

• 论 著 •

循环酶法测定同型半胱氨酸的性能验证

冯品宁¹, 姚真荣¹, 姚少羽¹, 刘 敏¹, 张丹丹²

(1. 中山大学附属第一医院检验科, 广东广州 510080; 2. 广东省中医院检验科, 广东广州 510120)

摘 要:目的 评价循环酶法检测同型半胱氨酸(Hcy)的分析性能。方法 参考美国临床和实验室标准化协会(CLSI)系列文件和有关文献,对 Hcy 试剂盒测定血清 Hcy 的精密度、正确度、分析测量范围、临床可报告范围等方面进行验证和评价,并将实验结果与厂家(宁波美康生物科技股份有限公司)(NingBo Medical System Biotechnology Co., Ltd)提供的分析性能或公认的质量指标进行比较。结果 循环酶法检测血清 Hcy 批内 CV 分别为 1.26%、0.84%,总 CV 分别为 1.36%、1.32%,低于厂家声明的允许总不精密度(10%);两个浓度校准品检测结果与靶值的相对偏倚分别为 3.69%、0.69%,均符合相关的质量要求(小于 10%);分析测量范围为 3.38~51.81 $\mu\text{mol/L}$,厂家线性范围为小于 50 $\mu\text{mol/L}$;最大稀释度为 1:3,临床可报告范围为 3.38~155.43 $\mu\text{mol/L}$ 。结论 宁波美康生物科技股份有限公司生产的 Hcy 试剂盒的主要分析性能达到了厂商声明的性能和有关的质量要求,适合临床应用。

关键词:同型半胱氨酸; 循环酶法; 方法学评价; 性能验证

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.15.033

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)15-2204-03

Evaluation of Hcy assay performance by circulating enzymatic method

Feng Pinning¹, Yao Zhenrong¹, Yao Shaoyu¹, Liu Min¹, Zhang Dandan²

(1. Department of Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong 510080, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Guangdong Provincial Hospital of Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong 510120, China)

Abstract: **Objective** To evaluate analytical performance of homocysteine(Hcy) by circulating enzymatic method. **Methods** Referring to CLSI evaluation project and pertinent literature, and by combining our actual works, we designed a verification procedure and experimental method. By using these above, the precision, accuracy, analytical measurement range, clinical reportable range of Hcy by circulating enzymatic method were evaluated. Results would be compared with the declaration of the manufacturer(NingBo Medical System Biotechnology Co., Ltd) or desirable specifications derived from biologic variation. **Results** The results showed that the within-run CV were 1.26% and 0.84%, and the total CV were 1.36% and 1.32%, less than 10% of the manufacturer's statement. The relative bias between the results measured for calibrator at tow levels and target value was 3.69% and 0.69%, less 10%. AMR was 3.38~51.81 $\mu\text{mol/L}$, and the most suitable dilution rate was 1:3, so the CRR was 3.38~155.43 $\mu\text{mol/L}$. **Conclusion** The analytical performance of Hcy analyzed by circulating enzymatic method is consistent with the standards which manufacturers has proclaimed, so it is conform to the requirements of clinical.

Key words: homocysteine; circulating enzymatic method; evaluation study; performance qualification

国际标准化组织颁布的《医学实验室质量和能力的专用要求》(ISO15189)和我国《医疗机构临床实验室管理办法》均要求实验室必须对引进或改变的检测系统或方法的主要性能进行验证或评价,证实其能够达到临床检测所要求的标准后方可用于临床检测^[1]。最早检测同型半胱氨酸(Hcy)是氨基酸分析法,后经改良,目前常用方法为高效液相色谱法(HPLC)和荧光偏振免疫检测法(FPIA)。HPLC 是经典的参考方法,其操作复杂、试验耗时长、试验数据变异比较大,在临床应用方面逐渐被 FPIA 所取代^[2]。但 FPIA 存在价格昂贵的缺点,所以基层医疗单位不适用于推广。近年来,由于 Hcy 检测技术的发展,对其研究逐渐深入,循环酶法因其快速、简便、灵敏度高,易于自动化等特点,逐渐成为适用于各级实验室的常规检测方法。本文对循环酶法双试剂测定血清 Hcy 进行了方法学评价。

