

• 论 著 •

IMMUNITE1000 化学发光分析系统检测白细胞介素-6 的性能验证

孙 飞, 崔天盆, 赵 岚, 陈家逸, 王艳艳
(武汉市第一医院检验科, 湖北武汉 430033)

摘 要:目的 验证 IMMUNITE1000 化学发光仪分析系统定量检测白细胞介素-6(IL-6)的性能。方法 按国际标准化组织(ISO)15189 实验室认可的要求,收集血清标本进行 IL-6 检测,验证 IMMUNITE1000 化学发光仪分析系统定量检测 IL-6 的精密度、准确度、线性范围、临床可报告范围及正常参考区间,评估其检验效能。结果 高值与低值标本的日间变异系数(CV)分别为 6.42%、1.97%,批内 CV 分别为 3.40%、3.82%;标准品检测值相对偏倚(*bias*%)为 0.91%;回归方程: $Y=0.986X-7.1(r^2=0.999, P<0.05)$;稀释至 27 倍,回收率在 97%~100%之间,临床可报告范围为 2~27 000 pg/mL;95%参考区间为 0~5.3 pg/mL。结论 该系统检测性能符合厂家声明,满足临床实验室质量要求。

关键词:白细胞介素-6; 化学发光; 性能验证

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.13.024

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)13-1858-03

Method performance verification of the detection of interleukin-6 by using IMMUNITE1000 chemiluminescence detection system

Sun Fei, Cui Tianpen, Zhao Lan, Chen Jiayi, Wang Yanyan

(Department of Clinical Laboratory, Wuhan No.1 Hospital, Wuhan, Hubei 430033, China)

Abstract: **Objective** To verify the performance of quantitative detection of interleukin-6 by using IMMUNITE1000 chemiluminescence analyzer. **Methods** According to the requirements of International Organization for Standardization(ISO)15189, serum specimen were collected and levels of IL-6 were detected. The precision, accuracy, analytical measurement range, reportable range and normal reference range of quantitative detection of interleukin-6 by using IMMUNITE1000 chemiluminescence analyzer were verified, and its performance was evaluated. **Results** The coefficient variation(CV) of between-day precision of high and low value was 6.42% and 1.97% respectively, and that of within-run precision was 3.40% and 3.82% respectively. Compared the test results with the target values, the *bias*% was 0.91%. The regression equation: $Y=0.986X-7.1(r^2=0.999, P<0.05)$. With 27 times diluted, the recovery rate was from 97% to 100%, and the clinical reportable range was 2 to 27 000 pg/mL. The 95% reference interval ranged from 0 to 5.3 pg/mL. **Conclusion** The performance of this system meets the manufacturer's declaration, and could satisfy the quality requirements of clinical laboratory.

Key words: interleukin-6; chemiluminescence; performance verification

国际标准化组织(ISO)15189:2012 对技术要求的检验过程分别单独列出了对检验程序的确认和验证及测量不确定度的要求,并将其改为强制要求,以期临床实验室正确利用,合理评价检验方法^[1]。依据第 5.5 条款^[2]的相关要求,实验室应对方法学进行评价和验证,以检查其分析性能和对预期用途的适用性。为了解本检验科所应用白细胞介素-6(IL-6)检测系统的分析性能,验证厂家对分析系统的声明,确保实验室开展的检验项目、检测结果准确可靠并满足临床需求,本研究对 IL-6 检测系统进行性能验证。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 德国西门子 IMMUNITE1000 化学发光免疫分析仪。IL-6 检测配套试剂(LK6P1;0234),包括 IL-6 检测杯(L6P1034,每个检测杯含有一个包被珠,包被有单克隆鼠抗人 IL-6 抗体)、液相试剂楔(L6PA1034、L6PB1034)、IL-6 校准品(L6PH0115;浓度为 561 pg/mL, L6PL0115;浓度为 0 pg/mL),均为德国西门子原装配套。试剂盒标明:不同浓度标本连续检测 20 d 批内变异系数(CV)为 3.5%~6.2%,分析灵敏度为 2 pg/mL,检测范围最高可达 1 000 pg/mL,参考区间为 0~5.9 pg/mL。

