

• 检验技术与方法 •

流式荧光发光法检测多肿瘤标志物的方法学评价

李洪涛, 高 庭

(南华大学附属第一医院妇产科, 湖南衡阳 421001)

摘要:目的 评价流式荧光发光法在 AFP、CEA、CA125、CA199 定量测定中的可靠性。方法 在 Luminex 200 多功能流式点阵仪上评价了本法的精密度、准确度(回收实验)、检出限、线性和抗干扰性,并分析了本法与电化学发光法检测结果的相关性。结果 批内变异系数均小于 10%,批间变异每米均小于 13%,回收率在 89%~113%之间,灵敏度较好,线性良好($r > 0.99$),血红蛋白、胆红素、三酰甘油对测定结果无显著性干扰($P > 0.05$),与电化学发光法检测结果相关性良好($r > 0.975$)。结论 本方法测定结果准确、可靠,操作简便、快速,适宜于临床检测推广。

关键词: 实验室技术和方法; 肿瘤标记,生物学; 流式荧光发光法

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.02.034

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)02-0203-03

Methodology evaluation of the determination of tumor markers based on flow cytometry fluorescence luminescence method

Li Hongtao, Gao Ting

(Department of Gynecology and Obstetrics, the First Affiliated Hospital of University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

Abstract: Objective To evaluate the reliability of the quantitative determination of tumor markers AFP, CEA, CA125 and CA199 based on the flow cytometry fluorescence method. **Methods** The precision, accuracy, sensitivity, linearity and interference resistance of the kits were evaluated with the automated analyzed Luminex 200 as determination instrument, and the correlation of the results were analysis with that of electrochemiluminescence. **Results** The chemical character evaluation showed that the within-run and between-run coefficients of variation(CV) were less than 10% and 13%, respectively. The recovery rate was between 89%–113%, and the sensitivity was high. The results demonstrated excellent linearity($r > 0.99$). The assay had no significant interference by haemoglobin (Hb), bilirubin (Bil) and triglyceride (TG) ($P > 0.05$). The correlation between the evaluated kits and electrochemiluminescence was excellent ($r > 0.975$). **Conclusion** The quantitative assay is safe, accurate and easy to operate, and it is worthy to extend in clinical application.

Key words: laboratory techniques and procedures; tumor markers, biological; flow cytometry fluorescence luminescence assay

肿瘤标志物是临床常用的生化检验项目,其常见的检测方法主要有放射免疫法(RIA)、酶联免疫吸附试验(ELISA)、电化学发光法(ECLIA)等,这些方法各有不尽人意的地方。流式荧光技术(液态芯片)近年来发展起来的基于荧光编码微球和流式技术的一种临床应用型高通量发光检测技术^[1],具有通量高、配套试剂多、应用领域广、重复性好、既能检测蛋白质又能检测核酸等优点^[2-5]。本研究选择甲胎蛋白(AFP)、癌胚抗原(CEA)、糖类蛋白 125(CA125)、糖类蛋白 199(CA199)4 个指标,在 Luminex 200 多功能流式点阵仪上评价了流式荧光发光法的精密度、准确度(回收实验)、检出限、线性和抗干扰性,并分析了本法与电化学发光法检测结果的相关性,以探讨本法在肿瘤标志物联合检测方面的实用性。

1 材料和方法

1.1 仪器和试剂 Luminex 200 多功能流式点阵仪(美国 Luminex 公司),多肿瘤标志物联合检测试剂盒(上海透景生命科技有限公司),罗氏 E411 全自动电化学发光分析仪(瑞士罗氏公司),肿瘤标志物物质控品 547,548,549(美国伯乐公司)。

1.2 检测标本 南华大学附属第一医院门诊和病房肿瘤患者血清 40 例。静脉抽血 3 mL,4 000 r/min 离心 8 min,分离血清于 -20 °C 保存。

1.3 评价方法 按照美国临床与实验室标准化协会(CLSI)评价方案,在 Luminex 200 多功能流式点阵仪上评价本法的精密度、准确度(回收实验)、检出限、线性和抗干扰性,并分析本法与电化学发光法检测结果的相关性。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计软件对检测数据进行配对 t 检验和回归分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 精密度实验 我们选择伯乐肿瘤标志物物质控品为检测标本。水平 1、2、3 的批号分别为 547,548,549。批内,选取水平 1、2、3 质控品各一份,各连续测定 20 次,批间:选取水平 1、2、3 质控品各 1 份,各连续测定 20 d,每天测定 1 次。结果显示水平 1、2、3 样本的各项肿瘤标志物批内变异系数(CV)均 $< 10\%$,批间 CV 均 $< 13\%$,见表 1、表 2。

