

• 临床研究 •

国产细胞角蛋白 19 片段 CYFRA21-1 化学发光定量检测试剂盒的性能评估*

方宜臻¹, 叶辉铭¹, 刘江武², 金宏伟¹, 林永志¹, 颜水堤¹, 于洋¹, 高磊², 徐飞海², 张忠英^{1△}

(1. 厦门大学附属中山医院检验科, 福建厦门 361000; 2. 厦门万泰凯瑞生物技术有限公司, 福建厦门 361000)

摘要:目的 对厦门万泰凯瑞生物技术有限公司的细胞角蛋白 19 片段非小细胞肺原相关抗原 21-1(CYFRA21-1)化学发光定量检测试剂盒进行分析性能评估。方法 依据《体外诊断试剂分析性能评估系列指导原则》等文件对试剂盒的敏感性、线性范围、可报告范围、准确度、精密密度、交叉反应等性能进行评估,同时与电化学发光法平行比对,检测配对血清/血浆结果的一致性。结果 该试剂盒检测最低限为 0.1 ng/mL;线性范围为 0.1~1 000.0 ng/mL;可报告范围达 0.1~2 000.0 ng/mL;批内精密密度为 6.15%~9.46%,批间精密密度为 7.57%~11.00%;回收率达 99.60%;与多种常见肿瘤抗原无交叉反应;轻度溶血、胆红素小于或等于 340 μmol/L、三酰甘油小于或等于 18.1 μmol/L 及类风湿因子小于或等于 400 U/mL 时,对试剂无显著干扰;与电化学发光法检测总符合率为 98.56%,一致性良好($P < 0.05$, $Kappa = 0.965$);血清、血浆标本检测一致性良好($P < 0.05$, $Kappa = 0.936$)。结论 厦门万泰凯瑞生物技术有限公司生产的细胞角蛋白 19 片段 CYFRA21-1 化学发光定量检测试剂盒各项性能评估良好,可满足临床检测要求。

关键词:细胞角蛋白 19 片段; 试剂; 化学发光免疫分析法; 方法学评价

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.22.031

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2016)22-3177-04

细胞角蛋白是一种构成上皮组织中间纤维亚单位的结构蛋白,是细胞骨架的重要组成部分^[1]。人体中约有 20 种相对分子质量为(40~70)×10³的角蛋白,其中细胞角蛋白 19 在正常状态下水平极低,当细胞恶性变时大量细胞角蛋白 19 的可溶性片段释放入血,通过 2 种特异性单克隆抗体 KS19.1 和 BM19.21 可测定出相对分子质量约为 30×10³的细胞角蛋白 19 片段^[2]。众多研究发现,血液、尿液中的细胞角蛋白 19 片段是一种重要肿瘤标志物,在非小细胞肺癌^[3]、鼻咽癌^[4-5]、膀胱癌^[6-8]、食管癌等肿瘤中均具有良好的临床诊断价值^[9]。

目前,非小细胞肺癌相关抗原 21-1(CYFRA21-1)的检测方法主要以电化学发光法和化学发光法免疫分析法为主,2 种方法具有高敏感性、高特异性、高稳定性等优点,但是 95.00% 以上的市场份额都被国外品牌所占领,且试剂盒成本昂贵。因此,开发具有自主知识产权,评估并使用性能稳定、优良的国产 CYFRA21-1 化学发光法免疫分析试剂盒是打破国外品牌长期垄断局面的有效途径,能大大降低临床检验 CYFRA21-1 的成本,降低医疗费用。

