

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2020.10.012

一氧化氮检测试剂盒的性能验证和临床应用评价

冯文强, 易向民, 关卓辉, 陈碧霞

广东省广州市红十字会医院检验科, 广东广州 510220

摘要:目的 对一氧化氮检测试剂盒进行性能验证和临床应用评价。方法 根据美国临床和实验室标准协会(CLSI)的标准要求,使用 7600-020 日立全自动生化分析仪,对一氧化氮检测试剂盒的精密度、正确度、检出限、线性范围、参考区间进行验证,并将检测结果和厂家提供的性能指标进行比较。结果 该试剂盒检测一氧化氮的批内精密密度为 3.69%、批间精密密度为 4.84%,均小于厂家提供的指标;正确度在允许偏倚范围内;检出限为 2.52 $\mu\text{mol/L}$;线性斜率为 0.982 5, r^2 为 0.999,大于 0.995 符合要求;生物参考区间符合率 95%。结论 该一氧化氮检测试剂盒在 7600-020 全自动生化分析仪上主要分析性能符合厂家的声明,结果准确、可靠,可以用于临床检验分析。

关键词:一氧化氮; 性能验证; 生化分析**中图法分类号:**R446.11**文献标志码:**A**文章编号:**1672-9455(2020)10-1355-04

Performance verification and clinical application evaluation of nitric oxide testing kits

FENG Wenqiang, YI Xiangmin, GUAN Zhuohui, CHEN Bixia

Department of Clinical Laboratory, Guangzhou Municipal Red Cross

Hospital, Guangzhou, Guangdong 510220, China

Abstract: **Objective** To conduct the performance verification and clinical application evaluation of nitric oxide detection kit. **Methods** According to the standard requirements of CLSI, the precision, accuracy, detection limit, linear range and reference range of the kit were validated by using the automatic Hitachi 7600-020 biochemical analyzer. The test results were compared with the performance indicators provided by the manufacturer. **Results** The intra-batch and inter-batch precisions of the reagent were 3.69% and 4.84% respectively, which were lower than those provided by the manufacturer; the accuracy was within the allowable bias range; the detection limit was 2.52 $\mu\text{mol/L}$; the linear slope was 0.982 5, the square r^2 of correlation coefficient was 0.999, which was more than 0.995, and the bio-reference interval was 95%. **Conclusion** The main analytical performance of the nitric oxide test kit on 7600-020 biochemical analyzers is in line with the statement of the manufacturer. The results are accurate and reliable, and it can be used for clinical laboratory analysis.

Key words: nitric oxide; performance verification; biochemical analysis

一氧化氮作为一种目前所知最强的血管内皮细胞舒张因子(EDRF)和新型生物信息递质,除具有扩张血管、降低血压、松弛平滑肌等活性外,还具有信号传递、酶活性调节、免疫调节及抗(致)氧化损伤等生物活性^[1-2]。一氧化氮检测对疾病的临床辅助诊断、病情的跟踪分析与判定、临床治疗疗效动态跟踪和预后评价有重要的意义。此外,检测一氧化氮对疾病发病机制的探讨及有效地指导临床治疗也具有一定的价值。外源性一氧化氮供体药物或直接吸入一氧化氮气体治疗在心脑血管疾病(如动脉硬化、冠心病、高血压、脑卒中)、肺动脉高压(PH)、慢性阻塞性肺疾病(COPD)、阳痿(ED)等疾病中具有重要意义^[3],一氧

化氮检测可以作为这些疗法疗效跟踪的辅助指标^[4-5]。在本研究中,笔者采用福建福缘生物科技有限公司生产的一氧化氮检测试剂盒进行方法学评估和临床测试分析,以验证该试剂盒方法学的分析性能是否良好,以及是否符合临床使用要求。