2.2 回收实验 在 90 μ L 正常血清样本,分别加入 10 μ L 试剂盒所带的低、中、高值标准液,3 份样本各重复测定 3 次,计算平均回收率。结果显示各项肿瘤标志物回收率为 89%~113%,见表 3。

2.3 检出限实验 对试剂盒的标准品 1 重复检测 20 次,计算测定结果的平均值(X)与标准差(SD)。各指标灵敏度为 $\pm 2SD$ 所对应的浓度值。AFP、CEA、CA125、CA199 指标的检出

限分别为 0.32 ng/mL、0.12 ng/mL、1.2 U/mL、1.1 U/mL。

2.4 线性 选低值和高值样本各 1 份,低值样本为 1 号,高值样本为 5 号,二者 3:1 混匀为 2 号,等份混匀为 3 号,1:3 混匀为 4 号。5 份样本各重复测定 3 次。结果显示各项肿瘤标志物线性良好,各稀释度的检测结果与期望值之间密切相关($r > 0.99$)。AFP、CEA、CA125、CA199 的 r 值分别为 0.998 4、0.997 1、0.995 1、0.996 7。

表 1 流式荧光发光法精密度实验批内结果

标志物	标本号	平均值 \bar{x}	标准差 d	CV(%)
AFP	水平 1	8.86	0.74	8.35
	水平 2	127.81	7.71	6.03
	水平 3	288.41	24.03	8.33
CEA	水平 1	12.46	1.12	8.98
	水平 2	25.12	1.55	6.17
	水平 3	103.20	4.96	4.81
CA125	水平 1	28.42	2.64	9.29
	水平 2	78.26	6.63	8.47
	水平 3	227.61	16.67	7.32
CA199	水平 1	14.86	1.23	8.28
	水平 2	70.38	3.68	5.23
	水平 3	188.16	18.20	9.67

表 2 流式荧光发光法精密度实验批间结果

标志物	标本号	平均值 \bar{x}	标准差 d	CV(%)
AFP	水平 1	8.75	0.94	10.74
	水平 2	126.62	11.78	9.31
	水平 3	278.32	26.48	9.51
CEA	水平 1	12.85	1.26	9.81
	水平 2	26.23	2.52	9.61
	水平 3	104.25	9.47	9.08
CA125	水平 1	27.46	2.89	10.52
	水平 2	79.63	8.41	10.58
	水平 3	228.98	23.45	10.24
CA199	水平 1	14.49	1.64	11.31
	水平 2	71.58	8.89	12.42
	水平 3	187.56	22.45	11.96

表 3 流式荧光发光法的平均回收率(%)

参数	低值	中值	高值
AFP	108.5	91.4	104.2
CEA	97.5	93.4	102.7
CA125	90.14	110.7	94.6
CA199	89.45	90.47	112.4

2.5 干扰实验 取三酰甘油(TG, 10.0 mmol/L)、高血红蛋白(Hb, 120.0 g/L)和高胆红素(Bil, 200.0 μ mol/L)新鲜样本,与各指标值进行比例稀释后,每份样本测定 2 次。结果显示 TG、Hb、Bil 对测定结果无显著干扰(P 均 > 0.05)。

2.6 方法学对比实验 随机选取临床低、中、高不同范围的血清样本 40 例,每天选择 8 个血清样本,按 1~8 的顺序编号。用流式荧光发光法和电化学发光法两种方法同时进行实验,按照 1,2,3,4,5,6,7,8,8,7,6,5,4,3,2,1 的样本顺序进行测定。以上实验重复 5 d(不连续)。所得数据进行相关性的线性回归分析,结果显示 4 项指标相关性良好($r > 0.975$),见表 4。

表 4 流式荧光发光法和电化学发光法测定结果相关性分析

参数	n	r 值	回归方程
AFP	40	0.9856	$Y = 1.056X + 1.458$
CEA	40	0.9825	$Y = 0.973X + 2.324$
CA125	40	0.9787	$Y = 1.082X + 1.473$
CA199	40	0.9762	$Y = 0.945X + 3.214$

3 讨论

目前临床上检测肿瘤标志物的常见方法有 RIA、ELISA、ECLIA。放射免疫法敏感性较高,但试剂稳定性受多种因素影响,且存在放射线辐射和污染等问题,现已逐步被淘汰了。ELISA 操作简单,所需设备较少,但其灵敏度、精密度较低,跟不上临床的需要。电化学发光法灵敏度高,精密度好,线性范围较宽,但试剂成本昂贵。因此,一种化学性能合格,操作简单、试剂成本较低的检测方法是目前临床上所急需的。

