

• 论 著 •

游离前列腺特异性抗原性能指标的建立

沙广群¹, 王启龙^{1△}, 刘 萍², 张 影², 李克锦¹, 赵 方²

(1. 江苏省邳州人民医院检验科 221300; 2. 博奥赛斯(天津)生物科技有限公司, 天津 300300)

摘要:目的 建立 Axceed 260 磁微粒全自动化学发光免疫分析仪检测游离前列腺特异性抗原(f-PSA)的空白限(LoB)、最低检出限(LoD)及定量检出限(LoQ)。方法 参照美国临床实验室标准化协会 2012 年颁发的 EP17-A2《临床实验室评价检测能力(第 2 版)》,将 f-PSA 的空白样品及系列低浓度样品在 Axceed 260 磁微粒全自动化学发光免疫分析系统进行检测,根据数据的分布规律,采用相应的统计学方法,确定该方法检测 f-PSA 的 LoB、LoD 及 LoQ。结果 f-PSA 的 LoB 为 0.05 ng/mL,LoD 为 0.16 ng/mL,LoQ 为 0.35 ng/mL。结论 建立的 Axceed 260 磁微粒全自动化学发光免疫分析系统 f-PSA 的 LoB、LoD、LoQ,其检测能力符合临床检验要求。

关键词:游离前列腺特异性抗原; 磁微粒化学发光; 空白限; 检出限; 定量检出限

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2017.14.034 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-9455(2017)14-2097-04

Establishment of performance indicators for f-PSA

SHA Guangqun¹, WANG Qilong^{1△}, LIU Ping², ZHANG Ying², LI Kejin¹, ZHAO Fang²

(1. Department of Laboratory, the Pizhou People's Hospital, Pizhou, Jiangsu 221300, China;

2. Bioscience (Tianjin) Diagnostic Technology Co. Ltd., Tianjin 300300, China)

Abstract: **Objective** To establish the limit of blank (LoB), the limit of detection (LoD) and the limit of quantitation (LoQ) for the detection of f-PSA by the Axceed 260 automatic magnetic particles chemiluminescence immunoassay (MCLIA) analyzer system. **Methods** According to CLSI EP17-A2 protocol, f-PSA blank sample and a series of low concentration samples were performed by the Axceed 260 MCLIA detection. According to the data distribution, the corresponding statistical method was adopted to establish the MCLIA detection of LoB, LoD and LoQ of f-PSA by the manual operation. **Results** LoB of f-PSA measured by the manual operation was 0.05 ng/mL, LoD was 0.16 ng/mL and LoQ was 0.35 ng/mL. **Conclusion** The established LoB, LoQ and LoQ of f-PSA in the clinical laboratory, its detection capability meets the clinical requirements.

Key words: f-PSA; magnetic particles chemiluminescence immunoassay; limit of blank; limit of detection; limit of quantitation

游离前列腺特异性抗原(f-PSA)是释放到血液中以游离形式存在的前列腺特异性抗原,是由前列腺上皮细胞分泌,相对分子质量为 $(30\sim 34)\times 10^3$ 的单链糖蛋白,PSA 具有较高的器官特异性,主要存在男性机体的前列腺组织、精液、血清^[1]。血清中 f-PSA 轻微升高的原因可能为良性前列腺疾病或前列腺癌,为提高 t-PSA 对前列腺癌临床诊断的准确性,建议血清中 t-PSA 为 4~10 ng/mL 时,检测 f-PSA 并计算 f-PSA/t-PSA 比值,从而辅助区分前列腺癌和良性前列腺疾病^[2-4]。前列腺癌患者的 f-PSA/t-PSA 比值低于健康者或良性前列腺增生患者,且比值越低,恶性程度越高^[5-6]。

