

· 论 著 ·

化学发光微粒子免疫分析法检测性激素 6 项的性能验证

罗立梅, 张 彬, 陈 刚

(四川省绵阳市中心医院检验科 621000)

摘要:目的 验证和评价 ARCHITECT i2000SR 分析仪应用化学发光微粒子免疫分析法(CMIA)检测雌二醇(E2)、孕酮(Prog)、促黄体生成素(LH)、卵泡刺激素(FSH)、泌乳素(PRL)和睾酮(Tes)的方法学性能。方法 参照美国临床和实验室标准协会(CLSI)的相关文件,对性激素 6 项的精密度、正确度、线性范围、参考区间和检测低限进行验证,其结果与厂家声称的性能指标或公认的质量目标进行比较。结果 性激素 6 项的批内不精密度 $\leq 2.62\%$,总不精密度 $\leq 3.17\%$;正确度在 $\pm 9.41\%$ 以内;线性范围内斜率(a)在 1.00 ± 0.05 以内,相关系数(r^2) > 0.995 ;参考区间符合率 $\geq 90\%$;检测低限均小于等于厂家声称的指标,以上性能指标均符合厂家或质量目标的要求。结论 ARCHITECT i2000SR 全自动化学发光免疫分析仪检测性激素 6 项的方法学性能满意,结果可靠,能满足临床需要。

关键词:化学发光; 性激素; 性能验证

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.09.021

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2017)09-1214-04

Performance verification of chemiluminescent microparticle immunoassay for 6-indicator sex hormones

LUO Limei, ZHANG Bin, CHEN Gang

(Department of Clinical Laboratory, Mianyang Municipal Central Hospital, Mianyang, Sichuan 621000, China)

Abstract: Objective To verify and evaluate the methodological performance of chemiluminescent microparticle immunoassay (CMIA) in the ARCHITECT i2000SR analyzer for detecting estradiol(E2), progesterone(Prog), luteinizing hormone(LH), follicle stimulating hormone(FSH), prolactin(PRL) and testosterone(Tes). **Methods** The precision, accuracy, linearity range, reference interval and low detection limit in the 6-indicator sex hormones detection were verified according to the CLSI related documents. The results were compared with the performance indicators or acceptable quality target claimed by the manufacturer. **Results** The within-run imprecision of 6-indicator sex hormones was $\leq 2.62\%$, the total imprecision was $\leq 3.17\%$. Accuracy was within $\pm 9.41\%$. The slope(a) within linearity was 1.00 ± 0.05 , and the correlation coefficient(r^2) was > 0.995 . The coincidence rate of reference interval was $\geq 90\%$. The low detection limits were less than the indicator claimed by the manufacturer. **Conclusion** The methodological performance of 6-indicator sex hormones detected by the ARCHITECT i2000SR analyzer is satisfactory, reliable in detection results and suitable for clinical needs.

Key words: chemiluminescence; sex hormone; performance verification

随着检验技术的不断发展,免疫学检测性激素的方法已从放射免疫测定法,经酶联免疫测定法,发展到了现在的化学发光免疫测定法,进入了全新的自动化微量分析时代。美国雅培公司的 ARCHITECT i2000SR 分析仪采用了化学发光微粒子免疫分析法(CMIA),可定量测定人血清或血浆中的性激素。根据 ISO 15189:2012《医学实验室质量和能力认可准则》和《医疗机构临床实验室管理办法》的要求,临床实验室在用于体外诊断前,必须对检测系统进行必要的性能验证,以满足临床和科研的需求^[1-3]。本文参照美国临床和实验室标准协会(CLSI)颁布的 EP 系列文件,结合工作实际,建立验证方案,对 ARCHITECT i2000SR 全自动化学发光免疫分析仪上检测的性激素 6 项,雌二醇(E2)、孕酮(Prog)、促黄体生成素(LH)、卵泡刺激素(FSH)、泌乳素(PRL)和睾酮(Tes)的精密度、正确度、线性范围、参考区间和检测低限进行验证和评价,结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 本院患者及健康体检者外观正常的新鲜血清。

