

• 论 著 •

国产循环酶法检测同型半胱氨酸试剂盒的分析性能评价

闫慧慧, 罗金刚, 骆 飞, 陈 敏[△]

(南京军区福州总医院全军临床检验医学研究所, 福州 350025)

摘要:目的 对某国产循环酶法同型半胱氨酸试剂盒进行性能评价。方法 依据 CLSI-EP 相关文件, 在 AU2700 生化仪上对该试剂盒的精密度、线性范围、可报告范围、生物参考区间验证、干扰试验等方面进行性能评价; 并与西门子化学发光法进行比对分析, 计算相关系数和直线回归方程, 根据回归方程计算同型半胱氨酸在医学决定水平处的预期偏倚和预期偏倚的 95% 可信区间并判断偏倚是否可以接受。结果 批内精密性(CV)为 0.94%、1.41%, 批间 CV 为 3.00%、2.60%; 线性范围 5.0~50.0 $\mu\text{mol/L}$, 最大稀释倍数为 20, 临床可报告范围 5.0~1 000.0 $\mu\text{mol/L}$; 血红蛋白 $\leq 5 \text{ g/L}$ 、三酰甘油 $\leq 7.8 \text{ mmol/L}$ 、抗坏血酸 $\leq 1.7 \text{ mmol/L}$ 、胆红素 $\leq 0.68 \text{ mmol/L}$, 对试验无明显干扰; 两种分析仪结果间均呈良好的线性关系, 其相关系数 r 均大于 0.975, 在医学决定水平处的系统偏倚临床可以接受。结论 该国产同型半胱氨酸测定试剂盒在 AU2700 全自动生化仪上的分析性能良好, 可应用于临床检测。

关键词: 同型半胱氨酸; 循环酶法; 全自动生化分析仪; 性能评价

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2016.16.014 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2016)16-2272-04

Evaluation of performance of cycling enzymatic method in detecting homocysteine

YAN Huihui, LUO Jingang, LUO Fei, CHEN Min[△]

(Research Institute of Clinical Laboratory Medicine, Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Region, Fuzhou, Fujian 350025, China)

Abstract: **Objective** To evaluate the performance of the reagent kit for determining homocysteine (Hcy) by the cycling enzymatic method. **Methods** According to CLSI-EP related documents of Hcy kit (enzyme circulation method), the precision linear range, reportable range, biological reference interval validation and interference test performance were evaluated by the AU2700 biochemistry analyzer. The results were compared with chemiluminescence method, and correlation analysis was conducted. By linear regression equation, expected bias and the expected bias of the 95% confidence interval of Hcy at the medical decision level was calculated, and the bias was determined accepted or not. **Results** The within-run coefficient of variations (CV) of repeated serum measurements were 0.94% and 1.41%, while those of the between-run CVs were 3.00% and 2.60%. Linear range was 5.0—50.0 $\mu\text{mol/L}$. Maximum dilution ratio was 20 and clinical reportable range was 5.0—1 000.0 $\mu\text{mol/L}$. The level of hemoglobin, triglycerides, ascorbic acid and bilirubin which was lower than 5 g/L, 7.8 mmol/L, 1.7 mmol/L and 0.68 mmol/L had no obvious interference for the test. The testing results of Hcy by two different analyzers had good linear relationship ($r > 0.975$), the systematic bias at the medical decision level was clinically acceptable. **Conclusion** Hcy determination kit (enzyme circulation method) tested by AU2700 automatic biochemical analyzer in the lab analysis shows good performance, which can be applied to clinical detection.

