

性参考模板做多管平行试验,各两天,结果如表 3,与控制前相比,控制组的标准差已显著减小($F=7.886, P=0.0154$),证实误差源 13 也能引起一定的误差。

表 2 室内质控血清双管平行试验结果(log10)

时间	A 管	B 管
第 1 天	4.66	5.93
第 2 天	5.20	6.04
第 3 天	6.15	5.65

$s = 0.575, CV = 10.25\%$ 。

表 3 阳性参考模板做多管平行试验结果(log10)

组别	1 管	2 管	3 管	4 管	$s(CV)$
不控制组	第 1 天	5.06	4.87	4.71	5.08 0.205(4.15%)
	第 2 天	4.99	4.62	5.17	4.93
控制组	第 3 天	5.00	5.00	5.15	5.13 0.073(1.45%)
	第 4 天	4.94	5.11	5.08	5.04

2.4 室内质控 CV 变化趋势 对误差源 10、13 经过纠正措施的实施后的 2008 年,室内质控 CV 由平均 9.3% 下降为 3.3%, 标准差稳定在 0.2(log10) 左右, 进一步证实误差源 10、13 是导致本实验室前期 HBV-DNA 定量检测的精密度不高的重要因素。

3 讨 论

室内质量控制的作用在于监控本实验室常规工作的精密度,为实验结果的准确性提供保障^[1-2]。正是基于对本实验室室内质控数据的回顾性分析,才能发现误差的存在,为误差源的查找提供方向,还能验证纠正措施是否得当。

HBV-DNA 定量检测是一种影响因素较多的实验技术,所以对实验各个环节都要进行控制才能保证高质量检验的完成。作者在查找误差源之前对诸多细节进行了准备,如规范化操作培训、移液器和温度计的校准、环境温湿度的监测、实验器材的

• 检验技术与方法 •

酶法测定同型半胱氨酸的初步评价

朝浩鹏, 申丽红, 陈永德[△]

(中国中医科学院望京医院检验科, 北京 100102)

摘要:目的 通过观察使用免疫学方法和酶法检测样本同型半胱氨酸(Hcy)结果的相关性;用酶法检测 Hcy 的不精密度、线性范围及抗交叉污染的性能,研究使用酶法代替免疫学方法的可行性。方法 (1)选取内科患者和体检人群样本共 118 例,对其血浆 Hcy 用两种方法同时分别检测,评价其相关性。(2)选取不同水平样本进行酶法的不精密度、线性范围及抗交叉污染的性能评价。结果 (1)两种方法的检测结果显示其相关性良好($r=0.985, P<0.01$)。测定结果的相对偏倚在线性范围内能被接受,其结果具有可比性。(2)酶法检测 Hcy 的不精密度、线性范围和抗交叉污染的性能良好。结论 用酶法代替免疫学方法测定 Hcy 在结果上具有一致性和可持续性,在临幊上是可行的。

关键词:半胱氨酸; 方法学相关性; 不精密度

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.04.034

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)04-0463-03

随着人们生活方式和饮食习惯的改变,心脑血管疾病在我国的发生率逐年上升,而 Hcy 的检测对于动脉粥样硬化、2 型糖尿病、慢性肾功能不全、叶酸缺乏等疾病^[1-3]的诊断价值也更

消毒等,然后经过质控品的替换、试剂的替换后还有较大负误差出现,再对常见误差源 3、6、11 进行控制后仍然没有得到改善。可见误差源存在于仪器因素和剩余操作步骤中,仪器因素因为短时不可控而作最后考虑。在剩余误差源中通过多组联合控制而筛选出疑似误差源 8、10、13,再经过比对和平行试验确认导致较大负误差的原因为误差源 10、13。

误差源 10、13 是 HBV-DNA 定量检测过程的两个步骤,按照试剂盒说明书要求操作不能避免出现较大负误差,通过作者提出的两项优化措施对其作相应纠正后的室内质控 CV 从 2006 年的 9.3% 下降到 2008 年的 3.3%,标准差控制在 0.2(log10)附近,与相关实验室的报道比较一致^[3-5],也证实了本文误差源查找的正确性与纠正措施的合理性,所以本文所运用的误差来源分析方式及处理方法值得从事 DNA 定量检测的临床工作者和研究者们的借鉴,以加强实验室工作的持续改进。

