

全自动免疫荧光分析仪检测苯丙氨酸的性能验证

梁晓威,程 威,孙 云,张 瑾,王彦云,蒋 涛*

南京医科大学附属妇产医院(南京市妇幼保健院)新生儿疾病筛查中心,江苏 南京 210004

[摘要] 目的:验证全自动免疫荧光分析仪(genetic screening processor, GSP)检测血苯丙氨酸的分析性能,以保证检测结果的准确可靠。方法:根据美国临床实验室标准化委员会(CLSI)系列文件及相关文献,设计验证方案,对GSP检测血苯丙氨酸的准确度、精密度、线性范围、检出限及临床可报告范围进行验证和评价,并与厂商声明的性能或公认的质量标准进行比较,应用百分位数联合ROC曲线确定苯丙氨酸的切值,并进行验证。结果:GSP对5份美国疾病预防控制中心(CDC)室间质控品检测结果与靶值的相对偏倚在-6.7%~19.2%之间,均小于CDC可接受偏倚($\pm 30\%$);检测质控品L(133 $\mu\text{mol/L}$)及H(641 $\mu\text{mol/L}$)的试剂批内的不精密度结果分别为7.5%和7.4%,分析批内的不精密度结果分别为7.4%和4.0%,总批间不精密度结果分别为7.5%和7.4%,与厂商提供的不精密度数据(2.6%~10.9%)基本一致;GSP检测苯丙氨酸在50~1 500 $\mu\text{mol/L}$ 范围内呈线性(厂商的线性范围为45~1 420 $\mu\text{mol/L}$);检测空白限(LoB)为20.9 $\mu\text{mol/L}$,检出限(LoD)为31.7 $\mu\text{mol/L}$,定量限(LoQ)为55.5 $\mu\text{mol/L}$,均小于厂商提供的数值(44.4 $\mu\text{mol/L}$ 、68 $\mu\text{mol/L}$ 、68 $\mu\text{mol/L}$);临床可报告范围为55.5~1 200.0 $\mu\text{mol/L}$ (厂商的可报告范围范围为68~1 200 $\mu\text{mol/L}$);确定苯丙氨酸初始切值为124.5 $\mu\text{mol/L}$ 。结论:GSP检测血苯丙氨酸的主要分析性能符合质量目标要求,可常规应用于临床。

[关键词] 全自动免疫荧光分析仪;苯丙氨酸;分析性能

[中图分类号] R722.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2018)05-699-04

doi: 10.7655/NYDXBNS20180527

苯丙酮尿症是国家卫计委规定的新生儿疾病筛查病种,采用的主要筛查指标是血苯丙氨酸(phenylalanine, Phe)。目前,国内新生儿疾病筛查实验室检测苯丙氨酸的方法主要有茚三酮荧光法(DEL-FIA)和串联质谱法(LC-MS/MS),两种方法均为半自动检测方法,工作量大,不精密度较高。为减少人为误差,提高工作效率,本实验室引进了一台全自动新生儿筛查荧光免疫分析系统,该系统检测苯丙氨酸的原理是全自动苯丙氨酸脱氢酶荧光免疫检测法。目前国内仅有个别单位在使用,国内外尚无相关参考文献。根据《医疗机构临床实验室管理办法》的要求,临床实验室应对所用的方法学进行评价,以保证所选用的方法、试剂、仪器达到临床性能和分析性能等方面的要求。本研究参照美国临床实验室标准化委员会(CLSI)相关指南并结合实际工作,验证了该系统检测苯丙氨酸的分析性能指标,现报道如下。

[基金项目] 江苏省卫生厅医学科研项目(H201343);南京市医学科技发展重点项目(ZKX14041);南京市科技发展计划(201405041)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: jiangzhang784@163.com

1 材料和方法

1.1 材料

选取本实验室新生儿疾病筛查干血滤纸片样本3 079例,其中阴性样本2 849例,阳性样本230例,阳性样本均为茚三酮荧光法初筛阳性并确诊为高苯丙氨酸血症患儿的血样;试剂盒自附质控品L(133 $\mu\text{mol/L}$)、H(641 $\mu\text{mol/L}$)以及美国疾病预防控制中心(CDC)室间及室内质控干血斑;空白血片为不含有人源性苯丙氨酸成分的血斑(绵羊血制备的G6PD质控品);由美国PerkinElmer公司提供的8种系列浓度样本[以高浓度样本(H, 1 500 $\mu\text{mol/L}$)和低浓度样本(L, 50 $\mu\text{mol/L}$),按L、0.98L+0.02H、0.94L+0.06H、0.9L+0.1H、0.8L+0.2H、0.5L+0.5H、0.2L+0.8H、H的比例配制]。滤纸片型号为Scheicher and Schuell 903[#]。所有样本-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