1.2 评价方案及试验方法

1.2.1 精密度评价试验 按照仪器的作业指导书对仪器进行系统维护保养,由收集的临床高值标本和正常血清配制高浓度、低浓度 2 种混合血清作为精密度评价样品,与临床标本一起按照检测程序进行测定,收集检测结果。参照美国临床实验室标准化协会(CLSI)EP15 文件^[3]分别计算批内、日间精密度,计算均值、标准差(SD)和 CV%进行评价。

1.2.2 准确度评价试验 先用校准品校准检测系统,再对同一批号试剂盒自带的 IL-6 校准品进行连续检测 10 次,对各自检测结果与靶值进行对比,计算检测值与靶值的相对偏倚(*bias*%),计算公式: $bias\%=(测定值-靶值)/靶值\times 100\%$ 。

1.2.3 分析测量线性范围(AMR)评价试验 按照美国临床实验室标准化委员会(NCCLS)EP6-A2 文件^[4]和国内参考文献^[5],选择低浓度(L)和高浓度(H)患者标本各 1 份,浓度覆盖仪器给定的线性范围,H 和 L 按 5L、4L+H、3L+2H、2L+3H、L+4H、5H 的关系配制 6 个浓度系列血清,将实测值与预期值作比较,计算回归方程 $Y=bX+a$ (*a* 为截距、*b* 为斜率),确定检测项目的 AMR。

1.2.4 临床可报告范围(CRR) 将 1 份分析测定范围内的高值血清使用生理盐水按照 3、9、27、81 倍进行系列等比稀释(记作稀释血清标本 1~5 号),使稀释后的各个点尽可能覆盖各自

项目的 AMR,分别测定 3 次,计算均值,然后计算测定值与预期值的比值(R)。R 在 80%~120%之间为可以接受^[6]。

1.2.5 参考区间的验证 经体检排除血压异常、肝胆疾病、溶血性疾病、心血管疾病和各种原因所致疾病,选取血液检验正常的人群,收集其 IL-6 检验结果,统计 0~95%分布范围,与厂家给定的生物参考区间进行对比。

1.3 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件进行线性相关分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 精密度评价结果 连续检测 20 d 高、低值标本,日间精密度检测结果显示:低值为 3.51 pg/mL,CV%=1.97%;高值为 17.1 pg/mL,CV%=6.42%。同一批次连续 20 次检测高、低值标本,批内精密度检测结果显示:低值为 3.38 pg/mL,CV%=3.82%;高值为 19.9 pg/mL,CV%=3.40%。

2.2 准确度评价结果 靶值水平为 561 pg/mL,测量数据均值为 566.1 pg/mL,SD=10.39 pg/mL,CV%=1.84%,测量值与靶值偏倚为 5.1 pg/mL,bias%=0.91%。

2.3 分析测量范围评价结果 选用的低限血清浓度为 2.34 pg/mL,高限血清浓度为 921 pg/mL,按比例混合后检测结果均值见表 1。回归曲线方程斜率 $b=0.986$ 、截距 $a=-7.1$,回归方程: $Y=0.986X-7.1(r^2=0.999,P<0.05)$ 。回归曲线见图 1。

表 1 混合血清检测结果		
混合血清	计算值(pg/mL)	检测均值(pg/mL)
5L	2.34	2.44
4L+1H	186.00	189.00
3L+2H	369.00	398.00
2L+3H	553.00	577.00
L+4H	737.00	753.00
5H	921.00	931.00