厦门万泰凯瑞生物技术有限公司与本实验室合作,对厦门万泰公司的细胞角蛋白 19 片段 CYFRA21-1 定量检测试剂盒的敏感性、线性范围、交叉反应等性能进行评价,同时与德国罗氏公司的 CYFRA21-1 定量测定试剂盒(电化学发光法)进行平行比对,结果显示国产试剂各性能指标良好。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 (1)比对血清:2013 年 7 月患者血清标本中选取 348 例标本,用于试剂 A、B 平行比对试验。(2)准确度验证试验血清:标本库选取 1 例健康人血清,用于准确度验证试验。(3)可报告范围验证血清:标本库中选取 5 例不同 CYFRA21-1 水平低值标本和 3 例不同 CYFRA21-1 水平高值标本用于可报告范围验证试验。(4)精密密度试验标本:标本库中选取 1 例低值及 1 例高值血清(血清标本 1、血清标本 2)用

于精密密度试验。(5)血清/血浆相关性分析标本:收集 2013 年 7 月 99 例患者配对血清/血浆标本共 99 对 198 例,用于血清/血浆一致性分析。(6)交叉反应试验标本:标本库中选取 42 例甲胎蛋白(AFP)、肿瘤抗原(CA)12-5、CA15-3、CA19-9、癌胚抗原(CEA)、鳞状细胞癌相关性抗原(SCC)分别为阳性且 CYFRA21-1 经电化学发光法检测为阴性的标本,用于交叉反应试验。

1.2 仪器与试剂

1.2.1 仪器 采用 CARIS 系列化学发光仪(厦门优迈科医学仪器有限公司),COBAS e601(德国罗氏公司)。

1.2.2 试剂 (1)试剂 A:厦门万泰凯瑞生物技术有限公司生产的细胞角蛋白 19 片段 CYFRA21-1 定量检测试剂盒(批号 RM2013031501、RM2013031601、RM2013031701);(2)试剂 B:德国罗氏公司的非小细胞肺癌相关抗原 21-1 定量测定试剂盒(批号 173353);(3)干扰物:胆红素(Aladdin Chemistry Co. Ltd,批号 39340)、三酰甘油(Aladdin Chemistry Co. Ltd,批号 55543)、类风湿因子(Biorbyt,批号 D6987);(4)L 系列参考品(厦门万泰凯瑞生物技术有限公司,批号 20130326);(5)参考品 M(0 水平校准品,厦门万泰凯瑞生物技术有限公司,批号 20130326);(6)企业一级校准品(厦门万泰凯瑞生物技术有限公司,批号 20130314)。

1.3 方法

1.3.1 分析敏感性评价 试剂 A 检测梯度稀释的 L 系列参考品并拟合剂量反应曲线,同时重复测定 0 水平校准品 20 次,计算最低检测限。

1.3.2 线性范围评价 参考 CLSI EP-6A 文件提供的方案并依据《体外诊断试剂分析性能评估系列指导原则》^[10],用试剂 A 检测梯度稀释的企业一级校准品,以校准品水平对数为 X,测定水平平均值对数为 Y 建立回归方程并计算偏离直线平均差异(ADL),评价其线性范围。

* 基金项目:厦门市重点实验室基金资助项目(3502Z20130006);福建省科技计划项目(2011D018)。

△ 通讯作者, E-mail: zhangzy1121@xmu.edu.cn。

1.3.3 可报告范围评价 参考 CLSI EP-6A 文件并依据《体外诊断试剂分析性能评估系列指导原则》^[10], 试剂 A 重复检测 5 个水平的低值标本 (Y1、Y2、Y3、Y4、Y5) 及 3 个不同水平的高值标本 (H1、H2、H3)。变异系数 (CV) ≤ 10.00% 的最低水平作为可报告范围低限。高值标本还原水平与理论水平偏差 不超过 (±10.00)% 时, 其还原水平为可报告范围高限。

1.3.4 准确度评价 20 μL 稀释校准品加入 180 μL 健康人血清制得混合血清, 将稀释校准品、正常人血清及混合血清重复测量 3 次, 参考 CLSI EP9-A2 文件并根据《体外诊断试剂分析性能评估系列指导原则》计算准确度^[11]。

