

• 论 著 •

# 两种循环酶法检测血清同型半胱氨酸结果的可比性及偏倚评估

许广伟, 王玉洁

(威海卫人民医院检验科, 山东威海 264200)

**摘要:**目的 对两种不同厂家同型半胱氨酸(Hcy)诊断试剂测定结果的可比性及偏倚评估进行研究,为血清 Hcy 诊断试剂的试验室认可提供试验数据。方法 依据美国临床试验室标准化协会(CLSI)中的 EP9-A2 文件,用上海华臣和深圳奥萨试剂在 Hitachi7600-020 全自动生化分析仪上对 40 份患者血清分别进行 Hcy 测定,其中以华臣试剂为参比方法,以奥萨试剂为试验方法。用线性回归分析对医学决定水平处的预期偏倚和可信区间进行计算,根据生物学变异导出的可允许偏倚为标准,判断试剂的临床可接受性。结果 两种试剂对患者血清 Hcy 测定结果显示,方法内重复性良好,无离群点。在医学决定水平处的系统偏倚临床可以接受。结论 同一试验室一个检测项目存在 2 个或 2 个以上的试剂时,应进行试剂间的方法比对及偏倚评估,判断其临床可接受性,以保证检验结果的可比性。

**关键词:**同型半胱氨酸; 诊断试剂盒; 方法学比对

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.09.025

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)09-1225-03

## Comparability of results and bias estimation of two kinds of enzymatic cycling assay for detecting serum Hcy

Xu Guangwei, Wang Yujie

(Department of Clinical Laboratory, Weihaiwei People's Hospital, Weihai, Shandong 264200, China)

**Abstract:** **Objective** To study the comparability of results and bias evaluation of two different of homocysteine (Hcy) diagnostic reagent produced by different manufacturers to provide the experimental data for laboratory accreditation of Hcy diagnostic reagent. **Methods** According to EP9-A2 file of United States Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI), Shenzhen OSA reagents and Shanghai Huachen(HC) reagent were adopted for detecting Hcy by the Hitachi7600-020 automatic biochemical analyzer on 40 serum specimens from the patients, in which the HC reagent was taken as reference method and the OSA reagent as the laboratory method. The linear regression analysis was used to calculate the expected bias and the confidence interval at the medical decision level. With the biological variation derived allowable bias as the standard, the clinical acceptability of reagents was judged. **Results** The detection results of serum Hcy by two kinds of reagent showed that the method reproducibility was good without outliers. The systematic bias at the medical decisions level was clinically acceptable. **Conclusion** If 2 or more than 2 reagents exist in a single item in the same laboratory, the method comparison and bias estimation should be performed for judging their clinical acceptability in order to ensure the comparability of the test results.

**Key words:** homocysteine; diagnostic reagent kits; methodology comparison

20 世纪 90 年代后期,对围绕同型半胱氨酸(Hcy)与心血管病的关系展开了大量研究,证明了血清 Hcy 水平是心脑血管疾病的一个独立危险因素,其检测已受到了世界各国的广泛重视<sup>[1]</sup>。但由于目前使用的试剂盒大部分是国外进口试剂,价格昂贵,其推广有一定的阻力。随着中国生物医学的发展,已有多家生产 Hcy 测定试剂的国内厂家,其与进口试剂测定结果是否存在差异以及测定结果的可比性是广受关注的问题。本文依据美国临床试验室标准化协会(CLSI)指南文件 EP9-A2 的要求对两种采用不同循环酶法测定 Hcy 的诊断试剂进行比对及偏倚的评估<sup>[2]</sup>,现报道如下。

### 1 材料与方法

**1.1 材料** 连续 6 日收集威海卫人民医院门诊及住院患者当天进行 Hcy 检测的血清共 40 份,要求血清新鲜、无黄疸、无溶血、无严重脂血,浓度分布均匀且范围在 3~48  $\mu\text{mol/L}$  范围内(在两种试剂规定的线性范围内)。其中华臣试剂与奥萨试剂的试验室参考值基本一致:分别为 0~15  $\mu\text{mol/L}$  和 0~14.8  $\mu\text{mol/L}$ ,至少保证 50% 的标本浓度在 4~15  $\mu\text{mol/L}$  范围之外。

**1.2 仪器与试剂** 采用日本日立公司生产的 HITACHI7600-020 全自动生化分析仪。华臣试剂来自上海华臣生物试剂有

限公司,为进口分装试剂,采用酶循环速率法进行测定,试剂批号为 HC53T03。奥萨试剂来自深圳奥萨制药有限公司,为国内自主研发试剂,也采用酶循环速率法进行测定,试剂批号为 AB200。

