

• 检验仪器与试剂评价 •

参照 CLSI EP 方案评价唾液酸检测试剂性能

沃燕波, 邹继华, 黄幸雷, 张桂春

(浙江宁波美康生物科技股份有限公司, 浙江宁波 315100)

摘要:目的 参照 CLSI EP 方案对自主研发的唾液酸(SA)试剂分析性能进行评价, 了解其是否满足临床需求。方法 参照文件测定试剂空白吸光度及变化率、检测限、分析灵敏度、精密度、准确度、线性范围、干扰试验和稳定性等技术指标。结果 试剂空白吸光度大于 1.0, 吸光度变化率小于 0.002, 检测限为 0.15 mg/dL, 分析灵敏度大于 0.08, 高、低值血清批内变异系数分别为 0.28% 和 0.42%, 批间变异系数分别为 1.03% 和 0.93%, 准确度测定相对偏差小于 2%, 方法比对实验结果 $Y=0.9281X-5.0944$, $r^2=0.9977$; 线性范围为 0~250.0 mg/dL, 1.71 mmol/L 结合胆红素, 3.42 mmol/L 非结合胆红素, 0.3 g/L 维生素 C, 50 g/L 血红蛋白浓度, 14 500 FTU 乳酸对检测结果无干扰, 试剂稳定。结论 该试剂分析性能可满足临床实验室的需要。

关键词: CLSI EP 方案; 唾液酸; 分析性能评价

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2013.10.046

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2013)10-1295-03

唾液酸(sialic acid, SA)是九碳糖神经氨酸衍生物的总称, 是细胞膜上糖蛋白和糖脂的重要成分, 存在于各种组织细胞膜上, 参与细胞表面多种生理功能^[1]。SA 在细胞恶性转化时起着特殊的作用, 其含量与恶性肿瘤细胞增殖、转移、浸润、细胞粘附性降低、肿瘤抗原性及逃避宿主细胞免疫监视等密切相关, 是一种广泛有效的肿瘤标志物^[1]。研究者依照临床和实验室标准协会(CLSI)制订的评价方案对自主研发的 SA 试剂在分析性能方面进行了评价, 旨在为临床检测应用提供数据参考。

1 材料与方法

1.1 材料 日立 7180 全自动生化分析仪购于日本日立公司; 岛津 2450 分光光度计购于日本岛津公司; 游离胆红素及结合胆红素购于百灵威科技有限公司(批号分别为 LK50L19 和 JH10-4286); 血红蛋白购于上海瑞齐生物科技有限公司(批号: 20101203); 中/长链脂肪乳注射液(C6-C24)购于华瑞制药有限公司(批号: 80DH066)。SA 测定试剂盒及标准、质控购于日本和光公司。

1.2 实验方法

1.2.1 检测原理 神经氨酸苷酶断裂结合 SA 的糖苷键, 生成游离的 N-乙酰神经氨酸; N-乙酰神经氨酸在神经氨酸醛缩酶的作用下生成 N-乙酰甘露糖胺和丙酮酸; 丙酮酸与 NADH 在乳酸脱氢酶的作用下生成乳酸和 NAD^+ , NADH 在 340 nm 有特异度吸收, 通过检测 NADH 的减少量来检测样本中的 SA。

1.2.2 测试参数 采用速率法, 反应温度为 37 °C, 光径为 1.0 cm, 检测主波长 340 nm, 副波长 405 nm, 样品(校准管以校准品做样品)加 R1 混匀, 孵育 3~5 min 后加入 R2 混匀, 反应 90 s 后, 监测 90 s 吸光度变化, 其中样本用量 8 μL , 试剂 1 用量 240 μL , 试剂 2 用量 80 μL , 根据仪器使用说明及分析参数编制检测程序。

1.2.3 性能评价测定方案 有关试剂空白吸光度及变化率、检测限、分析灵敏度、精密度、准确度、线性范围、干扰试验和稳定性等评价指标参照相关 EP 文件及国内外惯用方法进行。空白吸光度及变化率: 在波长 340 nm(光径 1.0 cm)处检测, 以蒸馏水为样本, 重复测定 2 次。检测限: 以蒸馏水为样本, 用试剂重复测定 20 次。分析灵敏度: 以 60 mg/dL 标本为样品, 用试剂测定, 记录在试剂规定参数下产生的吸光度改变, 换算为吸光度变化率。精密度按 EP-5A 文件评价^[2]: 取高值和低值