1 资料与方法

1.1 一般资料 搜集本院门诊及住院患者静脉血 20 例,黄色分离胶管 3 600 r/min,离心 8 min,2 h 内完成检测。

1.2 仪器与试剂 7600-020 日立全自动生化分析仪,福建福缘生物科技有限公司生产的一氧化氮检测试剂盒。高、低水平样品和相关定值样品均由福建福

缘生物科技有限公司提供,批号分别为 NO-C-190108-01、NO-S-190108-01。

1.3 方法 试验之前按照中华人民共和国医药行业标准对 7600-020 全自动生化分析仪进行校准,严格按照仪器操作说明书的规定对仪器进行维护、保养及操作。

1.3.1 精密度验证 采用高、低两个水平质控,各分装成 5 份,4℃ 的冰箱保存。按照 EP15-A2 文件^[6],每天各取一份样品,每个水平重复检测 4 次,连续检测 5 d。分别计算 $\bar{x}$ 、 $s_{\text{批内}}$ 、 $s_{\text{批间}}$ 、 $CV_{\text{批内}}$ 、 $CV_{\text{批间}}$ 。

1.3.2 正确度验证 选取定值样品进行测定,标示值为 150、100、75、50、37 μmol/L,分别编号 S1~S5,重复测定 3 次,计算测定结果和标示值的偏差。

1.3.3 线性范围验证 选择高、低两个水平的标本(理想的高水平和低水平应在测量区间的高低两端),按不同比例混匀上述两种水平,而得到不同稀释水平的标本,高水平标本(H),低水平标本(L),重复测两次,计算两次结果的均值,以均值(Y)和预期值(X)进行直线回归分析,回归方程:Y=aX+b。根据线性回归方程式求出每一稀释度符合线性的理论水平,计算每一稀释度实测值和计算理论值的差异。

1.3.4 生物参考区间验证 随机抽取 20 例健康查

体标本为测试对象,均为查体后排除肿瘤、心脑血管疾病、肝脏疾病、肾脏疾病、自身免疫性疾病的标本。根据实测结果来对照参考范围,观察该试剂的正常参考范围是否适用。

1.3.5 检出限 CLSI EP17-A2 推荐用空白限、检出限和定量检出限表示检验程序的检出能力^[7]。本研究选择纯化水作为不含待测物标本,重复测量 20 次,计算均值和标准差,速率法 $\bar{x}+2s$,即为验证的检出限,参照 CLSI EP17-A2 文件进行。

1.4 统计学处理 采用 Excel 2007 表格软件进行数据统计,计算相关系数和回归方程。

2 结 果

2.1 精密度验证结果 两个水平的精密度测定结果显示,低水平测定均值为 43.4 μmol/L, $s_{\text{批内}}$ 为 1.6 μmol/L, $CV_{\text{批内}}$ 为 3.69%, $s_{\text{批间}}$ 为 2.1 μmol/L, $CV_{\text{批间}}$ 为 4.84%,与厂家声明的批间、批内 $CV\leq 5\%$ 相符。高水平测量均值为 95.6 μmol/L, $s_{\text{批内}}$ 为 2.7 μmol/L, $CV_{\text{批内}}$ 为 2.82%, $s_{\text{批间}}$ 为 2.4 μmol/L, $CV_{\text{批间}}$ 为 2.51%,与厂家声明的批间、批内 $CV\leq 5\%$ 相符。

2.2 正确度验证结果 用 5 个水平的定值样品进行测定,计算均值和偏倚,与厂家声明的允许偏倚范围(±10%)相符,见表 1。

表 1 正确度验证结果

标本编号	标示值(μmol/L)	测量值 1(μmol/L)	测量值 2(μmol/L)	测量值 3(μmol/L)	均值(μmol/L)	偏倚(%)
S1	150	145	144	146	145.0	3.3
S2	100	98	99	98	98.3	1.7
S3	75	72	72	73	72.3	3.5
S4	50	52	53	53	52.3	4.6
S5	37	39	38	38	38.3	2.1

注:S1~S5 为标示值编号。

2.3 线性范围验证结果 以均值(Y)和预期值(X)进行直线回归统计,计算得到回归方程:Y=0.982 5X-0.941 5,斜率(a)为 0.982 5,在 0.97~1.03; r^2 为 0.999, $r^2>0.995$ 符合要求,见图 1。若不同水平处差异值都在厂家声称的允许差异百分数(差异限)内,可确认厂家声称的可测量范围是可接受的。根据产品的技术要求:在 5~50 μmol/L,线性绝对偏差≤5 μmol/L;在 50~400 μmol/L,线性相对偏差≤10%。根据以上试验结果可知,线性范围内偏差小于技术要求的规定(在 5~50 μmol/L,线性绝对偏差≤5 μmol/L;在 50~400 μmol/L,线性相对偏差≤10%),符合产品技术要求。见表 2。

