

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2020.06.003

AutoLumo A2000 检测系统检测 17- α -羟孕酮的性能验证及评价^{*}

单志鸣, 王文洁, 李进香, 孙红启[△]

郑州大学附属儿童医院/河南省儿童医院/郑州儿童医院郑州市感染与
免疫重点实验室, 河南郑州 450018

摘要:目的 对 AutoLumo A2000 检测系统检测 17- α -羟孕酮(17- α -OHP)的分析性能进行评价。
方法 参考美国临床实验室标准化协会(CLSI)系列文件,制订方法学评价方案,对 AutoLumo A2000 检测系统的精密度、灵敏度、线性范围、干扰试验和参考区间进行评价和验证。**结果** 分析室内质控品 QC1 批内精密度为 2.85%,批间精密度为 1.25%,室内质控品 QC2 批内精密度为 3.25%,批间精密度为 2.65%;分析灵敏度为 0.005 ng/mL;线性相关系数 R^2 为 0.999 8,在试剂参考范围内线性良好;高胆红素和高三酰甘油水平对检测结果无显著干扰,高血红蛋白水平对结果影响明显;参考区间偏倚为 -4.34%。**结论** AutoLumo A2000 检测系统检测 17- α -OHP 的分析性能良好,能够满足临床检测的需求。

关键词:17- α -羟孕酮; 性能验证; 化学发光法; AutoLumo A2000 检测系统
中图法分类号:R446.61 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-9455(2020)06-0728-04

Performance verification and evaluation of AutoLumo A2000 detection system for detecting 17-alpha-hydroxyprogesterone^{*}

SHAN Zhiming, WANG Wenjie, LI Jinxiang, SUN Hongqi[△]

Zhengzhou Municipal Infection and Immunization Key Laboratory, Affiliated
Children's Hospital of Zhengzhou University/Henan Provincial Children's Hospital/
Zhengzhou Children's Hospital, Zhengzhou, Henan 450018, China

Abstract: Objective To evaluate the analytical performance of the AutoLumo A2000 detection system for detecting 17-alpha-hydroxyprogesterone (17- α -OHP). **Methods** Referring to the series documents of the American Association for Clinical Laboratory Standardization (CLSI), the methodological evaluation scheme was formulated to conduct the evaluation and verification on the precision, sensitivity, linear range, interference test and reference range of AutoLumo A2000 detection system. **Results** The intra-batch precision of internal quality control QC1 was 2.85%, the inter-batch precision was 1.25%, and the intra-batch precision of internal quality control QC2 was 3.25%, the inter-batch precision was 2.65%; the analytical sensitivity was 0.005 ng/mL; the linear correlation coefficient (R^2) was 0.999 8; the linearity was good within the reference range of reagent; high bilirubin and high triglyceride had no significant interference on the test results, high hemoglobin had a significant impact on the results, and the reference interval deviation was -4.34%. **Conclusion** The AutoLumo A2000 detection system has good performance in measuring 17- α -OHP and can meet the needs of clinical testing.

Key words: 17-alpha-hydroxyprogesterone; performance verification; chemiluminescent measurements; AutoLumo A2000 detection system

17- α -羟孕酮(17- α -OHP)主要由人肾上腺皮质生成,为低孕酮活性,可以经 21-羟化进一步合成皮质醇类激素^[1]。育龄女性的 17- α -OHP 水平随月经周期发生变化,表现为黄体期高,卵泡期低。妊娠时,胎盘和肾上腺等可以大量生成 17- α -OHP,妊娠 32 周以后 17- α -OHP 水平骤然升高持续至分娩期。病理状态(如先天性肾上腺皮质增生)会引起 17- α -OHP 水平