Key words: homocysteine; circulation enzymatic; automatic biochemical analyzer; performance evaluation

同型半胱氨酸(Hcy)是一种含巯基的氨基酸, 主要来源于饮食摄取的蛋氨酸, 是蛋氨酸和半胱氨酸代谢过程中一个重要的中间产物, 其本身并不参加蛋白质的合成。Hcy 最直接的危害是损伤血管, 对血管内皮产生毒性, 参与动脉粥样斑块的形成等, 是心脑血管疾病的一个独立危险因素, 高 Hcy 水平可以反映相关疾病的危险程度^[1]。近年来, 随着循环酶法检测同型半胱氨酸试剂盒的大量上市, Hcy 检测已在国内各级医院广泛开展, 其检测性能也引起了检验工作者的重视。本文对一新上市国产试剂盒的检测性能进行了详细分析, 现报道如下。

1 材料与方法

1.1 评价系统

1.1.1 仪器 Olympus AU2700 全自动生化分析仪。

1.1.2 试剂 漳州片仔癀诊断技术有限公司产同型半胱氨酸测定试剂盒及其配套校准品和质控品(试剂批号: 150129-0307A, 校准品批号: 2015030301, 质控品批号: 2015030303)(注: 高值质控品为自配混合血清)。

1.1.3 检测原理 Hcy 在 Hcy 甲基转移酶及 S-腺苷 Hcy 水解酶的共同作用下被循环放大, 同时产生腺苷。腺苷被水解成氨和次黄苷, 氨在谷氨酸脱氢酶催化下使 NADH 转化成 NAD^+ , 在 340 nm 处检测反应吸光度, 其变化率与 Hcy 的浓度成正比^[2]。

1.1.4 检测参数 采用两点速率法, 主波长 340 nm, 样本 13 μL , R1 试剂 240 μL , R2 试剂 65 μL , 反应时间 10 min。

1.2 对照系统 西门子 Centaur XP 全自动化学发光仪及其配套检测试剂、校准品和质控品(试剂批号: 088166, 校准品批号: C8842, 质控品批号: 23603)。其检测原理为采用直接化学发光技术进行的竞争性免疫测定方法。样品中不同形式的 Hcy 通过还原剂还原成游离 Hcy。然后游离的 Hcy 通过酶试剂转化成 S-腺苷甲硫氨酸(SAH)。为得到标记试剂中用吡啶酯标记的有限数量的 SAH 抗体, 样品中转化后的 SAH 和与固相试剂中顺磁性粒子共价偶合的 SAH 进行竞争。

1.3 样本 本院门诊、住院患者及健康体检者的血清样本。

1.4 方法 上述 2 个检测系统,每天先测定 2 个水平质控品,按实验室室内质控规则判断质控在控后,再进行性能评价和比对实验。

1.4.1 性能评价 依据 CLSI-EP 相关文件,在 AU2700 生化仪上对循环酶法 Hcy 测定试剂盒进行精密度(CV)、线性范围、可报告范围、生物参考区间验证、干扰试验等方面进行性能评价,并与试剂厂家声明的参数进行比较。

1.4.2 比对试验 依据 EP9-A2 文件,准备 40 例样本,浓度覆盖生物参考区间,用化学发光法作为参比方法(X 方法),循环酶法作为试验方法(Y 方法)进行方法间的比对试验。40 例

标本分 5 天测定,每天测定 8 例,先将标本按照 1 到 8 排列顺序检测,之后 8 到 1 排列反向检测,测试在 2 h 内完成。

1.5 统计学处理 采用 Excel2007 进行数据处理,相关分析采用线性相关,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 精密度试验 根据 CLSI EP-5A 文件进行精密度检测,循环酶法取低值质控液和高值标本(接近医学决定水平)各一份,化学发光法取高低质控液各一份,2 h 内连续测定 20 次,计算批内 CV 值。每天测定一次,连续测定 20 d,计算批间 CV 值。批内和批间精密度见表 1。

表 1 循环酶法和化学发光法检测 Hcy 的批内、批间 CV 试验(%, $\bar{x}\pm s$)

样本	循环酶法		化学发光法	
	批内 CV	批间 CV	批内 CV	批间 CV
低值	0.94(14.06±0.16)	3.00(13.55±0.32)	3.26(4.58±0.36)	6.92(4.73±0.33)
高值	1.41(40.35±0.03)	2.60(40.49±0.43)	4.41(14.41±0.87)	6.05(14.60±0.90)