1.2 仪器与试剂 美国雅培公司的 ARCHITECT i2000SR 全自动化学发光免疫分析仪。美国雅培公司的原装试剂:雌二

醇测定试剂盒(批号 55941);孕酮测定试剂盒(批号 53957);促黄体生成素测定试剂盒(批号 51915);卵泡刺激素测定试剂盒(批号 52950);泌乳素测定试剂盒(批号 55967);睾酮测定试剂盒(批号 10442)。

1.3 校准品 美国雅培公司的原装校准品:雌二醇校准品(批号 50038UI00);孕酮校准品(批号 47196UI06);促黄体生成素校准品(批号 49154UI00);卵泡刺激素校准品(批号 47043UI00);泌乳素校准品(批号 51301UI00);睾酮校准品(批号 802904721)。

1.4 质控品 美国伯乐公司的 Lyphochek 免疫分析质控品:水平 2(批号 40292),水平 3(批号 40293);卫生部临床检验中心 2015 年第二次内分泌室间质量评价质控品 5 份(批号 201521~201525)。

1.5 方法 参加实验操作的人员必须进行仪器的操作培训,熟练掌握仪器的操作和保养,熟悉性能验证方案。所有项目测定前均根据厂家说明书规定的方法进行校准,再进行室内质控样本测定,质控在控后,严格按照本实验室根据厂商提供的仪器操作说明书制定的操作规程进行操作。

1.5.1 精密度验证 参考 CLSI EP15-A2 文件^[4],选择质控品水平 2、3 进行验证。每天对 2 个浓度的质控品重复测定 3

次,连续测定 5 d,计算批内和总不精密度的均值(\bar{x})、标准差(s)和变异系数(CV),与厂家声称的 CV 进行比较。

1.5.2 正确度验证 参考 CLSI EP15-A2 文件^[4],选择卫生部临床检验中心 2015 年第二次内分泌室间质评的 5 份内分泌质控品进行验证。每个浓度的质控品测定 3 次,计算检测结果与靶值的偏倚(%),以允许总误差的 1/2 为判断标准进行比较。

1.5.3 线性范围验证 参考 CLSI EP6-A 文件^[5],选择高值样本 H(浓度接近厂家说明书标示的高限值)和低值样本 L(去离子水)进行验证。将 H 和 L 按 0:4、1:3、1:1、3:1、4:0 的比例配制成 5 个浓度,每个浓度测定 4 次。做线性回归分析,得出实测值与理论值的线性关系 $Y=aX+b$,计算相关系数(r^2),得到的线性范围与厂家声称的进行比较。

1.5.4 参考区间验证 参考 CLSI C28-A2 文件^[6],选择本院健康体检者外观正常的新鲜血清样本进行验证,包括非绝经期

女性、绝经期女性和男性标本各 20 例。共 60 例标本分别检测性激素 6 项,检测结果用“1/3”规则进行离群值检测,发现离群值应删除,用新的参考个体代替。参考区间的引用标准为符合率 $\geq 90\%$,符合率=检测值在引用参考区间的个数/总的参考个数 $\times 100\%$ 。

1.5.5 检测低限验证 参考 CLSI EP17-A 文件^[7],选择非“0”浓度校准品测定 3 次,选择“0”浓度校准品测定 20 次,得到的平均发光值(RLU)加上 2s,即为可以与零区分的最小检出浓度,即空白限(LOB),与厂家声称的 LOB 进行比较。

1.6 统计学处理 根据 EP 系列文件要求,采用 Excel 对数据进行处理和分析。

2 结 果

2.1 精密度的结果 从表 1 可见,2、3 水平质控品测定性激素 6 项的批内 CV 和总 CV 均小于厂商声称的值,所以厂家声称的 CV 可靠,验证通过。

表 1 性激素 6 项精密度结果(%)

