

国产 Auto TRFIA-4 型自动荧光免疫分析仪与试剂盒检测妊娠相关血浆蛋白 A 的性能评价与参考区间的建立

谭玉华¹, 曹春玲², 邢晓敏¹, 周晓珊¹, 谢敬玲¹, 冯健明¹

(1. 广州市丰华生物工程有限公司体外诊断试剂研发中心, 广州 510730;

2. 广东省医疗器械质量监督检验所中山检验室, 广东中山 528400)

摘要: 目的 评价国产 Auto TRFIA-4 型自动荧光免疫分析仪与试剂盒检测妊娠相关血浆蛋白 A (PAPP-A) 的性能, 并建立参考区间。方法 国产 Auto TRFIA-4 型自动荧光免疫分析仪与试剂盒组成待评价系统。依据 PAPP-A 检测试剂盒医药行业标准, 对待评价系统检测 PAPP-A 的检测限、线性和精密度的评价; 并采用方法学比对试验检测了 66 例孕早期不同孕周的孕母血清样本, 进行准确度评价。参考 C28-A2 文件, 待评价系统检测了 2 524 例孕早期不同孕周的孕母血清样本, 进行 PAPP-A 参考区间的建立。结果 待评价系统检测 PAPP-A 的空白限为 0.50 mIU/L, 检测限优于 25.00 mIU/L, 线性在 9.00 ~ 2 530.00 mIU/L 内的相关系数 (r) 达 0.999 8, 批内变异系数 (CV) 小于 3%, 批间 CV 小于 4%。待评价系统与对比系统检测血清样本结果的线性回归方程为 $Y=0.9373X+271.15$, $r=0.9966$ ($t_r=96.68$, $P < 0.05$), 且两系统检测的 PAPP-A 浓度结果差异无统计学意义 ($t=1.10$, $P > 0.05$)。在 $9 \sim 9^{+6}$, $10 \sim 10^{+6}$, $11 \sim 11^{+6}$, $12 \sim 12^{+6}$ 和 $13 \sim 13^{+6}$ 孕周的 PAPP-A 中位数分别为 977, 1 550, 2 536, 3 683 和 5 393 mIU/L。结论 待评价系统检测 PAPP-A 满足 PAPP-A 检测试剂盒医药行业标准的要求, 建立的 PAPP-A 参考区间以供临床参考。

关键词: 妊娠相关血浆蛋白 A; 时间分辨荧光免疫分析法; 性能评价; 参考区间

中图分类号: R446 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-7414 (2020) 04-075-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2020.04.018

Performance Evaluation of Domestic Auto TRFIA-4 Model Automatic Fluorescence Immunoassay and Kit for Detection of Pregnancy Associated Plasma Protein A and Establishment of Reference Interval

TAN Yu-hua¹, CAO Chun-ling², XING Xiao-min¹, ZHOU Xiao-shan¹, XIE Jing-ling¹, FENG Jian-ming¹

(1. R & D Center of IVD, Guangzhou Fenghua Bioengineering Co. Ltd., Guangzhou 510730, China;

2. Zhongshan Test Department, Guangdong Medical Device Quality Supervision and Test Institute, Guangdong Zhongshan 528400, China)

Abstract: Objective To evaluate the performance of a domestic Auto TRFIA-4 model automatic fluorescence immunoassay analyzer and kit for detecting pregnancy associated plasma protein A(PAPP-A) and establish its reference interval. **Methods** The evaluation system was consisted of the domestic Auto TRFIA-4 model automatic fluorescence immunoassay analyzer and kit. The detection limit, linearity and precision of the evaluation system for detecting PAPP-A were evaluated, which accorded to the pharmaceutical industry standard of PAPP-A detection reagent kit. The accuracy was evaluated by testing 66 cases of maternal serum samples from different gestational weeks in the first trimester, which based on methodological comparison test method. The reference interval of the evaluation system was established by detecting 2 524 pregnant women's serum samples from different gestational weeks in the first trimester, which referenced to C28-A2 file. **Results** The blank limit of the evaluation system for detecting PAPP-A was 0.50 mIU/L, the detection limit was better than 25.00 mIU/L, the correlation coefficient (r) was reached 0.999 8 within the linear range of 9.00 to 2 530.00 mIU/L, the coefficient of variation (CV) of inter-assay was less than 3%, and the CV of intra-assay was less than 4%. The linear regression equation of the clinical serum sample results of the evaluation system and the comparison system was $Y=0.9373X+271.15$, $r=0.9966$ ($t_r=96.68$, $P < 0.05$). There was no significant difference in PAPP-A concentration between the two systems ($t=1.10$, $P > 0.05$). The PAPP-A median was 977, 1 550, 2 536, 3 683 and 5 393 mIU/L at $9 \sim 9^{+6}$, $10 \sim 10^{+6}$, $11 \sim 11^{+6}$, $12 \sim 12^{+6}$ and $13 \sim 13^{+6}$ gestational week, respectively. **Conclusion** The performance of the evaluation system for detecting PAPP-A met the requirements of the pharmaceutical industry standard of PAPP-A detection reagent kit, and the PAPP-A reference interval was