检测限是指检测系统或方法可检测到的样品中最低分析物浓度^[7]。低浓度值特别有意义的项目,确定其检测限对疾病的诊断或治疗检测有重要的意义。以往由于检出能力评价方法的不统一、各个制造商说明书对检测能力的术语说明不同、术语命名规则不统一,造成检测能力评价方式不一致。美国临床实验室标准化协会(CLSI)在 2012 年《临床实验室评价检测能力的方案;批准指南(第 2 版)》(EP17-A2)提出选择合适的空白样本和低浓度样本来获取检测能力评价的方法^[8]。

f-PSA 是辅助前列腺疾病早期诊断,以及监察患者治疗后复发的重要信息,明确报告 f-PSA 有意义的最小量在临床诊断

中非常重要。现采用 CLSI 制定的 EP17-A2 标准确定 f-PSA 项目的空白检测限(LoB)、检出限(LoD)、定量检出限(LoQ)。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集前列腺肿瘤术后患者血清作为空白样品,用样品稀释液对原始 f-PSA 样品做系列稀释,配置成系列低浓度 f-PSA 样品,所有样品浓度均用罗氏测值验证。选取 LoD 样本浓度范围介于 LoB 水平的 1~10 倍。所有样品均无溶血、黄疸、脂浊,分装于-20℃冰箱保存。

1.2 仪器与试剂 博奥赛斯(天津)生物科技有限公司提供的 Axceed 260 磁微粒全自动化学发光免疫分析仪。仪器配套原装试剂和配套校准品。f-PSA 发光试剂盒,检测项目配套 2 批不同批号的试剂盒(批次 1 批号 201611018,批次 2 批号 201612013)。

1.3 方法 按照仪器操作说明书对仪器进行维护保养、质量控制,每天进行校准,质控品在控后方可开始实验。准备足够量样品,确保实验过程中出错时有足够样品量备用;每个检测日按照实验设计严格执行实验步骤;每日检查测量结果,是否有操作失误或离群值,是否需要重新实验或补充足够数量的数据;如果有超过 5 个离群值,需拒绝并重新实验;实验结束时确保有充足的实验数据。

1.3.1 LoB 的确定 选用 2 批不同批号试剂进行空白限的检测,5 份空白样本,每个批号试剂每日进行 1 次测定,每个空白样本重复测定 4 次,共 3 d,记录浓度值,每批试剂总计获得 60 份结果。按国际标准化组织(ISO)的建议,设定 I 类错误与 II 类错误水平为 5%,即 $\alpha=\beta=5\%$ 。对检测结果进行正态性检验,若空白值呈正态分布,则 $LoB=MB+1.645\ SDB$ (式中 MB 和 SDB 分别为空白样品检测的均值和标准差);若呈非正态分布,则采用非参数法估计 LoB 值。将检测空白样品的结果按照大小排列,求相应 $PctB=1-\alpha=0.95$ 百分位数对应的秩号, $LoB=0.5+B\times PctB$ 位置对应的浓度结果(式中 B 为空白样品数据结果总数)。

1.3.2 LoD 的确定 选用 2 批不同批号试剂进行空白限检测,5 个低浓度样本,每个批号试剂每日进行 1 批测定,与空白限的测定为同一实验批次,每个样本重复测定 4 次,共 3 d,记录浓度值,每批试剂总计获得 60 份测量结果。若检测结果呈正态分布,使用参数法估计 LoD 值。首先计算 5 份低浓度样品的总计标准差 SDL(其中 SD_i 表示每个低浓度样本的标准差; n_i 为每个低浓度水平样本的测定结果数量; J 为低浓度水平样本的个数; cp 是标准正态分布的第 95 百分位数值)。

若低浓度样品呈非正态分布,则使用非参数估计 LoD 值:计算测定结果中低于 LoB 值的百分比。情况 1:如果百分比数值小于 $\beta(5\%)$,那么 LoD 为 60 个结果按照大小顺序排列的中位数。使用 2 批不同批号的试剂,分别计算每批试剂结果的 LoD,选择较大值作为 LoD 值。情况 2:如果计算测定结果中低于 LoB 的百分比数值超出设定的 β 值,那么需要重新选择 1 批稍高浓度的低浓度样品进行 LoD 值的重新测定,直到测定结果中低于 LoB 值的百分比数值小于 β 为止。