1.3.5 精密度评价 基于《YYT 1175-2010 肿瘤标志物定量测定试剂(化学发光免疫分析法)》的有关要求并参考 CLSI EP5-A 文件^[12], 用 3 批试剂 (批号: RM2013031501、RM2013031601、RM2013031701) 检测血清标本 1、2 并计算批内和批间 CV。

1.3.6 干扰试验 参考 CLSI EP7-A 文件并依据《体外诊断试剂分析性能评估系列指导原则》^[13], 用 3 批试剂 (批号 RM2013031501、RM2013031601、RM2013031701) 分别检测同一患者溶血前与溶血后的血清标本, 考察轻度溶血对试剂准确度的影响; 用健康人血清稀释胆红素溶液、三酰甘油溶液及类风湿因子溶液, 测试胆红素、三酰甘油及类风湿因子对试剂检测准确度的影响。计算添加干扰因素前后的百分偏差 (Bias), 以超过 ±10.00% 判定为存在干扰。

1.3.7 交叉反应验证 试剂 A 检测 42 例交叉反应试验标本, 用于交叉反应的验证。

1.3.8 试剂 A 与试剂 B 平行对比试验 试剂 A、B 平行测定 347 例患者血清 CYFRA21-1 水平, 以试剂 B 的结果为 X, 试剂 A 结果为 Y, 构建线性回归方程。同时, 根据各试剂的参考范围将结果判为 CYFRA21-1 异常或正常, 计算总符合率并进行一致性分析和相关性分析。

1.3.9 血浆/血清相关性分析 试剂 A 检测 99 对 198 例配对血清/血浆标本, 比较血清、血浆标本检测结果的一致性、相关性并以血浆检测结果为 Y, 血清检测结果为 X 进行简单线性回归分析。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 19.0 软件进行统计分析。采用多项回归分析并计算 ADL, 当 ADL 小于相应临界值时认为多项式具有临床可接受的非线性; 一致性评价采用 Kappa 一致性检验, 相关性分析采用 Pearson 相关性分析, 线性回归分析采用简单线性回归分析, 当 P < 0.05 时表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 分析敏感性评价 剂量反应曲线见图 1, 试剂 A 最低检测水平平均值为 0.095 2 ng/mL, 该试剂盒最低检出限为 0.1 ng/mL。

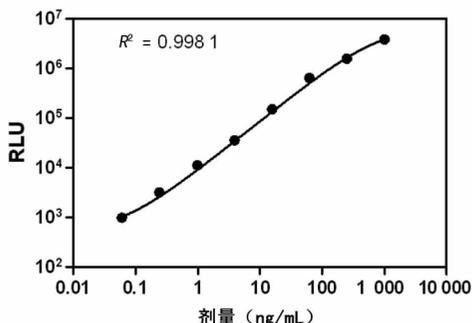


图 1 试剂 A (RM2013031501) 的剂量反应曲线

2.2 线性范围评价 检测结果, 见表 1。PetBnd 取 5.00% 时, ADL 均小于其临界值具有临床可接受的非线性, 见表 2。因此, 本试剂盒线性范围为 0.1~1 000.0 ng/mL。

表 1 试剂 A (RM2013031501) 对企业一级校准品梯度稀释的检测结果 (ng/mL)

| 组别 | 水平 1 | 水平 2 | 水平 3 | 水平 4 | \bar{x} | CV (%) |
|----------|--------|--------|----------|----------|-----------|--------|
| 1 000.00 | 979.44 | 961.56 | 1 044.88 | 1 015.53 | 1 000.35 | 3.72 |
| 250.00 | 258.23 | 242.39 | 237.52 | 263.23 | 250.34 | 4.92 |
| 62.50 | 61.96 | 59.22 | 70.50 | 58.72 | 62.60 | 8.72 |
| 15.63 | 15.71 | 15.40 | 16.01 | 14.74 | 15.47 | 3.51 |
| 3.91 | 3.91 | 3.87 | 4.01 | 3.76 | 3.89 | 2.66 |
| 0.98 | 1.03 | 1.14 | 1.03 | 1.00 | 1.05 | 5.87 |
| 0.24 | 0.26 | 0.26 | 0.27 | 0.28 | 0.27 | 3.55 |
| 0.06 | 0.049 | 0.043 | 0.039 | 0.044 | 0.044 | 9.40 |

