

化学发光检测血清总人绒毛膜促性腺激素分析测量范围和临床可报告范围的建立

曾令恒,倪永圣,赵艳华,蔡银凤,和仕进,潘开拓(广东省佛山市南海区第三人民医院检验科 528244)

【摘要】 目的 验证西门子 Centaur cp 化学发光检测系统检测总人绒毛膜促性腺激素(THCG)的分析测量范围(AMR),并建立临床可报告范围(CRR)。**方法** 参考美国临床与实验室标准化协会(CLSI)EP6-A 文件和相关文献,选用超出厂商声明的分析测量范围下限和上限浓度的样本,按比例精确配成等间距的不同浓度样本,每个浓度样本重复测定 2 次,用多项式回归评价并验证厂商声明 AMR;选用 THCG 浓度在分析测量范围内的高值样本 3 份,用稀释液作不同倍数稀释后测定,计算稀释回收率,确定最大允许稀释度,并结合功能灵敏度建立 CRR。**结果** THCG 的分析测量范围:1.7~995.0 mIU/mL,最大允许稀释度 1:200,根据其功能灵敏度,临床可报告范围:2.6~199 000 mIU/mL。**结论** 西门子 Centaur cp 化学发光检测系统在厂商声明的分析测量范围内线性良好,所建立的临床可报告范围可以满足临床需要。

【关键词】 人绒毛膜促性腺激素; 分析测量范围; 临床可报告范围; 最大允许稀释度

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2012.17.002 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2012)17-2115-03

Investigation of the analytical measurement range and clinical reportable range of chemiluminescence immunoassay in the detection of THCG ZENG Ling-heng, NI Yong-sheng, ZHAO Yan-hua, CAI Yin-feng, HE Shi-jin, PAN Kai-tuo (Department of Laboratory, the Third People's Hospital of Nanhai District of Foshan City, Foshan, Guangdong 528244, China)

【Abstract】 Objective To investigate the analytical measurement range(AMR) and establish the clinical reportable range(CRR) of SIEMENS Centaur cp system in the detection of THCG. **Methods** Samples with equal interval,proportional prepared with samples at concent ration levels,exceeding the low and high concent ration limits claimed by manufacture,were detected twice each. The AMR claimed by manufacture was evaluated and verified by polynomial regression analysis. Three samples,at high concentration level and within the AMR,diluted to different dilution ratio,were detected,and the dilution recovery rate was calculated to determine the max allowable dilution rate and establish CRR by combining functional sensitivity. All of the detection and analysis mentioned above were performed according to clinical and laboratory standard institute(CLSI) document EP6-A. **Results** The AMR of THCG was 1.7~995.0 mIU/mL,the max allowable dilution rate was 1:200,the CRR was 2.6~199 000 mIU/mL. **Conclusion** There can be fine linearity within the AMR,claimed by manufacture. SIEMENS Centaur cp system in the detection of THCG and the CRR established in this research can meet the needs of clinical laboratory.

【Key words】 THCG; analytical measurement range; clinical reportable range; max dilution limit

分析测量范围(AMR)和临床可报告范围(CRR)是反映分析方法及检测系统分析性能的重要指标。美国颁布的《临床实验室修正法案的最终法规》(CLIA'88 final rule)、国际标准化组织颁布的《医学实验室质量和能力的专用要求》(ISO15189)以及美国病理家学会(CAP)的认证标准^[1-3]均要求实验室必须对引进或改变的检测系统或方法的主要分析性能进行验证或评价,证实其能够达到临床检测所要求的标准后方可用于临床检测^[4]。人绒毛膜促性腺激素(HCG)在临床上应用非常广泛,主要包括预测妊娠高血压综合征,提示异常妊娠的出现(如先兆流产、输卵管妊娠),唐氏综合征的产前筛查,诊断和监测妊娠滋养层疾病(葡萄胎、绒癌等),治疗先兆流产及习惯性流产,治疗小儿隐睾症及男性不育等^[5]。本研究主要参考美国临床和实验室标准化协会(CLSI)发布的 EP6-A 文件《定量检验程序的线性评价:统计方法——批准指南》^[6]对西门子 Centaur cp 化学发光检测系统检测总人绒毛膜促性腺激素(THCG)的分析测量范围进行验证确认,并结合功能灵敏度建立其临床可报告范围。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 检测系统 西门子 Centaur cp 化学发光分析仪及其配套的 THCG 试剂(批号 029245),稀释液(批号 08921662)校准品(批号 CB27L/CB27H),质控品为美国伯乐公司生产的化学发光质控物,批号为 40331、40232、40233。