的患者混合血清各 1 份, 测定 20 次, 计算批内精密度。取上述高、低值混合血清各自分装成 20 份, 并于 -20 °C 避光冰冻保存。每天取高、低值混合血清各 1 份, 完全溶解后测定, 计算批间精密度。准确度试验按 CLSI EP-9A 文件评价^[3]: 相对偏差以高、中、低三个浓度水平样本对试剂进行测试, 重复测定 3 次; 方法学比对实验采用 40 例临床样品对试剂进行测试, 并将结果与日本和光试剂进行数据统计分析, 计算其相关系数和回归方程。线性评价按 EP-6A 文件评价^[4]: 取 SA 高、低值血清标本各一份。将高值和低值血清分别按不同比例混合稀释成不同浓度梯度的样本, 并将这些样本随机排列进行测定, 各个浓度重复测定 5 次, 取其均值为测定值, 与预期值做线性对比。干扰实验按照 CLSI EP-7A 文件评价^[5]: 分别测定加入干扰物的高、低值混合血清。试剂热稳定性通过将试剂置于 37 °C 水浴, 分别于水浴前及水浴 1、4、7 d 后对高、低浓度的 SA 标本进行测定; 试剂开口稳定性实验通过将试剂定标后, 开口放置于生化分析仪的试剂仓, 分别在开口 0、3、5、7、14、21、30 d, 选用高、低浓度的 SA 标本进行不定标检测, 比较开口前后的检测结果偏差。

1.3 统计学处理 数据统计和存储应用 SPSS 10.0 软件, 相关性分析作曲线拟合(Curve Estimation), 回归方程应用线性回归分析。

2 结果

2.1 试剂空白吸光度及吸光度变化率 试剂空白吸光度分别为 1.34 和 1.33, 大于 1.0, 符合试剂设计要求; 试剂空白吸光变化率分别为 0.001 8 和 0.001 7, 小于 0.02, 符合试剂设计要求。

2.2 检测限 结果显示最低检测限为 0.15 mg/dL。

2.3 分析灵敏度 60 mg/dL 样本吸光度变化率为 0.087, 大于 0.01, 符合试剂设计要求。

2.4 精密度 结果显示, 该试剂对高、低值血清的批内变异系数分别为 0.28% 和 0.42%, 批间变异系数分别为 1.03% 和 0.93%。

2.5 准确度 测定低、中、高浓度质控品, 相对偏差小于 2%, 满足临床要求(误差小于或等于 $\pm 10\%$), 结果见表 1。测定临床标本 40 例, 将测定结果与日本和光试剂测定结果进行相关回归分析, 结果见图 1, 计算出相关方程和相关系数为 $Y=0.9281X-5.0944$ 和 $r^2=0.9977$ 。

2.6 线性范围测定 结果如图 2 所示, 相关方程及相关系数

分别为 $Y=0.9875X+3.104$ 和 $r^2=0.9992$ (浓度范围 0~250.0 mg/dL)。

表 1 准确度(相对偏差)实验结果

项目	低浓度标本	中浓度标本	高浓度标本
靶值(mg/dL)	54.5	106.75	159.0
平均值	54.8	108.8	159.7
相对偏差	0.6%	1.9%	0.4%