**1.3 方法** 试验前对仪器进行常规维护与保养,待仪器稳定后,用两种试剂厂家自带校准液对两种方法分别进行校准,两校准品皆可溯源至国际标准参考物质。使用德国 Diasys 公司 Hcy 质控品进行监测,在控后分别在 HITACHI7600 全自动生化分析仪上使用两种不同的检测试剂对每份标本进行测定, Hcy 的检测严格按照各厂商试剂盒的说明书进行。具体步骤如下:每天随机抽取 8 份标本,分别用 1~8 标号,每份标本各测定 2 次,第一次按 1~8 顺序上机进行测定,第二次按 8~1 顺序上机进行测定,当天所有测定在 2 h 内完毕,双份测定取均值为对比数据,连续测定 5 d。本实验室长期用上海华臣试剂,室内质控日间变异系数(CV)小于 3%,室间质评成绩优异。故以华臣试剂作为参比方法(X 方法),奥萨试剂作为试验方法(Y 方法),进行方法间的比对试验。

**1.4 统计学处理** 两种诊断试剂的测定结果按照 CLSI EP9-A2 指南要求进行统计学分析,数据收集过程中不采用已明确有人为误差的结果。主要内容有:(1)两种试剂的测定均值;

(2)方法内双份数据的离群值检验;(3)方法间离群值的检验;(4)X 值合适范围的检查及散点图和偏倚图的绘制;(5)计算线性回归;(6)计算预期偏倚及可信区间。用 Excel 2003 和 SPSS19.0 软件对数据进行录入和统计分析。

2 结 果

2.1 两种试剂的测定均值 采用两种试剂分别对所有标本进行 Hcy 测定,每种方法所有结果的均值分别为: $\bar{X}=21.088$  和  $\bar{X}=20.934$ ,其中  $\bar{X}$  代表参比方法的均值, $\bar{Y}$  代表试验方法的均值,见表 1。

2.2 方法内双份数据的离群值检查 分别计算每个样品参比方法和试验方法内两次测定差值的绝对值  $DX_i=|X_{i1}-X_{i2}|$ ,  $DY_i=|Y_{i1}-Y_{i2}|$ , (其中 i 代表样本数)。分别计算每个方法双份测定的差值绝对值的均值:  $\overline{DX}=\sum DX_i/N$ ,  $\overline{DY}=\sum DY_i/N$ , (其中 N 为样品数,  $N=40$ ) 以  $4\overline{DX}$  和  $4\overline{DY}$  为可接受限,方法 X 和 Y 测定值的任一绝对差值均小于可接受限,说明两方法重复性好,未有离散值,符合相关性试验要求,见表 1。

2.3 方法间离群值检验 计算方法 X 和 Y 测定值之间的绝对差值  $E_{ij}$  (j 代表样本的重复测定次数) 及其平均值  $\bar{E}=\frac{1}{2N}\sum_i^N\sum_j^2E_{ij}$  结果详见表 1,以  $4\bar{E}$  为可接受限,方法 X 和 Y 的所有绝对差值均小于可接受限,说明两方法间数据无离群值存在。

表 1 两种试剂各统计量的计算

	参比方法 X	试验方法 Y	
均值	$\bar{X}, \bar{Y}$	21.088	20.934
方法内平均绝对差值	$\overline{DX}, \overline{DY}$	0.367 5	0.404 7
可接受限	$4\overline{DX}, 4\overline{DY}$	1.470	1.619
方法间平均绝对差值	$\bar{E}$	0.18	
可接受限	$4\bar{E}$	0.72	
方法内最大绝对差值	$MAX(DX_i; DY_i)$	1.26	1.56
方法间最大绝对差值	$MAX(E_{ij})$	0.71	