1.1.2 样本制备 (1)分析测量范围实验样本:分别收集 THCG 低浓度和高浓度的新鲜患者血清标本若干份,要求外观澄清、无溶血、无黄疸、无脂血,将若干份低浓度样本和高浓度样本分别混合、离心,得到本实验所需的低值样本(L)和高值样本(H),其浓度分别接近或超过厂商声明的分析测量范围下限和上限。L 和 H 按 10L、9L+1H、8L+2H、7L+3L、6L+4H、5L+5H、4L+6H、3L+7H、2L+8H、1L+9H 和 10H 混合配制,形成系列浓度实验样本,并将各浓度实验样本编号作为相对浓度。(2)临床可报告范围验证实验样本:选择分析测量范围内 THCG 高浓度样本(700.0~900.0 mIU/mL)3 份,要求外观澄清、无溶血、无黄疸、无脂血,用 THCG 配套稀释液分别对每份样本作 5、10、50、100、200、300 倍稀释。

1.2 方法

1.2.1 分析测量范围验证实验 (1)按照 EP6-A 文件确定分析总误差的要求,并根据有关专业组织要求 THCG 检测不精

密度 $CV \leq 10\%$ 的质量目标, 确定本实验室的重复性和线性允许误差范围分别为 5% 和 10% 。(2) 依照厂商要求和操作规程, 对西门子 Centaur cp 化学发光分析仪进行维护、保养、校准和质量控制, 质控在控条件下, 将配制好的系列浓度实验样本上机检测, 每个浓度重复测量 2 次。(3) 计算系列浓度血清 2 次测量结果的重复测量误差, 判断不精密度是否符合实验要求。(4) 在不精密度符合实验要求的条件下, 进行多项式回归分析, 将测定数据分别拟合为一次多项式模型 $Y = b_0 + b_1X$ 、二次多项式模型 $Y = b_0 + b_1X + b_2X^2$ 和三次多项式模型 $Y = b_0 + b_1X + b_2X^2 + b_3X^3$, 用 t 检验判断拟合二次回归多项式模型的非线性系数 b_2 及三次回归多项式模型的非线性系数 b_2 和 b_3 与 0 的差异是否有统计学意义。如有, 则判断为非线性, 否则为线性。当存在非线性时, 根据回归标准误的大小, 以最小者确定为最适拟合模型。(5) 实验数据判断为非线性时, 计算线性偏离: $DL_i = P(X_i) - (b_0 + b_1X_i)$, $P(X_i)$ 为最适多项式在每个稀释浓度处的预期值。将每个浓度的线性偏离百分比与线性允许误差相比较, 若在线性允许误差范围内, 则引入的误差不超过临床允许误差目标, 实验室按线性关系来处理; 若在线性允许误差范围外, 则舍去某组数据。缩小分析测量范围后, 再次进行多项式回归分析, 若多项式回归有明显改善, 非线性系数或线性允许误差均符合要求, 则缩小的分析测量范围是真实的分析测量范围。