流式荧光技术是 20 世纪 90 年代中期发展起来的以美国 Luminex 公司的 XMAP(flexible multi-analyte profiling)技术为基础的新型生物芯片技术平台。在其多功能流式点阵分析仪上,荧光编码的微球可被微量液体传送系统排成单列,通过 2 束激光,一束判定微球的编码,从而决定被测物质的种类;另一束测定微球上 PE 的荧光强度,由仪器自动转换成数字信号,数字信号的高低即反映被测物质的含量^[6]。流式荧光发光法多肿瘤标志物定量检测试剂盒的基本实验原理是双抗体夹心法^[11]。

本研究中,评价了本法的精密度、准确度(回收实验)、检出限、线性和抗干扰性,并比较本法与电化学发光法检测结果的相关性。由于本法对每种检测指标最少进行 100 个微球的计数,而后取其平均值,相当于对每例样本重复了至少 100 次检测,从而保证了检测结果的精密度和准确性,本研究结果显示批内变异系数(CV) $< 10\%$,批间 CV $< 13\%$,表明本法精密度较高,回收率在 89%~113%之间表明本法准确性较高过去的研究也表明微球系统的敏感性,非细胞性高于传统 ELISA 和放射免疫法^[12]。AFP、CEA、CA125、CA199 指标的检出限分别为 0.32 ng/mL、0.12 ng/mL、1.2 U/mL、1.1 U/mL 表明本法有较好的灵敏度,线性实验结果提示本法线性良好。干扰实验表明,高浓度的三酰甘油、胆红素和血红蛋白对检测结果没有影响。流式荧光法和电化学发光法相关性良好,相关系数均大于 0.975,提示两法测定的结果具有一致性。

流式荧光发光法的另一个优势体现在多肿瘤标志物联合检测方法。由于流式荧光发光法可将许多种不同荧光编码的微球放在同一反应体系内,理论上一次可同时检测 100 种不同的肿瘤标志物。一次检测的标志物越多,单个标志物的成本就越低。另外流式荧光技术平台的操作过程主要为加样、孵育和上机读数,步骤较少,简单易用。本法免疫反应在悬浮的液相中进行,反应所需的时间短(从 2 h 缩短到 20~40 min),反应后常不用清洗,即可直接读数,所以检测效率高。

总之,本法精密度准、准确度较高,线性良好,灵敏度较好,抗干扰能力强,与电化学发光相关性较好,操(下转第 207 页)

各分量的相对贡献,从图中可以得知,吸光度、标准曲线的斜率和截距是影响血清总胆红素测量不确定度的主要分量。

2.2.4 合成标准不确定度 血清总胆红素的合成标准不确定度如下合成:

$$u_c(\bar{c}) = \sqrt{u_{cb}^2(\bar{c}) + u^2(\text{rep})}$$

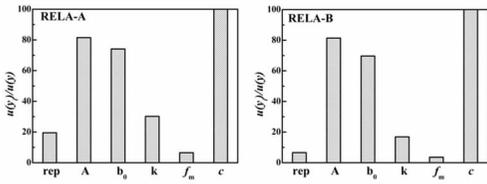


图 2 样本中各分量的相对贡献

3 讨论

本研究建立血清总胆红素参考方法,以实现常规检测系统的溯源性。对建立的参考方法的线性、精密度和准确度进行评估,通过参加国际间质量评价(IFCC-RELA)进行能力验证,以 IFCC-RELA 对该项目的等效限作为合格指标。本研究测定 2011 年和 2012 年 RELA 样本结果均在等效限内,表明该方法符合参考方法的要求。

本研究依据 GUM^[11] 文件对建立的 TBIL 参考方法进行不确定度评估,通过建立不确定度评估模型,探讨不确定度各分量对测量结果不确定度的相对贡献。通过 RELA-A 和 RELA-B 样本各分量的相对贡献分析可知,吸光度、标准曲线的斜率和截距是影响血清总胆红素测量不确定度的主要分量。因此,对标准溶液的配制和测定应严加控制,确保测量结果具有较小的不确定度。这也是建立血清总胆红素参考方法的难点^[12]。

综上所述,本实验室依据 JCTLM 推荐方法建立的血清总胆红素参考方法,方法性能符合要求,测定结果通过 RELA 参考实验室能力评估,同时建立了血清总胆红素测量结果不确定度评估模型,可应用于血清总胆红素项目的量值溯源和标准化,为血清总胆红素常规检测系统向参考方法/参考物质溯源

