

• 临床研究 •

全自动生化分析仪测定血清高、低密度脂蛋白胆固醇分析性能验证

孙云芝, 唐 欧, 许安春[△]

(成都市中医药大学附属医院检验科, 四川成都 610072)

摘要:目的 对在 AU5400 全自动生化分析仪上检测高/低密度脂蛋白胆固醇(H/LDL-C)的分析性能进行验证。方法 参考《临床实验室对商品定量试剂盒分析性能的验证》及国内外有关性能评价的文件和报道,结合临床工作实际,对全自动生化分析仪测定血清 H/LDL-C 的精密度、正确度、分析测量范围和生物参考区间 4 项分析性能进行验证和评价。结果 H/LDL-C 测定在 2 个不同浓度水平的重复标准差和期间标准差都小于厂家规定的不精密度要求;采用室内质评样本作为参考物质, HDL-C 的参考物质偏移值小于参考物质赋值的不确定度,验证厂家声称可靠; LDL-C 的参考物质偏移值大于参考物质赋值的不确定度,则将此偏移的验证区间与参考物质的赋值比较,得出参考物质赋值在此验证区间内,表明此差异无统计学意义也认可厂家声称可靠; HDL-C 分析测量范围为 0.245~2.605 mmol/L, LDL-C 的分析测量范围为 1.04~12.85 mmol/L,略宽于厂家声明的线性范围;生物参考区间验证结果均在设定的范围之内。结论 贝克曼库尔特全自动生化分析仪测定 H/LDL-C 的分析性能与厂家声明基本一致,符合临床的要求,可以应用于临床。

关键词:全自动生化分析仪; 高密度脂蛋白胆固醇; 低密度脂蛋白胆固醇; 性能验证; 精密度; 正确度

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.08.044

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2016)08-1117-03

高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)主要由肝脏合成,由载脂蛋白、磷脂、胆固醇及少量脂肪酸组成,是逆向转运的胆固醇酯,可有效降低患动脉粥样硬化及冠状动脉心脏病的危险^[1]。HDL-C 降低可作为冠心病的危险指标;血清低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)检测作为反映缺血性心血管病发病危险的指标已在临床被广泛应用^[2],许多前瞻性研究和临床试验也发现 LDL 是冠心病发病风险的最主要影响因素^[2-3]。《中国成人血脂异常防治指南》明确规定不同危险因素存在情况下 LDL-C 的控制目标。目前, H/LDL-C 检测已经广泛应用于临床。为此,笔者参考《临床实验室对商品定量试剂盒分析性能的验证》及国内外有关性能评价的文件和报道,结合临床工作实际,对全自动生化分析仪测定血清 H/LDL-C 的精密度、正确度、分析测量范围和生物参考区间 4 项分析性能进行验证和评价。

1 材料与与方法

1.1 样本来源 选取门诊和住院部标本,要求空腹至少 8 h 后采血, 3 500 r/min 离心 10 min, 取血清检测。

1.2 仪器与试剂 检测仪器为贝克曼-库尔特 AU5400 全自动生化分析仪。试剂包括, (1)北京中生北控 HDL-C 检测试剂; (2)北京中生北控 HDL-C 检测试剂; (3)北京中生北控配套校准品; (4)RANDOX 质控血清水平 2、水平 3。

1.3 方法

1.3.1 精密度验证 精密度验证进行 5 天, 每天一个批次, 每个批次选取高、低两个浓度水平的混合血清进行测量。每个批次测量前按照厂家要求进行校准, 测量前后均进行室内质控标本测量, 如出现室内质控失控, 则舍去此批数据, 另加一个批次。每个批次对各浓度样本分别重复测量 3 次。按照公式^[4]分别计算重复标准差(S_r), 期间标准差(S_i), 厂家声称值 σ_r 和 σ_i , 并判断是否小于厂家规定的性能标准。