1.2.2 临床可报告范围验证实验 依照厂商要求和操作规程对西门子 Centaur cp 化学发光分析仪进行维护保养、校准和质量控制, 质控在控条件下, 将制备好的实验样本在化学发光分析仪上检测, 检测结果与稀释后的预期值进行比较, 计算稀释回收率: 稀释回收率 = (实测值/预期值) $\times 100\%$ 。参考仪器说明书和有关文件, 稀释回收率 $80\% \sim 120\%$ 为可接受性的判断标准, 从而确定标本稀释的最大倍数, 结合功能灵敏度, 确定临床可报告范围。

1.3 统计学处理 所有数据在 Excel2003 办公软件及 SPSS19.0 统计软件上完成。

2 结 果

2.1 AMR 结果 11 个系列浓度样本 THCG 的重复测量结果见表 1。10 和 11 号样本因超出了检测上限而未能得出准确的浓度结果故将其舍去。其余每个浓度 2 次测量结果的重复测量误差 $CV = 1.87\%$, 小于设定的允许不精密度 5% , 重复测定误差符合实验要求。实验数据进行多项式回归分析, 结果见表 2。将统计结果进行 t 检验, 结果二次多项式模型非线性系数 b_2 和三次回归中的非线性系数 b_2 、 b_3 均不具有统计学意义, 一次多项式的 b_1 具有统计学意义, 且具有最小回归标准误, 所以本实验结果直接判断为线性。因此可以认为本实验 THCG 的 AMR 为 $1.7 \sim 995.0$ mIU/mL。

表 1 THCG 分析测量范围系列浓度测量结果(mIU/mL)					
样本编号	配置比例	测量结果 1	测量结果 2	测量均值	预期值
1	10L	1.8	1.6	1.7	1.7
2	9L+1H	135.1	128.9	132.0	125.9
3	8L+2H	267.6	258.6	263.1	250.0
4	7L+3H	369.4	377.3	373.4	374.2
5	6L+3H	489.7	496.3	503.0	498.3
6	5L+5H	634.2	644.9	639.6	622.5
7	4L+6H	745.7	755.3	768.0	746.7
8	3L+7H	880.2	887.3	883.8	870.8
9	2L+8H	987.6	980.2	983.9	995.0

续表 1 THCG 分析测量范围系列浓度测量结果(mIU/mL)					
样本编号	配置比例	测量结果 1	测量结果 2	测量均值	预期值
10	1L+9H	>1 000	>1 000	—	1 119.1
11	10H	>1 000	>1 000	—	1 243.3

注: 10 号和 11 号样本的预期值为样本用 THCG 稀释液 1:1 稀释后的检测结果。—表示无数据。

表 2 THCG 多项式回归分析结果								
阶别	系数符号	系数值	系数 SE	t 检验	P	自由度	回归标准误	
1	b_0	-116.437	1.273	-16.249	0.000	16	9.863	
	b_1	123.751	7.166	97.184	0.000			
2	b_0	-125.982	12.698	-9.921	0.000	15	9.979	
	b_1	128.957	5.830	22.118	0.000			
3	b_2	-0.521	0.569	-0.916	0.395	14	10.370	
	b_0	-112.457	22.421	-5.061	0.004			
	b_1	116.006	18.385	0.973	0.001			
	b_2	2.553	4.162	0.613	0.566			
	b_3	-0.205	0.275	-0.746	0.489			

2.2 CRR 结果 取 THCG 含量分别为 774.3、734.6、845.0 mIU/mL 3 份血清样本, 用 THCG 稀释液进行 5、10、50、100、200、300 倍稀释, 计算稀释回收率, 结果见表 3。回收率 $80\% \sim 120\%$ 为可接受范围, 3 份样本的最大稀释度均为 1:200, AMR 乘以最大稀释度即为 CRR($995.0 \times 200 = 199\,000$ mIU/mL), 结合功能灵敏度 2.6 mIU/mL, 故本检测系统测定 THCG 的 CRR 为 $2.6 \sim 199\,000$ mIU/mL。