2.2 线性范围试验 依照 CLSI EP6-A2 文件的要求,选择 Hcy 值为 2.7 $\mu\text{mol/L}$ 的低值血清(L)和 51.6 $\mu\text{mol/L}$ 的高值血清(H),按照 L、0.9L+0.1H、0.8L+0.2H、0.7L+0.3H、0.6L+0.4H、0.58L+0.5H、0.4L+0.6H、0.3L+0.7H、0.2L+0.8H、0.1L+0.9H、H 比例配制成 11 个样本,每个样本检测 3 次,计算平均值。采用多项式回归作为分析线性的评价方法,以预期值为 X,以实测均值为 Y,在初步判断无离群值后,使用 Excel 软件进行二元一次、二元二次和二元三次多项式的回归分析。选择最小标准误差的拟合曲线为最适模型。计算最适模型在每个浓度的预期值,其与线性模型的偏离(Dli)应小于 1/2TEa(TEa = 17.7%)。对检测数据拟合的最佳形式为直线,所有数据几乎均落在一条直线上,且数据的

CV 较高。Hcy 线性从 1 到 11 点成线性,回归方程为 $Y=0.997X+0.396(r^2=0.999)$,符合厂商声明的线性范围 5.0~50.0 $\mu\text{mol/L}$ 的范围。

2.3 临床可报告范围 取一份高浓度的患者样本(接近最高线性范围)样品,用厂家推荐的稀释液(纯水)进行 5、10、15、20、30 倍稀释,稀释倍数包含厂家推荐最大稀释倍数,每个浓度重复测定 3 次,以样品原倍结果作为预期值,将样品进行稀释后得出的结果为检测值,计算各稀释倍数的回收率,应在 90%~110% 范围内。从表 2 数据可见,该试剂盒的最大稀释倍数为 20,高于试剂盒声明的最大稀释倍数为 10,线性可报告范围 5.0~1 000.0 $\mu\text{mol/L}$,可以满足临床需求。

表 2 Hcy 循环酶法临床可报告范围试验

稀释倍数	实测 1 ($\mu\text{mol/L}$)	实测 2 ($\mu\text{mol/L}$)	实测 3 ($\mu\text{mol/L}$)	实测平均 ($\mu\text{mol/L}$)	浓度预期 ($\mu\text{mol/L}$)	回收率 (%)	是否通过
5	10.30	10.50	10.40	10.40	10.32	101	通过
10	4.80	5.10	5.10	5.00	5.16	97	通过
15	3.40	3.40	3.40	3.40	3.44	99	通过
20	2.60	2.60	2.60	2.60	2.58	101	通过
30	1.90	1.90	2.00	1.93	1.72	112	未通过

2.4 生物参考区间验证 收集 40 例健康人的标本,年龄 23~56 岁,其中男 20 例,女 20 例。对参考范围进行验证,不超过 2 例患者标本结果超过生物参考值区间即验证通过。结果显示男性(10.54±4.03) $\mu\text{mol/L}$;女性(9.85±3.11) $\mu\text{mol/L}$ 。男性和女性的 Hcy 值差异无统计学意义($P>0.05$),测定值均在参考范围内(0.0~15.0) $\mu\text{mol/L}$ 。

2.5 干扰试验 参照 EP-7A2 文件,将不同浓度的血红蛋白、三酰甘油、抗坏血酸、胆红素和待测血浆按 1:9 的比例混合,各样本分别测定 2 次取均值,计算其干扰程度;要求干扰偏差(%)在±10% 范围内。结果显示当血红蛋白≤5 g/L、三酰甘油≤7.8 mmol/L、抗坏血酸≤1.7 mmol/L、胆红素≤0.68 mmol/L 时对测定结果的相对偏差均在±10.0% 以内,结果见