1.3.2 正确度验证 正确度验证进行 5 个批次, 每个批次测定 2 次, 选取 2015 年第一次脂类室间质评 201514 号样本作为参考物质进行测量。每个批次测量前按照厂家要求进行校准, 测量前后均进行室内质控标本测量, 如出现室内质控失控, 则

舍去此批数据, 另加一个批次。按照公式^[4]分别计算测量均值($\bar{x}$)、标准差(s_x)及参考物质测量偏移值($b_{\text{偏}}$), 并判断是否小于参考物质赋值的不确定度(s_a)。若大于赋值的不确定度, 则将此赋值的验证区间与赋值进行比较。

1.3.3 分析测量范围验证 按照参考文献^[5-7], 在厂家声称的线性范围内选取 5~7 个浓度样本, 尽量覆盖整个线性范围。准备高、低值浓度样本, 分别命名样本 6(H)和样本 1(L), 按照 5L、4L+1H、3L+2H、2L+3H、1L+4H、5H 关系配置, 形成系列浓度梯度。测量前按照厂家要求进行校准, 测量前后均进行室内质控标本测量, 如出现室内质控失控, 则舍去此次数据, 重新测量。每个浓度水平至少测定 2 次。按照公式计算线性回归方程和相关系数 r^2 , 若 $r^2 > 0.995$, 则表明厂家声称的线性测量范围是可接受的。

1.3.4 生物参考区间验证 参考 CLSI C28-A2 文件^[8], 选取健康体检者 20 例, 年龄 19~80 岁, 平均 42 岁。男女各一半。按照标准操作程序进行检测, 对结果进行统计并与设定的参考区间进行比较, 若 20 份标本的检测结果均在设定的参考区间内或不超过 2 份标本超出, 则验证通过。否则, 进行参考区间确立实验。

1.4 统计学处理 应用 SPSS17.0 统计软件进行数据分析。分析测量范围的验证中截距 a 与 0 的比较用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 精密度验证 HDL-C 和 LDL-C 的 $S_r < \sigma_r$, 表明厂家声称的重复精密度可靠, HDL-C 和 LDL-C 的 $S_i < \sigma_i$, 表明厂家声称的期间精密度可靠。见表 1。

2.2 正确度验证 HDL-C 的参考物质偏移值 $<$ 参考物质赋值的不确定度, 则验证厂家声称值可靠; LDL-C 的参考物质偏移值 $>$ 参考物质赋值的不确定度, 则将此偏移值的验证区间与参考物质赋值比较。由公式^[4]计算得出, 验证区间 $VI = \bar{x} \pm t_{1-\alpha, 2n-1} X \sqrt{s_x^2 + s_a^2} = (3.308 \pm 0.336) \text{ mmol/L}$, 参考物质赋值 3.38 mmol/L 在此验证区间内, 说明此差异无统计学差异, 应

[△] 通讯作者, E-mail: 31922465@qq.com。

认可厂家声称可靠。见表 2。

表 1 H/LDL-C 精密度验证结果

项目	HDL				LDL			
	S _r	S ₁	σ _r	σ ₁	S _r	S ₁	σ _r	σ ₁
低值混合血清	0.037 4	0.054 7	0.093 6	0.112	0.067 6	0.087 7	0.140	0.140
高值混合血清	0.047 3	0.071 0	0.124 0	0.149	0.031 8	0.049 5	0.159	0.159

表 2 HDL-C 和 LDL-C 的正确度验证

项目	$\bar{x}$	s_x	$b_{\text{参}}$	$\bar{x}_{\text{赋}}$	s_a
HDL	1.259	0.051 7	-0.021	1.28	0.022 4
LDL	3.306	0.103	-0.074	3.38	0.060 4

