

· 论 著 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2019.15.006

吡喃糖氧化酶法检测 1,5-脱水葡萄糖醇的空白限、 检出限和功能灵敏度的建立及评价*

陈颖,李莎,胡婷,温冬梅

中山大学附属中山医院检验医学中心,广东中山 528403

摘要:目的 建立吡喃糖氧化酶法检测 1,5-脱水葡萄糖醇(1,5-AG)的空白限(LoB)、检出限(LoD)和功能灵敏度(FS)并进行评价。**方法** 参考美国临床和实验室标准化委员会(NCCLS)发布的 EP17-A 文件,将 1,5-AG 空白标本和系列低水平标本在 ADVIA2400 生化分析仪上测定 1,5-AG,确定该方法的 LoB、LoD 和 FS。**结果** 依据 NCCLS EP17-A 方案建立吡喃糖氧化酶法检测 1,5-AG 的 LoB 为 0.35 $\mu\text{g/mL}$,LoD 为 0.64 $\mu\text{g/mL}$,FS 为 0.960 $\mu\text{g/mL}$ 。**结论** 该研究建立了适合实验室 ADVIA2400 生化分析仪吡喃糖氧化酶法检测 1,5-AG 的 LoB、LoD 和 FS,其分析性能指标基本满足实验室的要求,可为临床提供准确、可靠的检验结果。

关键词:1,5-脱水葡萄糖醇; 吡喃糖氧化酶法; 空白限; 检出限; 功能灵敏度

中图法分类号:R446.1

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2019)15-2131-03

Establishment and evaluation of blank limit,detection limit and function sensitivity of pyranose oxidase method for detecting 1,5-anhydroglucitol*

CHEN Ying,LI Sha,HU Ting,WEN Dongmei

Department of Laboratory Medicine,Affiliated Zhongshan Hospital of SUN Yat-sen
University,Zhongshan,Guangdong 528403,China

Abstract: Objective To establish the limit of blank (LoB),limit of detection (LoD) and the functional sensitivity (FS) of the pyranose oxidase method for detecting 1,5-anhydroglucitol (1,5-AG) and to conduct the evaluation. **Methods** According to the document EP17-A published by NCCLS,the blank samples and serial low level samples performed the 1,5-AG detection by the ADVIA2400 biochemical analyzer and its LoB,LoD and FS were determined. **Results** According to the NCCLS EP17-A schemem,LoB of pyranose oxidase for detecting 1,5-AG was 0.35 $\mu\text{g/mL}$,LoD and FS were 0.64 $\mu\text{g/mL}$ and 0.960 $\mu\text{g/mL}$. **Conclusion** LoB,LoD and FS of the pyranose oxidase method for detecting 1,5-AG suitable for laboratory ADVIA2400 biochemical analyzer are established,its analytical performance basically meets the laboratory requirements and can provide accurate and reliable detection results for clinic.

Key words: 1,5-anhydroglucitol; pyranose oxidase; limit of bank; limit of detection; functional sensitivity

1,5-脱水葡萄糖醇(1,5-AG)又称 1,5-脱水-D-山梨醇,是一个与糖尿病代谢密切相关的指标。机体在高糖状态下,葡萄糖会竞争性地抑制 1,5-AG 在肾小管的重吸收,导致 1,5-AG 随尿液大量排出,而在血液中的水平降低,可反映近 3~7 d 的血糖情况^[1-3]。1,5-AG 作为一项新的糖尿病血糖监测指标,其代谢稳定,短时间内高血糖患者的血清 1,5-AG 降低幅度大,经常会达到厂商声明的检测低限,所以有必要建立本实验室的检测限和功能灵敏度^[4-5]。为了保证患者检验结果的可靠性,本研究建立及评价吡喃糖氧化酶法检测 1,5-AG 的空白限(LoB)、检出限(LoD)和功能灵敏度(FS),证实其是否能满足预期实验室用途,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 1,5-AG 测定试剂盒、校准品及质控品均由北京九强生物技术股份有限公司提供(试剂批号:17-0613;校准品:GC-1,5-AG16-1020,17-0214;质控品 GQ-1,5-AG,16-1020)。仪器为德国西门子 ADVIA2400 生化分析仪。实验前严格按照厂家操作规程进行仪器的维护保养和校准,以确保仪器处于良好的状态;每天进行质控 2 次,每次在控后方可检测标本。