评价项目	批内 CV		厂家标准	总 CV		厂家标准	结果
	水平 2	水平 3		水平 2	水平 3		
E2	1.20	2.40	≤ 6.40	1.38	2.70	≤ 7.40	通过
Prog	1.61	1.91	≤ 5.50	2.27	2.56	≤ 6.20	通过
LH	1.14	2.28	≤ 3.60	2.70	3.10	≤ 8.90	通过
FSH	2.31	2.62	≤ 4.20	2.73	3.17	≤ 4.60	通过
PRL	1.84	1.64	≤ 3.80	2.15	2.27	≤ 4.70	通过
Tes	1.61	2.16	≤ 5.10	2.27	2.23	≤ 5.20	通过

2.2 正确度结果 卫生部临床检验中心 2015 年第二次内分泌室间质评的允许总误差均为 25%,从表 2 可见,性激素 6 项的偏倚(%)均小于 1/2 允许总误差,当前性能满意,验证通过。

2.3 线性范围结果 从表 3 可见,验证项目的 a 值均在 1.00 ± 0.05 范围内, $r^2 > 0.995$,且测定的线性范围在厂家声称的范围内,可判断厂家提供的线性范围符合要求,验证通过。

2.4 参考区间结果 在非绝经期女性、绝经期女性和男性中,E2 的参考区间符合率为 90%、100%、95%;Prog 的符合率为 100%、90%、90%;LH 的符合率为 95%、95%、100%;FSH 的符合率为 95%、95%、95%;PRL 的符合率为 90%、95%、95%;Tes 的符合率为 100%、100%、100%。每组 20 个结果中只有少于或等于 2 个检测值超出参考区间,符合率 $\geq 90\%$,说明厂家提供的参考区间是可接受的,验证通过。

2.5 检测低限结果 从表 4 可见,性激素 6 项实测的 LOB 均

小于等于厂家在试剂说明书中声称的 LOB,所以厂家声称的 LOB 是可接受的,验证通过。

表 2 性激素 6 项正确度验证结果(%)

评价项目	5 份质控品检测偏倚					判断标准	结果
	1	2	3	4	5		
E2	3.35	1.39	6.35	1.55	4.66	12.50	通过
Prog	1.80	2.18	4.33	1.53	4.85	12.50	通过
LH	-2.14	0.00	0.78	1.70	1.70	12.50	通过
FSH	3.95	2.17	7.78	1.93	3.21	12.50	通过
PRL	-6.03	-9.41	-3.05	-5.18	-8.33	12.50	通过
Tes	0.00	-3.30	2.17	-1.24	-0.86	12.50	通过

表 3 性激素 6 项线性范围结果

评价项目	回归方程	r^2	测定线性范围	厂家线性范围	结果
E2(pg/mL)	$Y=1.0151X+10.3470$	0.9966	10.25~902.50	10.00~1000.00	通过
Prog(ng/mL)	$Y=0.9920X-0.1373$	0.9994	0.10~37.45	0.10~40.0	通过
LH(mIU/mL)	$Y=1.0116X+2.7556$	0.9958	0.01~236.30	0.01~250.00	通过
FSH(mIU/mL)	$Y=0.9967X-2.1937$	0.9983	0.05~139.77	0.05~150.00	通过
PRL(mIU/L)	$Y=1.0104X+67.3100$	0.9983	12.60~3757.62	12.60~4200.00	通过
Tes(ng/mL)	$Y=1.0102X-0.0985$	0.9992	0.13~8.94	0.13~10.09	通过

表 4 性激素 6 项检测低限结果

评价项目	测定 LOB	厂家标准	结果	评价项目	测定 LOB	厂家标准	结果
E2(pg/mL)	9	10	通过	FSH(mIU/mL)	0.02	0.05	通过
Prog(ng/mL)	0.10	0.10	通过	PRL(mIU/L)	10.40	12.60	通过
LH(mIU/mL)	0.01	0.01	通过	Tes(ng/mL)	0.005 9	0.008 7	通过

3 讨 论

性激素在人类血液中的浓度极低,但这样微小的数量却在人类的诞生、生存、死亡和种族的延续中起着重要的作用。性激素的主要功能是调节内分泌,近年来,内分泌失调的发病率逐年增高,故准确检测人体性激素的含量尤为重要。