表 3 THCG 稀释回收率测定结果				
样本	稀释倍数	预期值	实测值	回收率(%)
1	1:5	154.9	143.5	92.7
	1:10	77.4	68.0	87.8
	1:50	15.5	16.1	104.0
	1:100	7.7	8.9	114.3
	1:200	3.9	4.3	111.1
	1:300	2.6	3.6	137.5
2	1:5	146.9	159.0	108.2
	1:10	73.5	69.0	93.9
	1:50	14.7	15.5	105.2
	1:100	7.3	8.6	116.4
	1:200	3.7	4.4	119.8
	1:300	2.4	4.0	161.3
3	1:5	169.0	158.3	93.6
	1:10	84.5	75.9	89.8
	1:50	16.9	18.6	109.8
	1:100	8.5	9.5	112.4
	1:200	4.2	5.1	119.5
	1:300	2.8	3.7	129.6

3 讨 论

AMR 是指患者标本不经稀释或浓缩等任何处理, 由检验

方法或检测系统得到可靠测量结果的范围^[7]。它是反映仪器及分析方法分析性能的重要指标,也是保证临床检测结果准确、可靠的前提,更是建立临床可报告范围的基础。通过线性验证实验,实验室可证实检测系统的线性性能、决定其测量范围、核实校正的正确性、发现试剂的变质和检验结果的精确度等^[3]。

CAP 对临床开展的一些检测项目提供线性验证品,并对线性结果利用多项式回归方法判定线性,但我国还没有临床化学发光免疫检验的线性验证品。选择低浓度和高浓度患者标本按适当比例关系配制形成系列浓度血清,在检测系统上进行测定,将实测值与预期值作比较,确定 THCG 的 AMR,方法简便实用^[6-8]。实验表明,THCG 的 AMR 为 1.7~995.0 mIU/mL,与厂商声明的线性范围 2~1 000 mIU/mL 基本一致。

CRR 即定量检测项目向临床所能报告的结果范围,患者标本可经稀释、浓缩或其他处理,有别于 AMR。CAP 要求定量检测项目须进行 AMR 验证实验,即线性验证实验,并确定每个项目的 CRR。此后每半年至少进行一次线性验证实验,而 CRR 一经确定、不需更改^[3]。本研究进行 CRR 验证实验时先进行最大允许稀释度实验,因其是进行功能灵敏度、CRR 实验的前提。在 AMR 内选择 3 份不同浓度高值标本,按实验方法稀释后计算稀释回收率,结果 3 份标本的最大稀释度为 1:200,与检测系统的最大自动稀释倍数一致。结合功能灵敏度 2.6 mIU/mL,AMR 上限 995.0 mIU/mL,故本检测系统测定 THCG 的 CRR 为 2.6~199 000 mIU/mL。但值得注意的是各浓度水平在不同稀释条件下所得的稀释回收率,随着稀释倍数的逐渐增加,稀释回收率也有逐渐增加趋势甚至可达到约 20%的正偏差。在临床应用中,THCG 的高值更具诊断、监测和治疗意义,对于妊娠 3~4 周妇女 THCG 的浓度很可能大于 1 000 mIU/mL,必须经过稀释才能得到准确结果,但当原始浓

度大于 1 000 mIU/mL 时,即使进行 1:5 倍稀释,所得结果也将产生约 10%的偏差,若进行 1:200 的稀释,结果将产生约 20%的偏差,在临床应用时必须引起注意。由此可见,对于高值检测有重要意义的检测项目都应验证或建立其临床可报告范围,才能更好地保证检验质量,为临床提供准确有效的信息。

