

• 论 著 •

## 速率法测定血浆谷氨酸脱氢酶活性的分析性能验证

李 敬, 刘定海, 邹 宁, 许 丹

(四川省德阳市人民医院检验科, 四川德阳 618000)

**摘要:**目的 对速率法测定血浆谷氨酸脱氢酶(GLDH)活性进行方法学评价,以确定其分析性能是否符合临床实验室应用的要求。方法 由 ADVIA 2400 全自动化分析仪和武汉生之源生物科技股份有限公司的 GLDH 检测试剂组成检测系统,参照 CLSI 提供的临床检验方法学评价方案 EP5-A2、EP 6-A、EP7-A2、EP15-A 分别对该检测系统的精密度、线性范围、干扰、正确度等性能进行评价。结果 该检测系统的高、低 2 个 GLDH 水平的批内 CV 分别为 3.09% 和 4.88%,总精密度 CV 分别为 3.83% 和 5.74%;浓度在 2.9~155.4 U/L 的范围内样本,测定结果为线性;干扰物血红蛋白(Hb)=2 g/L;三酰甘油(TG)=5.6 mmol/L;总胆红素(TB)=342  $\mu$ mol/L;维生素 C(Vc)=6 g/L 时,干扰相对偏差从-1.81%到 4.82%不等,对检测结果无明显干扰;正确度验证时偏差 $\leq$ 10.59%。开瓶后 30 d 内试剂吸光度值无明显变化,试剂稳定性良好。结论 该 GLDH 试剂盒的精密度、分析范围、分析特异性、正确度、试剂稳定性等重要指标与试剂盒声明性能指标一致,可以满足临床检测需要。

**关键词:**谷氨酸脱氢酶; 分析性能; 性能验证

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.12.011

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2017)12-1614-03

## Analytical performance verification of continuous monitoring assay for detecting plasma GLDH activity

LI Jing, LIU Dinghai, ZOU Ning, XU Dan

(Department of Clinical Laboratory, People's Hospital of Deyang City, Deyang, Sichuan 618000, China)

**Abstract:** Objective To evaluate the analytical performance of glutamate dehydrogenase (GLDH) activity detection kit using continuous monitoring assay. **Methods** GLDH activity was determined by using continuous monitoring assay on ADVIA 2400 automatic biochemistry analyzer. Performance characteristics, including precision, linearity, interference and accuracy, were evaluated respectively according to EP5-A2, EP 6-A, EP7-A2, EP15-A document issued by Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). **Results** The coefficient of variation (CV) of within-run and total precision at high concentration (45.0 U/L) were 3.09% and 3.83% respectively, CV of within-run and total precision at low concentration (21.1 U/L) were 4.88% and 5.74% respectively. The linear range was 2.9–155.4 U/L. The interference bias of 2 g/L hemoglobin, 342  $\mu$ mol/L bilirubin, 0.3 g/L vitamin C and 5.6 mmol/L triglyceride were less than 4.82%. For the accuracy based tests, the bias was less than 10.59%. **Conclusion** The analytical performance of the GLDH detection kit could achieve the manufacturer's performance indication and meet the clinical needs.

**Key words:** GLDH; analytical performance; performance verification

谷氨酸脱氢酶(GLDH)是一种含锌的线粒体酶,广泛存在于肝脏、肾脏、脑及胰腺等多种组织细胞中,以肝脏的含量最高<sup>[1]</sup>。GLDH 亚细胞定位于线粒体中,所以是一种反映肝实质细胞坏死的指标<sup>[2-3]</sup>。GLDH 与谷氨酸代谢和能量代谢有关,故在一些肿瘤患者中也表达异常<sup>[2,4-6]</sup>。检测 GLDH 活性的常用 ELISA 法和酶比色法,这些方法一般供科研用。而近年来采用连续监测法的 GLDH 检测试剂盒逐渐增多,该法适用于全自动生化仪,可以很大程度地提高检测速度和准确度。本室拟开展 GLDH 测定,作为一个重要的肝损伤指标,验证其分析性能显得尤为重要。

## 1 材料与方法

**1.1 仪器与试剂** GLDH 试剂盒及其配套校准品和质控品由武汉生之源生物科技股份有限公司提供,按试剂盒说明书在 ADVIA 2400 全自动化分析仪上设置实验参数,用配套校准品校准,并在室内质控在控后进行标本测定。

**1.2 方法原理** 采用速率法测定 GLDH 活性。样本中的 GLDH 在还原型辅酶 II (NADPH) 的存在下催化  $\alpha$  酮戊二酸与氨反应生成 L-谷氨酸和水,同时 NADPH 被氧化,通过监测 340 nm 处吸光度下降速率即可得出样本中 GLDH 活性。