参考文献

- [1] Westgard JO. Internal quality control: planning and implementation strategies[J]. Ann Clin Biochem, 2003, 40(6): 593-611.
- [2] 李承彬, 彭长华, 欧阳耀灵. 定量检测 HBV-DNA 质量的持续改进[J]. 中国医院感染学杂志, 2009, 19(16): 2128-2130.
- [3] Lee C, Lee S, Shin SG, et al. Real-time PCR determination of rRNA gene copy number: absolute and relative quantification assays with Escherichia coli[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2008, 78(2): 371-376.
- [4] Sun S, Meng S, Zhang R, et al. Development of a new duplex real-time polymerase chain reaction assay for hepatitis B viral DNA detection[J]. Virol J, 2011, 8(2): 227-230.
- [5] Kim MH, Cha CH, An D, et al. Performance evaluation of Abbott RealTime HBV Quantification Kit for HBV viral load by real-time PCR[J]. Korean J Lab Med, 2008, 28(2): 144-150.

(收稿日期:2012-10-02)

普遍地为临幊所接受和重视。目前医疗保险已将酶法检测 Hcy 列为报销项目,而以前传统应用的免疫学方法^[4]因其价格等问题并未列入。本院根据医疗需求和医保精神,选取了部分

标本对两种方法进行相关性的评价,并对酶法的方法学进行初步评价,以研究使用酶法代替免疫学方法在临床上的可行性,确保在不降低检验水平的基础上减轻患者的经济负担。

1 资料与方法

1.1 一般资料 随机选取了本院内科患者样本和体检人群样本共118例,其中男71例、女47例; <60 岁的58例、 ≥ 60 岁的60例。因全血样本在搁置后会使血浆Hcy水平升高^[5],因此样本均及时分离血清。

的60例。因全血样本在搁置后会使血浆Hcy水平升高^[5],因此样本均及时分离血清。

1.2 方法

1.2.1 将每例标本分别用免疫学方法和酶法(见表1)进行检测,并保证和试剂配套的质控品结果在受控范围内。

表1 免疫学方法和酶法的使用情况

方法	仪器	试剂	检测原理	参考值
免疫学方法	雅培 AXSYM 免疫分析仪	美国雅培公司 Hcy 检测试剂盒	应用特异性的抗S-腺苷同型半胱氨酸单克隆技术,采用全自动荧光偏振免疫技术 ^[6] 测定Hcy	男性 5.9~16 μmol/L 女性 3.36~20.44 μmol/L
	日立 7600 全自动生化分析仪	中国九强生物技术股份有限公司 Hcy 检测试剂盒	基于小分子捕获技术 SMT 的 S-腺苷同型半胱氨酸水解酶。Hcy 被转化为游离型后,通过与共价底物反应,循环放大,同时产生腺苷。腺苷水解后在酶的作用下使 NADH 转化为 NAD,样本中的 Hcy 浓度与 NADH 转化速率成正比。	<60 岁 0~15 μmol/L ≥ 60 岁 0~20 μmol/L
酶法	日立 7600 全自动生化分析仪	中国九强生物技术股份有限公司 Hcy 检测试剂盒	基于小分子捕获技术 SMT 的 S-腺苷同型半胱氨酸水解酶。Hcy 被转化为游离型后,通过与共价底物反应,循环放大,同时产生腺苷。腺苷水解后在酶的作用下使 NADH 转化为 NAD,样本中的 Hcy 浓度与 NADH 转化速率成正比。	<60 岁 0~15 μmol/L ≥ 60 岁 0~20 μmol/L

1.2.2 精密度评价 结合美国临床实验室标准化委员会(NCCLS)EP5-A2^[7]文件和本实验室情况,选取低、中、高3种不同Hcy浓度的标本,用酶法进行不精密度测定。每个浓度同时测定双份,分别测定10次。

1.2.3 线性范围验证 根据酶法厂家提供的线性范围,选取高浓度标本(H)和低浓度标本(L)按:5L、4L+1H、3L+2H、2L+3H、1L+4H、5H进行配制,并对每个浓度进行双份测定取平均值。

1.2.4 抗交叉污染的评价 用酶法对Hcy浓度进行测定,每天选取8份不同水平的样本,按顺序编号,顺序中的浓度按随机排列。先按顺序1到8测定第一次,再按顺序8到1测定第2次,在2 h内完成检测,连续测定5天。

1.3 统计学处理 运用SPSS 12.0统计软件进行分析,对118例标本的结果进行两种方法的相关性分析。并对精密度试验的数据进行不精密度计算。

2 结果

2.1 全部118例样本,除6例超出两种方法的线性范围(>50 μmol/L)外,根据其性别、年龄进行分组后,其结果均显示相关性良好(见表2)。以方法一为标准计算方法二的偏差范围,最小与最大偏差范围为0.4%~33.5%,平均为14.5%,酶法测定结果较免疫学方法偏高,但在医学决定水平上和参考值差异方向相一致。经直线相关回归分析,测定结果的相对偏倚在线性范围内能被接受,其结果具有可比性。