美国雅培公司的 ARCHITECT i2000SR 分析仪是应用 CMIA 的原理对肿瘤标志物、甲状腺功能、激素、输血前检查等进行的定量检测,其检测血清标志物的性能验证已有相关报道^[8-10],但其定量检测性激素的性能验证还鲜有文章报道。本文就对 CMIA 检测性激素 6 项性能验证进行了报道。

ARCHITECT i2000SR 分析系统,使用抗原或抗体包被微粒子、吡啶类羧基氨基化合物作为标记物,采用 CMIA 测量样品中的分析物浓度,具有准确度高、灵敏度高、检测速度快等特点^[10]。虽然厂家说明书给出了性能指标,但是其性能参数是在国外的最适条件下完成的,与本科室的水质、电压稳定性、环境温度湿度、操作人员素质等外部条件存在差异,所以在使用前,必须对其进行验证。

精密度是重复测定值间的一致性;正确度是大批检验结果的均值与真值的一致程度。良好的精密度和正确度是保证分析系统检验结果准确性的前提,也是进行其他方法学评价和验证试验的前提^[11-12]。一直以来对分析系统精密度和正确度的验证并无具体标准,本文参考了 CLSI EP15-A2 的评价方案^[13]。结果显示验证项目的批内 CV 在 1.14%~2.62% 范围内;总 CV 在 1.38%~3.17% 范围内,均小于厂家声称的 CV。同时厂家给出的 CV 指标也符合行业标准的要求,说明 CMIA 检测性激素 6 项的重复性好,结果稳定。对于正确度的验证,目前可采用 3 种方法,除本文介绍的方法外,还包括测定参考物质和与参考方法的方法学比对。本文选择了一种简单可行的方法,即参加卫生部临床检测中心的室间质评,结果显示偏倚范围为-9.41%~6.35%,测定结果均在允许范围内,说明 CMIA 检测性激素 6 项的正确度高,结果可靠。

线性范围指测定值与稀释倍数呈线性关系的范围,以保证样本的检测结果在线性范围内准确可靠。EP6-A 采用多项式回归分析,是目前公认的分析测量范围评价中最好的统计学方法。验证结果显示本实验室测定的线性范围与厂家提供的线性范围相近,且都在厂家提供的范围内,各检测项目的 a 值和 r² 均符合要求,说明实测值与理论值具有良好的相关性,结果符合要求。

参考区间指某项检查结果在正常人群中的分布范围,是解释检验结果分析检验信息的一个基本尺度和依据^[14]。几乎所有的试剂说明书都会建议各实验室应为其相应患者人群建立自己的参考区间,而实际情况是实验室验证厂家提供的参考区间居多。本文验证结果显示 6 种性激素均有超过 90% 的测量数据在推荐的参考区间内,符合要求,可直接引用厂家提供的

参考区间。

检测低限指可检测出的最低被测量浓度,也称低检测限或最小检出浓度,是监测检测系统的性能指标,评价其所能测定的最低浓度,确保检测质量。LOB 验证用于确认实测的分析灵敏度是否达到厂家的声称。本文验证的 LOB 均不大于厂家声称的值,厂家的 LOB 可接受,说明 CMIA 检测性激素 6 项的灵敏度高。