1.3.3 LoQ 的确定 依据 CLIA'88 中 f-PSA 项目允许总误差目标,设定本实验室 f-PSA 项目总误差目标为 25%。选用 2 批不同批号试剂进行空白限检测,5 份低浓度样本,每份样本重复测定 4 次,共 3 d,每批试剂总计获得 60 份数据结果。(1)计算每批次试剂每份低浓度样本的平均值、标准差。(2)计算每份样本测值平均值和参考值(R)之间的偏差(Bias)。(3)利用 Westgard 模型计算每份样本总允许误差(TE),并转换为%TE 形式。(4)如果使用 2 或 3 批不同试剂,重复(1)~(3)步骤,计算所有批次试剂的 TE 和%TE。(5)比较%TE 值和设定允许总误差要求是否一致。如果不超出设定要求,那么达到允许误差要求的样本浓度值即该批试剂的 LoQ 值。从所有批次试剂中选择较大 LoQ 值为所有批次试剂的 LoQ 值。(6)如果%TE 值超出设定允许总误差目标的要求,则重新更换一批低浓度样本(比之前浓度稍微高的低浓度样本)重新测定;若低浓度样本的%TE 均小于实验室设定的最大允许误差,则该批次试剂中最低浓度值即为 LoQ 值;如果有 2 批试剂,分别计算 LoQ 值,然后比较选出较大值为最终 LoQ 值。

2 结 果

2.1 LoB 检测结果 空白样品的检测结果经正态性检验,呈非正态分布,故采用非参数方法估计 LoB 值,即 $LoB=0.5+B\times 0.95=0.5+60\times 0.95=57.5$ 位置上的结果,将 60 个空白检测值由小到大排序,列出第 51~60 位数值。第 57、58 个位置上的检测值均为 0.05、0.05 ng/L,故 $LoB=X_{(57)}+0.5[X_{(58)}-X_{(57)}]=0.05$ 。见表 1。

2.2 LoD 检测结果 5 份低浓度样本测定结果经正态性检

验,60 份低浓度样本检测结果呈非正态分布,故采用非参数方法计算 LoD。60 份测定结果中小于 LoB 值的百分比为 $0.0\%<\beta=5\%$ 。LoD 为所有测定结果按照大小排列的中位数,2 批不同批号试剂盒测得结果的中位数分别为 0.16、0.16 ng/L,LoD 值为 0.16 ng/L。见表 2、3。

表 1 空白样品第 51~60 位数值(ng/L)

序号	批次 1	批次 2
51	0.04	0.04
52	0.04	0.04
53	0.04	0.04
54	0.04	0.04
55	0.04	0.04
56	0.04	0.05
57	0.05	0.05
58	0.05	0.05
59	0.05	0.05
60	0.05	0.05

表 2 低值样本检测值统计结果

低值样品测值(ng/mL)	批次 1	批次 2
0.06~0.10	20	19
0.11	3	3
0.12	1	2
0.14	1	2
0.15	2	1
0.16	3	3
0.17	5	3
0.18	5	7
0.19~0.26	20	20
总计	60	60

表 3 低值样本第 26~34 位数值(ng/L)

序号	批次 1	批次 1
26	0.15	0.14
27	0.15	0.15
28	0.16	0.16
29	0.16	0.16
30	0.16	0.16
31	0.17	0.17
32	0.17	0.17
33	0.17	0.17
34	0.17	0.18

2.3 LoQ 检测结果 使用 LoD 实验相同的低浓度样本数据计算 f-PSA 项目的 LoQ 值,5 份低浓度样本的理论浓度经罗氏试剂测定验证,计算结果的平均值、标准差、偏倚、总误差百

分比。见表 4。结果显示 5 份低水平浓度样本的总误差百分比全部超出设定允许误差值 25%，说明该系列浓度的样本未能达到在设定允许误差范围内的准确度要求，所以另外选择 1 批浓度稍高的样本，重新进行试验。选取低值样本理论浓度作为横坐标，测量值总允许误差为纵坐标作散点图，确定另选样本浓度目标为 0.4 ng/mL。同样选择罗氏试剂定量检测的低