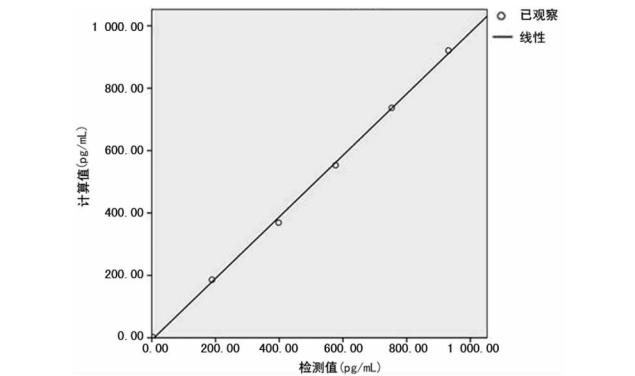


图 1 化学发光免疫法检测 IL-6 的回归曲线

2.4 临床可报告范围结果 混合血清的基础浓度水平为 117.00 pg/mL,等比稀释后计算回收率在 97%~100%之间,见表 2。临床可报告范围为 2~27 000 pg/mL。

2.5 生物参考区间的验证结果 对 104 份体检健康标本进行检测,其中小于 2 pg/mL 的低值标本 65 份,占 62.5%;2~<4 pg/mL 的标本 26 份,占 25.0%;4~<6 pg/mL 的标本 7 份,占 6.7%;≥6 pg/mL 的标本 6 份,占 5.8%,其中 1 份标本检测水平为 8.24 pg/mL,为最高值。检测结果分布范围基本呈偏峰分布。95%的标本检测水平在 0~5.3 pg/mL,即为 95%

参考区间;90%参考区间为 0~4.4 pg/mL。

表 2 不同稀释度检测水平			
稀释血清标本	期望值(pg/mL)	检测水平(pg/mL)	回收率(%)
1 号	117.00	116.00	99.1
2 号	39.00	38.50	98.7
3 号	13.00	13.00	100.0
4 号	4.33	4.23	97.6
5 号	1.44	<2.00	—

—:无数据。

3 讨 论

IL-6 是体内主要由单核-巨噬细胞、血管内皮细胞、T 淋巴细胞、成纤维细胞和心肌细胞等多种细胞产生的一种具有多种生物活性的前炎性分子,是由 212 个氨基酸组成的具有多种生物学功能的糖蛋白。作为机体复杂的细胞因子网络中的成员之一,它参与机体的各种病理生理过程,可以促进肝脏合成急性期蛋白,激活 T 淋巴细胞,并诱导 B 淋巴细胞的终末期分化,使之成为具有分泌免疫球蛋白功能的免疫活性细胞^[7]。在败血症、自身免疫性疾病、淋巴瘤、获得性免疫缺陷综合征、酒精性肝病、感染等疾病及移植排斥过程中 IL-6 在血清或血浆中浓度均可升高。因此 IL-6 的定量检测结果对于临床辅助诊断和基础研究都有重要意义,因而验证和评价其方法学性能指标非常有必要。

检验科通过精密度和准确度验证试验,了解检测系统的总误差(TE)。TE 是评估检验科检验质量切实可行的指标之一。它的大小由检测系统的精密度和准确度决定,分别通过不精密度和不准确度表示,且分别反映随机误差和系统误差^[8]。本次精密度验证试验选择高低 2 个不同浓度的样品,低值标本平均浓度为 3.51 pg/mL,在生物参考区间正常范围内;高值标本平均浓度为 17.1 pg/mL,约为正常高值的 3 倍,具有较好的临床代表性。其检测结果 CV%与厂家给出的基本相符,低浓度检测结果 CV%和批内 CV%均低于厂家给出的 CV%,表明检测系统在同日内,检测生物参考区间附近的低浓度标本稳定可靠,不同日间检测结果变化稍大可能与检测环境有一定的关系。准确度验证试验结果 bias%为 0.91%,约为 CV%的一半,满足相关要求,其结果可以接受。但选择仪器定值校准品进行评估,检测结果有一定的局限性,且检测值较大,不具代表性,有条件可以购买稳定性较好的定值标准品或质控品进行试验。