作者简介: 谭玉华 (1980-), 男, 医学硕士, 二级企业培训师, 医疗器械工程师, 临床医学检验技师, 主要从事医疗器械 (体外诊断试剂) 的研发、应用、质量管理和医学检验工作, E-mail: tanywhy@aliyun.com。

established for clinical reference.

Keywords: pregnancy-associated plasma protein A; time-resolved fluorescent immunoassay; performance evaluation; reference interval

妊娠相关血浆蛋白 A (pregnancy associated plasma protein A, PAPP-A) 是由胎盘合体滋养细胞分泌的大分子糖蛋白, 其功能可调节母体免疫系统, 保护胎儿免遭排斥。孕早期的 PAPP-A 对罹患 21-三体综合征胎儿的识别能力是迄今为止最敏感的孕早期筛查的首选血清标志物。目前, PAPP-A 检测标准化还面临许多问题, 不同实验间的检测结果差异明显^[1]。近年我国实施了 PAPP-A 检测试剂盒医药行业标准 (简称 PAPP-A 行业标准)^[2], 规范了我国 PAPP-A 产品质量, 且《医学实验室质量和能力认可准则》要求检验程序在常规应用前, 实验室需对检验程序性能进行独立验证, 确定检验程序的性能特征足以保证其能够达到临床检测所要求^[3]。由于产前筛查血清标志物要求灵敏度高、线性范围宽, 并且将中位数及中位数倍数 (multiple of median, MOM) 应用于血清学产前筛查是一个非常重要的手段, 但仪器所配软件内置初始中位数往往与实际筛查数据并不匹配。时间分辨荧光免疫分析法 (time resolved fluoroimmunoassay, TRFIA) 作为具有灵敏度高、特异性强和线性范围宽等特点的第三代标记免疫技术之一, 在国内也已经实现了 TRFIA 的自动化。因此, 笔者对国产 Auto TRFIA-4 型自动荧光免疫分析仪与试剂盒检测 PAPP-A 进行了性能评价和建立了参考区间, 现报道如下。

1 材料与方法

1.1 研究对象 收集了 2 519 例孕早期不同孕周的临床检测过的孕母血清剩余样本, 用于参考区间的建立, 其中孕 9~9⁺⁶ 周 314 例, 孕 10~10⁺⁶ 周 372 例, 孕 11~11⁺⁶ 周 405 例, 孕 12~12⁺⁶ 周 766 例, 孕 13~13⁺⁶ 周 662 例。并收集了 66 例孕早期不同孕周的临床检测过的孕母血清剩余样本用于方法学比对试验。

1.2 仪器与试剂 广州市丰华生物工程有限公司生产的 PAPP-A 测定试剂盒 (时间分辨荧光免疫分析法) 和 Auto TRFIA-4 型自动荧光免疫分析仪组成待评价系统。芬兰 Wallac Oy 公司生产的 PAPP-A 测定试剂盒 (时间分辨荧光法) 和 Auto DELFIA[®] 1235 型全自动时间分辨荧光免疫分析系统组成的对比系统。低值、中值和高值质量控制品由广州市丰华生物工程有限公司提供。

1.3 方法

1.3.1 检出限评价: 待评价系统重复测定零浓度校准品 (校准品 A) 20 次, 计算出反应量 (荧光信号值) 的平均值 (average, \bar{x}) 和标准差 (standard deviation,

s), 将 $\bar{x}+2s$ 的反应量采用同步检测校准品得到的剂量-反应曲线拟合, 计算出相应浓度值为空白限。根据 PAPP-A 行业标准^[2] 要求的检出限应不高于 25 mIU/L, 参考 PAPP-A 行业标准试验方法, 对 5 份近似 25 mIU/L 的低值样本 (理论浓度为 22.51, 22.70, 23.18, 23.73, 24.37 mIU/L) 进行检测, 每份样本检测 5 次, 对所有检测结果按照大小进行排序, 低于空白限数值的检测结果的数量应 ≤ 3 个。