升高。新生儿脐带血内也可检测出 17- α -OHP^[2-3]。磁微粒化学发光法检测 17- α -OHP 采用竞争法原理:用二抗包被磁微粒,17- α -OHP 抗体制成抗体溶液,将辣根过氧化物酶标记的 17- α -OHP 抗原制备成酶标结合物。通过抗原抗体相互反应形成抗体酶标抗原复合物,复合物可催化发光底物产生光子,发光值(RLU)强度与 17- α -OHP 水平呈反比。该方法是一

^{*} 基金项目:河南省医学科技攻关计划联合共建项目(2018020646,2018020600)。
作者简介:单志鸣,男,主管技师,主要从事临床免疫学检验研究。 [△] 通信作者, E-mail: sunhongqi@163.com。

种敏感、特异的快速检测方法。根据美国临床实验室改进修正案和 ISO15189 等文件对实验室质量的管理要求和实验室认可的要求^[4-5],实验室检测分析系统在临床应用前须对其进行分析性能验证^[6-7]。本研究通过分析 AutoLumo A2000 检测系统检测 17- α -OHP 的精密度、灵敏度、线性范围、干扰试验和参考区间,验证厂商给定的性能参数,为临床应用该项目提供准确、翔实、可靠的依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集本院 2019 年 1—5 月就诊患者的新鲜血清标本,根据 17- α -OHP 水平的高低分开保存,置于-20℃冻存备用。

1.2 仪器与试剂 AutoLumo A2000 化学发光测定仪及检测试剂盒(豫械注准 20142400077)。

1.3 方法

1.3.1 精密度分析 按照美国临床实验室标准化协会(CLSI)EP15-A2 文件要求^[8],选用高、低两个水平的安图生物室内质控品(QC1 和 QC2,批号:20171023)进行检测,评价仪器精密度。每天 9:00 测定 QC1 和 QC2 两次,15:00 测定 QC1 和 QC2 两次,连续测定 10 d,共测得 40 组数据,根据测定结果分析批内和批间精密度。

1.3.2 灵敏度分析 选择水平为 0 的标本(配套最低浓度校准品 S0)重复测定 20 次,统计测量结果的发光值,得出其均数($\bar{x}$)和标准差(s),将 $\bar{x}+2s$ 带入 Lin-log 拟合的标准曲线方程中,求出对应值,即为分析灵敏度。

1.3.3 线性范围评价 按照 CLSI EP6-A 文件要求^[9],取 17- α -OHP 高水平(H)和低水平(L)血清各 1 份,按 4H、3H+1L、2H+2L、1H+3L 和 4L 的比例配制成 5 个水平的标本,形成系列水平血清进行测定。以稀释后的理论值为 X,实测值为 Y,将所有结果标注在坐标图上,计算回归方程 $Y=\alpha X+\beta$,验证线性范围,判断标准: α 为 0.97~1.03,线性相关系数 $R^2\geq 0.990 0$ 。

1.3.4 干扰试验 按照 CLSI EP7-A2 文件要求^[10],配制干扰物:(1)胆红素(TBil),选择临床黄疸标本加蒸馏水配制 TBil 水平分别为 25.00、12.50、6.25 g/L;(2)三酰甘油(TG),选择血脂标本加蒸馏水配制 TG 水平分别为 6、4、2 g/dL;(3)血红蛋白(Hb),选择新鲜乙二胺四乙酸二钾抗凝全血加蒸馏水配制 Hb 水平分别为 100、50、25 mg/dL。测定分析:选择已知 17- α -OHP 低水平标本和高水平标本各 1 份,每份标本分成 10 份,按 1:1 比例分别加入试剂配套稀释液和 9 份干扰物(TBil 水平分别为 25.00、12.50、6.25 g/L, TG 水平分别为 6、4、2 g/dL, Hb 水平分别为 100、50、25 mg/dL)中,稀释后标本编号为①②③④⑤⑥⑦⑧⑨⑩,每份标本连续测 3 次取平均值。分析、测定干扰值:干扰值等于均值减去未加干扰物的测定