采用美国PerkinElmer公司生产的苯丙氨酸测定试剂盒(荧光法)(GSP Neonatal Phenylalanine kit)。采用美国PerkinElmer公司生产的全自动荧光免疫分析仪(genetic screening processor, GSP)、荧光免疫分析仪(1420 VICTOR)及全自动打孔仪Punthera-PuncherTM 9;德国Eppendorf单通道微量可调

移液器。

1.2 方法

1.2.1 准确度验证实验

参考CLSI EP15-A2文件^[1],对美国CDC 2016年2月发放的5个不同浓度的室间质控品进行检测,各浓度均测量1次,计算检测值与靶值的相对偏倚。CDC室间质控可接受水平为相对偏倚 $\leq \pm 30\%$ 为可接受。

1.2.2 精密度验证实验

参考CLSI EP5-A2文件^[2],选择2个批号的GSP试剂盒自附的2个水平的质控品(低浓度L和高浓度H)及美国CDC的4个水平的室内质控品,每种浓度质控品第1次用2个批号的GSP试剂盒分别检测20次,以后每天分别重复测定每种浓度质控品2次,连续20 d,对结果进行试剂批内精密度、分析批内精密度及总批间精密度性能验证,以变异系数(CV)表示。

1.2.3 线性评价实验

参考CLSI EP6-A2文件^[3]进行线性范围验证。对8个系列浓度样本,每个样本重复检测2次,画出理论值与测量值的散点图,目测排查离值点,只有1个离值点可直接删除,如果多于1个,则需要排查原因并重新测量,计算重复性误差须在10%以内。对实验数据进行一次、二次和三次多项式回归分析,建立回归方程分别为 $Y = b_0 + b_1X$, $Y = b_0 + b_1X + b_2X^2$, 以及 $Y = b_0 + b_1X + b_2X^2 + b_3X^3$ 。再通过t检验,判断高阶系数(二次回归多项式中的 b_2 、三次回归多项式中的 b_2 、 b_3)与0是否有统计学差异($P < 0.05$)。若有统计学差异,判断数据存在非线性,反之,则认为数据不存在非线性。最后根据所用的验证样本最低浓度和最高浓度确定线性范围。

1.2.4 检出限验证

参考CLSI EP17-A文件^[4],检测空白样本26次,并计算均值 μ_B 及标准差 σ_B 。若空白低限的值符合高斯分布,则空白限(LoB)的计算方法为 $LoB = \mu_B + 1.645\sigma_B$ ^[5];若空白样品结果未报负值或不符合高斯分布时,则LoB为空白样本检测值分布的第95百分位数;检出限(LoD)根据参考文献[6]定义为 $\mu_B + 3SD$;定量限(LoQ)定义为 $\mu_B + 6SD$ 。

1.2.5 临床可报告范围验证

根据定量限、线性范围验证结果以及最高和最低标准品浓度值确定GSP测定新生儿苯丙氨酸的可报告范围。确定原则:在线性范围内,如果定量限 $>$ 最低标准品浓度值,可报告范围为定量限至最

高标准品浓度值之间;如果定量限 $<$ 最低标准品浓度值,则可报告范围为最低标准品浓度值至最高标准品浓度值之间。

1.2.6 筛查切值制定

根据新生儿疾病筛查的特点,筛查切值制定原则定为:保证灵敏度为100%的基础上,选取特异性最高的数值为筛查切值。具体方法为应用百分位数联合ROC曲线确定苯丙氨酸的切值,并对该切值进行前瞻性验证^[7]。

1.3 统计学方法

应用SPSS19.0软件对全部数据进行分析处理,运用频数分布直方图观察苯丙氨酸数据分布特征。

2 结果

2.1 准确度验证结果

5个不同浓度的CDC室间质控品的检测结果与靶值的相对偏倚见表1,均在可接受范围内($\leq \pm 30\%$)。

表1 准确度验证结果

样本	检测结果($\mu\text{mol/L}$)	靶值($\mu\text{mol/L}$)	偏移(%)
CDC1	52.9	56.7	-6.7
CDC2	281.5	281.7	-0.1
CDC3	59.4	51.6	15.1
CDC4	61.5	51.6	19.2
CDC5	53.2	51.6	3.1