表 3。

表 3 Hcy 酶法干扰试验

干扰物	浓度	Hcy 两次均值 ($\mu\text{mol/L}$)	干扰偏差(%)
血红蛋白(g/L)	0.625	23.89	1.99
	1.250	23.51	0.35
	1.875	24.42	4.23
	2.500	24.63	5.12
	3.125	24.49	4.53
	3.750	23.37	-0.24

续表 3 Hcy 酶法干扰试验			
干扰物	浓度	Hcy 两次均值 ($\mu\text{mol/L}$)	干扰偏差(%)
三酰甘油(mmol/L)	4.375	24.66	5.26
	5.000	24.07	2.73
	0.975	23.68	-0.15
	1.950	23.90	0.74
	2.925	23.89	0.73
	3.900	24.14	1.76
	4.875	24.00	1.17
	5.850	23.27	-1.92
抗坏血酸(mmol/L)	6.825	23.65	-0.31
	7.800	23.54	-0.74
	0.212 5	23.89	0.29
	0.425 0	24.14	1.31
	0.637 5	23.55	-1.17
	0.850 0	24.07	1.03
	1.062 5	23.83	0.01
	1.275 0	23.20	-2.64
胆红素(mmol/L)	1.487 5	23.37	-1.90
	1.700 0	23.75	-0.30
	0.085	23.86	0.01
	0.170	23.93	0.31
	0.255	23.93	0.31
	0.340	23.48	-1.60
	0.425	24.28	1.76
	0.510	23.96	0.45
	0.595	24.14	1.19
	0.680	24.66	3.37

2.6 比对试验结果

2.6.1 两种试剂的测定均值 采用两种试剂分别测定所有标本,每种方法所有结果的均值分别为: $\bar{X}=20.36$ 和 $\bar{Y}=$

19.728,其中,代表参比方法的均值,代表试验方法的均值。

2.6.2 方法内及方法间离群点检查 方法内离群点控制限 $4DX$ 、 $4DY$ 、 $4DX'$ 、 $4DY'$ 分别为 1、1、0.031、0.034,无方法内离群点;方法间离群点控制限 $4E$ 、 $4E'$ 分别为 3、0.211 2,两种测定方法无离群点。

2.6.3 X 取值范围检验及散点图和偏倚图的绘制 根据 EP9-A2 文件,计算两个方法的相关系数 $r=0.999$,大于文件要求的 $r\geq 0.975$,说明两个检测系统测定 Hcy 浓度达到了足够的宽度,分布范围合适。具体见图 1。由图 2 可知:检测系统 Y 对检测系统 X 单个测定值的相对偏差较小,偏差值分布较合理。

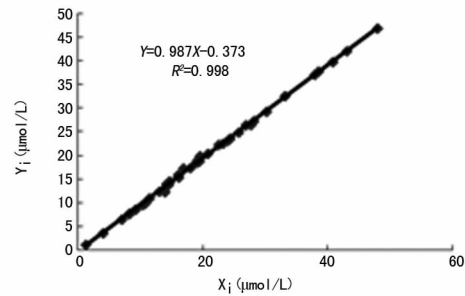


图 1 每个样品的 X 和 Y 方法均值比较散点图

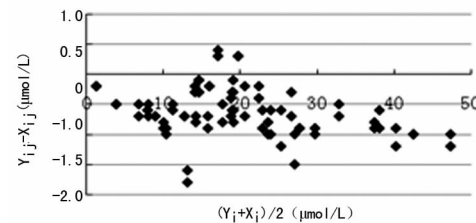


图 2 两种试剂单个结果的差值对两种方法均值的偏倚图

2.6.4 计算回归方程 应用 Excel 统计统计两种方法的线性回归方程为: $Y=0.988X-0.560$ 。

2.6.5 计算预期偏倚及可信区间 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,预期偏倚 $B_c=a+(b-1)\times X_c$,其中预期值 Y_c 用公式 $Y_c=a+BX$ 允许偏倚 EA 由文献[3]获得,具体结果见表 4。