值,干扰值如果在未加干扰物测定值范围内($\bar{x}\pm 1.96s$,95%CI)就说明对结果无显著性干扰。

1.3.5 参考区间 选择在线性范围内的 17- α -OHP 高水平标本 1 份,用系统稀释液按照说明书最大稀释倍数的 10 倍进行稀释,检测稀释前高水平标本和稀释后标本各 2 次,得出靶值(原值的均值)和检测值(稀释后标本均值 $\times 10$),计算检测值与靶值的相对偏倚,偏倚=(检测值-靶值)/靶值 $\times 100\%$ 。

2 结果

2.1 精密度验证结果 QC1 批内精密度为 2.85%,批间精密度为 1.25%,总精密度为 2.37%;QC2 批内精密度为 3.25%,批间精密度为 2.65%,总精密度为 3.51%,均符合 CLSI 指南要求的标准。

2.2 灵敏度验证结果 20 次测定发光值 $\bar{x}$ 为 25 914 678, s 为 501 325, $\bar{x}+2s$ 为 26 917 328,得出最低检测限即分析灵敏度为 0.005 ng/mL。

2.3 线性范围验证结果 选取 17- α -OHP 高水平(28.59 ng/mL)和低水平(0.38 ng/mL)血清,稀释后的理论值 X 和实测值 Y 见表 1。线性回归方程结果显示, $Y=0.971 6X+0.138$, $R^2=0.999 8$ 。根据 α 为 0.97~1.03,线性相关系数 $R^2\geq 0.990 0$,判断线性范围良好。故 17- α -OHP 水平在厂家给出的线性范围内(0.05~30.00 ng/mL)线性良好。见图 1。

表 1 17- α -OHP 理论值 X 和实测值 Y 比较 (ng/mL)		
配制比例	理论值 X	实测值 Y
4H	28.590	27.940
3H+1L	21.537	21.012
2H+2L	14.485	14.129
H+3L	7.433	7.581
4L	0.380	0.395

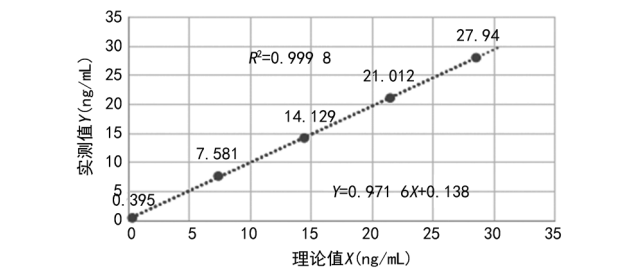


图 1 17- α -孕酮线性回归分析

2.4 干扰试验验证结果 TBil 水平高达 25 g/L、TG 水平高达 6 g/dL 时,测定的 17- α -OHP 高、低水平标本的干扰值都在限定值范围内($\bar{x}\pm 1.96s$),均不构成干扰。当 Hb 水平大于或等于 50 mg/dL 时,高、低水平标本测定结果的干扰值均增大,超出限定值的范围($\bar{x}\pm 1.96s$),提示对结果有显著干扰。见表 2。

2.5 参考区间验证结果 原值两次测定结果均值为 26.98 ng/mL,稀释标本两次测定结果均值为 25.81 ng/mL,偏倚为-4.34%,符合标准要求,试剂盒参考范围满足 0.05~30.00 ng/mL 的要求。

表 2 干扰试验结果 (ng/mL)

项目	稀释液	干扰物 TBil			干扰物 TG			干扰物 Hb		
		②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨	⑩
低水平标本	3.261	3.189	3.191	3.196	3.190	3.194	3.211	3.012	3.028	3.256
高水平标本	14.537	14.475	14.496	14.952	14.546	14.582	14.601	13.122	13.212	14.216
干扰值	—	可接受	可接受	可接受	可接受	可接受	可接受	>1.96s	>1.96s	可接受