2.2 精密度验证结果

精密度验证结果见表2,与说明书提供的精密度性能基本一致。

表2 批内和批间精密度性能验证结果 (%)

质控类型	批内CV		总批间CV
	试剂批	分析批	
GSP试剂盒质控-LOW	7.5	5.2	7.5
GSP试剂盒质控-HIGH	7.4	4.0	7.4

2.3 线性评价验证结果

系列浓度血片理论值与实测值见表3,目测无明显离群点,重复性误差为9.54%,满足要求。回归分析结果见表4。回归分析结果显示二次和三次方程的高阶系数与0比较,均无显著差异,故认为数据不存在非线性,GSP检测苯丙氨酸在50~1 500 $\mu\text{mol/L}$ 范围内呈线性。

2.4 检出限验证结果

对空白样本重复测定26次的结果进行分析,正态性检验结果显示浓度值分布符合正态分布,故采

表3 系列样本浓度血片理论值与实测值 (μmol/L)

样本编号	1	2	3	4	5	6	7	8
理论值	50.0	79.0	137.0	195.0	340.0	775.0	1 210.0	1 500.0
实测均值	74.5	108.3	151.2	242.8	400.7	767.2	1 242.5	1 478.1

表4 回归分析结果

阶次	回归系数	回归系数值	t值	P值
1	b0	37.06	3.01	0.02
1	b1	0.98	59.19	<0.01
2	b0	28.74	1.64	0.16
2	b1	1.03	13.11	<0.01
2	b2	0.00	-0.70	0.52
3	b0	26.41	0.95	0.40
3	b1	1.05	4.77	0.01
3	b2	0.00	-0.22	0.84
3	b3	0.00	0.12	0.91

用 $LoB = \mu_B + 1.645\sigma_B$ 计算空白限。空白限、检出限、定量限验证结果见表5。

表5 检出限验证结果 (μmol/L)

检出限	测定结果	厂家报告
空白限(LoB)	20.9	44.4
检出限(LoD)	31.7	68.0
定量限(LoQ)	55.5	68.0

2.5 临床可报告范围验证结果

根据定量限(55.5 μmol/L)、线性范围(50~1 500 μmol/L)以及最高(1 200 μmol/L)和最低标准浓度值(30 μmol/L),取定量限结果及最高标准浓度值计算得出实验室的可报告范围为55.5~1 200.0 μmol/L,厂家声明为68~1 200 μmol/L,验证结果为可接受。

2.6 切值分析结果

对2 360例样本检测结果进行分析,其中阴性样本2 211例,阳性样本149例。根据ROC曲线表,在敏感度为1时,特异性最大为0.995,对应的切值为124.5 μmol/L。ROC分析最佳切值124.5 μmol/L对应的百分位数约为99.5%。故得到苯丙氨酸初始筛查切值为124.5 μmol/L。另取81例临床确诊的阳性样本和638例阴性样本进行前瞻性验证,阳性样本检出率100.0%,阴性样本假阳性率为0.47%。

3 讨论

GSP是集试剂存储、配液与加样、振荡孵育、去血片与洗板、荧光测定于一体的全自动新生儿疾病筛查系统。国外已应用多年,积累了一定应用经验^[6],

目前国内刚刚引入,对仪器检测性能尚缺乏足够认识,在临床应用参考上缺少系统性的性能评价数据。因此,实验室在其常规运用于临床样本检测前,有必要对其进行性能验证,同时检测系统的分析性能是否满足临床要求也是医学实验室质量和能力认可^[8]和“检验结果互认”的根本保证^[9]。