1.3.2 线性评价: 将高值样本准确稀释成理论浓度为 9.00, 24.00, 40.00, 200.00, 1 000.00 和 2 530.00 mIU/L 的 6 个梯度。参考 PAPP-A 行业标准试验方法^[2], 待评价系统对每一浓度的样本重复测定 2 次, 计算其 \bar{X} 作为实测浓度, 将实测浓度与理论浓度用最小二乘法进行直线拟合, 应至少在覆盖 25.00 ~ 2 500.00 mIU/L 线性范围内, 线性相关系数 (related coefficient, r) ≥ 0.990 。

1.3.3 精密度评价: 参考 PAPP-A 行业标准试验方法^[2], 待评价系统采用同一批号国产试剂盒, 在一次实验中分别平行测定高、中、低三种不同浓度的质量控制品各 10 次, 计算测定结果的 \bar{x} 与 s , 其批内变异系数 (coefficient of variation, CV) 应不超过 10.0%。待评价系统采用三批国产试剂盒分别测定同一批次低、中、高值质量控制品, 每批试剂盒各测 10 孔, 计算 30 次测定结果的 \bar{x} 与 s , 3 个批号国产试剂盒的批间 CV 应不超过 15.0%。

1.3.4 准确度评价: 参考 PAPP-A 行业标准中的方法学比对试验^[2], 待评价系统和对比系统平行检测 66 例不同浓度的孕妇血清样本, 每个样本测定 1 次 (样本均先按试剂盒说明书稀释 5 倍后检测, 得到的结果乘以 5 后为样本的原始浓度), 采用线性回归方法对两组结果进行线性拟合, PAPP-A 行业标准要求两组结果的 r 应不小于 0.950, 斜率应在 0.9~1.1 内。并利用回归方程进行偏差估计, 以预期偏差满足国家卫生健康委员会临床检验中心室间质量评价标准 (PAPP-A 靶值 $\pm 30\%$) 为接受标准。

1.3.5 参考区间建立: 参考 C28-A2 要求^[4], 待评价系统检测孕期在 9~13⁺⁶ 周的 2 519 例孕母血清样本, 建立 PAPP-A 的参考区间。

1.4 统计学分析 采用 Excel 2007 软件进行统计处理。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示; 线性回归采用最小二乘法进行分析, 并对 r 采用 t 检验, $t_r > t_{0.05(v)}$, $P < 0.05$, 认为 2 个变量间具有相关性, r 的绝对值大于 0.7, 则表示 2 个变量高度相关; r 的绝对值大

于0.4, ≤ 0.7 时,则表示2个变量中度相关; r 的绝对值大于0.2, ≤ 0.4 时,则表示2个变量低度相关;2组配对样本定量结果的差异采用 t 检验, $t < t_{0.05(v)}$, $P > 0.05$,表明差异无统计学意义。不同孕周PAPP-A的参考区间计算,采用第5和95的百分位数表示,并计算其中位数。

2 结果

2.1 检出限 见表1。待评价系统重复测定零浓度校准品20次的反应量的 \bar{x} 为943.15, s 为15.78, $\bar{x}+2s$ 为974.71,采用同步检测校准品得到的剂量-反应曲线拟合,得到相应浓度值为0.50 mIU/L,即为空白限。5份近似25 mIU/L的低值样本检测结果均未低于空白限。

表1 待评价系统检测 PAPP-A 低值样本的结果

测定次数 (n)	理论浓度 (mIU/L)				
	22.51	22.70	23.18	23.73	24.37
1	21.81	21.91	23.11	22.81	24.51
2	21.91	22.11	23.21	22.91	24.51
3	21.91	22.81	23.41	23.51	24.61
4	22.61	23.01	23.41	23.81	24.71
5	22.81	23.01	23.51	24.21	24.71
\bar{x} (mIU/L)	22.21	22.57	23.33	23.45	24.63

表2 待评价系统的精密度评价结果

质量控制品	批内			批间		
	\bar{x} (mIU/L)	s (mIU/L)	CV (%)	\bar{x} (mIU/L)	s (mIU/L)	CV (%)
低值	257.95	7.37	2.86	261.84	7.92	3.02
中值	985.65	23.06	2.34	994.79	29.63	2.98
高值	4 055.79	113.59	2.80	3 987.52	138.92	3.48