表 2 试剂 A (RM2013031501) 多项式回归方程及线性检验

| 级数 | 多项式 | R ² | ADL (%) | σ | C |
|----|--|----------------|---------|------|-----|
| 一级 | Y=1.012X-0.018 | 0.999 | — | — | — |
| 二级 | Y=-0.016X ² +1.039X-0.001 | 0.999 | 0.38 | 0.02 | 6.3 |
| 三级 | Y=0.016X ³ -0.059X ² +1.023X+0.037 | 1.000 | 0.58 | 0.02 | 6.5 |

注: —表示无数据。

2.3 可报告范围评价 可报告范围的结果, 见表 3、4。水平为 0.076~0.206 ng/mL 时, CV 值均小于 10.0%, 所以 0.1 ng/mL 为可报告范围低限。高值标本进行 2 倍稀释时, CV 值小于 5.00% 且还原水平与理论水平的偏差 Bias 均小于 10.00%, 可报告范围高限为 2 000.0 ng/mL, 因此该试剂盒可报告范围为 0.1~2 000.0 ng/mL。

表 3 试剂 A (RM2013031501) 可报告范围下限检测结果

| 项目 | 检测结果 (ng/mL) | CV (%) |
|----|---------------|--------|
| Y1 | 0.164 ± 0.020 | 9.50 |
| Y2 | 0.103 ± 0.010 | 5.70 |
| Y3 | 0.180 ± 0.010 | 7.80 |
| Y4 | 0.087 ± 0.010 | 8.50 |
| Y5 | 0.177 ± 0.010 | 7.00 |

表 4 试剂 A (RM2013031501) 可报告范围上限检测结果

| 项目 | 检测结果 (ng/mL) | CV (%) | 稀释倍数 | 还原水平 (ng/mL) | 理论水平 (ng/mL) | Bias (%) |
|----|----------------|--------|------|--------------|--------------|----------|
| H1 | 496.86 ± 10.28 | 0.03 | 2 | 993.73 | 1 000 | -0.60 |
| H2 | 781.54 ± 14.79 | 1.89 | 2 | 1 563.08 | 1 500 | 4.20 |
| H3 | 948.42 ± 22.80 | 2.40 | 2 | 1 896.85 | 2 000 | -5.20 |

2.4 准确度评价 回收率为 95.60%~103.70%, 平均回收率为 99.60%, 定量准确性良好。

2.5 精密度评价 批内精密密度为 6.15%~9.46%, 批间精密密度为 7.57%~11.00%, 试剂盒的重复性良好, 见表 5。

2.6 干扰试验 溶血、胆红素、三酰甘油及类风湿因子对试剂 A 影响较小, 添加干扰因素后的 Bias 均在 10.00% 以内。

见表 6。

表 5 试剂 A 精密度

| 试剂批号 | 血清标本 1 | | | 血清标本 2 | | |
|--------------|------------|------------|----------|------------|------------|----------|
| | 最大值(ng/mL) | 最小值(ng/mL) | 批内 CV(%) | 最大值(ng/mL) | 最小值(ng/mL) | 批内 CV(%) |
| RM2013031501 | 154.99 | 119.32 | 7.62 | 18.67 | 13.49 | 9.30 |
| RM2013031601 | 144.76 | 114.79 | 6.15 | 19.02 | 14.43 | 8.65 |
| RM2013031701 | 161.31 | 122.88 | 8.62 | 16.00 | 11.92 | 9.46 |