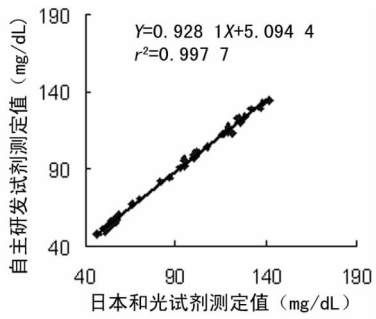


图 1 试剂方法学比对结果

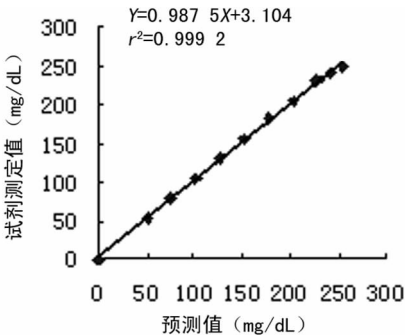
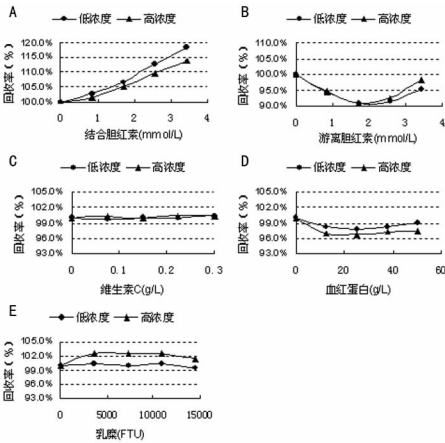


图 2 试剂线性范围实验结果

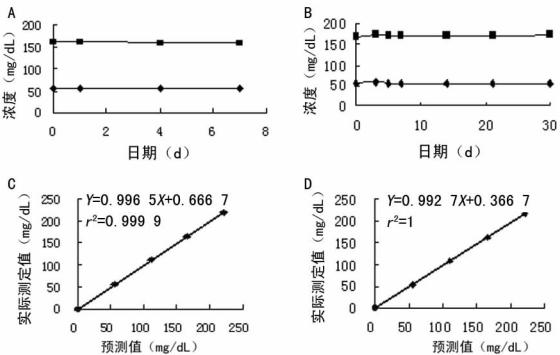
2.7 干扰实验 以相对偏差大于或等于 10% 作为有明显干扰的评判指标,结果显示,1.71 mmol/L 结合胆红素,3.42 mmol/L 非结合胆红素,0.3 g/L 维生素 C,50 g/L 血红蛋白浓度,14 500 FTU 乳糜对高、低值浓度 SA 样本检测结果均无干扰,见图 3;常规剂量的肝素锂、肝素钠、K2-EDTA、氟化钠/草酸钾抗凝剂对检测结果亦无干扰。



A: 试剂抗结合胆红素干扰结果;B: 试剂抗游离胆红素干扰结果;C: 试剂抗维生素 C 干扰结果;D: 试剂抗血红蛋白干扰结果;E: 试剂抗乳糜干扰结果。

图 3 试剂抗干扰结果

2.8 稳定性观察 试剂经 7 d 热破坏(37℃)和试剂瓶开口(2~8℃)30 d 后,高、低值标本和线性实验测定结果与热破坏前相比无显著偏差,结果见图 4。



A: 试剂 7 d 热破坏结果;B: 试剂开瓶 30 d 检测结果;C: 试剂 7 d 热破坏后线性;D: 试剂开瓶 30 d 后线性。

图 4 试剂稳定性观察结果

3 讨论

随着对 SA 研究的不断深入,其临床检测价值已经逐渐得到认可和重视^[1,6-7]。相比某些特异度的肿瘤标志物^[8],如 AFP、CEA、CA125、CA50,仅应用于诊断某种特定的恶性肿瘤,SA 作为肿瘤的一种非特异度标志物,其特点在于可适用于多种恶性肿瘤的诊断,被广泛应用于肝癌、肺癌、胃癌、恶性血液病、头颈鳞状细胞癌等的诊断及鉴别诊断中,也被用作常见恶性肿瘤分期的参考指标及病例治疗效果的评价指标^[9]。SA 也适用于大批人群健康筛查,以便对肿瘤患者做到早期发现、诊断和治疗;还可作为肿瘤疗效观察指标,监测肿瘤的消长,估计预后^[10]。