浓度样本作为理论浓度，5 份低值样本浓度范围为(0.4±0.1) ng/mL。实验方法相同，所有批次样本的总误差百分比均小于 25%。因此，选择符合设定标准最低样本浓度值作为 LoQ 值，批次 1 对应的 LoQ 与批次 2 对应的 LoQ 为相同浓度样本值，因此 LoQ=0.35 ng/mL。见表 5。

表 4 5 份低浓度样本的检测结果

低浓度样本	理论浓度(ng/mL)		平均值(ng/mL)		标准差(ng/mL)		偏倚(ng/mL)		总误差百分比(%)	
	批次 1	批次 2	批次 1	批次 2	批次 1	批次 2	批次 1	批次 2	批次 1	批次 2
1	0.093	0.087	0.081	0.020	0.020	— 0.006	— 0.012	49.82	55.04	52.43
2	0.114	0.090	0.099	0.012	0.014	— 0.024	— 0.015	42.54	37.19	39.86
3	0.196	0.188	0.173	0.028	0.025	— 0.008	— 0.023	32.96	37.58	35.27
4	0.216	0.189	0.183	0.016	0.019	— 0.027	— 0.033	27.51	32.45	29.98
5	0.257	0.238	0.232	0.022	0.027	— 0.019	— 0.025	24.34	30.87	27.61

表 5 5 份低浓度样本检测结果

低浓度样本	理论浓度(ng/mL)		平均值(ng/mL)		标准差(ng/mL)		偏倚(ng/mL)		总误差百分比(%)	
	批次 1	批次 2	批次 1	批次 2	批次 1	批次 2	批次 1	批次 2	批次 1	批次 2
1	0.35	0.320	0.310	0.021	0.013	— 0.030	— 0.040	20.35	18.99	19.67
2	0.39	0.388	0.374	0.032	0.022	— 0.002	— 0.016	17.14	15.20	16.17
3	0.42	0.394	0.409	0.016	0.014	— 0.026	— 0.011	13.66	9.14	11.40
4	0.46	0.443	0.449	0.018	0.017	— 0.017	— 0.011	11.46	9.77	10.62
5	0.50	0.496	0.490	0.025	0.024	— 0.004	— 0.010	10.91	11.80	11.35

3 讨 论

传统建立检测限仅为计算检测低限(LLD)，以样品响应量与样品内分析物量呈正比例关系为例，通常在一次运行中对空白样本进行 20 次重复测定，以空白均值加 2 倍标准差所对应的分析物含量即为检测低限^[7]。该方法虽操作简单，但缺少统计学和生物科学依据，只简单地对空白样本进行测定，对含有分析物的低浓度样品未明确关于检出限的评价方案，更未涉及定量检出限的建立方案。检测能力的验证是评价临床医疗试剂效能的重要依据，也是产品注册报批的重要申请材料之一。目前，国内关于检测能力验证都参考使用第 1 版 EP17-A^[9-11]。使用新版 EP17-A2 标准指南的甚少，而国际已有很多报道是参照 EP17-A2 建立和验证试剂盒检测能力^[12-14]。

空白样品和低浓度样品检测结果的离散分布是因随机测量误差所致。真实空白样品给出的仪器响应值有 5% 的可能性被认为有分析物存在，这是 I 类错误导致的假阳性(空白样品被认为是阳性样本——α 错误)。同时观察到含有低浓度分析物样品的检测值会低于这个限值，此时若认为样品中不存在可检出的分析物，导致 II 类错误，即假阳性(真阳性的低浓度真阳样本被认定是阴性标本——β 错误)。因此，如何确定低浓度样品和空白检测区别的位置至关重要，应根据控制 I、II 类错误的相对费用，合理设置 a、b 值。一般情况下按国际标准化组织(ISO)建议，设定 I 类错误与 II 类错误水平为 5%，即 α=β=5%。相当于使用空白样本测定结果分布 95%(1-α)的百分位数作为空白检测值的限值，即为 LoB 值^[15]。