注：—表示无数据。

3 讨 论

17-α-OHP 是诊断多种临床疾病的重要指标,主要包括婴幼儿期的女婴男性化、厌食、腹泻、呕吐、体重下降、代谢性酸中毒、皮肤黏膜色素沉着等。青少年期体格发育过快、骨龄大于年龄、阴毛早出及性早熟,女童月经初潮延迟,多毛症,原发性闭经,以及成年男女痤疮、秃顶及不明原因的不孕不育等也需要检测 17-α-OHP^[11]。先天性肾上腺皮质增生症最常见的病因是酶的缺陷,尤其是 21-羟化酶缺陷,占 90% 左右。患者由于 21-羟化酶缺乏或活性降低,孕酮和 17-α-OHP 产物不能催化、转化为去氧皮质酮和脱氧皮质醇,导致促肾上腺皮质激素反馈性分泌增多,刺激肾上腺皮质束状带增生,使孕酮和 17-α-OHP 等中间代谢产物水平增高^[12-13]。因此,检测 17-α-OHP 水平对疾病的诊断和治疗效果监测具有重大意义。

目前,17-α-OHP 实验室常用检测方法有放射免疫法、化学发光法以及高效液相色谱串联质谱法^[14]。放射免疫法的灵敏度和特异度较低,同时会对受检人员的身体造成伤害,故逐渐被淘汰。2000 年左右,高效液相色谱串联质谱法开始用于类固醇激素检测,该方法避免了许多干扰因素,是一种新的检测手段。该方法不仅可作为参考方法,还能被用于许多临床指标的检测^[15],但是由于操作困难和成本较高等因素,目前国内临床实验室应用较少。化学发光法凭借其高通量和较高的灵敏度、特异度,仍然是实验室检测 17-α-OHP 等激素类指标的常用方法。

实验室检测方法都存在误差,为保证实验室为临床提供高质量服务,在检测方法经过试验后、应用于临床实验室检测前和在对原检测系统进行调整后,都应对该方法进行严格、系统、专业的分析性能评价,对仪器厂家提供的技术指标进行性能验证^[16-17]。为此,CLSI 出台了一系列 EP 文件,本研究依据部分 EP 文件对 AutoLumo A2000 检测系统进行性能评价,EP15-A2 文件作为精密度性能评价方案指南,是目前评价仪器精密度最全面和最有统计学效能的方法;EP7-A2 文件为干扰试验方案指南;根据 EP6-A2 文件制订的线性评价方案是多项式回归评价方法中具有代表性的方法^[18]。本试验中化学发光法对黄疸和血脂标本抗干扰能力较强,而在高 Hb 状态下抗干扰能力较弱,建议在临床报告结果中注明标本可能存在的干扰因素,提醒临床注意。精密度是评价检测系统

的主要指标之一,是仪器性能评价的基础。本研究结果显示,AutoLumo A2000 检测系统测定 17-α-OHP 的 QC1 批内精密度为 2.85%,批间精密度为 1.25%;QC2 批内精密度为 3.25%,批间精密度为 2.65%,均符合 CLSI 指南要求^[19]。线性范围验证是验证方法的最高检测限和最低检测限之间是否呈线性关系,有助于发现仪器、校准品、试剂和操作规程等方面的误差来源。本研究通过系列比例稀释,检测标本的 17-α-OHP 水平,对数据结果进行回归分析,结果可看出其与多项式的拟合曲线接近重合,所有数据几乎都落在一条直线上,初步判断最佳的拟合形式为直线,且数据精密度较高,证明在该范围内稀释的几个点构成直线方程。结果表明,实测值与理论值之间相关性良好, R^2 为 0.999 8。与之前的研究^[19]相比,本研究对 AutoLumo A2000 检测系统的 17-α-OHP 项目进行了系统、全面的性能指标分析,更好地评价了仪器的性能,为临床应用提供支持。

综上所述,通过对 17-α-OHP 测定仪器的精密度、灵敏度、线性范围、干扰试验和参考范围的评价和分析,证实 AutoLumo A2000 检测系统应用化学发光法测定 17-α-OHP 的灵敏度高、精密度好、结果准确可靠,性能可达到临床检测的要求。

参考文献

[1] 张芹,王本敬,陈亚平,等. 新生儿胎龄、出生体重与 17-α-羟孕酮水平的多中心回顾性分析[J]. 中华儿科杂志, 2014,52(9):706-709.