## 1.3 方法学评价

**1.3.1 精密度试验** 依据 CLSI EP5-A2 文件<sup>[7]</sup>,测定 2 个浓度的患者混合血清,连续测定 20 d,每天测 2 批,批间间隔至少 4 h 以上,每个浓度获得 80 个有效数据,然后计算各浓度水平的重复性和实验室内总精密度。

**1.3.2 线性试验** 依据 CLSI EP 6-A 文件<sup>[7]</sup>,收集 1 份低浓度混合血清(L)、1 份接近预期上限的高浓度混合血清(H),按体积比配制以下 6 个不同浓度的样本:1L、0.8L+0.2H、0.6L+0.4H、0.4L+0.6H、0.2L+0.8H、1H,各浓度梯度样本测定 3 次计算均值。按照 CLSI EP6-A 提供的方案进行数据处理和多元线性回归分析。

**1.3.3 干扰试验** 参考 CLSI EP7-A2 文件提供的方案<sup>[7]</sup>,收集浓度为 16.6 U/L 的混合血清作为基础样本,同时配制干扰物质储存液[血红蛋白(Hb)=40 g/L;三酰甘油(TG)=112 mmol/L;总胆红素(TB)=6 840  $\mu$ mol/L;维生素 C(Vc)=6 g/L]。基础样本和干扰物质储存液按 20:1 的体积比配制干扰样本。各样本测定 2 次求均值,并计算偏差和干扰率。

**1.3.4 正确度验证** 参考 EP15-A 文件提供的方案<sup>[7]</sup>,收集 2 个不同批号的校准品,以其中一个批号的校准品作为校准系统,然后分别检测同一批号 and 不同批号的校准品,重复测定 5 次求均值,并与校准品标示值比较,计算绝对偏差和相对偏差,

以判读是否与厂家声明的性能要求一致。

**1.3.5 试剂稳定性实验** 试剂开瓶后置于 ADVIA 2400 全自动分析仪,每日测定 1 次试剂空白吸光度(A),同时将校准物作为标本,每天测定 1 次,计算测定结果的偏差。

**1.3.6 建立参考区间** 选取来本院体检的 120 名健康人用以建立参考区间,其中男性 65 名,女性 55 名,年龄 21~55 岁,所有对象肝功、肾功等实验室指标无异常,均无心、脑、肝、肾等系统疾病。

2 结 果

**2.1 精密度试验** 精密度评价采用了高(45.0 U/L)、低(21.1 U/L)2 个浓度的临床标本,其重复性 CV 分别为 3.09%、3.83%,室内精密度 CV 分别为 4.88%、5.74%,均低于厂家声明的精密度(批内重复性 CV≤4%,批间 CV≤6%),

可满足临床应用。

**2.2 线性范围实验** 依据 CLSI EP 6-A 的数据处理方法,采用 SPSS17.0 对 GLDH 的预期值与实测值(表 1 中减 0 后的浓度)进行多项式回归分析,其最佳拟合方程为一次多项式,回归方程  $Y=1.016X-1.035$ ,  $R^2=0.999$ 。各个浓度梯度样本的线性偏离 DLi 为 0.13%~2.84%,明显低于厂商声明的偏差(≤15%)。GLDH 在 2.9~155.4 U/L 的浓度范围内呈线性,与厂商声称的 0~150 U/L 的线性范围基本一致,见表 1。

**2.3 干扰试验** 以浓度为 16.6 U/L 的混合血清作为基础样本,干扰物浓度 Hb=2 g/L、TG=5.6 mmol/L、TB=342 μmol/L、Vc=0.3 g/L 时,所产生的偏差从-1.81%到 4.82%不等,明显低于厂商声明的偏差范围(±15%),见表 2。

表 1 GLDH 线性范围实验数据记录表(U/L)

样本配制	1L	0.8L+0.2H	0.6L+0.4H	0.4L+0.6H	0.2L+0.8H	1H
相对量	0	1	2	3	4	5
测量结果 1	3.6	33.2	65.5	97.5	130.1	157.2
测量结果 2	3	32.2	66.1	94.5	129.1	158.4
测量结果 3	2	33.6	63.3	96.5	129.7	159.3
测量均值	2.9	33.0	65.0	96.2	129.6	158.3
减 0 后的浓度	/	30.1	62.1	93.3	126.8	155.4
斜率	/	30.13	31.05	31.1	31.69	31.09
预期值	/	31.01	62.02	93.03	124.04	155.05