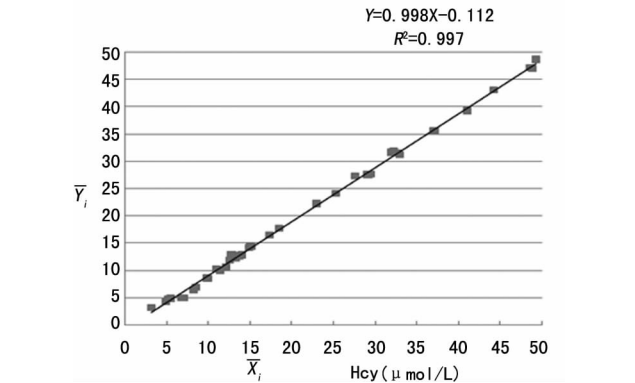


图 1 每个样品的 X 和 Y 方法均值比较散点图

2.4 X 值合适范围的检查及散点图和偏倚图的绘制 将数据导入 SPSS19.0 进行线性回归与散点图分析,图 1 是每个样品重复测定均值的散点图,横轴用  $\bar{X}$  表示参比方法单个样本的测定均值,纵轴用  $\bar{Y}$  表示试验方法单个样本的测定均值。图 2 为两种试剂单个结果的差值对两种方法均值的偏倚图:横轴为(试验方法的均值  $\bar{Y}$ +参比方法的均值  $\bar{X}$ )/2,纵轴为(单个试验方法的结果  $Y_{ij}$ -单个参比方法的结果  $X_{ij}$ )。X 取值范围是否够宽,可用相关系数 r 来做粗略的估计。由图 1 可知,两种试剂的相关系数为 0.998 大于 0.975,说明两种试剂取值范围线性关系良好,回归统计的截距和斜率均可靠。由图 2 可知:奥萨试剂单个测定值对华臣试剂单个测定值的相比偏差较小,

偏差值分布较合理。

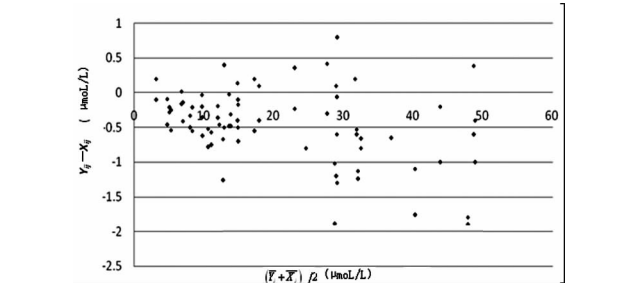


图 2 两种试剂单个结果的差值对两种方法均值的偏倚图

2.5 计算线性回归 将所有数据导入 SPSS19.0 统计两种方法的线性回归方程为:  $Y=0.988X-0.108$ 。

2.6 计算预期偏倚及可信区间 可用线性回归统计方法计算 Hcy 医学决定水平  $X_c$  处的预期偏倚  $B_c$  和  $B_c$  的 95% 可信区间,  $B_c$  的估计值用  $B_c$  表示,用公式  $B_c=X_c-Y_c$  求得,其中  $Y_c$  为试验方法的预期值,其计算公式如下  $Y_c=a+bX$ 。然后求得  $B_c$  的标准误  $S_{xy}=\sqrt{\frac{\sum(Y_{ij}-\bar{Y}_{ij})^2}{2N-2}}=0.306$  (其中  $Y_{ij}=a+bX_{ij}$ , 为试验方法的预期值)。  $B_c$  的 95% 可信区间有以下公式求得  $[B_{c\text{ low}}, B_{c\text{ high}}]=B_c\pm 2s_{xy}\sqrt{\frac{1}{2N}+\frac{(X_c-\bar{x})^2}{\sum\sum(x_{ij}-\bar{x})^2}}$ 。允许分析偏倚  $E_A$  可根据 Hcy 的个体内生物学变异算得,具体结果见表 2。

表 2 2 种试剂 Hcy 测定结果的临床可接受性偏倚分析

医学决定水平 $X_c(\mu\text{mol/L})$	X <sub>c</sub> 处允许分析偏倚		$Y_c$	$B_c$	B <sub>c</sub> 的 95% 置信区间	
	$E_A\%$	$E_A$			$B_{c\text{ low}}$	$B_{c\text{ high}}$
15	2.97	0.45	14.71	0.29	0.22	0.36

3 讨 论

检验医学的发展带动了生物试剂产业的迅猛发展。不同诊断试剂对同一项目检测结果的可比性检验和偏倚评估是申请临床医学实验室认可必不可少的内容,检测结果的可比性为不同种试剂间检测结果的互认提供了保障<sup>[3-4]</sup>。国内检验试剂的生产和临床试验参考系统并不十分完善,多数实验室按照自己的意愿和实际情况,选择相应的仪器、试剂、质控和操作流程,组合成本实验室的检测系统。怎样寻找这些检测结果溯源性和可比性,是一个极大的现实问题<sup>[5-7]</sup>。实验室准备用一个新的检测系统或测定方法在患者标本测定前,和原有的检测系统或公认的参比方法一起检测一批患者样品,从测定结果间的差异了解新检测系统或方法引入后的偏倚,以说明新检测系统或方法替代原有检测系统或方法不会对临床结果的判断造成明显影响<sup>[8]</sup>。