在这一基础上,为研究两个封闭系统能否在人为改变实验条件的情况下实现结果的统一,选取了在方法一中结果和方法二的校准液浓度相近的血清标本,用其血清和在方法一中的检测值对方法二系统进行校准。然后选取了不同浓度的40例标本用两种方法进行检测,结果显示两方法最大偏差缩小到了6%以内,平均偏差不到3%。这为实验室统一不同系统的检验结果提供了参考思路。

2.2 进行酶法精密度试验的高中低水平3组数据显示(见表3),其批内不精密度 $<2.6\%$ 、批间不精密度($n=10$) $<3.8\%$,均低于九强公司所提供的批内变异系数(CV) $\leq 4\%$ 、批间变异系数(CV) $\leq 6\%$ 。在没有明确的国内外质量要求范围的情况下根据临床经验判断为可以接受。

2.3 进行酶法线性范围验证的试验数据显示(见图1),本系

统的Hcy检测线性范围可以达到九强公司提供的0~50 μmol/L。

表2 酶法和免疫学方法检测Hcy的相关性结果

分组	样本例数	r	P值	偏差范围%	平均偏差%
女性	47	0.988	<0.01	2.4~27.7	14.3
男性	65	0.986	<0.01	0.4~33.5	14.6
≥ 60 岁	58	0.988	<0.01	2.4~33.5	14.9
<60 岁	54	0.987	<0.01	0.4~32.7	14.1
合计	112	0.985	<0.01	0.4~33.5	14.5

表3 酶法测定Hcy的精密度试验结果

样本	均值 (μmol/L)	批内不精密度		批间不精密度		全距 (μmol/L)
		s	CV(%)	s	CV(%)	
低值	16.2	0.4	2.42	0.6	3.8	1.9
中值	27	0.5	1.8	0.8	2.83	2.6
高值	42.7	0.9	2.15	0.7	1.64	2.6

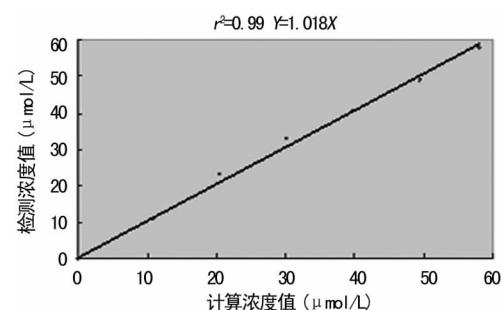


图1 酶法检测Hcy线性范围验证

2.4 随机选取的40例不同水平的标本,先后以不同顺序进行2次检测,其结果重复性良好。以第1次检测的结果为X轴,第2次检测的结果为Y轴绘制散点图(见图2),各点均匀的分布在 $X=Y$ 直线两侧,显示不同浓度的标本(高浓度到低浓度或低浓度到高浓度)在连续检测时抗交叉污染及漂移^[8]的性能良好。

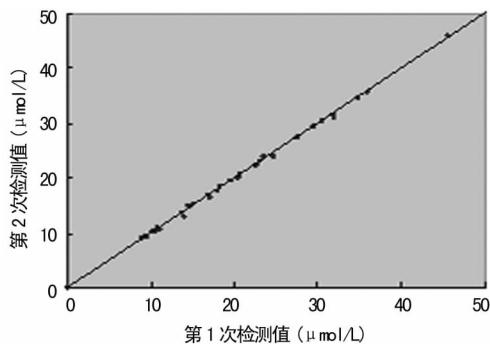


图 2 Hcy 重复性检测散点图

3 讨 论

结果显示,不论是分性别、年龄还是综合统计,两种方法均具有良好的相关性,其检验结果在临床水平上具有一致性,使用酶法代替免疫学方法后,其结果具有前后可持续性,不会对临床诊断造成影响。酶法本身又具有良好的方法学评价,可以在不降低检验水平的基础上减轻患者的经济负担,符合国家医保的精神。为临床检验提供了更优化的选择,使 Hcy 检测在临床上的广泛使用成为可能。另外,希望我室在如何统一不同系统的检验结果上所提出的探讨方向能为大家提供帮助。

参考文献

- [1] De Koning ABL, Werstuck GH, Zhou J, et al. Hyperhomocysteineemia and its role in the development of atherosclerosis [J]. Clin Biochem, 2003, 36(3): 431-441.
- [2] 陈建军,王兴木. 血浆 Hcy 水平与 DM2 慢性并发症的关系[J]. 放射免疫学杂志, 2009, 22(6): 620-621.