表 4 2 种试剂测定 Hcy 结果的临床可接受性偏倚分析

医学决定水平 X_c ($\mu\text{mol/L}$)	允许偏倚		预期值 Y_c	预期偏倚 B_c	BC 的 95%可信区间	
	EA%	EA			BClow	BChigh
15	10.3	1.545	14.26	-0.74	-0.867	-0.612

3 讨 论

随着临床对 Hcy 检测的逐步重视,其对实验室检测质量的要求也越来越高,参加卫生部室间质评的实验室从 2010 年的 107 家上升到 2014 年的 464 家。循环酶法具有快速、简便、大批量、自动化分析等优点,近年来得到了广泛运用^[3-5],是参评实验室中选用数量最多的方法,2010 年其占总方法的 62.6%,2014 年则上升到 80.4%。根据最终检测原理的不同,循环酶法可分为紫外酶法和 Trinder 法,其共同反应途径是:

在 TCEP 作用下,氧化型 Hcy 转化为游离型 Hcy,游离型 Hcy 与共价底物 S 腺苷甲硫氨酸 SAM 催化反应形成甲硫氨酸与 S 腺苷 HcySAH。SAH 被 SAH 水解酶水解成腺苷和 Hcy,形成的 Hcy 可以循环加入反应,从而放大了检测信号,腺苷立即水解为次黄嘌呤和氨。紫外酶法是检测生成的氨在谷氨酸脱氢酶的作用下,使 NADH 转化为 NAD⁺,其转化速率与样品中 Hcy 含量成正比^[6];而 Trinder 法是检测次黄嘌呤在嘌呤氧化酶偶联过氧化物酶的作用下,发生 Trinder 显色反应,样本中

Hcy 浓度与色原变化成正比。

众所周知,Trinder 法易受还原性药物(维生素 C、还原性谷胱甘肽、羟苯磺酸钙等)的干扰,使结果假性偏低,此类问题已多有报道^[7];而内源性氨是紫外酶法的潜在干扰源^[8]。从实际情况分析,还原性药物的干扰更为常见,因此,本研究认为实验室应优先选择采用紫外检测的循环酶法。

从本文的结果可以看出,循环酶法的检测精密度优于化学发光法,这与文献报道一致^[9-10]。线性范围验证为 5.0~50.0 $\mu\text{mol/L}$,最大稀释倍数为 20 倍,高于试剂盒声明的 10 倍;得益于其紫外速率法的检测原理,该试剂盒具有较好的抗干扰能力。与我科现有的化学发光法比较,具有良好相关性,其相关系数 r 均大于 0.975,在医学决定水平处的系统偏倚临床可以接受。有相关文献用循环酶法与荧光偏振免疫法相比较结果无明显差别^[8],杨云帆^[11]用另一种国产的循环酶法试剂与传统的高效液相色谱法(HPLC)进行了比对相关性良好,说明国产试剂盒结果可靠,可满足临床测试要求。

参考文献

[1] 蔡小平,郭纯,雷雨婷.循环酶法测定心脑血管疾病患者血清同型半胱氨酸水平的研究[J].临床医学工程,2015,22(5):578-579.

[2] Roberts RF,Roberts WL. Performance characteristics of a recombinant enzymatic cycling assay for quantification of total homocysteine in serum or plasma[J]. Clin Chim Acta,2004,344(1/2):95-99.

[3] 杨有业,张秀明.临床检验方法学评价[M].北京:人民卫生出版社,2009:119-128.

[4] 王兴宁,雷光星,李慧,等.循环酶法测定同型半胱氨酸试剂盒评价[J].标记免疫分析与临床,2014,21(3):318-320.

[5] 王宇.血浆同型半胱氨酸临床常用检测方法及其影响因素[J].检验医学与临床,2010,7(24):2808-2010.

[6] 袁平宗.循环酶法测定同型半胱氨酸的临床研究[J].检验医学与临床,2011,8(4):424-425.

[7] 罗军,王贤俊,曹晓燕.循环酶法测定血清同型半胱氨酸方法学评价[J].中国实验诊断学,2010,14(8):1325-1326.