1.2 方法 参考美国临床和实验室标准化委员会(NCCLS)发布的 EP17-A 文件及相关文献进行评价^[6-7]。

1.2.1 LoB 的确定 采用试剂原装配套标本稀释液

* 基金项目:广东省中山市科技计划项目(2017B1034);广东省中山市医学科研基金项目(2016A020108)。

作者简介:陈颖,女,主管技师,主要从事临床检验诊断研究。

作为空白标本,每天上下午各检测1次,每批6次,连续5d,共60个数据。将实验数据绘制成频数分布图,根据其分布再采用参数或非参数检验方法估计LoB。

1.2.2 LoD的确定 参考NCCLS EP17-A文件,收集1份新鲜患者血清,要求外观无溶血、黄疸、脂血的1,5-AG低水平标本,用专用稀释液将其稀释成水平介于1~4倍LoB的6个低水平实验标本,重复检测10次,其均值分别为0.36、0.55、0.63、0.96、1.15、1.31 μg/mL,置-70℃冰箱保存。每天上下午各检测1次,连续5d,共60个数据。将实验数据绘制成频数分布图,根据其分布再采用参数或非参数检验方法估计LoD。

1.2.3 FS的确定 分别计算以上6个低水平样品测定结果的平均值、标准差和CV值。CV值接近10%时所对应的水平即为ADVIA2400生化分析仪吡喃糖氧化酶法测定1,5-AG的FS。

1.3 统计学处理 所有实验资料和数据采用SPSS 19.0和使用Microsoft Excel 2003进行数据分析和统计分析。

2 结果

2.1 LoB实验结果 60个空白标本结果为非正态分布,故采用非参数检验。将所有数据由小到大排序,LoB=NB×95/100+0.5=60×95/100+0.5=57.5所在位置对应的数据,即为57号结果+58号结果的均值。空白标本检测排序后第51~60位数结果见表1,第57.5的结果为0.35 μg/mL,即吡喃糖氧化酶法检测1,5-AG的LoB为0.35 μg/mL。

表1 空白标本检测第51~60位数结果

秩号	检测结果(μg/mL)	秩号	检测结果(μg/mL)
51	0.25	56	0.33
52	0.26	57	0.35
53	0.26	58	0.35
54	0.29	59	0.36
55	0.31	60	0.36

2.2 LoD实验结果 60个低水平标本结果为非正态分布,故采用非参数检验确定LoD。将所有数据由小到大排序,部分结果见表2。根据公式LoD=LoB+Ds.β,Ds.β是低水平标本测定中位数和第5个百分位数的间距,中位数=60×0.5+0.5=30.5位置结果=30号结果+31号结果的均值=0.63 μg/mL,第5个百分位数的值=60×0.05+0.5=3.5位置结果=3号结果+4号结果的均值=0.34 μg/mL,故Ds.β=0.63-0.34=0.29 μg/mL。故吡喃糖氧化酶法检测1,5-AG的LoD=LoB+Ds.β=0.29+0.35=0.64 μg/mL。

2.3 FS实验结果 系列低水平样品测定结果的平均值、标准差和CV值见表3。按照1,5-AG的检测不

精密度CV≤10%的质量要求,由表3可以看出,在水平为0.960 μg/mL时CV值最接近10%,故吡喃糖氧化酶法检测1,5-AG的FS为0.960 μg/mL。

