 公司 FreeliteTM 血清游离轻链检测试剂盒 (κ FLC 批号 344785G, λ FLC 批号 349269A); FreeliteTM sFLC 配套校准品 (κ FLC 批号 344965, λ FLC 批号 347207); FreeliteTM sFLC 配套质控品 (κ FLC 批号 351843, λ FLC 批号 347208); 日本 Sysmex A-Plus 干扰试剂盒 (批号 ZS1001)。

1.3 方法

1.3.1 建立 sFLC 比浊法测定法 根据 FreeliteTM sFLC 说明书设置仪器参数: 标本量 5 μ L, Buffer 195 μ L, 稀释倍数 1:10。6 点校准, 每个浓度校准品重复测定两次。

1.3.2 精密度评价 根据 NCCLS EP5-A2^[4] 文件方案进行操作, 常规质控在控后按标本检测程序进行测定。分别取 sFLC 低、高两个不同浓度的新鲜混合血清进行试验 (H: κ FLC 67.21 mg/L, λ FLC 116.51 mg/L; L: κ FLC 9.35 mg/L, λ FLC 21.44 mg/L), 连续重复测定 20 次, 计算其批内均值 (\bar{x})、标准差 (s) 及变异系数 (CV); 将 sFLC 低、高浓度血清分别分装于 Eppendorf 管, 保存于 -20 °C, 用于批间精密度试验, 每天上、下午各测定一次, 连续测定 10 d, 分别计算 sFLC 批间精密度。

1.3.3 正确度评价 参照 NCCLS EP15-A^[5], 按照检测定值的参考物质计算偏差进行验证: 测定高、低两个水平质控品, 每天测定 2 次, 连续测定 5 d, 计算 10 次检测结果均值, 将各自检测结果与靶值进行对比, 计算检测值与靶值的相对偏倚 (%), 计算公式: 偏倚 = (测定值 - 靶值) / 靶值 × 100%。

1.3.4 分析测量范围评价 参照 NCCLS EP6-A^[6] 文件, 分别选择 sFLC 含量接近厂家线性范围上限的新鲜血清标本 1 份作为高值浓度水平 (H: κ FLC 128.0 mg/L, λ FLC 121.0 mg/L), sFLC 含量低的健康体检者血清作为低值浓度水平 (L: κ FLC 10.8 mg/L, λ FLC 10.1 mg/L) 1 份, 按照 5H、4H+L、3H+2L、2H+3L、H+4L、5L 的关系分别配制 6 个浓度梯度, 对各浓度水平进行 sFLC 测定, 各浓度重复测定 4 次, 对测定结果的均值和理论值进行线性回归统计, 计算回归方程: $Y = aX + b$, 进行分析测量范围评价。a 值应在 1 ± 0.05 范围内, 相关系数 (r^2) ≥ 0.950 。

1.3.5 携带污染率评价 参照文献 [7], 分别选取高水平 FLCs 新鲜血清标本连续测定 3 次, 测定值分别为 H1、H2、H3; 再分别选取低水平 sFLC 新鲜血清标本连续测定 3 次, 测定值分别为 L1、L2、L3, 计算携带污染率。携带污染率 = $(L1 - L3) / (H3 - L3) \times 100\%$ 。携带污染率应 $\leq 2.0\%$ 。

1.3.6 特异性评价 参照 EP7-A2^[8] 文件方案, 通过评价标本中出现游离胆红素 (BU)、结合胆红素 (BC)、血红蛋白 (Hb) 和乳糜微粒 (CM) 的干扰来检验方法学的特异性。分别选择 κ FLC 为 39.0 mg/L, λ FLC 为 47.0 mg/L 的新鲜血清 (无溶血、黄疸、脂血) 作为基础标本。将血清标本分 2 份, 作为 1 号及 6 号管。1 号管加入 10% 干扰物空白液, 6 号管加入 10% 干扰物, 1 号管和 6 号管分别按照 4:1、3:2、2:3、1:4 比例混合成 2、3、4、5 号管, 形成不同的干扰物浓度 (4 种干扰物各管终浓度见表 1)。测定各管 sFLC 浓度, 每管重复 4 次, 计算各组均值 (\bar{x}_i); 1 号管连续重复测定 20 次, 计算均值 (\bar{x}_e)、 s , 以 \bar{x}_e 在 $\bar{x}_i \pm 1.96s$ 范围内无显著干扰为判断标准。

1.3.7 参考区间验证 参照 NCCLS C28-A2^[9] 文件选取 2015 年 8 月南通大学附属医院体检中心健康体检者 40 例。健康参考个体选择标准: (1) 男、女各 20 例, 年龄 20~60 岁, 无