参考文献

[1] 魏昊,丛玉隆. 医学实验室质量管理与认可指南[M]. 北京:中国计量出版社,2004:59-75.
[2] Department of Health and Human Services, Centers for Medicare and Medicaid Services. Clinical laboratory improvement amendments of 1988: final rule[M]. Fed Register, 2003;3704.
[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] 张秀明,郑松柏,庄俊华,等. 临床化学发光免疫法检测 AFP 的分析性能验证方案与实验方法[J]. 中华检验医学杂志, 2007, 30(11): 1293-1297.
[5] 王秀萍,焦琳,郭红燕. 人绒毛膜促性腺激素的临床应用进展[J]. 药学服务与研究, 2010, 10(3): 185-189.
[6] Clinical and Laboratory Standards Institute. EP-6A User demonstration of performance for precision and accuracy [S]. Wayne, PA: CLSI, 2004.
[7] 杨有业,张秀明. 临床检验方法学评价[M]. 北京:人民卫生出版社, 2008: 168-195.
[8] 丛玉隆,冯仁丰,陈晓东. 临床实验室管理学[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2004: 96-108.

(收稿日期:2012-02-18)

(上接第 2114 页)

形精子可产生过量的 ROS, ROS 对成熟精子的氧化损伤可能是男性不育的重要原因。表 2 结果显示,白细胞精子症组精液 ROS 和精浆 MAD 水平明显高于畸形精子组,也证实了精液中白细胞计数增高是导致 ROS 升高的主要原因。

在男性生殖道中,适量低浓度的 ROS 对精子有着重要的生理作用^[7],如精子的高活跃性运动、获能及完成顶体反应等;但是过多 ROS 可引起氧化应激,导致精子运动能力下降甚至丧失,本研究结果也证实了这点。轻度弱精子症组、中度弱精子症组及重度弱精子症组精液中 ROS 和精浆中的 MAD 的水平明显高于健康对照组,随着精子活动力下降,精液中 ROS 和精浆中的 MAD 的水平也依次升高。ROS 导致精子运动力下降的机制主要有:(1)过多的 ROS 引起精子细胞膜脂质的过氧化及链式反应,产生过多 MAD,造成精子膜硬度增加,膜流动性减弱,使精子膜的超微结构损伤,精子运动能力下降甚至丧失^[8];(2)精子线粒体是提供精子运动的源泉,过多的 ROS 也会导致精子线粒体的超微结构损伤,影响到精子运动能力;(3)ROS 也会引起三磷酸腺苷耗竭,从而导致精子活动力丧失。

综上所述,ROS 是影响男性不育的一个重要病因和病理因素,对男性不育患者精液 ROS 和精浆 MAD 进行检测具有重要的临床意义。

参考文献

[1] 郝新霞,杨敬英,龚道元. 活性氧与男性不育相关研究进

展[J]. 医学综述杂志, 2011, 17(18): 2726-2729.
[2] Agarwal A, Sharma RK, Nalljella KP, et al. Reactive oxygen species as an independent marker of male factor infertility [J]. Fertil Steril, 2006, 86(4): 878-885.
[3] Andrew Gallardo JM. Evaluation of antioxidant system in normal semen[J]. Rev Invest Clin, 2007, 59(1): 42-47.
[4] 赵洪鑫,史庭燕,时伟丽,等. 应用化学发光法检测男性不育人群精液活性氧水平[J]. 中国男科学杂志, 2009, 23(4): 14-17.
[5] Andrew CW, Wiliam CLF. Relationship between reactive oxygen species production and lipid peroxidation in human sperm suspensions and their association with sperm function[J]. Fertil Steril, 2005, 83(4): 929-936.
[6] Zalata AA, Ahmed AH, Allamaneni SS, et al. Relationship between acrosin activity of human spermatozoa and oxidative stress[J]. Asian J Androl, 2004, 6(4): 313-318.
[7] 焦瑞宝,唐吉斌. 氧化应激与男性不育[J]. 现代检验医学杂志, 2011, 26(4): 13-15.
[8] Venret P, Aitken RJ, Drevet JR. Antioxidant strategies in the epididymis[J]. Mol Cell Endocrinol, 2004, 216(1/2): 31-39.

(收稿日期:2012-05-12)