注:血清标本 1 批间 CV 为 7.57%,血清标本 2 批间 CV 为 11.00%。

表 6 不同干扰因素对试剂检测结果的影响

| 干扰物 | 试剂批号 Bias(%) | | |
|--------------------------|--------------|--------------|--------------|
| | RM2013031501 | RM2013031601 | RM2013031701 |
| 轻度溶血 | -7.39 | 2.24 | 2.18 |
| 胆红素($\mu\text{mol/L}$) | | | |
| 34 | -1.30 | 3.40 | -1.12 |
| 85 | 7.27 | 3.63 | 1.57 |
| 170 | -5.45 | 8.23 | 4.92 |
| 340 | 5.19 | 6.05 | 4.25 |
| 三酰甘油(mmol/L) | | | |
| 2.3 | 8.39 | -2.64 | 5.05 |
| 4.5 | 1.44 | 1.92 | 3.21 |
| 9.0 | 3.84 | -0.24 | 5.96 |
| 18.1 | 7.19 | -1.68 | 6.65 |
| 类风湿因子(U/mL) | | | |
| 50 | -8.35 | -4.51 | 5.38 |
| 100 | 7.49 | -4.75 | 9.05 |
| 200 | -8.35 | -2.61 | 4.40 |
| 400 | 9.20 | 1.19 | -1.71 |

2.7 交叉反应验证 AFP、CA125、CA15-3、CA19-9、CEA、SCC 对试剂 A 的交叉反应物水平分别为:31.54~244.72 ng/mL、104.8~516.2 U/mL、72.63~189 U/mL、134.2~801.3 U/mL、119.9~379.6 ng/mL、11.9~35.8 ng/mL,试剂 A 对多种肿瘤抗原交叉反应试验结果均为阴性。

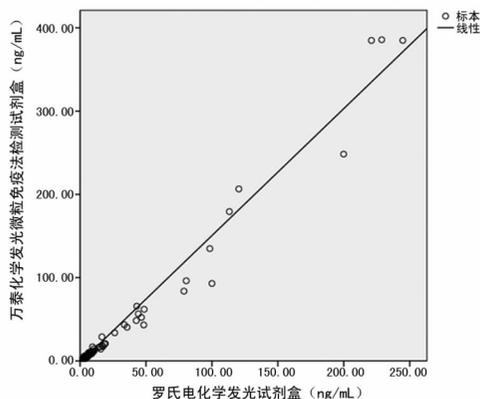


图 2 A、B 试剂血清 CYFRA21-1 检测结果线性相关拟合

2.8 试剂 A 与试剂 B 平行比对试验 试剂 A 与试剂 B 呈良

好的线性关系,线性回归方程为 $Y = 1.524X - 1.889$ ($R^2 = 0.975, P < 0.05$),见图 2。同时,一致性比较及相关性分析的结果显示试剂 A 与试剂 B 具有良好的一致性 ($Kappa = 0.971, P < 0.05$)及相关性 ($r = 0.987, P < 0.05$),总符合率为 98.56%。

2.9 血浆/血清相关性分析 配对血浆/血清标本的测定结果具有良好一致性 ($Kappa = 0.936, P < 0.05$)及相关性 ($r = 0.949, P < 0.05$),线性回归方程为 $Y = 0.947X + 0.242$ ($R^2 = 0.900, P < 0.05$),见图 3,因此试剂 A 对血清和血浆的检测结果差异无统计学意义。