吸烟、饮酒, 自觉健康者; (2) 无急慢性感染、呼吸系统疾病、过敏性疾病、肝胆管疾病、血液性疾病、肾脏疾病、风湿性疾病、血管病和高血压; (3) 近期未手术、输血、大量失血和服用药物; (4) 无慢性理化损伤或接触化学损伤。测定 sFLC, 将检测结果与参考区间比较 (厂家参考区间: κ FLC 3.30~19.40 mg/L; λ FLC 5.71~26.30 mg/L)。检测结果若超出参考区间的数据不超过 10%, 则通过验证, 以判定厂家提供的生物参考区间有效。

表 1 4 种干扰物各管浓度表

编号	BU 浓度 (μ mol/L)	BC 浓度 (μ mol/L)	Hb 浓度 (g/L)	CM 浓度 (浊度)
1	0	0	0	0
2	68.4	68.4	1	600
3	136.8	136.8	2	1 200
4	205.2	205.2	3	1 800
5	273.6	273.6	4	2 400
6	342.0	342.0	5	3 000

1.4 统计学处理 采用 Microsoft Excel 2003 软件对精密度试验、特异性试验数据进行统计及 Origin75 统计软件对分析测量范围数据进行回归分析。

2 结果

2.1 sFLC 精密度评价结果 分别用低、高两个浓度血清做批内和批间精密度评价, κ FLC 低、高浓度血清批内 CV 分别为 7.84%、2.95%, 批间 CV 分别为 7.38%、5.58%; λ FLC 低、高浓度血清批内 CV 分别为 4.59%、3.94%, 批间 CV 分别为 4.00%、2.01%, 见表 2。

表 2 sFLC 批内精密度

标志物	标本号	批内			批间		
		\bar{x} (mg/L)	s (mg/L)	CV (%)	\bar{x} (mg/L)	s (mg/L)	CV (%)
κ FLC	低	9.33	0.73	7.84	9.39	0.69	7.38
	高	66.34	1.95	2.95	69.39	3.87	5.58
λ FLC	低	21.67	0.99	4.59	21.02	0.88	4.00
	高	116.63	4.59	3.94	116.62	2.33	2.01

2.2 sFLC 正确度评价结果 κ 、 λ FLC 正确度验证结果见表 3, κ FLC 相对偏倚分别为 3.01%、-3.81%, λ FLC 相对偏倚分别为 2.28%、-4.58%, 结果均低于厂家说明书的偏倚值, 正确度满足要求。见表 3。

表 3 sFLC 准确度评价试验

标志物	校准品	靶值 (mg/L)	检验值 (mg/L)	偏倚 (%)
κ FLC	L	16.60	17.10	3.01
	H	34.10	32.80	-3.81
λ FLC	L	26.30	26.90	2.28
	H	54.50	52.00	-4.58

2.3 sFLC 分析测量范围评价结果 分别测量 sFLC 6 个浓度混合血清, 计算均值, 将测定均值与理论预期值比较, 偏倚均小于 10%; 同时将测定均值与理论值进行线性回归分析, 本系

本研究中,单因素 Logistic 回归和校正了年龄、性别、LDL-C 和 non-HDL-C 的多因素 Logistic 回归均证实了 SUA 水平为冠心病的独立危险因素,但 OR 值较小,并未有国外研究中的值大,可能与不同的人群或不同的样本量有关,进一步的研究还需要收集更多的人群进行前瞻性研究以确定两者的因果关系。

本研究发现 SUA 水平与冠心病的患病率及其严重程度呈正相关,在女性和相对低年龄(30~70岁)人群中效应更为明显,提示在中青年女性中要注意 SUA 水平,一定程度上可能指示有冠心病风险。此外,SUA 水平对不同性别和年龄人群的影响及其生物学机制还需进一步深入研究。

参考文献

- [1] Gertler MM, Garn SM, Levine SA. Serum uric acid in relation to age and physique in health and in coronary heart disease[J]. Ann Intern Med, 1951, 34(6):1421-1431.
 - [2] Kim SY, Guevara JP, Kim KM, et al. Hyperuricemia and coronary heart disease:a systematic review and meta-analysis[J]. Arthritis Care Res (Hoboken), 2010, 62(2):170-180.
 - [3] Wheeler JG, Juzwischin KD, Eiriksdottir G, et al. Serum uric acid and coronary heart disease in 9 458 incident cases and 155 084 controls:prospective study and meta-analysis [J]. PLoS Med, 2005, 2(3):e76.
 - [4] Jin M, Yang F, Yang I, et al. Uric acid, hyperuricemia and

(上接第 2060 页)