1 材料与方法

1.1 检测系统 Hcy 采用 HITACHI 7180 全自动生化分析仪测定,校准品(批号为 20130902、20131018,可溯源至 NIST

SRM1955)、质控品(批号 20130726、20130511、20131107)由美康公司提供。

1.2 测定原理 样品中的氧化型 Hcy 被还原剂还原成游离型 Hcy,游离型 Hcy 与试剂中的底物和酶发生反应引起吸光度变化,通过检测反应中的吸光度变化的速率,可以计算出待测样本中 Hcy 的浓度。

1.3 检测方法 生化分析仪基本参数设置:反应类型为速率法;波长 340 nm(主)/405 nm(副);37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 10 min,读数时间 23:00~31:00,样品量 8 μL ,R1 量 125 μL ,R2 量 25 μL 。

1.4 实验基本要求 实验前严格按照厂商操作规程进行仪器的保养和校准,以确保仪器处于良好状态。所有实验过程均按照厂商操作规程进行质量控制,确认同批实验的质量控制结果在控的前提下,采用实验数据。

1.5 方法学评价指标

1.5.1 精密度实验 选取同一批号两个浓度水平的 Hcy 质控品,各分装成 20 份,冰冻保存备用。所有实验样本每天批内重复 4 次,连续 5 d,共获得 20 个实验数据。按照 EP15-A2 文

件^[3]计算批内不精密度和总不精密度,并与厂家声明的不精密度进行比较。

1.5.2 正确度实验 参考 EP15-A2 文件^[3],对批号为 20130902、20131018 的标准品进行检测,每个浓度重复测定 2 次,以相对偏差 10%判读正确度性能的可接受性。

1.5.3 分析测量范围验证实验 分析测量范围^[4](AMR)是指患者标本未经任何处理(稀释、浓缩或其他处理),由检测系统直接检测得到的可靠检测范围。根据《中华人民共和国卫生行业标准》颁布的 WS/T 408-2012 文件^[5]《临床化学设备线性评价指南》,选择浓度接近厂家声明的分析测量范围下限和上限的低值标本(L)和高值标本(H),按 8L、7L+1H、6L+2H、5L+3H、4L+4H、3L+5H、2L+H、L+7H、8H 的关系配制,形成系列浓度血清。每个血清在检测系统上重复测定 4 次,记录结果。在重复测量误差符合实验要求的条件下,进行多项式回归分析,判断在实验所涉及的浓度范围内是否为线性。当实验数据判断为非线性时,计算线性偏离。若每个浓度点的线性偏离小于线性允许误差,则实验所涉及的浓度范围即为分析测量范围。本研究设定重复测定误差小于或等于 5%,线性偏差小于或等于 10%为可接受的判断标准。

1.5.4 临床可报告范围验证^[6] 临床可报告范围^[4](CRR)为患者标本经稀释、浓缩或其他处理后,向临床所能报告的结果范围。先进性稀释回收实验,选择 Hcy 浓度在 AMR 内的高值标本 3 份,用生理盐水分别作 2、3、5 倍稀释,检测结果与稀释后的预期值比较,计算回收率,回收率在 90%~110%为可接受性的判断标准,从而确定最大稀释倍数。AMR 上限乘以最大稀释度即为 CRR 上限。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 16.0 统计学软件进行分析,严格按照 CLSI EP15-A 文件所设计的数据处理表格计算不精密度、及进行多元回归计算,回归系数进行 *t* 检验及多元回归汇总采用单样本符号秩检验,以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 精密度实验结果 不同浓度水平 Hcy 测定的不精密度见表 1。验证所得两个浓度水平批内 CV%与总 CV%均小于厂商声明的不精密度,显示该方法的精密度符合相关行业标准要求。