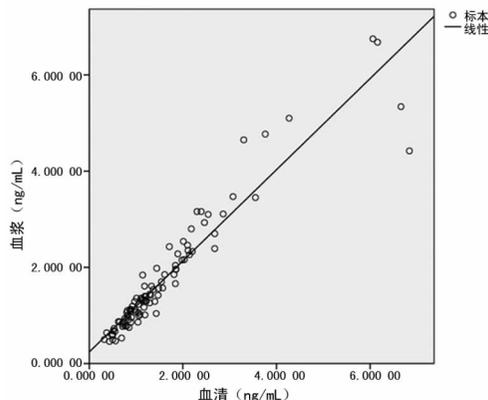


图 3 血清、血浆 CYFRA21-1 测定结果线性相关拟合图

3 讨论

CYFRA21-1 是一种临床肿瘤标志物,尤其对非小细胞肺癌有重要诊断价值。目前,国内检测 CYFRA21-1 多以罗氏、雅培等国外品牌为主,临床检验成本昂贵。因此,国产 CYFRA21-1 化学发光免疫试剂盒的研究、应用和推广对降低医疗费用、提升患者满意度具有重要社会意义。万泰凯瑞生物技术有限公司与本实验室合作,对厦门万泰凯瑞生物技术有限公司的细胞角蛋白 19 片段 CYFRA21-1 化学发光定量检测试剂盒的敏感性、线性范围、可报告范围、准确度、精密性、干扰试验、交叉反应进行评估,并与试剂 B(化学发光法)进行平行比对,结果显示,该试剂盒各项检测性能均可满足临床检验要求,且适用于血清及血浆标本。

干扰试验结果表明胆红素、三酰甘油及类风湿因子不会对检测结果造成影响,但本试验添加的外源性胆红素、三酰甘油、类风湿因子水平分别为 0~340 $\mu\text{mol/L}$ 、0~18.1 mmol/L 和 0~400 U/mL,因此,对于胆红素水平高于 340 $\mu\text{mol/L}$ 、高乳糜浊度及高类风湿因子水平标本,本试剂盒的抗干扰能力还有待进一步改良。同时,溶血前后血清标本检测结果显示,轻度溶血对检测结果影响较小,但中、重度溶血对该试剂盒的抗干扰能力还未验证,临床上应避免中、重度溶血对本试剂盒检测结果的影响。

在方法学平行比对试验中,试剂 A 与试剂 B(电化学发光法)有较好相关性,其检测结果与电化学发光法等效,而线性范围高于电化学发光法(电化学发光法的检测范围为 0.1~500 ng/mL,试剂 A 为 0.1~1 000.0 ng/mL)。同时,试剂 A 可报告范围为 0.1~2000.0 ng/mL,高于电化学发光法的 0.1~1000.0 ng/mL,表明该试剂盒相较于电化学发光法不仅有价格优势,部分指标性能更优于罗氏,有广阔的应用前景。

参考文献

[1] Maeda Y, Segawa Y, Takigawa N, et al. Clinical usefulness of serum cytokeratin 19 fragment as a tumor marker for lung cancer[J]. Internal Medicine, 1996, 35(10): 764-771.

[2] Stieber P, Hasholzner U, Bodenmuller H, et al. CYFRA 21-1. A new marker in lung cancer[J]. Cancer, 1993, 72(3): 707-713.

[3] Zhang ZH, Han YW, Liang H, et al. Prognostic value of serum CYFRA21-1 and CEA for non-small-cell lung cancer[J]. Cancer Medicine, 2015, 4(11): 1633-1638.

[4] Zhu WQ, Yu JM, Sun XD, et al. Serum CYFRA21-1 as a prognostic marker for patients with undifferentiated nasopharyngeal carcinoma[J]. Biomarkers, 2010, 15(7): 602-607.

[5] Song XM, Wang SZ, Wang ZJ, et al. Serum CYFRA21-1 as an effective tumor biomarker for patients with nasopharyngeal carcinoma[J]. Neoplasma, 2015, 62(1): 124-129.

[6] Kuang LI, Song WJ, Qing HM, et al. CYFRA21-1 levels could be a biomarker for bladder cancer: a meta-analysis [J]. Genetics and Molecular Research, 2015, 14(2): 3921-3931.