检测系统最主要的性能指标是准确度和精密度,实验室对于产品质量的检验,首要目的是要得到准确可靠的结果,其次要求检验结果的精密度高。验证结果表明,GSP测定苯丙氨酸的准确度符合美国CDC室间质控的要求($\leq \pm 30\%$)。本实验室在验证系统的精密度时,结合工作经验,考虑了试剂批次不同对实验结果的影响,分别验证了试剂批内精密度和分析批内精密度,结果显示不精密度与厂商提供的基本一致,同时也符合卫生部临床检验中心室内质量评价的要求(允许不精密度在1/3允许总误差之内)。线性范围是检验性能的重要指标之一,通过线性验证可以发现检测系统在本实验室与厂家提供的数据是否一致,特别是当实验室外部条件发生改变时,检测系统的各项参数是否适合本实验室的检验要求,因此,线性验证是非常有必要的。GSP配套试剂盒说明书上声明的线性范围为45~1 420 μmol/L,本实验室验证得出的线性范围为50~1 500 μmol/L,故该系统声明的线性范围与本验证结果基本一致。检出限评价的目的是评估方法所能检测到的分析物最低浓度,确定的依据是CLSI EP17-A文件的要求,验证厂家声明的检出限至少需要25个重复测量,计算所得空白限、检出限和定量限的结果均小于厂家声明的值。本实验室计算得出的可报告范围也与厂家声明一致。新生儿疾病筛查的实验室工作不同于一般临床检验,是无法弥补的一次性检验,不可有任何疏忽,因此制定切值的原则是在保证灵敏度为100%的基础上,选取特异性最高的数值为筛查切值。本次计算得出的苯丙氨酸切值为124.5 μmol/L,此结果仅代表本实验室的初始切值,随着实验结果数据的积累,苯丙氨酸的切值需重新确定和调整。

综上所述,GSP检测血苯丙氨酸的分析性能验证结果与厂商声明的分析性能基本一致,能够满

足临床检测要求。建议使用或将要使用该仪器的临床实验室对该检测系统的分析性能进行评价,并建立完善的质量管理控制制度,保证其结果的准确可靠。

[参考文献]

[1] Clinical and Laboratory Standards Institute. Userdemonstration of performance for precision and accuracy[S]. EP15-A2, CLSI, 2014

[2] Clinical and Laboratory Standards Institute. Userdemonstration of performance for precision and accuracy[S]. EP5-A2, CLSI, 2014

[3] Clinical and Laboratory Standards Institute. Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures [S]. EP6-A2, CLSI, 2014

[4] Clinical and Laboratory Standards Institute. Interference

testingin clinical chemistry[S]. EP17-A2, CLSI, 2014

[5] 王治国. 临床检验方法确认与性能验证[M]. 北京:人民卫生出版社, 2009:246-255

[6] Fingerhut R, Torresani T. Evaluation of the genetic screening processor (GSP) for newborn screening[J]. Analytical Methods, 2013, 5(18):4769-4776

[7] 王艳云, 吕 伶, 孙 云, 等. 应用百分位数法联合 ROC 曲线探讨建立新生儿 11 种酰基肉碱非衍生化串联质谱法的正常值范围[J]. 中华检验医学杂志, 2016, 39(10):756-760

[8] 张秀明. 浅析定量检验程序分析性能验证试验方案设计[J]. 中华检验医学杂志, 2015, 38(6):428-430

[9] 李金明, 申子瑜. 正确认识临床实验室认可与提高检验质量之间的关系[J]. 中华检验医学杂志, 2007, 30(2):132-135

[收稿日期] 2017-11-23

参考文献的著录格式

1. 期刊

[顺序号] 作者. 题名[J]. 刊名, 年份, 卷号(期号): 起止页码

示例:

[1] 徐春阳, 杨 荣, 张 浩, 等. NOMO1 基因在大鼠胚胎心脏发育过程中的表达[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2013, 32(6):728-731

[2] Li JZ, Bunney BG, Meng F, et al. Circadian patterns of gene expression in the human brain and disruption in major depressive disorder [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2013, 110(24):9950-9955

2. 专著

[顺序号] 作者. 书名[M]. 版本. 出版地: 出版者, 年份: 起止页码

示例:

[3] 何 维. 医学免疫学[M]. 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 136

3. 析出文献

[顺序号] 析出文献责任者. 析出文献题名[M]//析出文献其他责任者或专著主要责任者. 专著题名: 其他题名信息. 出版地: 出版者, 年份: 析出文献起止页码

示例:

[4] 林穗芳. 美国出版业概况[M]//陆本瑞. 世界出版概况. 北京: 中国书籍出版社, 1991: 1-23

[5] 钟文发. 非线性规划在可燃毒物配置中的应用[C]//赵 玮. 运筹学的理论与应用: 中国运筹学会第五届大会论文集. 西安: 西安电子科技大学出版社, 1996: 468-471