[2] 中华预防医学会出生缺陷预防与控制专业委员会新生儿筛查学组,中国医师协会青春期医学专业委员会临床遗传学组,中华医学会儿科学分会内分泌遗传代谢学组. 先天性肾上腺皮质增生症新生儿筛查共识[J]. 中华儿科杂志, 2016,54(6):404-409.

[3] 简永建. 新生儿先天性肾上腺皮质增生症筛查诊断实验方法学发展[J]. 中国儿童保健杂志, 2014,22(10):1065-1067.

[4] KLONOFF D C, ARON D, COHEN R M, et al. The need for accuracy in hemoglobin A1c proficiency testing: why the proposed CLIA rule of 2019 is a step backward[J]. J Diabetes Sci Technol, 2019,13(3):424-427.

[5] THELEN M H M, HUISMAN W. Harmonization of accreditation to ISO15189[J]. Clin Chem Lab Med, 2018,56(10):1637-1643.

[6] 王杰. 浅谈医院医疗器械档案规范化管理[J]. 健康大视野, 2018,26(23):291.

(下转第 735 页)

- 119th ENMC international workshop: trial design in adult idiopathic inflammatory myopathies, with the exception of inclusionbody myositis, 10 — 12 October 2003, Naarden, the Netherlands[J]. Neuromuscul Disord, 2004, 14 (5): 337-345.
- [4] HAYASHI M, YANABA K, UMEZAWA Y, et al. Impact of anti-tumor necrosis factor- α agents on serum levels of KL-6 and surfactant protein-D in patients with psoriasis[J]. J Dermatol, 2017, 44(9): 1063-1066.
- [5] YAMAKAWA H, HAGIWARA E, KITAMURA H, et al. Serum KL-6 and surfactant protein-D as monitoring and predictive markers of interstitial lung disease in patients with systemic sclerosis and mixed connective tissue disease[J]. J Thorac Dis, 2017, 9(2): 362-371.
- [6] 王高亚, 邓瀚文, 祝紫葳, 等. 皮炎和多发性肌炎临床表现和实验室检查对比分析[J]. 中国实用内科杂志, 2016, 36(12): 1067-1069.
- [7] 张丽君, 叶志中, 庄俊汉, 等. 抗 Jo-1 抗体在多发性肌炎/皮炎中的临床研究[J]. 中华风湿病学杂志, 2004, 8 (3): 165-167.
- [8] ANTONIOU K M, MARGARITOPOULOS G, ECONOMIDOU F, et al. Pivotal clinical dilemmas in collagen vascular diseases associated with interstitial lung involvement[J]. Eur Respira Soc, 2009, 33(4): 882-896.
- [9] KRYSTUFKOVÁ O, HULEJOVÁ H, MANN H F, et al. Serum levels of B-cell activating factor of the TNF family (BAFF) correlate with anti-Jo-1 autoantibodies levels and disease activity in patients with anti-Jo-1 positive polymyositis and dermatomyositis[J]. Arthritis Res Ther, 2018, 27, 20(1): 158-166.
- [10] HULEJOVÁ H, KRYŠTUFKOVÁ O, MANN H, et al. Increased visfatin levels are associated with higher disease activity in anti-Jo-1-positive myositis patients [J]. Clin Exp Rheumatol, 2016, 34(2): 222-229.
- [11] GONO T, KANEKO H, KAWAGUCHI Y, et al. Cytokine profiles in polymyositis and dermatomyositis complicated by rapidly progressive or chronic interstitial lung disease[J]. Rheumatology (Oxford), 2014, 53(12): 2196-2203.
- [12] ZHANG L, FU X H, YU Y, et al. Treatment with CA-074Me, a Cathepsin B inhibitor, reduces lung interstitial inflammation and fibrosis in a rat model of polymyositis [J]. Lab Invest, 2015, 95(1): 65-77.
- [13] 林小慧, 刘开祥, 李清华, 等. 肌炎抗体在多发性肌炎/皮炎的表达研究[J]. 中国神经免疫学和神经病学杂志, 2014, 21(2): 151-152.
- [14] ZAMPELI E, VENETSANOPOULOU A, ARGYROPOULOU O D, et al. Myositis autoantibody profiles and their clinical associations in Greek patients with inflammatory myopathies [J]. Clin Rheumatol, 2018, 38 (1): 1007-1015.
- [15] YOUSEM S A, GIBSON K, KAMINSKI N, et al. The pulmonary histopathologic manifestations of the anti-Jo-1 tRNA synthetase syndrome [J]. Mod Pathol, 2010, 23 (6): 874-880.