注:平均斜率为 31.0;/表示该项无数据。

表 2 不同干扰物对 GLDH 检测的影响

干扰物	重复 1(U/L)	重复 2(U/L)	重复 3(U/L)	均数(U/L)	偏差(%)	干扰率(%)
Hb(2 g/L)	17.0	15.7	16.8	16.50	-0.10	-0.60
TB(342 μmol/L)	17.5	14.9	16.8	16.40	-0.20	-1.20
Vc(0.3 g/L)	19.0	16.7	16.5	17.40	0.80	4.82
TG(5.6 mmol/L)	17.3	14.5	17.1	16.30	-0.30	-1.81
基础样本	17.5	16.0	16.3	16.60	/	/

注:/表示该项无数据。

表 3 GLDH 正确度验证结果

校准品	标示值(U/L)	测定值(U/L)	绝对偏差(U/L)	相对偏差(%)
与校准系统相同批号的校准品	17	15.7	-1.3	7.65
	17	18.1	1.1	6.47
	17	17.7	0.7	4.12
	17	16.5	-0.5	2.94
	17	16.9	-0.1	0.59
与校准系统不同批号的校准品	17	15.6	-1.4	8.24
	17	18.8	1.8	10.59
	17	18.3	1.3	7.65
	17	18.8	1.8	10.59
	17	16.4	-0.6	3.53

**2.4 正确度验证** 参照 EP15-A 文件,采用 2 个不同批次的校准品验证方法的正确度,结果如表 3 所示。测定与校准系统

相同批号的校准品,其结果的相对偏差为 0.59%~10.0%,测定与校准系统不同批号的校准品,其结果的相对偏差为 3.53%~10.59%。以上偏差均小于或接近厂商声明的偏差≤10%,该试剂盒可以确保试验结果的正确度。

**2.5 试剂稳定性** 开瓶后的试剂在 ADVIA 2400 全自动化分析仪,30 d 之内吸光度 A 值无明显改变(R2 吸光度范围为 1.525 1~1.574 5),连续测定标示浓度为 17 U/L 的定标品,30 d 内实测值与标示值的平均偏差为 4.02%,见图 1。

**2.6 参考区间** 120 例健康体检者的 GLDH 结果经 Kolmogorov-smirnov 正态性检验,结果显示偏度系数(skewness)=0.421(标准误 0.221),峰度系数(Kurtosis)=0.334(标准误 0.438), $Z=0.880$ ,双侧  $P=0.422$ ,即呈正态分布。方差分析显示不同性别和不同年龄组间 GLDH 水平无统计学差异( $P>0.05$ )。以 95%可信区间( $\bar{x}\pm 1.96s$ )初步确定参考区间为 4.4~13.3 U/L,略高于试剂说明书提供的参考区间(0~10 U/L)。

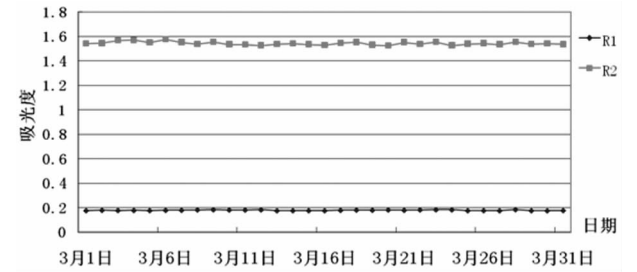


图 1 试剂开瓶后的吸光度变化

3 讨 论

GLDH 广泛存在于肝脏、肾脏、脑及胰腺等多种组织细胞中,以肝脏的含量最高,故可作为肝损伤的标志物<sup>[1]</sup>。GLDH 主要存在于肝细胞线粒体基质及内膜中,当肝细胞坏死及线粒体崩解时 GLDH 才会逸出细胞进入血流,故测定血清 GLDH 活性可作为诊断肝细胞严重病变的指标<sup>[3,8]</sup>。连续监测法是酶活性测定的常用和首选方法,该法有精密度高、特异性好、线性范围宽、易于自动化分析等优点。本室拟开展 GLDH 测定,故首先验证了其分析性能。