2.4 生物参考区间验证结果 根据实测的结果来对照参考值区间(30~60 μmol/L),观察该试剂的(正

常)参考区间是否适用。测试结果见表 3,由试验结果可知,20 个临床结果中一氧化氮测试只有 1 个超出范围,符合临床使用要求。厂家提供的参考区间可作为本实验室的参考区间。

表 2 线性范围系列水平标本测量结果

稀释度	稀释	测量值 1 (μmol/)	测量值 2 (μmol/L)	平均值 (μmol/L)	理论水平 (μmol/L)
1	L	4.0	3.0	3.5	4.1
2	3L+1H	103.0	103.0	103.0	102.4
3	2L+2H	200.0	204.0	202.0	200.6
4	L+3H	296.0	297.0	296.5	298.9
5	H	399.0	397.0	398.0	397.1

2.5 检出限检测结果 选择纯化水作为不含待测物

标本,重复测量 20 次,计算 20 次测量数据的 $\bar{x}$ 和 s ,速率法 $\bar{x} + 2s$,即为验证的检出限,检出限要小于线性低值($5\text{ }\mu\text{mol/L}$)。根据试验结果,20 次数据平均值为 $-0.55\text{ }\mu\text{mol/L}$,标准差为 $1.53\text{ }\mu\text{mol/L}$,因此本试剂盒的检出限为 $2.52\text{ }\mu\text{mol/L}$,符合产品技术要求。

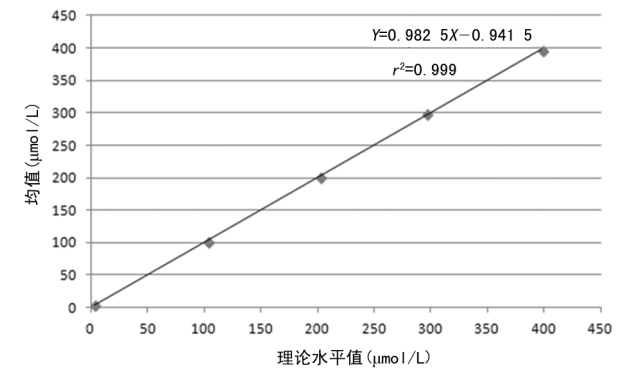


图 1 线性回归方程

表 3 参考区间验证结果

编号	结果(μmol/L)	编号	结果(μmol/L)
1	59	11	38
2	30	12	50
3	40	13	36
4	50	14	53
5	40	15	32
6	49	16	33
7	45	17	41
8	50	18	37
9	36	19	44
10	45	20	24

3 讨 论

一氧化氮是左旋-精氨酸(L-精氨酸)在一氧化氮合酶(NOS)的作用下生成的,它是一种小分子自由基,具有高度的亲脂性,使其具有穿透膜的特殊能力^[8],也是体内重要的效应和信使分子,对微循环的舒缩有重要的调节作用。不同类型的 NOS 催化合成的一氧化氮具有不同的生物学作用。一氧化氮能引起血管舒张,抑制白细胞与内皮细胞的黏附,抑制血小板聚集^[9]。同时,一氧化氮也是一种毒性分子,过量的一氧化氮在身体发生炎症及免疫反应时,对机体产生损伤作用^[10-11]。

人体血清中的一氧化氮在氧及水的存在下,可生成与该一氧化氮等摩尔水平的亚硝酸盐和硝酸盐。而在酸性介质条件下,亚硝酸盐和硝酸盐又能与多巴胺和 3-甲基-2-苯并噻唑啉酮腺酸盐反应,生成紫红色复合物,在最大吸收峰 545 nm 波长处读取吸光度值变化率,即可求出此时人体血清中亚硝酸盐和硝