(收稿日期: 2019-05-16 修回日期: 2019-09-16)

(上接第 730 页)

- [7] 潘细牙, 胡红梅. 医学检验检测系统的性能评价及优化建议[J/CD]. 临床检验杂志(电子版), 2018, 7(3): 567.
- [8] 冯洋, 徐上放, 鲁静. OLYMPUS AU640 型全自动生化分析仪性能验证[J]. 实验与检验医学, 2014, 32 (2): 229-232.
- [9] SHIPKOVA M, VOGESER M, RAMOS P A, et al. Multi-center analytical evaluation of a novel automated tacrolimus immunoassay[J]. Clin Biochem, 2014, 47(12): 1069-1077.
- [10] HINZMANN R, TRAN C T. System accuracy evaluation for blood glucose measurements should be performed in accordance with ISO15197: 2003 and CLSI approved guideline EP7-A2[J]. Diabetes Technol Ther, 2012, 14 (4): 379-380.
- [11] 中华医学会儿科学分会内分泌遗传代谢病学组. 先天性肾上腺皮质增生症 21-羟化酶缺陷诊治共识[J]. 中华儿科杂志, 2016, 54(8): 569-576.
- [12] 韩连书. 先天性肾上腺皮质增生症诊治现状[J]. 中国实用儿科杂志, 2016, 31(6): 410-413.
- [13] 李强, 郭琳. 先天性肾上腺皮质增生症的诊断与处理[J]. 内科急危重症杂志, 2016, 22(4): 241-246.
- [14] 叶致含, 傅之妍, 谢丽鸿, 等. 高效液相色谱-串联质谱法检测血清油酸及其在胰岛素抵抗中的应用[J]. 临床检验杂志, 2019, 37(3): 161-166.
- [15] 朱智慧. 两种方法检测血浆中间肾上腺素的一致性比较[J]. 标记免疫分析与临床, 2019, 26(1): 153-156.
- [16] 苏荣, 叶桂样, 罗娜, 等. 乙型肝炎病毒 E 抗原检测方法性能的初步评价[J]. 实验与检验医学, 2013, 31(1): 21-23.
- [17] 安崇文, 李海霞, 焦莉莉, 等. 顺磁性微粒子化学发光免疫分析法检测血清尿酸的性能评价[J]. 药物分析杂志, 2014, 34(12): 2217-2224.
- [18] 姜雯雯, 赵有利, 祁媚姣, 等. 罗氏 Cobas8000 全自动生化分析仪配套试剂的性能验证[J]. 甘肃医药, 2019, 38(1): 16-20.
- [19] 渠海, 吕萌萌, 朱宇皇, 等. 基于三种检测方法的 17 α 羟孕酮临床检测比对[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2017, 9(4): 272-277.

(收稿日期: 2019-05-15 修回日期: 2019-10-08)