表2 系列低水平标本第1~10位和第26~35位结果

秩号	数值(μg/mL)	秩号	数值(μg/mL)
1	0.24	26	0.59
2	0.25	27	0.59
3	0.34	28	0.60
4	0.34	29	0.60
5	0.35	30	0.62
6	0.36	31	0.64
7	0.39	32	0.65
8	0.43	33	0.67
9	0.44	34	0.67
10	0.45	35	0.69

表3 系列低水平样品1,5-AG检测结果

标本号	均值(μg/mL)	标准差(μg/mL)	CV(%)
1	0.367	0.078	21.25
2	0.566	0.116	20.86
3	0.640	0.128	20.00
4	0.960	0.091	9.48
5	1.160	0.080	6.89
6	1.330	0.090	6.77

3 讨论

血清1,5-AG作为一个新的糖尿病诊断指标,其敏感性高、特异性强,对筛查、诊断及治疗糖尿病具有重要的临床应用价值,适于临床推广^[1-2]。德国西门子ADVIA2400为国内常用的全自动生化分析仪,具有良好的性能,而酶法测定1,5-AG具有简单、特异性高、微量、快速的特点^[8]。检测系统或检验方法分析性能评价是临床检验质量管理的重要内容,精密度是检测系统的主要分析性能之一,本实验前期已对精密度进行评价,总不精密度小于10%,低于厂商声明的不精密度。目前大多数试剂厂商和实验室只按常规方法检测得出检测低限,本研究参考EP17-A文件和相关文献^[9-10],并结合本实验室实际情况,建立及评价西门子ADVIA2400生化分析仪检测系统吡喃糖氧化酶法测定1,5-AG的LoB、LoD和FS。

EP17-A文件是2004年NCCLS颁布的《检出限和定量检出限确定方案批准指南》,该方案就如何验证厂商声明的检测限值,如何正确使用和解释各种限值等提出建议且适用于所有的定量检验项目。LoB是指空白标本可能观察到的最高测量结果,本研究采用试剂配套稀释液作为空白标本,避免基质效应。本实验连续5d检测1,5-AG,总共60个空白标本的检测结果均低于厂商声明的灵敏度,得到吡喃糖氧化酶

法检测 1,5-AG 的 LoB 为 0.35 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。LoD 是可以检测到的分析物最低水平,也称为最小检出水平或检测低限,本实验建立的 LoD 为 0.64 $\mu\text{g}/\text{mL}$,FS 为 0.960 $\mu\text{g}/\text{mL}$,均小于厂商声明的灵敏度 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$,厂商声明的灵敏度性能得到验证确认。本实验参照 NCCLS EP17-A 文件得出 LoB、LoD 和 FS,与常规方法相比具有很大的优势,多次重复检验,可令实验结果的精密度更高、更可靠。根据 EP17-A 方案,可根据实验数据是否符合正态分布,再选择参数检验或非参数检验估计 LoB 和 LoD,有效避免统计方法的局限性;使用分析水平计算,而不选择原始信号结果计算,符合实验室需要^[10-12]。

综上所述,本实验室西门子 ADVIA2400 生化分析仪检测系统采用吡喃糖氧化酶法测定 1,5-AG 的 LoB、LoD 和 FS 得到了验证。本检测系统能够为临床提供准确、可靠的低水平 1,5-AG 检测结果。

参考文献

[1] WARREN B, LEE A K, BALLANTYNE C M, et al. Diagnostic performance of 1,5-Anhydroglucitol compared to 2-H glucose in the atherosclerosis risk in communities study[J]. *Clin Chem*, 2018, 64(10): 1536-1537.

[2] WANG Y, YUAN Y E, ZHANG Y L, et al. Serum 1,5-anhydroglucitol level as a screening tool for diabetes mellitus in a community-based population at high risk of diabetes[J]. *Acta Diabetol*, 2017, 54(5): 425-431.

[3] JURASCHEK S P, MILLER E R, APPEL L J, et al. Effects of dietary carbohydrate on 1,5-anhydroglucitol in a population without diabetes: results from the omniCarb

trial[J]. *Diabet Med*, 2017, 34(10): 1407-1413.

