

· 标准研究 ·

泌乳素测定试剂盒行业标准的验证

于婷, 黄杰, 曲守方* (中国食品药品检定研究院, 北京 100050)

摘要 **目的:** 对泌乳素测定试剂盒的行业标准进行验证。**方法:** 选择化学发光法、电化学发光法、磁微粒酶联免疫法等 10 家泌乳素试剂盒, 按照拟定的行业标准, 对外观、空白限、线性、准确度、精密度、特异性和稳定性项目进行验证。**结果:** 除个别试剂不满足准确度要求外, 其余试剂均能满足拟定行业标准中的要求。**结论:** 泌乳素测定试剂盒行业标准制定合理、可操作性强。

关键词: 泌乳素; 试剂盒; 化学发光法; 电化学发光法; 磁微粒酶联免疫法; 行业标准; 验证

中图分类号: R817.4 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2017)05-0495-06

doi:10.16153/j.1002-7777.2017.05.006

Validation of Industry Standard for Prolactin Assay Kits

Yu Ting, Huang Jie, Qu Shoufang* (National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

Abstract **Objective:** To validate the industry standard for the prolactin assay kits. **Methods:** Based on different methods, such as chemiluminescent assay, electrochemiluminescent assay and magnetic particle enzyme linked immunosorbent assay ten prolactin assay kits were selected. The appearance, blank limit, linearity, accuracy, precision, specificity and stability were validated according to the proposed industry standard. **Results:** Except for few kits that couldn't meet the accuracy requirement, others could meet all the requirements of the proposed industry standard. **Conclusion:** The industry standard for prolactin assay kit is reasonable and operable.

Keywords: prolactin; kit; chemiluminescent assay; electrochemiluminescent assay; magnetic particle enzyme linked immunosorbent assay; industry standard; validation

人泌乳素 (Prolactin, PRL) 是由人垂体前叶分泌的单链多肽激素, 由 199 个氨基酸组成, 分子量约为 23,000 道尔顿^[1-4]。PRL 的主要生理功能是激发和维护妇女的哺乳期, 对机体和乳腺的生长发育、乳汁的分泌、性腺发育、调节水及电解质代谢都起着十分重要的作用^[5-12]。泌乳素浓度的测定有助于下丘脑-垂体功能障碍等的诊断^[13-18]。

截至 2016 年 4 月, 在我国上市销售, 具有医疗器械注册证的国产和进口 PRL 定量检测试剂盒多达 50 余种, 检测原理主要有酶联免疫法、化学发光

免疫法^[19-22]、电化学发光免疫法和时间分辨免疫荧光法等。目前, 没有统一的泌乳素医疗器械行业标准和国家标准, 因此在注册检验中, 均采用企业自行制定的企业技术要求, 完成对产品的注册检验。由于各自的技术要求指标宽严不一, 造成不同厂家试剂盒质量参差不齐。因此, 在上市后市场监管中, 很难通过统一的尺度对试剂盒性能优劣做出判断。针对这类试剂盒的实际情况, 按照国家食品药品监督管理总局医疗器械标准制修订计划, 中国食品药品检定研究院 (以下简称我

作者简介: 于婷, 副研究员; Tel: (010) 67095283; E-mail: yuting@nifdc.org.cn

通信作者: 曲守方, 副研究员; Tel: (010) 67095283; E-mail: qushoufang@nifdc.org.cn

院)提出了制定PRL测定试剂盒标准的项目提案,项目编号为I2014104-T-bj。我院在调研PRL相关资料、征求多方意见以及实验验证的基础上,制定出泌乳素测定试剂盒行业标准。