对分析测量范围线性进行验证所选择的 2 个标本最好接近仪器高、低限值,此次选择低值为 2.34 pg/mL、高值为 921 pg/mL。2 个样品各进行 3 次测定,以均值表示 2 个标本测定结果。依照比例配制系列评价样品浓度,并计算各试验样品内含分析物的预期值。将每个系列评价样品检测 3 次取平均值为相应评价样品的检测值;以预期值对检测值作图,所有试验点在坐标图上呈直线趋势,回归方程中 b 为 0.986,在 0.95~1.05 pg/mL 范围内; a 为 -7.1,与 0 比较接近,可直接判断该测定方法分析测量范围在低、高限值浓度之间,即厂家给出的分析测量范围可信。

对于检测值极高的标本,如检测结果大于上限(1 000 pg/mL),临床或基础试验需要了解确切的检测值或需要连续监测 IL-6 变化情况,就要进行稀释检测。本次试验选择接近分析测量上限附近的患者标本,倍比稀释 27 倍后回收率仍然在可接受范围内,表明分析系统的临床可报告范围至少包括 2~

27 000 pg/mL,比厂家给出的范围要大,且能够满足本科室需求。

参考区间是参考值分布的中间 95% 区间^[2]。IL-6 检测只有参考区间上限具有临床意义,故参考区间为 0 至参考上限^[1]。不同分析系统、不同地区、不同人群的生物参考区间有差异,故理想情况下每个新的测试项目开展前或其分析方法学改变甚至患者人群改变时,都需要进行生物参考区间的测定,甚至要给出不同人群如不同性别人群、不同年龄层人群等的不同参考区间^[9]。由于参考区间检测成本较高,检验科实验室往往选用国家统计局发布、厂家检测给定或者本地区高等级医疗机构应用过的参考区间,选用时仍需要进行适当的验证,其中选择恰当的参考个体是参考区间验证试验的关键。检验科可选择无系统疾病,健康的男、女参考标本 20 份进行参考区间验证,有性别、年龄差异的,需分组验证。统计各参考个体检测值,与引用的参考区间比较,计算比率(r =检测值在引用参考区间的参考个体数/总的参考个体数)。 $r<90\%$,分析查找原因后重新进行参考区间验证试验或需进行参考区间的确立试验; $r\geq 90\%$,不能说明该参考区间不符合本科室应用,故验证结果可以接受,可以引用该参考区间。本次验证选择 104 份标本,95% 的标本检测数据在 0~5.3 pg/mL 范围内,而厂家给出的参考区间为 0~5.9 pg/mL,符合厂家声明,验证通过。

综上所述,由验证结果可以认为西门子 IMMULITE1000 化学发光分析仪检测 IL-6 的方法学性能良好,能够为临床提供准确可靠的检验结果,也可以适应科研试验的需求。

参考文献

[1] 康凤凤,王治国. ISO 15189:2012 与临床检验定量检测方法确认

和性能验证[J]. 临床检验杂志,2013,31(12):881-884.

[2] International Organization for Standardization. ISO15189 Medical laboratories: requirements for quality and competence[S]. Geneva,Switze,ISO,2012.

[3] Clinical and Laboratory Standards Institute. EP15-A2 User verification of performance for precision and trueness; approved guideline[S]. 2nd ed. Wayne,PA,CLSI,2005.

[4] National Committee for Clinical Laboratory Standards. EP6-A Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures: a statistical approach' approved guideline[S]. Wayne, PA, NCCLS,2003.

[5] 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.

[6] 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.

[7] 余霄龙,闫胜利,纂玉琴,等. 碘化钠对人甲状腺上皮细胞分泌细胞因子 IL-6 和 IL-8 的影响[J]. 免疫学杂志,2004,20(2):124-127.

[8] 毕波,吕元. 定量检测系统的方法学性能验证实验结果的评价[J]. 中华检验医学杂志,2007,30(12):1332-1333.

[9] National Committee for Clinical Laboratory Standards. C28-A How to define and determine reference intervals in the clinic all-laboratory; approved guideline[S]. Wayne,PA,NCCLS,2000.