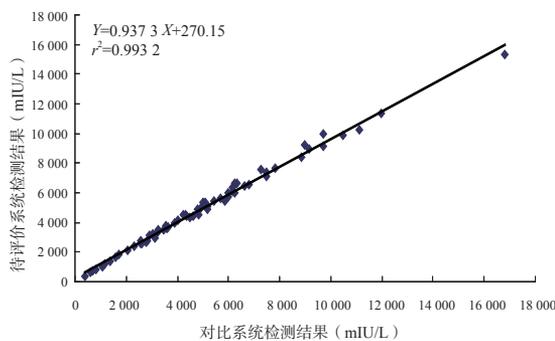


图2 待评价系统和对比系统检测 PAPP-A 结果的线性回归分析

2.5 参考区间 见表3。待评价系统检测了9~13⁺⁶周的2 519例孕母血清中的PAPP-A,在9~9⁺⁶,10~10⁺⁶,11~11⁺⁶,12~12⁺⁶和13~13⁺⁶孕周的PAPP-A中位数分别为977,1 550,2 536,3 683和5 393 mIU/L。

2.2 线性 见图1。在9.00~2 530.00 mIU/L范围内,实测浓度与理论浓度的线性回归方程为 $Y=0.9980X+6.0617$, $r=0.9996$,实测浓度与理论浓度呈高度正相关($t_r=86.59$, $P<0.05$)。

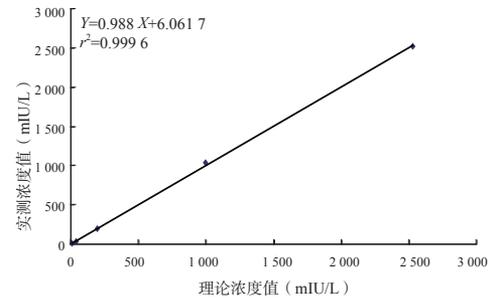


图1 待评价系统检测 PAPP-A 的线性评价

2.3 精密度 见表2。待评价系统检测低值、中值和高值PAPP-A质量控制品的批内CV分别为2.86%,2.34%和2.80%;批间CV分别为3.02%,2.98%和3.48%。

2.4 准确度 待评价系统和对比系统平行检测66例孕母血清样本的浓度结果差异无统计学意义($t=1.10$, $P>0.05$),两组数据的线性回归方程为 $Y=0.9373X+270.15$, $r=0.9932$,呈高度正相关($t_r=96.68$, $P<0.05$),结果见图2。采用回归方程进行偏差估计,当孕母血清样本PAPP-A浓度>745 mIU/L时,预期偏差均在靶值 $\pm 30\%$ 范围内。

表3 待评价系统检测 PAPP-A 的参考区间

孕期 (周)	例数 (n)	PAPP-A 浓度 (mIU/L)		
		5th%	中位数	95th%
9~9 ⁺⁶	314	267	977	2 958
10~10 ⁺⁶	372	534	1 550	4 629
11~11 ⁺⁶	405	793	2 536	6 672
12~12 ⁺⁶	766	1 179	3 683	8 952
13~13 ⁺⁶	666	1 972	5 393	10 449

3 讨论

检测系统在用于实际检测临床样本、发出检验报告前,实验室必须在检测系统最佳稳定状态下使用,对检测系统的分析性能予以证实。血清学产前筛查对血清标志物检测结果有较高的准确度和精密度要求,实验室需要使用符合要求的检测产品。本研究参考PAPP-A行业标准对Auto TRFIA-4型自动荧光免疫分析仪和试剂盒检测PAPP-A进行了

性能评价,空白限达到 0.50 mIU/L,检测限符合 PAPP-A 行业标准要求;线性范围达 9.00~2 530.00 mIU/L,较 PAPP-A 行业标准要求的线性范围宽,其 r 达到 0.999 6;检测 PAPP-A 的批内 CV 小于 3%,批间 CV 小于 4%,精密度优于 PAPP-A 行业标准的 要求,在加拿大的技术规范中要求检测 PAPP-A 的 CV 不超过 10%^[5],我国颁布的孕中期产前筛查 技术标准要求的产前筛查血清标志物批内 CV 小于 3%,批间 CV 小于 5%^[6];方法学比对试验为准确 度评价的方法之一,待评价系统和对比系统检测 PAPP-A 结果采用线性回归方程分析,斜率为 0.937 3, r 为 0.993 2,符合 PAPP-A 行业标准的 要求,且两系统检测的 PAPP-A 浓度结果差异无统计学意义 ($t=1.10, P>0.05$)。采用回归方程进行偏差估计, 当孕母血清样本 PAPP-A 浓度大于 745 mIU/L 时, 预期偏差均在国家卫生健康委员会临床检验中心室 间质量评价标准(PAPP-A 靶值 $\pm 30\%$) 范围内。 本研究参考 C28-A2 要求^[4],建立了待评价系统检 测 PAPP-A 的中位数,与高刚^[7]等报道的临沂地区 8 426 例孕妇 9~13⁺⁶ 周的 PAPP-A 中位数比较,平 均高 18.38%,可能与不同检测系统、不同地区受 检人群和入选样本例数差异有关,蒋涛等^[8]也曾报 道了 2 个不同地区的 PAPP-A 中位数偏差平均可达 14.3%,因此实验室应积累一定数据后,根据本地 数据建立自己的中位数,而后将所有实际测定值的 浓度转化为 MOM 来表达,再使用标化后的 MOM 值对筛查疾病进行风险评估。