表 1 Hcy 测定的不精密度

样本	均值 (μmol/L)	批内不精密度		总不精密度	
		标准差(μmol/L)	CV(%)	标准差(μmol/L)	CV(%)
水平 1	13.43	0.170	1.26	0.183	1.36
水平 2	30.15	0.255	0.84	0.399	1.32

2.2 正确度实验结果 对美康公司提供的 4 份标准品进行检测,每个浓度重复测定 2 次,结果见表 2,相对偏差小于允许总误差为 10%的质量目标,符合相关行业标准要求。

表 2 正确度实验结果

样本批号	靶值 (μmol/L)	验证值均值 (μmol/L)	绝对偏差 (μmol/L)	相对偏差 (%)
20130902	11.50	11.07	-0.43	-3.69
20130902	34.50	34.26	-0.24	-0.69
20131018	9.80	9.53	-0.27	-2.76
20131018	33.50	33.18	-0.32	-0.96

2.3 分析测量范围实验结果 对重复测定的数据组采用格拉布斯法进行离群值检验后,得到 9 个系列浓度样本 Hcy 的重复测量结果的均值分别是 3.38、14.88、22.15、29.47、34.59、39.92、44.38、48.03、51.81 μmol/L。以相对浓度为 X,实际浓度为 Y,进行多项式回归分析,结果见表 3(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。自由度为 32,双侧检验可信度为 95%时,*t*=2.037,三次多项式模型非线性系数 b2、b3 的 *t* 值均小于 2.037,因而三次非线性系数 b2 和 b3 与 0 差异有统计学意义(*P*>0.05);自由度为 33,双侧检验可信度为 95%时,*t*=2.035,二次非线性系数 b2*t* 值也小于 2.035,二次非线性系数 b2 与 0 差异无统计学意义(*P*>0.05)。所以本实验测量的最适模型为一次方程式 Y=5.804X+3.087,符合线性要求。所以 AMR 确定为 3.38~51.81 μmol/L。

2.4 临床可报告范围实验结果 取 Hcy 浓度分别为 30.65、35.08 μmol/L 的两份血清样本,用生理盐水分别作 1:2、1:3、1:5 稀释,计算稀释回收率,结果见表 4(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。两份样品的最大稀释度均为 1:3。AMR 上限乘以最大稀释度即为 CRR 上限,故本测定系统检测 Hcy 的 CRR 为 3.38~155.43 μmol/L。

3 讨 论

一种新的检测方法是否能够满足临床要求是临床检验管理的重要任务^[7-8]。根据美国《临床实验室改进法规修正案》(CLSI'88)和 ISO15189 医学实验室认可的要求,一种分析方法最重要的评价指标包括不精密度、不准确度、分析灵敏度、分析测量范围、临床可报告范围,在新方法应用于临床前,必须对这些指标进行评价。由于 Hcy 在低值范围内并无太大的临床价值,故本实验对除了分析灵敏度的其他指标都进行了评价,旨在为实验室更全面地判断酶循环法的性能。

检测方法的精密度和正确度是最根本的评价指标。对于精密度最全面科学的文件是 CLSI EP5-A^[3]文件。但由于该文件对精密度的评价方案操作繁复,耗时过长,且成本较高,所以本实验采用了 CLSI EP15-A 提供的简化方案,采用美康公司提供的两个水平的质控品作为实验样本,每天测 4 次,连续 5 d,得到批间 CV 和总 CV,方法简便,适用于临床。由实验结果可知,Hcy 浓度在 13.43 μmol/L 和 30.15 μmol/L 时,总 CV 分别为 1.36%和 1.32%,远低于国际公认的质量标准(允许不精密度小于 6%)^[9]。由于 Hcy 的测定缺乏参考方法,因此不能采用 CLSI EP9-A2 规定的方法,用待评价方法的结果与参考方法的结果进行比对和偏倚评估。本实验依据 CLSI EP15-A 文件^[3],检测方法的正确度可通过对定值参考物的检测予以确认,文件中所指的定值参考物包括用于校正检测系统的校准品。本实验依据该方法,对厂家提供的 4 份标准品(可溯源至 NIST SRM1955)进行检测,将结果与靶值比对,相对偏差在-3.69%~-0.96%范围,达到国际公认的质量标准(允许相对偏差小于 10%)^[9]。