f-PSA 是辅助区分前列腺疾病和前列腺癌的重要指标，因此对 f-PSA 项目检测能力的要求很高，本研究依照 EP17-A2 文件，使用 Axceed 260 plus 磁微粒化学发光免疫分析仪建立 f-PSA 项目的 LoB、LoD、LoQ。最低的限值是“LoB”，是预期看到的不含分析物样品系列结果的最大值，是一个观察到的检测结果，而其他的 2 个限值只是分析物的实际浓度。Axceed 260 检测系统测定 f-PSA 的 LoB 为 0.05 ng/mL。LoD 是指分析物的实际浓度，在该浓度处观察到的检测结果刚刚大于 LoB，Axceed 260 检测系统测定 f-PSA 的 LoD 为 0.16 ng/mL，与厂家试剂说明书中声明的最低检出限(<0.2 ng/mL)一致。LoQ 是指本研究 f-PSA 项目总误差目标 25% 范围内，能定量测出分析物的实际浓度，在此浓度下分析物被准确检出。低浓度 0.4 ng/mL 特别有意义的 f-PSA 项目，确定其检测限对区分前列腺疾病和前列腺癌具有重要的临床意义。本研究结果显示，Axceed 260 检测系统测定 f-PSA 项目的定量检出限为 0.35 ng/mL，表明该检测系统对 f-PSA 具有很好的检测灵敏度，为临床诊断和治疗提供准确而有价值的信息。

参考文献

[1] 张汉东,富晓敏.前列腺特异性抗原的临床应用价值[J].医学理论与实践,2014,12(12):1648-1649.
[2] 张雪峰,刘一兵,许文革,等.游离前列腺特异性抗原酶促化学发光免疫分析方法学的建立[J].原子能科学技术,2008,9(42):57-62. (下转第 2102 页)

综上所述, rhTPO 治疗小儿 ITP 安全有效, 虽影响 rhTPO 疗效的因素较多, 但 Logistic 回归分析证实只有病程分类和 BMMCT 是 rhTPO 疗效的独立预后因素, 可为临床治疗提供经验。

参考文献

[1] 张慧, 刘红, 南虎松. 小儿特发性血小板减少性紫癜的治疗进展[J]. 吉林医学, 2016, 13(2): 429-430.

[2] 黄垚, 刘烨, 王伟. 利妥昔单抗联合环磷酰胺治疗难治性特发性血小板减少性紫癜的临床观察[J]. 医学综述, 2016, 11(3): 572-574.

[3] 童华波, 庭永君, 王亚, 等. 特发性血小板减少性紫癜血小板参数临床价值探讨[J]. 重庆医学, 2014, 22(32): 4365-4367.

[4] John ML, Hitzler W, Scharrer I. The role of human leukocyte antigens as predisposing and/or protective factors in patients with idiopathic thrombotic thrombocytopenic purpura[J]. Ann Hematol, 2012, 91(4): 507-510.

[5] Bay A, Coskun E, Leblebisatan G, et al. Prevalence and clinical significance of antithyroid antibodies in children with immune thrombocytopenic purpura[J]. Pediatr Hematol Oncol, 2013, 30(8): 698-704.

[6] Wieland I, Kentouche K, Jentzsch M, et al. Long-term remission of recurrent thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP) after Rituximab in children and young adults [J]. Pediatr Blood Cancer, 2015, 62(5): 823-829.

[7] 白静, 刘文君. 儿童原发性免疫性血小板减少症血小板参

数及功能变化[J]. 临床儿科杂志, 2015, 11(9): 797-801.

[8] 杨建荣, 王海玲, 高秀丽, 等. 重组血小板生成素与小剂量人血丙种球蛋白治疗特发性小儿血小板减少性紫癜的疗效比较[J]. 临床合理用药杂志, 2015, 22(18): 101-102.

[9] 林晓骥, 姚荣欣, 朱宝玲, 等. 脾切除治疗特发性血小板减少性紫癜的疗效观察及预后因素分析[J]. 临床血液学杂志, 2011, 24(3): 270-272.

[10] 王缉干, 罗建明. 儿童特发性血小板减少性紫癜急性转慢性危险因素分析[J]. 中国实用儿科杂志, 2012, 16(2): 49-51.