[7] Huang YL, Chen J, Yan W, et al. Diagnostic accuracy of cytokeratin-19 fragment(CYFRA 21-1) for bladder cancer: a systematic review and meta-analysis[J]. Tumour Biology, 2015, 36(5): 3137-3145.

[8] 叶辉铭,林永志,张忠英. 电化学发光免疫分析法检测尿细胞角蛋白 19 及其在膀胱癌诊断中的应用[J]. 检验医学, 2005, 20(6): 533-535.

[9] Zhang J, Zhu Z, Liu Y, et al. Diagnostic value of multiple tumor markers for patients with esophageal carcinoma [J]. PloS One, 2015, 10(2): e0116951.

[10] CLSI, EP6-A; Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures [S]. Wayne, PA, USA: CLSI, 2003.

[11] CLSI. EP9-A2; Method comparison and bias estimation using patient samples[S]. Wayne, PA, USA: CLSI, 2002.

[12] CLSI. EP5-A; Evaluation of precision performance of clinical chemistry devices[S]. Wayne, PA, USA: CLSI, 2004.

[13] CLSI. EP7-A; Interference testing in clinical chemistry [S]. Wayne, PA, USA: CLSI, 1986.

(收稿日期:2016-05-21 修回日期:2016-08-14)

• 临床研究 •

老年原发性高血压患者早期血浆 NT-proBNP 检查对预防急性心力衰竭发作的应用价值*

张 健

(广东省潮州市人民医院检验科 521000)

摘要:目的 研究老年原发性高血压患者早期血浆 N 末端脑利钠肽前体(NT-proBNP)检查对预防急性心力衰竭发作的应用价值。方法 选取 2014 年 12 月至 2015 年 11 月该院收治的 83 例高血压患者为研究对象,将其中 49 例合并急性心力衰竭的患者纳入观察组,另外 34 例未合并急性心力衰竭的高血压患者纳入对照组。比较 2 组研究对象血浆 B 型钠利尿肽(BNP)、NT-proBNP 及左室射血分数(LVEF)水平,对高血压合并急性心力衰竭患者血浆 BNP、NT-proBNP 与 LVEF 相关性进行分析。结果 观察组的血浆 BNP、NT-proBNP 水平[(62.13±3.24)pg/mL、(824.32±82.14)pg/mL]显著高于对照组[(29.43±1.32)pg/mL、(71.43±6.46)pg/mL],LVEF 水平[(50.15±5.14)%]显著低于对照组[(66.25±6.04)%],差异有统计学意义(P<0.05)。高血压合并急性心力衰竭患者血浆 BNP、NT-proBNP 和 LVEF 呈负相关(r=-0.38、-0.67,P<0.05)。结论 血浆 NT-proBNP 能较好地预防老年原发性高血压患者急性心力衰竭的发作,具有重要临床应用价值。

关键词:高血压; N 末端脑利钠肽前体; 急性心力衰竭

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.22.032

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2016)22-3180-03

N 末端脑利钠肽前体(NT-proBNP)主要为受心肌细胞影响而分泌 B 型钠利尿肽(BNP)时出现的神经激素,当室舒张末期的压力或容积增加时,会对 NT-proBNP 起释放与合成作用^[1]。NT-proBNP 具有体外稳定性好、个体变异性低、血浆水平高、半衰期长、不受标本采集调节影响、不受生理节律影响等优势,通过对血浆 NT-proBNP 水平进行检测,能更有效地

对心脏功能做出反映^[2]。心力衰竭时,会增加心室壁张力,升高 NT-proBNP 和 BNP 在血浆中的的水平,且和健康人比较,水平升高更为显著,在大多数心血管疾病中,心力衰竭作为最终转归,也是导致此类心血管疾病患者死亡的主要因素^[3]。其中,高血压是导致心力衰竭的常见病因之一。本研究将对老年原发性高血压患者早期血浆 NT-proBNP 检查对预防急性心

* 基金项目:广东省潮州市科技计划项目(2013S10)。