本文按照 CLSI 指南文件 EP9-A2 的要求,对两种 Hcy 试剂的测定结果进行比对及偏倚评估,计算出两种试剂医学决定水平处的预期偏倚估计值及 95% 可信区间,但美国临床实验室改进修正法规<sup>88</sup>(CLIA'88)中并未给出 Hcy 的允许偏倚,根据 1999 年国际临床化学和检验医学联合会(IFCC)和 ISO 技术委员会确定的建立性能目标优先方法的分级系统,基于生物学变异的一般质量规范是处在分级系统的第二级,基于法规和室内质量评价的质量规范(CLIA'88)则处于第四级,即基于生物学的变异质量规范更客观、更接近临床需要。基于调查系列结果显著性改变的数学模式已显示出在(下转第 1228 页)

0.683 8,  $r_2 = 0.692\ 6$ ); IDA 患者血清 Fer、EPO、Fol、VitB<sub>12</sub> 4 项指标与其健康对照组相关数据比较经 *t* 检验, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), IDA 患者 Fer、Fol 和 VitB<sub>12</sub> 水平低于健康对照组, 而 EPO 水平高于健康对照组。

### 3 讨 论

贫血可以被分为多种类型, 导致贫血的原因也是多方面的。IDA 的病程进展包括储存铁缺乏、缺铁性红细胞生成最终发展为 IDA。所以说 IDA 是长期负铁平衡导致的最终结果<sup>[2]</sup>。世界卫生组织确定缺铁诊断的标准包括: (1) 血清铁小于 8.95 μmol/L; (2) 转铁蛋白饱和度小于 0.15; (3) Fer < 12 μg/L; (4) 红细胞游离原卟啉大于 1.26 μmol/L<sup>[3]</sup>。其中相对重要的检查是对铁蛋白的检测。铁蛋白是由蛋白质外壳即去铁蛋白与铁核心即铁三价形成的复合物, 具有强大的结合铁和贮存铁的能力, 以维持体内铁含量的相对稳定性, 与体内贮存铁的相关性极好, 只有在体内缺铁的状态下才会出现 Fer 降低<sup>[4]</sup>。本文表 1 显示, Fer 在 IDA 患者体内比健康对照者明显偏低, 平均相差 16.5 倍, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 与文献<sup>[5]</sup>基本符合。

EPO 是由肾脏产生的具有促进红细胞增殖分化作用的糖蛋白类激素, 在非贫血状态下体内水平极低, 但缺氧等条件会导致红细胞和(或)血红蛋白水平低下的状态下上升 1 000 多倍。一般临床上对 IDA 的诊断并不把它作为诊断标准, 而本次研究发现在 IDA 患者组 EPO 的检测平均值为 (289.9 ± 93.6) mIU/mL, 相对于健康组平均值 (13.9 ± 5.1) mIU/mL 明显偏高, 且具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 可以推测由于机体贮存铁消耗殆尽出现 IDA 贫血状态, 机体出现缺氧情况, 从而引发 EPO 代偿性增加, 以满足机体对红细胞携氧的需求<sup>[6]</sup>。

Fol 与 VitB<sub>12</sub> 缺乏后会引起 DNA 合成障碍, 是导致巨幼细胞性贫血的主要原因之一。可是从表 1 发现, 在 IDA 患者组与健康对照组的对比中, Fol 与 VitB<sub>12</sub> 的体内水平也有一定

变化, IDA 组的两个指标分别明显低于健康对照组, 并且这种差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )<sup>[7]</sup>。所以 Fol 与 VitB<sub>12</sub> 的检测不仅在巨幼细胞性贫血的诊断中具有很高的临床价值, 在 IDA 患者的诊断过程中也具有一定的诊断价值。

综上所述, 贫血作为一种临床表现, 导致的原因是多种多样的。随着越来越多关于某种疾病致病因素或者其真正的致病因素的发现, 以及复杂疾病的出现, 要求研究者要以更加广阔的视角去诊断疾病。单就 IDA 来讲, 它的主要原因是由于铁供应和(或)贮存铁的缺乏引起, 但笔者也发现 EPO、Fol、VitB<sub>12</sub> 也会出现相应一些变化。由此可以说明, 在临床上对临床表现不明显的 IDA, 可以联合以上 3 项指标来进行诊断、治疗以及预后的判断。

### 参考文献

[1] 邓家栋. 邓家栋临床血液学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2001: 511-514.