盐的总水平^[12]。试剂的良好性能是保证检验结果准确、可靠的前提。试剂的性能验证是评价该检测系统是否能够用于临床检验工作的必要程序。本研究参考 CLSI 系列指导文件,结合工作实际,对一氧化氮检测试剂盒在 7600-020 全自动生化分析仪使用的精密度、正确度、线性范围、生物参考区间、检出限进行了验证和评价。参照 CLSI EP15 和 WS/T 420-2013 文件,连续检测 5 d,每天检测 1 个分析批,两个水平,重复检测 4 次,计算结果可知 CV 在厂家声明范围之内。本研究采用厂家提供的正确度验证计划的质控品、其他第三方供应商提供的参考材料等,选择两个水平的参考材料,对每个参考材料分别在 3~5 个不同批次中重复测量 2 次,计算均值与指定值比较,估计偏倚,验证厂家声明,结果与厂家声明的偏倚相符。线性范围是评价试剂检测性能的重要指标之一^[13]。选取接近厂家声明的线性范围的高值和低值标本,将高值与低值按比例配制成不同水平的混合标本用于线性范围验证,结果显示 r^2 为 0.999,说明该方法在试验所涉及的水平范围内呈线性,与厂家提供的线性范围相符。本研究采用 20 例健康者标本来验证,结果只有 1 例不在区间内,符合要求。为进一步检测该试剂盒的效能,本研究还增加了检出限检测,结果显示本试剂的检出限符合技术要求。由于不同实验室使用的仪器型号、检测系统不同,制订适合本实验室的检测方法十分重要。由于该一氧化氮检测试剂盒并非本实验室仪器配套试剂,关于一氧化氮检测的报道较少,因此需要在使用该试剂前根据本实验室情况进行验证^[14]。本研究首次对一氧化氮检测试剂盒在 7600-020 全自动生化分析仪上进行性能验证,对本项目的开展提供了质量保证。当然,本研究只是对一氧化氮检测试剂盒进行了一般性能验证,在后续工作中将持续进行观察、完善,如干扰试验等。

综上所述,一氧化氮检测试剂盒在 7600-020 全自动生化分析仪上的主要性能与厂家声明相符,其重复性好、正确度高、线性良好、生物参考区间可靠、灵敏度高,可用于临床分析,为新项目的开展提供了质量保证。

参考文献

[1] SHI Y, VANHOUTTE P M. Macro and microvascular endothelial dysfunction in diabetes[J]. J Diabetes, 2017, 9 (5): 434-449.

[2] CASTELA A, GOMES P, DOMINGUES V F, et al. Role of oxidative stress-induced systemic and cavernosal molecular alterations in the progression of diabetic erectile dysfunction [J]. J Diabetes, 2015, 7(3): 393-401. (下转第 1361 页)

发生变化,蛔虫的声像图则有一定特异性,超声显像下蛔虫有蠕动发生,呈两条平行高回声光带伴随一低回声中心,其“双线征”间距始终如一,呈一体运动,必要时可饮开水使胃肠充盈、皱褶伸展以助于鉴别。同时超声操作也方便、快捷,对人体无痛,不存在创伤,能进行多次重复检查,可对出现类似腹痛症状的疾病如阑尾炎、肠系膜淋巴结炎等进行区分。值得注意的是高频超声穿透性不佳,高频探头显示较粗的虫体其纵切面与胃壁相似,也需加以鉴别^[12]。有学者建议在高频超声诊断中,能利用不同频段超声的不同特点,将低频超声穿透性好与高频超声分辨率高的特点结合起来,利用低频超声探查患儿肠道扩张与积液情况,利用高频超声判断肠道与蛔虫的微观结构,避免肠道气体、患儿肥胖、身体结构与蛔虫本身对诊断结果的影响,提高诊断准确率^[13]。而本研究因条件受限,未做此方面的研究,因此后期可进一步开展研究。

综上所述,高频超声在儿童肠道蛔虫症中有较好的诊断价值,且有一定的超声影像学特征,能为临床开展驱虫治疗提供有价值的信息,值得在临床推广实践。

参考文献

[1] 蔡敏琪,何宇佳,孟铖,等. 云南省某少数民族地区小学生肠道寄生虫感染调查及流行病学分析[J]. 检验医学与临床, 2016, 13(16): 2292-2293.

[2] 李肖春,常青,江睿,等. 40 例眼弓蛔虫病患者首诊临床特征分析[J]. 中华眼底病杂志, 2016, 32(1): 40-43.

(上接第 1357 页)

[3] 任川,陈少敏,祖凌云,等. 高血压患者血管生成素 2 与血管内皮因子及血管舒张功能的关系分析[J]. 中华医学杂志, 2019, 99(12): 934-938.