提供有效途径。

参考文献

- [1] Bhutani VK, Johnson LH. Urgent clinical need for accurate and precise bilirubin measurements in the United States to prevent kernicterus[J]. Clin Chem, 2004, 50(4): 477-480.
- [2] Bian WW, Zhang N, Wang L. Spectrofluorometric determination of total bilirubin in human serum samples using tetracycline-Eu3+[J]. Anal Sci, 2010, 26(6): 785-789.
- [3] Perry BW, Doumas BT, Bayse DD, et al. A candidate reference method for determination of total bilirubin in serum: test for transferability[J]. Clin Chem, 2008, 60(2): 297-301.
- [4] Doumas BT, Kwok-Cheung PP, Perry BW, et al. Candidate reference method for determination of total bilirubin in serum: development and validation[J]. Clin Chem, 2008, 25(16): 1779-1789.
- [5] Watson D. Analytic methods for bilirubin in blood plasma[J]. Clin Chem, 2006, 7(5): 603-625.
- [6] Bhutani VK, Johnson LH. Urgent clinical need for accurate and precise bilirubin measurements in the united states to prevent kernicterus[J]. Clin Chem, 2004, 50(4): 477-480.
- [7] White GH. Metrological traceability in clinical biochemistry[J]. Ann Clin Biochem, 2011, 48(2): 393-409.
- [8] 徐建华, 庄俊华, 郑松柏, 等. 常规方法检测血清总胆红素的正确度评价[J]. 临床检验杂志, 2012, 30(8): 946-949.
- [9] 邵燕, 孙慧颖, 胡滨, 等. 血清总胆红素常规系统测量结果的正确度评价[J]. 标记免疫分析与临床, 2013, 20(2): 266-268.
- [10] Kessler A, Siekman N, Weykamp C, et al. External Quality Assessment Scheme for reference laboratories-review of 8 years' experience[J]. Clin Chem Lab Med, 2013, 51(8): 977-1005.
- [11] Eurochem/CITAC Guidelines. Quantifying uncertainty in analytical measurement[M]. 2nd ed. Eurochem, 2000.
- [12] 邵燕, 胡滨, 孙慧颖, 等. Doumas 血清总胆红素参考方法标准曲线的复现[J]. 临床检验杂志, 2013, 31(2): 139-141.

(收稿日期: 2013-09-07)

(上接第 204 页)

作简单, 适宜于临床检测推广。

参考文献

- [1] Seideman J, Peritt D. A novel monoclonal antibody screening method using the Luminex-100 microsphere system[J]. J Immunol Methods, 2002, 267(2): 165-171.
- [2] Dunbar SA. Applications of LuminexR xMAP technology for rapid, high-throughput multiplexed nucleic acid detection[J]. Clin Chim Acta, 2006, 363(1/2): 71-82.
- [3] Croft H, Malinowski T, Krizbai L, et al. Use of Luminex xMAP-derived Bio-Plex bead-based suspension array for specific detection of PPV W and characterization of epitopes on the coat protein of the virus[J]. J Virol Methods, 2008, 153(2): 203-213.
- [4] Giavedoni LD. Simultaneous detection of multiple cytokines and chemokines from nonhuman primates using Luminex technology [J]. J Immunol Methods, 2005, 301(1/2): 89-101.
- [5] 姚见儿. Luminex 高通量检测技术的应用和挑战[J]. 临床检验杂志, 2010, 28(4): 250-251.
- [6] 张保强, 张晓. Luminex 液态芯片在临床及科研中的应用[J]. 当代医学, 2012, 18(1): 18-20.

- [7] National Committee for Clinical Laboratory Standards. Preliminary evaluation of quantitative clinical laboratory methods [S]. EP10-A2, NCCLS, 2002.
- [8] National Committee for Clinical Laboratory Standards. Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures: a statistical approach[S]. EP6-A2, NCCLS, 2003.
- [9] National Committee for Clinical Laboratory Standards. Interference testing in clinical chemistry; proposed guide line[S]. EP7-P, NCCLS, 1986.
- [10] National Committee for Clinical Laboratory Standards. Method comparison and bias estimation using patient samples[S]. EP9-A, NCCLS, 1995.
- [11] Vrzalova J, Prazakova M, Novotny Z, et al. Test of ovarian cancer multiplex xMAP technology panel[J]. Anticancer Res, 2009, 29(2): 573-576.
- [12] Desai N, Wu H, George K, et al. Simultaneous measurement of multiple radiation-induced protein expression profiles using the Luminex(TM) system[J]. Adv Space Res, 2004, 34(6): 1362-1367.

(收稿日期: 2013-09-12)