[11] 王海燕, 王华, 耿少怡. 耿少怡教授治疗小儿免疫性血小板减少性紫癜的临床经验[J]. 中外医疗, 2016, 35(18): 193-195.

[12] 程衍杨, 熊昊, 徐之良. 新诊断儿童免疫性血小板减少症与人细小病毒 B19 感染的相关性研究[J]. 医学研究杂志, 2015, 44(10): 103-106.

[13] 史利欢, 粟春香, 王国锋. 特发性血小板减少性紫癜实验室特点与临床关系探究[J]. 临床医药文献电子杂志, 2015, 2(34): 7103-7106.

[14] 白静, 刘文君. 原发性免疫性血小板减少症血小板参数及功能的改变[J]. 中国实用儿科杂志, 2015, 13(2): 75-78.

[15] 徐楠楠, 宋书凯, 马东方, 等. 特发性血小板减少性紫癜合并急性心肌梗死患者血小板参数变化的临床意义[J]. 川北医学院学报, 2015, 14(2): 147-150.

(收稿日期: 2017-03-07 修回日期: 2017-05-13)

(上接第 2099 页)

[3] 鄢盛恺, Ulf-Hkan S, Rolf L, et al. 美国临床生化科学院检验医学实践指南: 睾丸、前列腺、结直肠、乳腺及卵巢癌肿瘤标志物的应用[J]. 临床检验杂志, 2012, 2(2): 116-160.

[4] Roddam AW, Duffy MJ, Hamdy FC, et al. Use of prostate-specific antigen (PSA) isoforms for the detection of prostate cancer in men with a PSA level of 2-10 ng/mL: Systematic review and meta-analysis[J]. Eur Urol, 2005, 48(3): 386-399.

[5] Catalona WJ, Smith DS, Wolfetr RL, et al. Evaluation of percentage of free serum prostate-specific antigen to improve specificity of prostate cancer screening[J]. JAMA, 2005, 274(15): 1214-1220.

[6] Tanguay S, Begin LR, Elhilali MM, et al. Comparative evaluation of total PSA, free/total PSA, and complexed PSA in prostate cancer detection[J]. Urology, 2002, 59(2): 261-265.

[7] 冯仁丰. 分析灵敏度(检测限)[J]. 上海医学检验杂志, 2001, 17(3): 133-136.

[8] CLSI. Evaluation of detection capability for clinical laboratory measurement procedures[M]. PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012.

[9] 方婉仙, 李志雄, 董志宁, 等. 总前列腺特异性抗原定量测

定试剂盒(化学发光免疫分析法)的性能验证[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2015, 5(7): 323-327.

[10] 王新灵, 李忠信, 关学, 等. 基于磁微粒化学发光法的肝纤四项检测限与功能灵敏度研究[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2015, 39(5): 328-332.

[11] 秦雯, 胡大春, 肖利华. 时间分辨荧光法检测乙型肝炎病毒血清标志物的检出限探讨[J]. 检验医学与临床, 2015, 12(1): 34-36.

[12] 王雁, 袁伟, 李旻, 等. Access2 免疫化学发光仪检测动物血清心肌钙蛋白 I 的分析性能确证[J]. 药物评价研究, 2015, 38(2): 180-184.

[13] Nair SV, Kim HC, Fortunko JA, et al. Aptima HIV-1 quant Dx-A fully automated assay for both diagnosis and quantification of HIV-1[J]. J Clin Virol, 2016, 77(77): 46-54.

[14] Jeanblanc NM, Hemken PM, Datwyler MJ, et al. Development of a new ARCHITECT automated periostin immunoassay[J]. Clin Chimica Acta, 2017, 464(44): 228-235.

[15] Sokoll LJ, Chan DW, Klee GG, et al. Multi-center analytical performance evaluation of the Access Hybritech (R) p2PSA immunoassay[J]. Clin Chimica Acta, 2012, 413(15/16): 1279-1283.

(收稿日期: 2017-02-11 修回日期: 2017-04-19)