目前 SA 的检测方法很多,如 HPLC、酶法、化学比色法(常见的有硫代巴比妥酸法、间苯二酚法)^[7]。其中 HPLC 方法具有灵敏度高、特异度好的优点,但仪器昂贵且不适合临床批量样本检测。化学比色法虽然价格较低,但特异度低,操作复杂繁琐,需要高温萃取,不适合自动化分析,并且其试剂成分具有一定的腐蚀性和人体危害性。酶法具有高特异度,操作简单快捷、准确安全、可自动化分析等优点,本研究参考 CLSI EP 系列文件^[2-5],对自主研发的酶法 SA 试剂进行分析性能的系统评价,结果表明自主研发的 SA 试剂空白吸光度大于 1.0,吸光度变化率小于 0.002,检测限为 0.15 mg/dL,分析灵敏度大于 0.08,高、低值血清批内变异系数分别为 0.28% 和 0.42%,批间变异系数分别为 1.03% 和 0.93%,准确度测定相对偏差小于 2%,线性范围为 0~250.0 mg/dL,抗干扰能力较强,与日本和光试剂在分析性能上差异无统计学意义,与其比对实验结果 $r^2=0.9977$,可实现对其的替代应用于临床实验室。

参考文献

[1] Varki A. Sialic acids in human health and disease[J]. Trends Mol Med, 2008, 14(8): 351-360.
[2] NCCLS. Evaluation of precision performance of clinical chemistry devices; Approved Guideline[S]. EP5-A2. 1999, 19(2): 1-49.
[3] NCCLS. Evaluation of the linearity of quantitative analytical methods; A Statistical Approach; Approved Guideline[S]. EP6-A. 2003, 23(16): 1-46.
[4] NCCLS. Method comparison and bias estimation using patient samples; Approved Guideline[S]. EP9-A2. 2002, 22(19): 1-52.
[5] NCCLS. Interference Testing in Clinical Chemistry; Approved

Guideline[S]. EP7-A2. 2002, 25(27):1-107.

[6] Schauer R. Sialic acids as regulators of molecular and cellular interactions[J]. Curr Opin Struct Biol, 2009, 19(5):507-514.

[7] Kohler JJ. Aniline: a catalyst for sialic acid detection[J]. Chembiochem, 2009, 10(13):2147-2150.

[8] Bekci TT, Senol T, Maden E. The efficacy of serum carcinoembryonic antigen (CEA), cancer antigen 125 (CA125), carbohydrate antigen 19-9 (CA19-9), carbohydrate antigen 15-3 (CA15-3), alpha-fetoprotein (AFP) and human chorionic gonadotropin (hCG) levels in determining the malignancy of solitary pulmonary nodules[J]. J Int Med Res, 2009, 37(2):438-445.

[9] 张嘉宁, 汪淑晶. 唾液酸生物学与人类健康和疾病[J]. 生命科学, 2011, 23(7):678-684.

[10] 刘沛, 王舒, 李变荣. 血清唾液酸在恶性肿瘤诊断中的临床应用[J]. 检验医学与临床, 2012, 9(6):687-688.

(收稿日期: 2013-01-18)

• 检验仪器与试剂评价 •

HIV 酶免试剂在献血标本中检测效果评价

黄秀琳, 李 维, 程 颖, 尹 丹, 刘 东, 杨 虎, 秦伟斐, 韩继姝
(重庆市血液中心检验科, 重庆 400015)

摘要:目的 评价 HIV 酶免试剂在献血标本中的检测效果, 从而为检测试剂的选择和献血员屏蔽策略的制定提供依据。方法 统计该中心抗-HIV 复检项目试剂转国产前 3 个月(2010 年 11 月至 2011 年 1 月)和后 3 个月(2011 年 11 月至 2012 年 1 月)再检率、反应重复率 and 不合格相对重合率并做配对 *t* 检验分析及 2012 年 2 月酶免全项目的再检率和反应重复率。结果 复检抗-HIV 试剂转国产后稳定性明显下降, 再检率由 0.20% 提高至 0.44%, 反应重复率由 76.3% 降至 51.4%, 不合格相对重合率由 47.5% 降至 19.6% (*P* < 0.05)。2012 年 2 月再检标本结果显示初检单试剂阳性率低于复检试剂, 初检试剂的再检率明显低于复检试剂。初检试剂稳定性整体好于复检试剂。结论 再检率和反应重复率可以反映检测系统(包括检测试剂)的稳定性, 尽量选用稳定性高的检测试剂; 酶免检测结果的影响因素极多, 用“只要出现一次抗-HIV 检测结果呈反应性就判不合格的标准规程”是不合理的。