综上所述,CMIA 检测性激素 6 项具有重复性好、正确度高、线性良好、灵敏度高等特点,同时厂家声称的参考区间可靠,能满足临床实验室工作需要。

参考文献

- [1] 中国合格评定国家认可委员会. ISO15189 2012 医学实验室能力和质量认可准则[S]. 北京:中国合格评定国家认可委员会,2012.
- [2] 中华人民共和国卫生部. 医疗机构临床实验室管理办法[S]. 北京:中华人民共和国卫生部,2006.
- [3] 毕波,吕元. 定量检测方法学性能验证的系统设计[J]. 中华检验医学杂志,2007,30(2):143-145.
- [4] Clinical and Laboratory Standards Institute. EP15-A2 User demonstration of performance for precision and accuracy; approved guideline-second edition [S]. Wayne, PA: CLSI,2004.
- [5] Clinical and Laboratory Standards Institute. EP6-A Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures; a statistical approach; approved guideline [S]. Wayne, PA: CLSI,2003.
- [6] Clinical and Laboratory Standards Institute. C28-A2 How to define and determine reference intervals in the clinical laboratory; approved guideline-second edition [S]. Wayne, PA: CLSI,2000.
- [7] Clinical and Laboratory Standards Institute. EP17-A Protocols for determination of limits of detection and limits of quantitation; approved guideline [S]. Wayne, PA: CLSI, 2004.
- [8] 刘洋,葛亮,顾万建,等. 雅培 ARCHITECT i2000SR 型全自动免疫发光分析仪测量 3 种肿瘤标志物的性能验证[J]. 航空航天医学杂志,2014,25(10):1354-1357.
- [9] 刘立民,李钰,蒙雨明,等. 化学发光微粒子免疫分析技术检测输血四项的性能评价[J]. 现代检验医学杂志,2015, 30(2):107-110.
- [10] 罗利梅,王凤学,郑光柄. 雅培 ARCHITECT i2000 检测 B-型脑钠肽性能验证[J]. 齐齐哈尔医学院学报,2015, 36(21):3155-3157.

泌肽,它在黏膜防御、修复和肿瘤产生中起作用,是胃肠道分泌的稳定小分子,由于含有 3 环结构能避免被蛋白酶消化和热性物质降解^[2]。TFF3 在胃肠化生杯状细胞中表达,研究表明 TFF3 表达参与了胃癌发展。Aikou 等^[2]研究发现,TFF3 对胃癌诊断的准确度优于胃蛋白酶原。国外学者发现,TFF3 对胃癌诊断具有更好的特异性^[8]。人类分泌性蛋白 DKK-1 是由 Dickkopf 基因家族之一的 Dickkopf-1 基因所编码,具有 266 个氨基酸(相对分子质量 35×10^3)小分泌性糖蛋白,Dickkopf-1 基因仅在胎盘和间质干细胞中有限表达,但在其他正常组织中不表达。研究表明 DKK-1 是 Wnt 信号通路抑制剂,具有抑制癌症基因表达的作用,Dickkopf-1 基因的过度表达能抑制肿瘤细胞增殖、分化、凋亡和细胞死亡^[9-10]。Gomceli 等^[1]研究发现,DKK-1 用于胃癌诊断时,其特异性和敏感性均达 100%。但 Lee 等^[11]研究发现,DKK-1 对胃癌的诊断临界值为 31.915 0 pg/mL 时,其特异性和敏感性分别为 87.6% 和 87.9%。CA72-4 是一种高分子量糖蛋白,主要存在于大多数胃肠道肿瘤中,它与胃癌早期诊断有关,血清肿瘤标志物,CA72-4 检测优于 CA19-9 和 CEA,但 CA72-4 对胃癌诊断的敏感度较低^[12]。

本研究应用 DKK-1、TFF3 和 CA72-4 对胃癌进行诊断,结果显示胃癌组与健康对照组比较,胃癌患者 DKK-1、TFF3、CA72-4 水平均显著升高,且胃癌患者 DKK-1、TFF3 和 CA72-4 水平明显高于胃良性病变患者,差异具有统计学意义($P < 0.05$),提示在胃癌患者中 DKK-1、TFF3 和 CA72-4 水平存在显著的升高,表明 DKK-1、TFF3 和 CA72-4 检测有助于胃癌的鉴别诊断。

本研究结果显示,DKK-1、TFF3、CA72-4 对胃癌诊断的 ROC 曲线下面积分别是 0.876 (95% CI 0.803 ~ 0.950)、0.944 4 (95% CI 0.894 ~ 0.975)、0.818 (95% CI 0.726 ~ 0.884)。根据 ROC 曲线确定的 DKK-1、TFF3、CA72-4 对胃癌诊断的最佳临界值,DKK-1、TFF3、CA72-4 联合检测对胃癌诊断的敏感性和特异性均高于单项指标对胃癌诊断的敏感性和特异性,提示 DKK-1、TFF3、CA72-4 联合检测可弥补单项指标对胃癌诊断的局限性。胃癌组胃癌根治术后患者 DKK-1、TFF3、CA72-4 浓度明显降低,由此可见,DKK-1、TFF3、CA72-4 可应用于胃癌患者疗效检测。