(收稿日期:2015-05-12)

(上接第 1857 页)

合检测的灵敏度达 96.48%;如 3 种抗体全部阳性判断为阳性,则三者联合检测的特异度高达 98.98%,高特异度表明三者联合检测对 NPC 的诊断具有重要临床价值。在 NPC 患者中 Rta-IgG、EBNA1-IgA、VCA-IgA 抗体出现全阳性的构成比为 56.25%,而 688 例健康人中无一例检出三者全阳性,表明 3 种抗体全阳性预示着患 NPC 的风险极高,3 种抗体全阴性预示着患 NPC 的风险极低,而单一抗体阳性预示的风险度相对较低。

Rta 蛋白是 EB 病毒由潜伏期到裂解期,即早期 BRLF1 基因编码的产物,是 EB 病毒由潜伏期转向裂解期的关键性调控因子,引发 EB 病毒裂解感染。EB 病毒抗体主要分为 IgA 和 IgG 两类,通常 IgA 类抗体对检测样品的特异度较 IgG 类抗体高,但灵敏度偏低。将 Rta 蛋白的 IgA 和 IgG 抗体检测性能进行比较,结果显示 Rta-IgG 检测灵敏度较高。有研究报道,IgG 更适合作为检测抗体进行筛查,Rta 蛋白抗体 IgG 成为一个较新的 NPC 早期诊断的分子靶标^[7]。本研究显示,NPC 组 Rta-IgG 的相对吸光度值(3.132 ± 2.488)明显高于对照组,Rta-IgG 的检测灵敏度、特异度较高,与 VCA-IgA、EBNA1-IgA 相似。

本研究发现 NPC 组中有 10 例患者三项抗体为全阴性,其中 6 例病理诊断为鼻咽腺癌。钟碧玲等^[8]研究提示,鼻咽腺癌与 EB 病毒感染的关系并不明显。笔者在血清研究中认同该观点,但因为病例数少,还需要更大样本量的研究进一步明确。

综上所述,VCA-IgA、Rta-IgG、EBNA1-IgA 三者联合检测可以明显提高特异度及阳性率,从血清学方法上更好地避免误

诊和漏诊,对中山地区 NPC 的早期诊断具有重要的临床意义。然而,需要指出的是 EB 病毒抗体阳性仅能说明感染过 EB 病毒,而 EB 病毒感染不一定发展为 NPC。EB 病毒的上述 3 种抗体联合检测,可对尚未获得病理确诊但疑似 NPC 者,做进一步协助诊断。

参考文献

[1] 陈天游,范行良. EB 病毒诊断学意义及其方法学进展[J]. 微生物学免疫学进展,2009,37(3):50-53.

[2] 蔡永林,李军,陆爱英,等. 血清 EB 病毒抗体水平与鼻咽癌患者预后的关系[J]. 中华实验与临床病毒学杂志,2013,27(2):119-122.

[3] 曹复得. 球后注射氟丙嗪治疗绝对期青光眼[J]. 中国耳鼻咽喉科杂志,2002,2(6):381.

[4] 王朱健,曹文俊,陈浮,等. 上海地区鼻咽癌患者血清 EB 病毒抗体检测结果分析[J]. 中国耳鼻咽喉科杂志,2012,12(1):44-46.

[5] Quiroz-Mercado H, Alvarez-Celorio D, Martinez-Jardon S, et al. Pars plana vitrectomy and lamina cribrosa puncture in absolute glaucoma[J]. Ophthalmic Surg Lasers Imaging,2004,35(3):244-246.

[6] 阳茂春,陆爱英,李山,等. 免疫酶法与 ELISA 法检测 EB 病毒 VCA-IgA 的比较[J]. 标记免疫分析与临床,2009,16(2):93-95.

[7] 祝元雪,李晓江. EB 病毒 Rta 蛋白在鼻咽癌早期诊断中的研究进展[J]. 现代肿瘤医学,2013,21(12):2844-2846.

[8] 钟碧玲,李华仁,张锦波,等. 鼻咽癌组织学类型与 EB 病毒感染的关系[J]. 中国肿瘤,2005,14(6):389-391.

(收稿日期:2015-03-08)