1 材料与方法

1.1 仪器和试剂

1.1.1 仪器

磁酶免测定仪,型号: SEROZYME I型,由北京倍爱康生物技术有限公司提供;化学发光仪,型号: CHEMCLIN CC 100,由北京科美生物技术有限公司提供;电化学发光全自动免疫分析仪,型号: Elecsys 2010,由罗氏诊断产品(上海)有限公司提供;全自动化学发光免疫分析仪,型号: LIAISON XL,由索灵诊断医疗设备(上海)有限公司提供;化学发光免疫分析仪,型号: Immulite2000 Xpi,由西门子医学诊断产品(上海)有限公司提供;全自动免疫分析仪,型号: ISR02505,由雅培贸易(上海)有限公司提供;全自动化学发光检测仪,型号: AutoLumo A2000,由郑州安图生物工程股份有限公司提供;全自动化学发光仪,型号: Maccura IS1200,由四川迈克生物科技股份有限公司提供;全自动免疫分析仪,型号: Access 2,由贝克曼库尔特商贸(中国)有限公司提供;时间分辨荧光免疫分析系统,型号: DR6608,广州市达瑞抗体工程技术有限公司提供。

1.1.2 试剂盒

催乳素定量检测试剂盒(磁微粒分离酶联免疫法),北京倍爱康生物技术有限公司;催乳素测定试剂盒(化学发光法),北京科美生物技术有限公司;催乳素检测试剂盒(电化学发光法),罗氏诊断产品(上海)有限公司;促乳素测定试剂盒(化学发光法),索灵诊断医疗设备(上海)有限公司;泌乳素测定试剂盒(化学发光法),西门子医学诊断产品(上海)有限公司;泌乳素测定试剂盒(化学发光微粒子免疫检测法),雅培贸易(上海)有限公司;催乳素定量测定试剂盒(化学发光法),郑州安图生物工程股份有限公司;泌乳素测定试剂盒(化学发光法),四川迈克生物科技股份有限公司;泌乳素测定试剂盒(化学发光法),贝克曼库尔特商贸(中国)有限公司;人泌乳素定量检测试剂盒(时间分辨免疫荧光分析法),广州市

达瑞抗体工程技术有限公司;上述试剂盒均为取得医疗器械产品注册证的试剂盒。

1.1.3 PRL国际标准品

NIBSC批号: 84/500, 53mIU/支, 冻干品, 由中国食品药品检定研究院提供。

1.1.4 PRL质控品

批号: 1810-0101, 3支/套, 冻干品, 质控血清I理论值为 $150 \mu\text{IU} \cdot \text{mL}^{-1}$; 质控血清II理论值为 $390 \mu\text{IU} \cdot \text{mL}^{-1}$; 质控血清III理论值为 $1030 \mu\text{IU} \cdot \text{mL}^{-1}$, 由中国食品药品检定研究院提供。

1.2 方法

行业标准的验证试验主要是针对各项技术指标,至少采用2种试剂盒进行验证。PRL测定行标中的技术指标主要包括外观、空白限、线性、准确度、精密度、特异性和稳定性7项。

1.2.1 外观

采用目测法检查。通常是由制造商根据产品特点规定,一般应包括试剂盒内外包装、标签;各组分组成、性状等要求。

1.2.2 空白限

重复检测20次零浓度校准品或样本稀释液,计算信号值的平均值(M)和标准差(SD),对零浓度校准品或稀释液和相邻校准品之间的浓度-信号值,进行两点直线拟合得到方程,将(M+2SD)的信号值代入该方程,求出对应的浓度值即为空白限。要求应不高于 $20.0 \mu\text{IU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

1.2.3 线性

取接近试剂盒线性区间上限的高浓度样本,稀释至少5个浓度,其中稀释的最低浓度样本须接近试剂盒线性区间下限。每一浓度样本至少测定2次,采用最小二乘法直线拟合测定浓度均值与理论浓度或稀释比例,以计算线性相关系数。该项试验要求剂量-反应曲线范围下限不高于 $40 \mu\text{IU} \cdot \text{mL}^{-1}$,上限不低于 $3000 \mu\text{IU} \cdot \text{mL}^{-1}$,相关系数应不低于0.9900。