2.3 分析测量范围验证 以实测值为 Y 轴,预期值为 X 轴,将结果点在 Y-X 图上,计算线性回归方程 $Y=bX+a$ 。可以得出线性回归方程为 $Y=0.997\ 4X+0.008\ 2$, $r^2=0.999$ 。相关系数 $r^2>0.975$,直线回归方程 b 在 0.97~1.03 之间,常数小于 $\pm(C1+C6)\times0.05/2$,数据组呈线性关系。HDL 的分析测量范围为 0.245~2.605 mmol/L,与厂商提供的可报告范围基本一致。以实测值为 Y 轴,预期值为 X 轴,将结果点在 Y-X 图上,计算线性回归方程 $Y=bX+a$ 。可以得到线性回归方程为 $Y=1.004X-0.191\ 7$, $r^2=0.999\ 4$ 。 $r^2>0.975$,b 在 0.97~1.03 之间,常数在 $\pm(C1+C6)\times0.05/2$ 范围内,数据组呈线性关系。LDL 的分析测量范围为 1.04~12.85 mmol/L,与厂商提供的可报告范围基本一致。见表 3、4。

表 3 HDL-C 分析测量范围验证

项目	C1	C2	C3	C4	C5	C6
水平 1	0.25	0.73	1.19	1.64	2.15	2.66
水平 2	0.25	0.75	1.19	1.64	2.14	2.58
水平 3	0.24	0.74	1.21	1.64	2.14	2.6
水平 4	0.24	0.73	1.2	1.66	2.16	2.58
平均值	0.245	0.738	1.198	1.645	2.148	2.605
理论浓度	0.245	0.717	1.189	1.661	2.133	2.605

表 4 LDL-C 分析测量范围验证

浓度水平	C1	C2	C3	C4	C5	C6
1	1.01	3.06	5.14	7.52	10.14	12.64
2	1.06	3.30	5.43	7.68	10.21	12.26
3	1.05	3.18	5.45	7.85	10.48	13.53
4	1.04	3.21	5.49	7.93	10.48	12.97
平均值	1.04	3.19	5.38	7.75	10.328	12.850
理论浓度	1.04	3.402	5.764	7.964	10.488	12.850

2.4 生物参考区间验证 20 份表面健康人血清 HDL-C 检测浓度范围在 1.14~2.16 mmol/L 之间,LDL-C 检测浓度范围在 1.92~3.07 mmol/L 之间,均在厂家声明的生物参考区间之内。

3 讨 论

根据《医疗机构临床实验室管理办法》的要求,临床实验室

所用的检验方法、仪器等应保证检验结果的准确可靠,临床实验室应对所选购的商品定量试剂盒进行检查,以保证所选用的试剂盒达到临床实验室要求的临床性能、分析性能、经济性能等方面的要求。LDL-C 检测的参考方法是超速离心法,需要特殊的仪器,操作时间长,临床很难开展^[9]。HDL-C 检测的参考方法是超速离心结合肝素-锰沉淀法^[1]。本检测系统试剂的检测原理是直接法-表面活性剂清除法。本实验对贝克曼库尔特 AU5400 全自动生化分析仪测定 H/LDL-C 的主要分析性能进行评价,包括不精密度、不准确度、分析测量范围、生物参考区间来了解该系统的性能。

在本检测系统,5 个批次的高、低值混合血清的重复标准差和期间标准差均小于厂家规定的分析性能;正确度的验证,可以采用患者样本与其他检验方法/试剂盒进行正确度验证,也可以采用参考物质进行。本试验使用的是卫生部临检中心 2015 年第一次脂类室间质评第 201514 号样本作为参考物质进行验证,计算得出 HDL-C 的参考物质偏移值小于参考物质赋值的不确定度,则验证厂家声称可靠;LDL-C 的参考物质偏移值大于参考物质赋值的不确定度,则将此偏移的验证区间与参考物质的赋值比较,得出参考物质赋值在此验证区间内,表明此差异无统计学意义也认可厂家声称可靠。对于线性测量范围的验证,HDL-C 检测系统的分析测量范围为 0.245~2.605 mmol/L,略宽于厂家提供的线性范围 0.20~2.59 mmol/L,LDL-C 检测系统的分析测量范围为 1.04~12.85 mmol/L,略宽于厂家提供的线性范围 0.30~10.34 mmol/L。20 份健康人血清浓度均在设定的参考区间范围内,可以认为现用参考区间适用于本实验室。

综上,本文参考试剂厂家、CLSI 文件以及国内关于定量检测分析系统性能评价的相关报道,评价了在 AU5400 全自动生化分析仪上检测 H/LDL-C 的性能,基本与厂家声明的性能一致,该检测系统能够用于临床。

参考文献

[1] 尚红,王毓三,申子瑜.全国临床检验操作规程[M].4 版.北京:人民卫生出版社,2015:320-326.