- [4] WELTER M, BORITZA K C, ANGHEBEM-OLIVEIRA M I, et al. Data for serum 1,5 anhydroglucitol concentration in different populations[J]. *Data Brief*, 2018, 20: 753-760.
- [5] YING L W, MA X J, YIN J, et al. The metabolism and transport of 1,5-anhydroglucitol in cells[J]. *Acta Diabetol*, 2018, 55(3): 279-286.
- [6] National Committee for Clinical Laboratory Standards. Protocols for determination of limits of detection and limits of quantitation; approved guideline: EP17-A [S]. Wayne, PA, USA: NCCLS, 2004.
- [7] 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, 2008: 142-167.
- [8] ZHOU Z, ZHAO L, WANG Z, et al. Colorimetric detection of 1,5-anhydroglucitol based on graphene quantum dots and enzyme-catalyzed reaction[J]. *Int J Biol Macromol*, 2018, 112(112): 1217-1224.
- [9] 白晶, 王治海, 杨大伟, 等. TRFIA 全血降钙素原检测试剂盒的性能评价[J]. *检验医学与临床*, 2017, 14(22): 3313-3315.
- [10] SADLER W A. Using the variance function to estimate limit of blank, limit of detection and their confidence intervals[J]. *Ann Clin Biochem*, 2016, 53(1): 141-149.
- [11] 2012 医学实验室质量和能力认可准则: ISO 15189[S]. 北京: 中国合格评定国家认可委员会, 2012.
- [12] ARMBRUSTER D, PRY T. Limit of blank, limit of detection and limit of quantitation[J]. *Clin Biochem Rev*, 2008, 29(Suppl 1): S49-S52.

(收稿日期: 2019-02-25 修回日期: 2019-05-08)

(上接第 2130 页)

[15] MASSAD L S, EINSTEIN M H, HUH W K, et al. 2012 updated consensus guidelines for the management of abnormal cervical cancer screening tests and cancer precursors[J]. *J Low Genit Tract Dis*, 2013, 17(5 Suppl 1): S1-S27.

[16] 赵方辉, 胡尚英, 王少明, 等. 高危型人乳头瘤病毒载量与子宫颈病变的关系[J]. *中华预防医学杂志*, 2009, 43(7): 565-570.

[17] DI J, RUTHERFORD S, CHU C. Review of the cervical cancer burden and Population-Based cervical cancer screening in China[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2015, 16(17): 7401-7407.

[18] XIE F, LI Z, ZHANG L, et al. Systemic cervical cytology training and quality control programs can improve the interpretation of Papanicolaou tests[J]. *J Am Soc Cytopathol*, 2019, 8(1): 27-33.

[19] 谢凤祥, 张丽冉, 王新国, 等. 山东东明县 23 088 名已婚

女性宫颈癌筛查结果分析[J/CD]. *中华临床实验室管理电子杂志*, 2018, 6(3): 157-161.

- [20] 张丽冉, 谢凤祥, 王新国, 等. 传统涂片与液基细胞学筛查宫颈癌阳性率的差异分析与临床意义[J/CD]. *中华临床实验室管理电子杂志*, 2017, 5(2): 98-102.
- [21] 李婷媛, 吴泽妮, 姜明月, 等. 不同感染状态下高危型人乳头瘤病毒载量与子宫颈病变发生的关系[J]. *中华肿瘤杂志*, 2018, 40(6): 475-480.
- [22] DONG L, WANG M Z, ZHAO X L, et al. Human papillomavirus viral load as a useful triage tool for non-16/18 high-risk human papillomavirus positive women: A prospective screening cohort study[J]. *Gynecol Oncol*, 2018, 148(1): 103-110.
- [23] 李淑敏, 章文华, 吴令英, 等. 人乳头状瘤病毒负荷量与子宫颈癌及其癌前病变关系的初步研究[J]. *中华妇产科杂志*, 2004, 39(6): 42-44.

(收稿日期: 2019-01-22 修回日期: 2019-04-10)