[2] 孙金芳, 朱建斌. 缺铁性贫血的研究进展[J]. 中国综合临床, 2001, 17(8): 569-570.

[3] 叶任高, 陆再英. 内科学[M]. 6 版. 北京: 人民卫生出版社, 2004: 564-568.

[4] 王鸿利, 尚红, 王兰兰. 实验诊断学[M]. 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 60-61.

[5] Weiberg ED. Iron promot the growth of tumor cells[Z], 1992: 125.

[6] Shojania AM, von Kuster K. Ordering folate assays is no longer justified for investigation of anemias, in folic acid fortified countries[J]. BMC Res Notes, 2010, 3(3): 22.

[7] Fernández-Baoares F, Monzón H, Forné M. A short review of malabsorption and anemia[J]. World J Gastroenterol, 2009, 15(37): 4644-4652.

(收稿日期: 2014-12-27)

(上接第 1226 页)

一个实验室用于分析同一项目两个方法之间的允许差值设置质量规范, 其公式为: 方法间的允许差值小于 0.33CVI<sup>[9]</sup>。在 James Westgard 网站上可查的最新的生物学变异数据, 其中 Hcy 的个体内生物学变异 CVI 为 9%, 方法间允许偏倚百分数: EA% = 0.33CVI = 0.33 × 9% = 2.97%。本例将医学决定水平处的允许偏倚百分数转换成具体数值, EA = 2.97% × 15 = 0.45。由表 2 可知 EA 大于 的 95% 可信区间上限 0.36, 这说明预期偏倚小于可接受偏倚的概率很高(大于 97.5%), 即两种试剂的方法性能相当, 可以接受。

用于检测 Hcy 的方法较多, 包括高压液相色谱法(HPLC)、酶联免疫吸附检测法(ELISA)、放射免疫分析法、荧光偏振免疫分析法等, 然而上述检测方法所使用的仪器或试剂较为昂贵, 操作步骤繁杂, 无法在临床实验室中广泛应用。循环酶法是利用酶的底物特性, 放大靶物质的检测方法, 具有快速、简便、灵敏度高、易于自动化等特点而被广泛应用<sup>[10]</sup>, 虽然本文研究的两种试剂均使用循环酶法, 但具体的底物酶、工具酶、中间产物皆不同, 同时其制作工艺及适用仪器等都有一定的差异, 其检测结果不可能完全一致。本文根据 CLSI-EP9-A 相关文件, 选择新鲜患者的血清, 使用华臣诊断试剂和奥萨诊断试剂, 对 Hcy 的检测结果进行比对及偏倚评估, 为不同 Hcy 诊断试剂的可靠性和临床应用提供了科学数据。

### 参考文献

[1] 王清涛, 秦晓光. 同型半胱氨酸的检测和临床应用[J]. 中华检验

医学杂志, 2006, 29(3): 193-195.

[2] National Committee for Clinical Laboratory Standards. Ep9-A2 Method comparison and bias estimation using patient samples: Approved guideline-Second edition[S], Wayne, PA, USA: NC-CLS, 2002.

[3] 邢跃雷, 张忠, 鲁鸿昊, 等. 两种胱抑素试剂盒的方法学比较研究[J]. 标记免疫分析与临床, 2011, 18(1): 38-40.

[4] 阳苹, 张莉萍, 肖勤, 等. 实验室内不同检测系统比对周期及比对方案探讨[J]. 重庆医学, 2011, 40(3): 253-255.

[5] 魏昊, 丛玉隆. 中国实验室国家认可委员会技术委员会医学分委会. 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: 72-75.

[6] 刘怀平, 孙金芳, 陈欣, 等. 不同检测系统 21 项常规生化结果的比对与临床可接受性评价[J]. 中国实验诊断学, 2009, 13(10): 1406-1409.

[7] 陈锐, 王治海, 金静, 等. 不同进口试剂在罗氏检测系统上检测结果的可比性分析及偏倚评估[J]. 中国实验诊断学, 2010, 14(8): 1320-1321.

[8] 冯仁丰. 临床检验质量管理技术基础[M]. 上海: 上海科学技术文献出版社, 2003: 185.

[9] 王治国. 临床检验生物学变异与参考区间[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2012: 40-42.

[10] 李莹莹, 顾向明. 循环酶法检测血清同型半胱氨酸的分析性能评价[J]. 检验医学与临床, 2014, 11(4): 512-513.

(收稿日期: 2015-01-14)