[2] Castelli WP,Garrison RJ,Wilson PW,et al. Incidence of coronary heart disease and lipoprotein levels; the Framingham study[J]. JAMA,1986,256(20):2835-2838.

[3] Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. Executive summary of the third report of the national cholesterol education program(NCEP) expert panel on detection, evaluation, And treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III)[J]. JAMA,2001, 285(19):2486-2497.

[4] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. WS/T 420-2013 临

- 床实验室对商品定量试剂盒分析性能的验证[S]. 北京: 中国标准出版社, 2013.
- [5] 王治国. 临床检验方法确认与性能验证[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2009: 153-159.
- [6] 冯仁丰. 临床检验质量管理技术基础[M]. 2 版. 上海: 上海科学技术文献出版社, 2008: 111-138.
- [7] 张秀明, 庄俊华, 郑松柏, 等. 临床化学发光免疫法检测 AFP 的分析性能验证与实验方法[J]. 中华检验医学杂志, 2007, 30(11):

- 1293.
- [8] Clinical and Laboratory Standards Institute. C28-A2 How to define and determine reference intervals in the clinical laboratory [S]. Wayne, PA, USA: CLSI, 2000.
- [9] 王蓓丽, 孙林, 潘柏申. 低密度脂蛋白胆固醇检测方法的研究进展[J]. 检验医学, 2013, 28(11): 975-980.

(收稿日期: 2016-01-12)

• 临床研究 •

病毒性心肌炎患者外周血中 TNF- α 、TGF- β 1 和 IFN- γ 细胞因子水平的分析

陈 锐, 陈艳清, 贾 建, 许 瑶, 张达秀, 李婉葵, 邵锦欢
(东莞市塘厦医院检验科, 广东东莞 523721)

摘 要:目的 研究病毒性心肌炎患者外周血中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、转化生长因子- β 1(TGF- β 1)、细胞因子干扰素- γ (IFN- γ)的水平, 分析上述指标与心肌炎的相关性。方法 选取 2013 年 1 月至 2015 年 1 月间入院就诊的病毒性心肌炎患者 32 例, 作为实验组。选取同期入院体检的健康人 32 例作为对照组。应用 ELISA 方法检测血清中 TNF- α 、TGF- β 1 和 IFN- γ 蛋白水平。32 例病毒性心肌炎患者应用常规抗病毒、镇静治疗后, 应用实时荧光定量 PCR 法检测 TNF- α 、TGF- β 1 和 IFN- γ mRNA 水平, 观察并比较治疗前后 3 项指标的变化。结果 病毒性心肌炎患者急性期 TNF- α 、TGF- β 1 和 IFN- γ 蛋白水平水平最高, 在恢复期稍有下降, 当仍显著高于对照组($P < 0.05$)。与对照组相比, 病毒性心肌炎患者 TNF- α 、TGF- β 1 和 IFN- γ mRNA 水平明显较高($P < 0.05$)。结论 血清中 TNF- α 、TGF- β 1 和 IFN- γ 水平变化在病毒性心肌炎发病中有重要作用, 可在临床作为病情判断及疗效评价的参考指标。