合适的参考区间对疾病的预防、诊断、疗效评价及预后有着重要的意义^[14]。本次试验中对厂家提供的 sFLC 参考区间进行了验证。厂家提供的 κ FLC 参考范围是 3.30~19.40 mg/L, λ FLC 参考范围是 5.71~26.30 mg/L。通过对 40 例健康体检者进行 sFLC 检测分析,结果表明厂商提供的 sFLC 参考区间适用于本地区、本实验室使用。

本次研究结果表明,在 Immage 800 全自动特种蛋白分析仪上测定 sFLC 的方法精密度高,正确度高,线性良好,携带污染率低,抗干扰能力强。

综上所述,Immage 800 检测 sFLC 的主要分析性能符合临床质量管理目标的要求,是一种简便、快捷、准确、可靠的临床检测方法,能够为临床医生在疾病的诊疗过程中提供可信的实验室依据。

参考文献

- [1] Katzmann JA, Willrich MA, Kohlhagen MC, et al. Monitoring IgA multiple myeloma: immunoglobulin heavy/light chain assays[J]. Clin Chem, 2015, 61(2):360-367.
 - [2] Duri E, Harousseau JL, Miguel JS, et al. International uniform response criteria for multiple myeloma[J]. Leukemia, 2006, 20:2220-2226.
 - [3] 陈耐飞, 崔久嵬, 姚迪, 等. 血清游离轻链检测在多发性骨髓瘤诊治中作用的临床评价[J]. 临床血液学杂志, 2012, 25(6):703-705.
 - [4] NCCLS. Evaluation of precision performance of quantitative measurement methods. Approved guidelines second edition: EP5-A2[S]. Wayne, PA, USA: NCCLS, 2004.

vascular diseases[J]. Front Biosci (Landmark Ed), 2012, 17:656-669.

- [5] Wang H, Wang L, Xie R, et al. Association of serum uric acid with body mass index: a Cross-Sectional study from Jiangsu province, China[J]. Iran J Public Health, 2014, 43(11):1503-1509.
 - [6] Lin KC, Tsai ST, Lin HY, et al. Different progressions of hyperglycemia and diabetes among hyperuricemic men and women in the kinmen study[J]. J Rheumatol, 2004, 31(6):1159-1165.
 - [7] Uslu S, Ozcelik E, Kebapci N, et al. Effects of serum uric acid levels on the arginase pathway in women with metabolic syndrome[J]. Ir J Med Sci, 2016, 185(1):259-263.
 - [8] Kawamoto R, Katoh T, Ninomiya D, et al. Synergistic association of changes in serum uric acid and triglycerides with changes in insulin resistance after walking exercise in community-dwelling older women[J]. Endocr Res, 2016, 4:1-6.
 - [9] Kawamoto R, Tabara Y, Kohara K, et al. Synergistic influence of age and serum uric acid on blood pressure among community-dwelling Japanese women[J]. Hypertens Res, 2013, 36(7):634-638.

(收稿日期:2016-02-25 修回日期:2016-05-17)

- [5] NCCLS. User demonstration of performance for precision and accuracy. Approved guideline: EP15-A [S]. Wayne, PA, USA: NCCLS, 2001.
 - [6] NCCLS. Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures. Statistical approved guideline: EP6-A [S]. Wayne, PA, USA: NCCLS, 2003.
 - [7] 普程伟, 尚柯, 王建中, 等. UniCel DxH 800 血细胞分析仪临床应用评价 [J]. 中华检验医学杂志, 2012, 35(7): 643-646.
 - [8] CLSI. Interference testing in clinical chemistry: EP7-A2 [S]. Wayne, PA, USA: CLSI, 2005.
 - [9] NCCLS. How to define and determine reference intervals in the clinical laboratory; approved guideline-second edition: C28-A2 [S]. Wayne, PA, USA: NCCLS, 2000.
 - [10] College of American Pathologists. Clinical Immunology Checklist [R]. Northfield: CAP, 2006: 1-21.
 - [11] 丛玉隆, 冯仁丰, 陈晓东. 临床实验室管理 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2004: 72-73.
 - [12] 赵建忠. 生化分析仪精密度、准确性以及线性范围性能验证 [J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(10): 1111-1112.
 - [13] 蒋红君, 蒋杰, 王凡. 全自动生化分析仪的检测精密度、准确度评价及参考区间的验证 [J]. 国际检验医学杂志, 2013, 34(9): 1147-1148.
 - [14] 冯仁丰. 临床检验质量管理技术基础 [M]. 上海: 上海科学技术文献出版社, 2003: 1-136.

(收稿日期:2016-01-25 修回日期:2016-05-04)