总之,DKK-1、TFF3 具有巨大的潜力与价值,DKK-1 和 TFF3 与常用的胃癌标志物 CA72-4 联合检测,可提高对胃癌诊断的敏感性、特异性,有助于胃癌的鉴别诊断。DKK-1、TFF3 浓度变化与胃癌组织学类型、临床分期、淋巴结受累是否有关,有待于进一步研究。

参考文献

[1] Gomceli I, Bostanci EB, Ozer I, et al. A novel screening bi-

omarker in gastric cancer; serum dickkopf-1[J]. Hepato-gastroenterology, 2012, 59(117): 1661-1664.

[2] Aikou S, Ohmoto Y, Gunji T, et al. Tests for serum levels of trefoil factor family proteins can improve gastric cancer screening[J]. Gastroenterology, 2011, 141(3): 837-845.

[3] Chen WQ, Zheng RS, Zhang SW, et al. Annual report on status of cancer in China, 2010[J]. Chin J Cancer Res, 2014, 26(1): 48-58.

[4] 朱勇. 血清 TSGF、CEA、AFP、CA72-4、CA199 联合检测在胃癌诊断中的价值[J]. 山东医药, 2011, 51(14): 45-46.

[5] 邵建平, 李迪华. 胃癌患者血清 CA72-4 的参比值及临床意义[J]. 放射免疫学杂志, 2013, 26(3): 333-336.

[6] Wang Z, Tian YP. Clinical value of serum tumor markers CA19-9, CA125 and CA72-4 in the diagnosis of pancreatic carcinoma[J]. Mol Clin Oncol, 2014, 2(2): 265-268.

[7] Chen XZ, Zhang WK, Yang K, et al. Correlation between serum CA72-4 and gastric cancer; multiple analyses based on Chinese population[J]. Mol Biol Rep, 2012, 39(9): 9031-9039.

[8] Jin EH, Lee SI, Kim J, et al. Association between promoter polymorphisms of TFF1, TFF2, and TFF3 and the risk of gastric and diffuse gastric cancers in a Korean population[J]. J Korean Med Sci, 2015, 30(8): 1035-1041.

[9] Tao YM, Liu Z, Liu HL. Dickkopf-1(Dkk-1) promotes invasion and metastasis of hepato cellura carcinoma[J]. Dig Liver Dis, 2013, 45(3): 251-257.

[10] Rachner TD, Thiele S, Göbel A, et al. High serum levels of Dickkopf-1 are associated with a poor prognosis in prostate cancer patients[J]. BMC Cancer, 2014, 14(1): 614-649.

[11] Lee HS, Lee HE, Park DJ, et al. Clinical significance of serum and tissue Dickkopf-1 levels in patients with gastric cancer[J]. Clinica Chimica Acta, 2012, 413(21/22): 1753-1760.

[12] Kim DH, Oh SJ, Oh CA, et al. The relationship between perioperative CEA, CA19-9 and CA72-4 and recurrence in gastric cancer patients after curative radical gastrectomy [J]. J Surg Oncol, 2011, 104(6): 585-591.

(收稿日期: 2016-12-13 修回日期: 2017-02-07)

(上接第 1216 页)

[11] 徐建华, 何敏, 黄宪章, 等. 强生干化学检测系统方法学性能验证实验结果分析[J]. 中国现代医学杂志, 2010, 20(23): 3571-3575.

[12] 魏有仁. 参考值的几个基本问题[J]. 中国实验诊断学, 1997, 1(1): 44-46.

[13] 张传宝, 赵海建, 张天娇, 等. 评价一种以 CLSIEP15-A2

文件验证生化分析系统精密度和正确度方法的应用价值[J]. 中华临床实验室管理电子杂志, 2013, 1(1): 41-45.

[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: 36.

(收稿日期: 2016-12-12 修回日期: 2017-02-06)