关键词: 病毒性心肌炎; 肿瘤坏死因子- α ; 转化生长因子- β 1; 细胞因子干扰素- γ

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2016.08.045

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2016)08-1119-02

病毒性心肌炎(viral myocarditis, VMC)指病毒感染心肌细胞, 导致细胞溶解引起心肌局限性或弥漫性的急性或慢性炎症病变, 结果造成病毒对心肌细胞直接损伤和继发免疫反应对心肌组织的持续损害^[1]。目前临床尚未能确认 VMC 确切的发病机制, 但机体免疫功能紊乱和炎性细胞因子在其发病中的作用不容小觑。细胞因子是由免疫细胞和某些非免疫细胞经刺激合成、分泌的一类具有广泛生物学活性的小分子蛋白质, 通过结合相应受体从而具有调节细胞生长、分化、调节免疫应答的作用。本研究就 VMC 患者外周血中 TNF- α 、TGF- β 1 和 IFN- γ 细胞因子的水平进行了分析, 现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2013 年 1 月至 2015 年 1 月间入院就诊的病毒性心肌炎患者 32 例, 作为实验组。所有患者均符合成年人急性病毒性心肌炎的诊断参考标准^[2-3]。选取同期入院体检的健康人 32 例作为对照组。排除标准: 先天性心脏病、心脏病等心脏疾病; 1 个月内无感染、腹泻病史; 智力及精神异常, 无法配合此次研究者。实验组 32 例患者中, 男 19 例、女 13 例; 年龄 30~65 岁, 平均(46.25 $\pm$ 12.03)岁; 发病前 1~3 周均有上呼吸道感染史。对照组 32 例中男 18 例、女 14 例; 年龄 32~61 岁, 平均(46.32 $\pm$ 11.91)岁。两组在年龄、性别等基础资料方面无统计学差异, 可参与比较。

1.2 方法

1.2.1 标本采集 所有受试者在清晨空腹抽取静脉血 3 mL, 3 000 r/min 离心 15 min, 取上层血清, 分装-20℃留存备用。

1.2.2 标本的检测 应用 ELISA 检测两组患者血清中 TNF- α 、TGF- β 1 和 IFN- γ 蛋白含量, 试剂盒购自 bd biosciences

pharmingen 公司。操作步骤如下, (1)标准曲线: 冻干标准品复溶, 静置 15 min, 倍比梯度稀释(标准曲线取 7 个点, 最高浓度为 1 000 pg/mL, 标准品稀释液直接加入作为 0 浓度)。(2)取标本血清及标准品 100 μ L 加入相应孔中, 封板, 室温孵育 2 h, 洗板 5 次, 拍干。加生物素化抗体 100 μ L 到每孔, 封板, 室温孵育 1 h, 洗 5 次, 拍干。加酶结合物 100 μ L, 封板, 暗室室温孵育 20 min, 洗 5 次, 拍干。加显色剂 100 μ L, 暗室室温孵育 20 min, 加终止液 100 μ L 终止反应。(3)酶标仪检测, 读其 A450 值, 绘制标准曲线, 算出标本浓度。并在 32 例病毒性心肌炎患者应用常规抗病毒、镇静治疗后, 另行蛋白水平检测。设定实验组治疗前为 VMC 急性期, 治疗后为 VMC 恢复期。

同时应用实时荧光定量 PCR 法, 见表 1, 检测两组患者 TNF- α 、TGF- β 1 和 IFN- γ mRNA 水平。检测试剂盒、引物和探针序列均由上海基康生物技术有限公司提供, 检测仪器使用罗氏 Lightcycler 荧光定量 PCR 仪。

1.3 统计学处理 数据均应用 SPSS21.0 软件进行分析, 计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 计量数据两组比较应用 t 检测, 计数数据比较应用卡方检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 TNF- α 、TGF- β 1 和 IFN- γ 蛋白水平 病毒性心肌炎患者急性期 TNF- α 、TGF- β 1 和 IFN- γ 蛋白水平水平最高, 在恢复期稍有下降, 但仍显著高于正常对照组($P < 0.05$)。见表 2。

2.2 TNF- α 、TGF- β 1 和 IFN- γ mRNA 水平 与对照组相比, 病毒性心肌炎患者 TNF- α 、TGF- β 1 和 IFN- γ mRNA 水平明显较高, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 见表 3。