1.2.4 准确度

1) 将泌乳素国家(或国际)标准品配成与试剂盒校准品相应的浓度点(一般不少于5个),每个浓度至少测定2次,采用双对数或其它适当的数学模型拟合,计算两条反应曲线的斜率;以泌乳素国家(或国际)标准曲线为标准,计算试剂盒校准品实测值与理论值之比。要求经t检验分析,试剂

盒校准品与相应浓度的泌乳素国家（或国际）标准品的剂量-反应曲线不显著偏离平行；且试剂盒校准品的实测值与理论值之比应在0.900~1.100范围内。2）在试剂盒线性范围内，将泌乳素国家（或国际）标准品配成一定浓度样本，重复测定3次，计算实测值与理论值的相对偏差，要求相对偏差应在 $\pm 10.0\%$ 范围内。

1.2.5 精密度

1）批内精密度：用同一批号试剂盒，对2~3个不同浓度的质控品分别重复测定10次，要求手工法操作的试剂盒测定结果变异系数应不高于10.0%，全自动仪器操作的试剂盒测定结果变异系数应不高于8.0%；2）批间精密度：用3个不同批号试剂盒，对2~3个不同浓度的质控品分别重复测定10次，要求测定结果的变异系数应不高于15.0%。

1.2.6 特异性

平行测定浓度为 $200 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的人生长激素2次，要求测定结果的均值应不高于 $20.0 \mu\text{IU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

1.2.7 稳定性

效期末稳定性项是将试剂盒在规定条件下保存至有效期末、热稳定性项是将试剂盒在 37°C 条件下放置一定时间（由各试剂盒效期决定）后，冻干试剂复溶后稳定性是将试剂盒中冻干组分按照规定

的条件复溶后，在规定条件下放置一定时间后，检测各项性能指标（批间精密度和特异性不作要求）是否满足相应要求。方法同1.2.1~1.2.5。

2 结果

外观均满足要求。由表1可见，6家试剂盒的空白限均小于拟定行标的要求（ $20 \mu\text{IU} \cdot \text{mL}^{-1}$ ）；线性范围数据显示，除一国产试剂盒不满足要求外，其余试剂盒均能满足拟定行标线性范围的要求（下限应不高于 $40 \mu\text{IU} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，上限应不低于 $3000 \mu\text{IU} \cdot \text{mL}^{-1}$ ）；各试剂盒相关系数均大于拟定行标的要求（0.9900），表明在试剂盒剂量-反应曲线的线性范围内，量效关系反应良好；批内和批间精密度试验中，包括手工法试剂盒，变异系数均小于10.0%，尤其是进口全自动试剂的批内精密度基本均小于5.0%，表明重现性较好。6家试剂盒特异性样本的测定结果均低于拟定行标的要求（ $20 \mu\text{IU} \cdot \text{mL}^{-1}$ ），表明该浓度下的生长激素不影响PRL的测定。

准确性项目是PRL行业标准中关键性指标之一。本次验证方法有两种，详见“1.2.4”节1)和2)，由于国家标准品缺货，验证中只能采用国际标准品进行验证，大部分试剂结果令人满意，实测值与理论值的相对偏差在 $\pm 10.0\%$ 范围内，少数试剂不满足准确度要求，结果详见表2。

表1 PRL 测定试剂盒的部分验证结果

试剂盒	空白限 / ($\mu\text{IU} \cdot \text{mL}^{-1}$)	线性范围	相关系数	批内精密度 / %	批间精密度 / %	特异性 / ($\mu\text{IU} \cdot \text{mL}^{-1}$)
A	1.6	40 ~ 5000	0.9992	3.4; 1.4; 2.5	6.0; 1.8; 5.0	0.9
B	1.6	106 ~ 2120	0.9996	8.2; 2.8; 3.3	5.4; 6.2; 6.2	1.5
C	1.2	1.0 ~ 10000	0.9999	1.2; 1.2; 1.1	/	3.7
D	0.8	10 ~ 8000	1.0000	2.0; 2.2; 3.0	/	2.1
E	1.5	11 ~ 3180	0.9994	5.3; 2.2; 3.2	/	5.0
F	< 0.1	12.6 ~ 4200	0.9998	1.7; 1.2; 1.3	/	< 12.6