[4] 陆迪菲,白歌,马晓伟,等. 内皮源性一氧化氮合酶及与糖尿病关系的研究进展[J]. 中国糖尿病杂志, 2019, 27(5): 397-400.

[5] 魏海霞,宋永娜. 呼出气一氧化氮检测在哮喘诊断中的价值研究[J]. 黑龙江医药科学, 2019, 42(1): 131-133.

[6] NCCLS. User demonstration of performance for precision and accuracy; approved guideline: EP15-A2[S]. Wayne, PA, USA: NCCLS, 2001.

[7] 林健聪,王红翠,吴英松,等. 乙肝标志物定量测定试剂盒的性能验证及临床应用评价[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2018, 10(1): 47-55.

[8] MONSALVE-NAHARRO J Á, DOMINGO-CHIVA E, GARCÍA C S, et al. Inhaled nitric oxide in adult patients with acute respiratory distress syndrome[J]. Farm Hosp, 2017, 41(2): 292-312.

[3] 徐玲霞,张纯林,穆仲平,等. 经阴道及经腹部高频超声检查对成人肠道蛔虫症的诊断价值[J]. 安徽医学, 2016, 37(4): 450-451.

[4] 浦明娟,骆继芳,刘剑峰,等. 高频超声显像在小儿肠道蛔虫症的诊断价值[J]. 浙江预防医学, 2008, 20(3): 95-96.

[5] 胡毅倩,冯华章,周秀莉,等. 眼弓蛔虫病患眼 B 型超声图像分析[J]. 中国超声医学杂志, 2017, 33(7): 577-580.

[6] 王楚彬,詹伏兰,郑宝群,等. 实时高频超声显像对小儿肠道蛔虫的诊断意义[J]. 汕头大学医学院学报, 2014, 27(2): 123-124.

[7] 董彦,王立,纹条玉,等. 超声在肠道及胆道蛔虫症诊断中的价值[J]. 中国临床医学, 2013, 20(6): 835-837.

[8] 熊智红,葛可法,熊学荣,等. 肠道蛔虫症 39 例超声特点分析[J]. 中国乡村医药, 2015, 22(5): 57-58.

[9] 王东林,符少清,刘秉彦,等. 高频超声在诊断小儿肠道蛔虫症中的应用价值[J]. 海南医学, 2011, 22(16): 93-94.

[10] 方寅,许莉华. 儿童肠道蛔虫病 66 例超声诊断价值探究[J]. 中国地方病防治杂志, 2014, 30(2): 113.

[11] 梁淑英. 实时超声对消化道蛔虫的诊断价值[J]. 临床超声医学杂志, 2016, 18(5): 572-576.

[12] 杨兴丽,余林蔓. 高频超声诊断小儿肠道蛔虫症的临床可行性及有效性分析[J]. 医药前沿, 2014, 3(31): 231-232.

[13] 张艳飞,陈冬冬,许川一. 小儿肠道蛔虫症经高频超声诊断的可行性及有效性研究[J]. 中国地方病防治杂志, 2015, 30(2): 113.

(收稿日期:2019-08-07 修回日期:2020-02-28)

[9] PHILLIPS L, TOLEDO A H, LOPEZ-NEBLINA F, et al. Nitric oxide mechanism of protection in ischemia and reperfusion injury[J]. J Invest Surg, 2009, 22(1): 46-55.

[10] LI J, LI R J, LV G Y, et al. The mechanisms and strategies to protect from hepatic ischemia-reperfusion injury[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2015, 19(11): 2036-2047.

[11] 李莉萍. NO 与肝脏缺血再灌注损伤的研究进展[J]. 江西医药, 2019, 54(3): 289-291.

[12] NAGARAJA P, KUMAR M S H. Spectrophotometric determination of nitrate in polluted water using a new coupling reagent[J]. Anal Sci, 2002, 18(3): 355-357.

[13] 卢旭. 贝克曼库尔特 AU5800 全自动生化分析仪性能验证[J]. 医疗卫生装备, 2016, 37(5): 107-110.

[14] 钟乔华,谢细娜,巫娟. 某国产肌酐试剂在日立生化分析仪上检测的性能评价[J]. 标记免疫分析与临床, 2019, 26(7): 1219-1223.

(收稿日期:2019-09-06 修回日期:2020-02-24)