AMR 和 CRR 也是检测方法的重要评价指标。本实验依据《中华人民共和国卫生行业标准》颁布的 WS/T 408-2012 文件^[5]《临床化学设备线性评价指南》,对循环酶法测定 Hcy 的线性参数进行验证。所选浓度水平覆盖了预期测定范围的高限(由于未对该检测方法的分析灵敏度进行评价,所以测定下限未涉及)和医学决定水平。直接对数据组进行线性分析,得到线性相关系数 *r*²=0.9681,低于卫生行业标准要求的 0.995,但线性评价是为临床服务的,只有结合临床实际情况才具有实用价值。对数据组进行多项式回归分析,当(下转第 2208 页)

3.00%，与金黄色葡萄球菌能产生凝固酶、杀白细胞素等致病物质，可经多种途径侵入机体，引起局部组织的化脓性感染，特别是剖宫产时更容易侵入感染有关。

本组资料显示，大肠埃希菌中产 ESBLs 的大肠埃希菌检出率低于全国^[8]，笔者认为原因可能跟本院的患者来源只有产妇，标本类型少、标本量少等有关，不能简单地认为本院的中产 ESBLs 比全国的低。本组多重耐药菌中 ESBLs 介导的、非 ESBLs 介导的与蔡木发的研究基本一致^[9]，而产 ESBLs 株对青霉素类、头孢菌素类、喹诺酮类、氨基南和复方磺胺甲噁唑等抗菌药物的耐药率均显著高于非产 ESBLs 株。

本组资料显示，PROM 检出的金黄色葡萄球菌中，MRSA 的检出率低于全国^[10]。耐药率均显著高于 MSSA。CLSI 指出对红霉素耐药、克林霉素敏感或中介的葡萄球菌，应做诱导克林霉素耐药试验(D 试验)，本次监测金黄色葡萄球菌和凝固酶阴性葡萄球菌 D 试验阳性率低于国内报道^[11]。

本组资料显示，无乳链球菌对青霉素 G 和氨苄西林还没出现耐药的情况，适合孕晚期并检出无乳链球菌的孕妇作为预防用药，也合适因无乳链球菌感染引起产褥感染的产妇。白色念珠菌药敏方面，监测结果与国内的相关报道一致^[12]。

合理应用抗菌药物及按细菌的药敏选择抗菌药物是降低医院感染的有效措施之一，而无指征的预防用药增加了耐药菌致病的机会和治疗难度。本研究通过对本院近 3 年产科病房胎膜早破产妇的生殖道感染病原菌的构成及抗菌药物耐药性的分析，为临床合理选用药物提供参考，为控制医院感染的发生提供实验室依据，以助合理用药，减少耐药菌株产生，尽最大可能地减少患者经济负担避免必要的损失。

参考文献

[1] 乐杰. 妇产科学[M]. 7 版. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 137.
[2] 刘秀卿, 张镇松. 1 898 例胎膜早破临产孕妇宫颈分泌物培养及药敏