- [3] Semen LJ, McNamara JR, Schaeter EJ. Lipoprotein, homocysteine and remnantlike particles: emerging risk factors [J]. Curr Opin Cardiol, 1999, 14(2): 186-191.
- [4] 傅雷,杜同信,王书奎,王正正. 荧光偏振免疫法测定血同型半胱氨酸在临床中的应用[J]. 放射免疫学杂志, 2005, 18(2): 58-60.
- [5] Ueland PM, Reflum H, Stabler SP, et al. Total homocysteine in plasma of serum [J]. Clin Chem, 1993, 39(16): 1764-1779.
- [6] Pfeiffer CM, Twite D, Shih J, et al. Method comparison for total plasma homocysteine between the Abbott IMX analyzer and an HPLC assay with internal standardization [J]. Clin Chem, 1999, 45(1): 152-153.
- [7] National Committee for Clinical Laboratory Standards. EP5-A2 Evaluation of precision performance of clinical chemistry devices; approved guideline [S]. Wayne, PA: CLSI, 2008.
- [8] CLSI. EP9-A2 Evaluation of precision performance of quantitative measurement methods; approved guideline second edition [S]. Wayne, PA: CLSI, 2010.

(收稿日期:2012-10-02)

γ-谷氨酰转肽酶 37 ℃参考方法的建立在临床中的初步应用

张 莹,周铁成[△],童 开,岳乔红,郝晓柯

(第四军医大学西京医院全军临床检验中心,陕西西安 710032)

摘要:目的 建立 37 ℃γ-谷氨酰转肽酶(GGT)的参考方法,并对酶校准品定值,探讨血清 GGT 测定结果的准确性与可比性。**方法** 依据国际临床化学与检验医学联合会(IFCC)推荐的参考测量程序建立 GGT 酶催化活性参考方法,用参考方法测定 GGT(ERM AD452/IFCC)参考品,验证参考方法的准确度,并对其精密度进行方法学评价,同时用参考方法对制备的酶校准品进行准确定值,按照 NCCLS EP9-A 方案分别比较 40 例人血清用酶校准品校正的非配套常规方法、配套常规方法、理论 K 值常规方法和参考方法 GGT 结果,计算常规方法与参考方法的相关系数及相对偏倚。**结果** 用参考方法测定 ERM-AD 452 GGT 参考品结果 113.6 U/L,在其给定的(114.1±2.4)U/L 范围内。初步建立的 37 ℃ GGT 参考方法总 CV<1%。用酶校准品校正的非配套常规方法、配套常规方法、理论 K 值常规方法和参考方法比较,相关性均良好, r^2 分别为 0.999 8、0.999 6 和 0.999 5,与配套常规方法、理论 K 值常规方法相比较,酶校准品校正的非配套常规方法与参考方法的相对偏倚明显降低,在 10% 以下。**结论** GGT 参考方法基本建立,采用参考方法为酶校准品定值,可以提高血清 GGT 测定结果的准确度和可比性。

关键词:γ-谷氨酰转肽酶; 参考方法; 酶校准品

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.04.035

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)04-0465-03

血清 GGT 主要用于诊断肝脏疾病,结果的准确性对临床的诊断和治疗有很大的影响。由于各个试剂生产厂家为了适应分析的需要和生产、运输、储存的要求,会对试剂缓冲液的种类和浓度以及样本 / 试剂体积比有不同的规定,加之不同生化分析仪性能的不同,会使常规检测系统之间的检测结果有差异^[1]。目前同一酶学项目存在多种参考范围,各实验室间的差异性较大,明显高于一般检测项目的测定结果^[2]。实验室检测结果准确的、最有效的办法就是建立和保证检测结果的溯源性,检验量值溯源的必要条件是具备参考系统。利用参考方

法对酶活性测定结果进行标准化,可以保证检验结果的溯源性,减少不同实验室间同一酶学指标测定结果的差异。本文依据 IFCC 推荐的参考测量程序建立 GGT 参考方法^[3],验证其准确性,并用参考方法对制备的人血清标准品进行定值,将其用于常规方法的校准,从而提高常规方法与参考方法的可比性。

1 材料与方法

1.1 仪器 U-3310 紫外分光光度计(日立公司); Fluke 点式温度计(美国); Thermo Ph 计(美国); 分析天平 AUW220(岛