[8] 赵静.循环酶法与荧光偏振免疫法测定血清同型半胱氨酸水平的结果比较[J].河北医学,2014,20(11):1801-1804.

[9] 赵彦,康凤凤,王薇,等.同型半胱氨酸不同检测方法结果分析[J].检验医学,2015,30(3):284-286.

[10] 周莉,于秀娟,管洪在.血清同型半胱氨酸四种检测方法诊断脑梗死的效能比较及评价[J].山东医药,2015,55(1):54-56.

[11] 杨云帆.循环酶法同型半胱氨酸试剂的分析性能验证[J].国际检验医学杂志,2015,6(12):1715-1717.

(收稿日期:2016-02-05 修回日期:2016-04-14)

(上接第 2271 页)

法相结合,从而保证根管充填后根尖封闭的效果。

根管壁适度的湿润有助于维持牙本质表面胶原纤维网的原始结构,利于根管充填糊剂和根管壁的结合。联合采用管内负压吸引器与传统纸尖法,通过负压吸引技术能够增强冲洗效果,形成根管湿润状态。在湿润状态下,iRoot SP 糊剂和蓬松的牙本质胶原纤维网形成紧密的嵌合关系,从而降低了微渗漏。亚甲基蓝渗透实验及扫描电镜观察结果显示,根管壁适度的湿润度明显改变了 iRoot SP 糊剂的根尖封闭性能,但糊剂与牙本质间仍存在细微的间隙,与肖喜梅等^[6]的研究结果一致。Kossev 等^[9]认为,iRoot SP 糊剂固化膨胀率极低,且与牙本质间产生的化学性粘结使糊剂与牙本质间产生完全无缝隙的结合。本研究中,湿润组的糊剂与牙本质间虽然存在细微的间隙,但可发现部分糊剂进入牙本质小管内,与 Kossev 等^[9]的观点相近。

综上所述,在预备处理方法、根管充填材料及方法等可控因素相一致的前提下,根管充填前保持根管壁适度的湿润度,可达到更好的根管充填后的根尖封闭效果。此外,本研究中根管充填后的纵剖图进一步证实所选用的离体牙不存在根管内吸收及牙根隐裂等实验干扰因素。因此,在根管充填前营造根管湿润状态有利于保证 iRoot SP 糊剂的根尖封闭的效果。本研究有一定的不足,例如本研究采用的研究方法为离体实验,因此临床疗效有待于进一步证实。

参考文献

[1] 刘晓斌,侯本祥,卫书盛,等. GuttaFlow 根管充填系统根

尖封闭的微渗漏研究[J].现代口腔医学杂志,2008,22(4):356-358.

[2] Mollo A,Botti G,Principi Goldoni N,et al. Efficacy of two NiTi systems and hand files for removing gutta-percha from root canals[J]. Int Endod J,2012,45(1):1-6.

[3] 韩菲.3 种糊剂根充效果观察[J].口腔医学,2011,31(4):241-242.

[4] 徐培成,钱文昊.齿科病例精选[M].上海:上海科技教育出版社,2012:234-237.

[5] 樊明文,周学东.牙体牙髓牙周病学[M].北京:人民卫生出版社,2012:306-308.

[6] 肖喜梅,张春阳,苏凡,等.根管充填糊剂根尖封闭性的体外研究[J].口腔材料器械杂志,2014,23(2):75-79.

[7] Said HM,Bukar WZ. The effect of different sealer placement techniques on sealing ability:an in vitro study[J]. J Conserve Dent,2012,15(3):257-260.

[8] Tasdemir T,Yesilyurt C,Ceyhanli KT,et al. Evaluation of apical filling after root canal filling by 2 different techniques[J]. J Can Dent Assoc(Tor),2009,75(3):201-208.

[9] Kossev D,Stefanov V. Ceramics-based sealers as new alternatives to currently used endodontics sealers [J]. Roots,2009,1(1):41-48.

(收稿日期:2016-04-06 修回日期:2016-06-24)