表2 PRL 测定试剂盒的准确度验证结果

理论浓度 / ($\mu\text{IU} \cdot \text{mL}^{-1}$)	相对偏差							
	试剂 A	试剂 C	试剂 D	试剂 E	试剂 G	试剂 H	试剂 I	试剂 J
125	-12.1%	7.9%	3.7%	7.6%	10.3%	0.9%	-8.9%	-2.6%
250	-11.4%	8.2%	7.1%	12.7%	3.8%	4.3%	-8.8%	0.5%
500	-15.0%	7.3%	8.4%	-2.9%	1.6%	-0.4%	-9.3%	8.2%

值得注意的是, 验证期间, 发现采用不同的稀释液溶解PRL国际标准品, 对于测值结果影响非常大。表3结果显示, 采用去离子水溶解的PRL国际标准品样本, 无论是在国产还是进口试剂盒上, 实测值均显著低于理论值, 两者比值均值皆不超过

0.50, 最低仅为0.29; 而采用含0.1%BSA缓冲液溶解后的测定结果, 实测值接近理论值, 比值均值在0.93~1.06。从表3可见, 同时做了采用2种溶液溶解PRL国际标准品后进行检测的试验, 2种数据比对效果非常明显。

表3 两种溶解液对 PRL 国际标准品测值的影响

复溶液	次数	实测值 / 理论值的均值					
		试剂 A	试剂 C	试剂 D	试剂 E	试剂 G	试剂 I
a	1	0.40	0.35	0.43	0.51	0.52	0.32
	2	0.39	0.52	/	0.32	0.41	0.24
	3	0.42	0.45	/	0.33	/	0.30
	4	/	0.38	/	/	/	/
	总均值	0.40	0.42	0.43	0.39	0.47	0.29
b	1	1.01	1.10	1.10	1.07	1.02	0.94
	2	0.91	1.01	1.00	0.95	0.94	0.93
	总均值	0.96	1.06	1.05	1.01	0.98	0.93

备注: a 代表去离子水; b 代表含 0.1%BSA 的 PBS 缓冲液; 进口试剂分别为试剂 C、D、E、和 I, 国产试剂分别为试剂 A 和 G。

表4的数据来源于未参与本次行标验证的部分进口或国产试剂盒说明书资料, 结果同样显示均能满足拟定行标线性范围的要求, 表明该项指标制定较合理。

在稳定性试验中, 由于条件所限, 仅选择2家国产试剂盒进行了热稳定性和效期末稳定性项目中的大部分技术指标检测, 结果见表5, 其中准确度项目, 选择了4家试剂(2家国产, 2家进口)进行了分析, 详见表6。

表4 部分 PRL 试剂盒的线性范围

分类	编号	线性范围 / ($\mu\text{IU} \cdot \text{mL}^{-1}$)
进口 试剂盒	1	5.3 ~ 4240
	2	30.8 ~ 7000
	3	6.36 ~ 4240
国产 试剂盒	1	50 ~ 3000
	2	16 ~ 11000

表 5 PRL 试剂盒稳定性验证结果

项目名称	A 试剂盒 效期末稳定性	A 试剂盒 热稳定性	B 试剂盒 效期末稳定性	B 试剂盒 热稳定性
空白限 / ($\mu\text{IU} \cdot \text{mL}^{-1}$)	0.3	3.0	/	6.4
相关系数	0.9946	0.9987	0.9997	0.9996
批内精密密度 /%	4.4%; 3.5%; 6.4%	6.0%; 6.0%; 8.4%	1.2%; 0.6%; 0.8%	2.9%; 2.3%; 1.8%