关键词:酶联免疫检测; 再检率; 实验室技术和方法
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.10.047 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2013)10-1297-02

2011 年 5 月复检试剂 HBsAg 和抗-HIV 两项目转国内生产后, 先出现了 HBsAg 项目单试剂强阳性且再检标本明显增多, 再检双孔复试结果差异极大(表现为首次检测强阳性, 再检双孔阴性或一孔强阳一孔阴性)的情况。随后还发现 HIV 项目再检标本也明显增多且双孔复试结果重复率明显下降, 因上层领导对艾滋初筛结果判读规则的理解不同, 当然也是为血液安全考虑, 多年来本中心 HIV 项目只要出现 1 次阳性(+)或灰区(?) ($0.8 \leq S/CO < 1$), 该袋血报废且对献血员进行永久屏蔽, 禁止其终生献血。为了了解本实验室酶免检测系统及试剂的稳定性, 从而为检测试剂的选择和献血员屏蔽策略的制定提供依据, 对 HIV 进口试剂转国产前 3 个月(2010 年 11 月至 2011 年 1 月)和后 3 个月(2011 年 11 月至 2012 年 1 月)再检标本结果及 2012 年 2 月酶免全项目的再检标本结果进行统计分析, 现报道如下。

1 材料与方法

1.1 标本来源 HIV 进口试剂项目转国产前、后 3 个月再检标本结果及 2012 年 2 月酶免全项目的再检标本结果。酶免项目灰区(?) 设为 $0.8 \leq S/CO < 1$, 再检标本为: 抗-HIV 单/双试剂检测首次 $S/CO \geq 0.8$ 标本和 HBsAg、抗-HCV 及抗-TP 单

试剂检测首次 $S/CO \geq 0.8$ 的标本。

1.2 仪器与试剂 初、复检分别采用 TecanRSP200 和 TecanRSP150 全自动加样器加样, 再检标本采用移液器(经校准合格)手工加样, 后处理全部采用 FAME24/20 和 FAME24/30 全自动后处理系统; 本中心常规检测试剂。

1.3 方法 再检率 = 再检标本数/检测标本数 $\times 100\%$; 反应重复率 = 再检结果呈(+)或(?)标本数/再检标本数 $\times 100\%$; 不合格相对重合率 = 双试剂呈(+)或(?)标本数/该试剂不合格标本数 $\times 100\%$ 。

1.4 统计学处理 采用 Microsoft Excel2003 进行统计分析。

2 结 果

2.1 HIV 进口试剂转国产前后 3 个月及酶免全项目再检标本结果比较 见表 1~2。

2.2 2012 年 2 月酶免再检统计中结果异常情况 HIV 双试剂检测不合格的标本 7 例, 占反应重复率的 12.3%, 5 例双试剂检测均呈强阳性, 2 例双试剂检测结果有差异, 见表 3; 10 例标本 HBsAg 复检试剂首次检测呈强阳或较强阳性的标本, 该试剂双孔复试均为阴性, 见表 4。

表 1 HIV 进口试剂转国产前后 3 个月再检标本结果比较 (%)

转国产前					转国产后				
检测时间	<i>n</i>	再检率	反应重复率	不合格相对重合率	检测时间	<i>n</i>	再检率	反应重复率	不合格相对重合率
2010 年 11 月	9 897	0.20*	70.0*	40.0*	2011 年 11 月	9 176	0.54	52.0	14.0
2010 年 12 月	9 445	0.22*	85.7*	61.9*	2011 年 12 月	9 238	0.32	50.0	30.0
2011 年 1 月	10 482	0.17*	72.2*	38.9*	2012 年 1 年	6 171	0.44	51.9	18.5
合计	29 824	0.20*	76.3*	47.5*	合计	24 585	0.44	51.4	19.6

*: *P* < 0.05, 与转国产后比较。