本室在 ADVIA 2400 全自动化分析仪上,参考 CLSI 的方法学评价标准文件,并进行部分调整后,对武汉生之源生物科技股份有限公司的 GLDH 试剂盒进行了精密度、分析范围、分析特异性、正确度、试剂稳定性等重要指标进行了性能验证<sup>[7,9]</sup>。由于未查阅到 GLDH 的分析质量要求和生物学变异,故本室将性能评估结果与试剂说明书提供的性能进行比较。

参照 CLSI EP5-A2 文件,测定 2 个浓度混合血清的批内重复性和实验室内总精密度,结果显示,该 GLDH 测定试剂盒在 ADVIA 2400 全自动化分析仪上精密度良好,高(45.0 U/L)、低(21.1 U/L)2 个浓度临床标本的重复性 CV 分别为 3.09%、3.83%,室总内精密度 CV 分别为 4.88%、5.74%,低于厂家声明的近似浓度的 CV(批内重复性 CV≤4%,批间 CV≤6%),说明该试剂可以满足临床测定的需要。按照 CLSI EP 6-A 提供的线性评价的统计学方法,先排除数据中的离群点。然后利用 SPSS17.0 统计软件对数据进行一次直线回归分析和二次、三次曲线拟合。结果显示:该试剂盒的

最佳拟合方程为一次多项式,且在 2.9~155.4 U/L 的浓度范围内呈线性,与厂商声称的 0~150 U/L 的线性范围基本一致。由于客观原因,本研究仅选取了临床上 4 种常见的干扰物质进行干扰实验,干扰实验结果显示:干扰物浓度 Hb=2 g/L、TG=5.6 mmol/L、TB=342 μmol/L、Vc=0.3 g/L 时,所产生的偏差从-1.81%到 4.82%不等,明显低于厂商声明的偏差范围±15%,说明了该试剂盒具有较强的抗干扰能力。参考 EP15-A 文件,采用 2 个不同批次的校准品进行正确度验证,其偏差均小于 10.59%,与厂商声明的偏差(≤10%)接近。另外,该试剂盒开瓶后的放在 ADVIA 2400 全自动化分析仪上,30 d 之内试剂吸光度值无明显变化,同时将校准物作为标本连续测定 30 d,其实测值与标示值的平均偏差为 4.02%,说明试剂稳定性良好。

综上所述,武汉生之源生物科技股份有限公司的 GLDH 试剂盒的精密度、分析范围、分析特异性、正确度、试剂稳定性等重要指标与试剂盒声明性能指标一致,该试剂盒的各项性能可以满足临床测定的需要。

参考文献

[1] Li M, Li C, Aron A, et al. Glutamate dehydrogenase: structure, allosteric regulation, and role in insulin homeostasis[J]. Neurochem Res, 2014, 39(3):433-445.

[2] Aubrecht J, Schomaker S. Serum glutamate dehydrogenase as a potential biomarker of mitochondrial dysfunction[J]. Toxicol Sci, 2013, 134(1):223.

[3] Shelli S, Roscoe W, Jeff B, et al. Assessment of emerging biomarkers of liver injury in human subjects[J]. Toxicol Sci, 2013, 132(2):276-283.

[4] Liu G, Zhu J, Yu M, et al. Glutamate dehydrogenase is a novel prognostic marker and predicts metastases in colorectal cancer patients[J]. J Transl Med, 2015, 13(1):144.

[5] Piras-Straub K, Khairzada K, Gerken G, et al. Glutamate dehydrogenase and alkaline phosphatase as very early predictors of hepatocellular carcinoma recurrence after liver transplantation[J]. Digestion, 2015, 91(2):117-127.

[6] Jin L, Li D, Alesi GN, et al. Glutamate dehydrogenase 1 signals through antioxidant glutathione peroxidase 1 to regulate redox homeostasis and tumor growth[J]. Cancer Cell, 2015, 27(2):257-270.

[7] 张秀明. 浅析定量检验程序分析性能验证实验方案设计[J]. 中华检验医学杂志, 2015, 38(6):428-430.

[8] Jaeschke H, McGill MR. Serum glutamate dehydrogenase—biomarker for liver cell death or mitochondrial dysfunction[J]. Toxicol Sci, 2013, 134(1):221-222.

[9] 王薇, 王治国, 李少男. 临床实验室对厂家声明的精密度和真实度的性能验证要求[J]. 检验医学, 2010, 25(12):1001-1005.

(收稿日期:2016-10-17 修回日期:2017-01-13)