分析[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(1): 66-67.
[3] 贾卉, 杨军玲, 董玲, 等. 围生期生殖道感染病原菌构成及耐药分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2011, 21(24): 5305-5307.
[4] 王文慧, 肖玉会, 王淑兰. 胎膜早破孕妇宫颈分泌物细菌培养结果分析[J]. 现代中西医结合杂志, 2011, 20(2): 150-152.
[5] 王建红. B 群链球菌感染与胎膜早破[J]. 国际检验医学杂志, 2013, 34(18): 2459-2460.
[6] Yancey MK, Duff P, Clark P, et al. Peripartum infection associated with vaginal group B streptococcal colonization[J]. Obstet Gynecol, 1994, 84(5): 816-819.
[7] Yancey MK, Schuchat A, Brown LK, et al. The accuracy of late antenatal screening cultures in predicting genital group B streptococcal colonization at delivery[J]. Obstet Gynecol, 1996, 88(5): 811-815.
[8] 李耕, 吕媛, 薛峰, 等. 卫生部全国耐药监测网(Mohnarín)2011~2012 革兰阴性菌耐药监测报告[J]. 中国临床药理学杂志, 2014, 30(3): 260-277.
[9] 蔡木发, 李静, 罗虹烈, 等. 大肠埃希菌超广谱 β -内酰胺酶的检测及多重耐药性分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2014, 24(10): 1496-1499.
[10] 郑波, 吕媛. 卫生部全国耐药监测网 2011~2012 革兰阳性菌耐药监测[J]. 中国临床药理学杂志, 2012, 28(12): 888-892.
[11] 曹二龙. 葡萄球菌属红霉素诱导克林霉素的耐药性检测[J]. 基层医学论坛, 2014, 18(10): 1309-1310.
[12] 伊慧霞, 苏娜, 刘玉梅, 等. 临床念珠菌感染分布及耐药性分析[J]. 国际检验医学杂志, 2014, 35(21): 2997-2998.

(收稿日期: 2015-03-21)



(上接第 2205 页)

直线的偏离小于具有临床意义的临界值，且精密度较高时，则可判定数据的非线性不具有临床意义^[4]。所以，该试剂盒在实验所覆盖的浓度范围内是线性的。

循环酶法是目前临床测定血清 Hcy 最新的一种化学方法，与以前免疫、电泳、色谱等方法相比，更具有操作简单、可自动化等优点，随着对同型半胱氨酸的临床研究的深入，其定量测定意义越来越受到重视，因此本试验的检测方法及试剂具有很高的推广及应用价值。本实验采用一系列较为简化且合理的方法对其进行方法学评价，为临床实验室评价新方法提供了较为实用的方案。

参考文献

[1] 魏是, 从玉隆. 医学实验室质量管理与认可指南[M]. 北京: 中国计量出版社, 2004: 59-75.
[2] 吕伟标, 罗玲. 检测同型半胱氨酸的方法学进展和评价[J]. 临床和实验医学杂志, 2004, 7(7): 175-176.
[3] Clinical Laboratory Standards Institute. EP15-A User demonstration of performance for precision and accuracy[S]. Wayne, PA,

USA: CLSI, 2004.
[4] 李萍. 临床实验室管理学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2006.
[5] 康凤凤, 王治国. ISO15189:2012 与临床检验定量检测方法确认和性能验证[J]. 临床检验杂志, 2013, 31(12): 881-884.
[6] 毕渡, 吕元. 定量检测方法学性能验证的系统设计[J]. 中华检验医学杂志, 2007, 30(1): 143-145.
[7] 张秀明, 庄俊华. 临床化学发光免疫法检测 AFP 的分析性能验证与实验方法[J]. 中华检验医学杂志, 2007, 30(2): 1293-1297.
[8] 张秀明, 温冬梅. 电化学发光免疫法检测 NT-proBNP 的分析性能评价[J]. 中华检验医学杂志, 2011, 34(1): 1152-1155.
[9] Ricos C, Alvarez V, Cava F, et al. Current databases on biological variation: pros, cons and progress[J]. Stand J Clin Lab Invest, 1999, 59(1): 491-500.

(收稿日期: 2015-04-28)