综上所述,国产 Auto TRFIA-4 型自动荧光 免疫分析仪和试剂盒检测 PAPP-A 的性能符合 PAPP-A 行业标准的要求,建立的 PAPP-A 参考区 间以供临床参考。

参考文献:

- [1] 吴以刚.妊娠相关血浆蛋白 A 检测标准化研究进展 [J]. 中国卫生产业,2016,13(18): 125-128.
WU Yigang. Standardization research process of pregnancy-associated plasma protein A test[J]. China Health Industry,2016,13(18):125-128.
- [2] 国家食品药品监督管理局. YY/T 1422-2016, 血清妊 娠相关血浆蛋白 A 检测试剂(盒)(定量标记免疫 分析法) [S]. 北京: 中国标准出版社, 2017.
National Medical Products Administration. YY/ T 1422-2016, Pregnancy-associated plasma protein

- A(PAPP-A)in serum test reagent(quantitative labelling immunoassay)[S]. Beijing: China Standard Press, 2017.
- [3] 中国合格评定国家认可委员会. CNAS-CL02, 医学 实验室质量和能力认可准则 [S]. 北京: 中国计量出 版社. 2014.
China National Accreditation Service for Conformity Assessment. CNAS-CL02, Accreditation criteria for the quality and competence of medical laboratories (ISO 15189: 2012, IDT) [S]. Beijing: China Metrology Press, 2014.
- [4] National Committee for Clinical Laboratory Standards. C28-A2, How to define and determine reference intervals in the clinical laboratory. Approved guideline-second edition [S]. Wayne: PA, NCCLS, C28-A2, 2000.
- [5] 王维鹏, 邹琳, 王治国. 新生儿疾病筛查与产前诊 断实验室管理 [M]. 北京: 人民卫生教育出版社, 2018:348.
WANG Weipeng, ZOU Lin, WANG Zhiguo. Laboratory management of neonatal disease screening and prenatal diagnosis[M]. Beijing: People's Health Education Press, 2018:348.
- [6] 中华人民共和国卫生部. WS 322.1-2010, 胎儿常见 染色体异常与开放性神经管缺陷的产前筛查与诊断 技术标准. 第 1 部分: 中孕期母血清学产前筛查 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
Ministry of Health of the People's Republic of China. WS 322.1-2010, Technical standards of prenatal screening and diagnosis for fetal common chromosomal abnormalities and open neural tube defects. Part 1: Maternal serum prenatal screening in second trimester [S]. Beijing: China Standard Press, 2010.
- [7] 高刚, 林晓杰, 张力, 等. 孕早中期产前筛查血清标 志物中位数的研究 [J]. 国际遗传学杂志, 2019, 42(2): 120-123.
GAO Gang, LIN Xiaojie, ZHANG Li, et al. Research on medians of serum markers in prenatal screening during the first and second trimester of pregnancy[J]. Int J Genet, 2019, 42(2): 120-123.
- [8] 蒋涛, 孙云, 张晓娟, 等. 南京地区孕早期产前筛查 指标中位数建立和临床意义探讨 [J]. 南京医科大学 学报(自然科学版), 2011, 31(1): 71-75.
JIANG Tao, SUN Yun, ZHANG Xiaojuan, et al. Es- tablishment of the median value of soft-marker in first-trimester prenatal screening and investigation of it's clinical significance of Nanjing area[J]. Acta Universitatis Medicinalis Nanjing(Natural Sci- ence), 2011, 31(1): 71-75.

收稿日期: 2020-03-11
修回日期: 2020-03-16

(上接 44 页)

- [17] MARTINS E, MARCÃO A, BANDEIRA A, et al. Methionine adenosyltransferase I/III deficiency in portugal: high frequency of a dominantly inherited form in a small area of douro high lands[J]. JIMD Reports, 2012, 6: 107-112.
- [18] COUCE M L, BOVEDA M D, GARCIA J C, et al.

Clinical and metabolic findings in patients with methi- onine adenosyltransferase I/III deficiency detected by newborn screening[J]. Molecular Genetics and Metabo- lism, 2013, 110(3): 218-221.

收稿日期: 2020-04-14
修回日期: 2020-04-27