表 6 PRL 测定试剂盒稳定性项目中的准确度验证结果

理论浓度 / ($\mu\text{IU} \cdot \text{mL}^{-1}$)	相对偏差			
	试剂 A	试剂 D	试剂 G	试剂 J
125	24.6%	-11.3%	3.7%	-2.5%
250	2.0%	-2.1%	-2.0%	3.4%
500	-10.1%	-1.2%	-8.2%	5.0%

3 讨论

针对我国体外诊断试剂标准混乱的问题^[23-24], 国家食品药品监督管理总局对体外诊断试剂行业标准制定工作的支持力度不断加大, 2006 年至今, 标准制修订项目数呈逐年上升的趋势, 这对于相关产品的研发、注册审批和市场监管工作起到了重要的技术支撑作用。我院积极参与此项工作, 于 2014 年提出了制定 PRL 测定试剂盒的行业标准。在 PRL 行标验证试验中, 选择了化学发光法、电化学发光法、磁微粒酶联免疫法等多种不同标记方法, 对具有代表性的国产或进口试剂盒进行验证。验证过程中, 外观、空白限、线性、精密密度、特异性、稳定性等项目, 各试剂盒基本都能满足要求。除 B 试剂盒的线性范围稍窄外, 其余 5 种试剂盒的验证结果 (除准确度外) 均满足拟定行标的要求。但在准确度项目中, 最初验证结果并不是特别理想, 多次重复该试验, 且在多个试剂盒上进行验证, 与国际标准品 84/500 的相对偏差绝对值均在 40%~60% 范围内, 与制定的指标差异较大。当时基于此种特殊情况, 且时间所限, 经专家讨论和广泛征求意见, 准确度方法中增加“回收率”法, 但建议在 PRL 国家标准品换批之后, 还应优先采纳“1.2.4”节中 1) 或 2) 的方法。本实验室参加 PRL 国际标准品协作标定工作中发现, 不同稀释液复溶 PRL 国际

标准品 84/500, 对测值影响差别非常大。采用含一定浓度蛋白的稀释液复溶 84/500, 测定值与理论值相当, 而不含蛋白的去离子水或者 PBS 溶液复溶后, 测定值显著低于理论值, 最低仅为 20% 左右。因此, 重新对泌乳素行标中准确度进行验证, 在多个试剂盒上分析, 大多数结果满足相对偏差在 $\pm 10\%$ 范围内。虽然仍有少数试剂准确度结果超出规定范围, 建议试剂生产厂商应积极找出原因, 进行相应调整。上述结果表明, PRL 测定试剂盒行业标准中各项技术指标的制定得较为合理, 可操作性强。该标准的制定, 将有助于统一 PRL 定量测定试剂盒的技术要求, 为该产品的研制、检测检验及上市后的监管工作提供技术指导和依据。

近年来, 我国体外诊断试剂产业市场需求的潜力巨大, 在预测疾病、评价治疗疗效和愈后等领域, 发挥着越来越大的作用。国家食品药品监督管理总局对于相关标准和法律法规的制修订工作非常重视, 希望通过国家监管、检验检测等各部门、研发企业和临床部门的共同努力, 促进体外诊断试剂行业更加稳定、规范地发展, 保障人民用械安全。

参考文献:

- [1] 雷鸣, 苏映军, 王钠, 等. 泌乳素及其受体的研究进展 [J]. 现代生物医学进展, 2016, 16 (10): 1979-

- 1983.
- [2] Jeffcoate, SL. Assays for Prolactin: Guidelines for the Provision of a Clinical Biochemistry Service[J]. Ann Clin Biochem, 1986, 23: 638-651.
- [3] 王雄, 陈永刚, 吴金虎. 泌乳素的研究进展 [J]. 医学综述, 2012, 18 (1): 6-10.
- [4] Freeman ME, Kanyicska B, Lerant A. Prolactin: Structure, Function, and Regulation of Secretion[J]. Physiol Rev, 2000, 80: 1523.
- [5] 杨昆. 催乳素在银屑病中的水平检测及相关性分析 [J]. 中国医药指南, 2016, 14 (7): 110-111.
- [6] 邱代玉. 正常孕妇血清催乳素水平变化 [J]. 中国实用医药, 2012, 7 (15): 110-111.
- [7] 林晨, 张荣珍, 付卫红, 等. 双相障碍与单相抑郁患者雌二醇和催乳素水平对照研究 [J]. 四川精神卫生, 2016, 29 (2): 128-131.
- [8] 孔艳华, 任安. 泌乳素与免疫调节 [J]. 广东医学, 2012, 33 (16): 2517.
- [9] 张雪峰. 泌乳素与女性不孕症的关系 [J]. 标记免疫分析与临床, 2003, 10 (4): 256-258.
- [10] 陈宏谋, 郑捷敏, 闫宪磊, 等. 溴隐亭对垂体泌乳素腺瘤血管形成的影响及其分子作用机制研究 [J]. 实用心脑血管病杂志, 2016, 24 (3): 43-45.
- [11] 阮祥燕, 宋菁华. 妇科内分泌疾病与复发性流产 [J]. 实用妇产科杂志, 2016, 32 (2): 83-85.
- [12] 顾秀兰. 雌三醇及胎盘催乳素检测对胎儿生长受限的意义 [J]. 国际检验医学杂志, 2016, 37 (8): 1060-1062.
- [13] 李洁, 刘群. 高催乳素血症的病因和病因诊断 [J]. 实用妇产科杂志, 2007, 23 (2): 67-69.
- [14] 陈明明, 徐望明, 解美婷, 等. 高催乳素血症的治疗进展 [J]. 中国性科学, 2016, 25 (5): 43-45.
- [15] 杨光, 巴颖, 杜建玲, 等. 高泌乳素血症的病因分类及治疗转归: 附 149 例回顾性分析 [J]. 中国实用内科杂志, 2008, 28 (11): 973-975.
- [16] 张放. 溴隐亭治疗女性高泌乳素血症性不孕的临床效果分析 [J]. 中国现代药物应用, 2016, 10 (5): 157-158.
- [17] 杨阳. 垂体泌乳素瘤早期诊断的临床研究 [J]. 中国伤残医学, 2016, 24 (6): 58-59.
- [18] 郜水菊. 闭经溢乳综合征临床分析 [J]. 吉林医学, 2016, 37 (3): 673-674.
- [19] 李永生, 陈家强, 谢筱颖. 化学发光法检测促卵泡激素黄体生成素催乳素在萎缩性尿道炎患者中的价值 [J]. 实用医技杂志, 2016, 23 (11): 1178-1179.
- [20] 姚春艳, 府伟灵. 化学发光法检测性激素水平诊断继发性闭经 [J]. 重庆医学, 2003, 32 (12): 1660-1661.
- [21] 莫殿军. 2 种化学发光分析系统检测血清催乳素水平的对比分析 [J]. 中国卫生检验杂志, 2015, 25 (6): 842-843.
- [22] 陈芳芳, 李家亮, 张中书, 等. BECKMAN DxI 800 全自动化学发光仪检测泌乳素的性能验证 [J]. 现代检验医学杂志, 2015, 30 (1): 126-128.
- [23] 孙立魁, 施燕平. 我国体外诊断试剂质量现状分析 [J]. 中国医疗器械信息, 2011, 17 (3) 1-3, 55.
- [24] 刘艳, 孙楠, 王玉梅, 等. 体外诊断试剂行业标准制定工作的现状分析及展望 [J]. 中国医疗器械杂志, 2014, 38 (6): 448-450.

(收稿日期 2016年10月23日 编辑 邹宇玲)