

缺血修饰清蛋白测定试剂的性能评价*

牛广华, 高玉洁[△], 张程, 王柏山, 张艺凡, 索德宝(辽宁省中医院检验科, 沈阳 110032)

【摘要】 目的 评价终点法测定缺血修饰清蛋白(IMA)试剂盒的性能, 判断其分析性能是否满足临床要求。**方法** 应用终点法测定血清中的 IMA 浓度, 对试剂盒的精密度、正确度、线性及参考区间做出评价。精密度按照定量测量方法的精密度性能评价(EP5-A2)指南标准进行评价; 正确度按照定值参考物质检测的回收实验批准(EP15-A)指南标准进行评价; 线性范围按照 EP6-A 指南推荐方法进行评价; 参考区间按照美国临床实验室标准化委员会(NCCLS)标准进行评价。**结果** 该 IMA 试剂盒参考范围适用本实验室; 线性良好, 精密度、正确度均在规定范围内。**结论** 该商品化 IMA 试剂盒符合实验室性能标准, 性能良好, 可供本实验室对大批量血清标本进行检测。

【关键词】 缺血修饰清蛋白; 精密度; 正确度; 线性范围; 参考范围

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2014.23.003 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2014)23-3238-02

Performance evaluation of ischemia modified albumin reagent kit* NIU Guang-hua, GAO Yu-jie[△], ZHANG Cheng, WANG Bai-shan, ZHANG Yi-fan, SUO De-bao (Department of Clinical Laboratory, Liaoning Chinese Traditional Medical Hospital, Shenyang, Liaoning 110032, China)

【Abstract】 Objective To evaluate the performance of ischemia modified albumin(IMA) reagent kit utilized in endpoint method, and determine whether its analytical performance meet the clinical demand. **Methods** The endpoint method was used to detect serum IMA. The precision, accuracy, linearity and reference interval were evaluated by using the EP5-A2 document, EP15-A document, EP6-A document and National Committee for Clinical Laboratory Standards(NCCLS) reference method, respectively. **Results** The reference interval of IMA reagent kit met the laboratory demand, with good linearity, and the precision and accuracy of IMA reagent kit were in the specified ranges. **Conclusion** The commercial IMA kit might have good performance and could satisfy laboratory performance standards, which could be used in the detection of a large quantity of serum samples in this laboratory.

【Key words】 ischemia modified albumin; precision; accuracy; linearity range; reference interval

缺血修饰清蛋白(IMA)作为一项新的早期诊断心肌缺血的生化标志物, 可以在心肌缺血发生后 5~10 min 就迅速升高。因此, 与其他检测指标相比, IMA 具有出现时间早、敏感性高、阴性预测值高等优点, 正被越来越多的临床工作人员及科技人员所关注和重视^[1-3]。目前国内外多个机构对其应用于临床诊断心肌缺血进行了大量研究, 并已开始应用于心肌缺血的早期诊断和急性冠状动脉综合征(ACS)的危险分层^[4]。目前临床实验室的检测方法是根据清蛋白钴结合实验(ACB test)比色法原理进行 IMA 测定的^[5-6]。IMA 是本院新批准用于临床的检验项目, 根据临床实验室质量管理的要求, 临床试验是对新购进的试剂在投入使用前必须对其技术性能进行一定的评价, 其技术性能符合临床要求方可用于临床^[7]。本文参照 ISO15189 设计评价方案, 从精密度、正确度、线性范围及参考范围方面对 IMA 试剂盒的性能进行评价, 现报道如下。

1 材料与与方法

1.1 仪器 日立 7600-020 全自动生化分析仪, 参数设置参考试剂盒的液体双试剂 IMA 参数表。

1.2 IMA 终点法试剂盒 购于北京九强公司生产的 IMA 测定试剂盒及配套定标液(批号: 178689)、质控品 Q1(批号: 178601)和 Q2(批号: 178602)。

1.3 方法

1.3.1 检测原理 IMA 样品中的清蛋白与钴离子结合后, 加入显色剂与剩余的游离钴离子反应, 产生红褐色产物, 在 505 nm 的波长下比色, 通过与同样处理的 IMA 标准品进行比较, 即可计算出样品中 IMA 浓度。采用两点终点法测定, 样品用量 20 μ L; 试剂用量 R1: 150 μ L, R2: 50 μ L; 主波长 700 nm, 副波长 505 nm。

1.3.2 精密度 按照定量测量方法的精密度性能评价(EP5-A2)指南, 尽可能选择与临床样本类似的基质, 且与厂商声明性能相近的或接近“医学决定水平”的 2 个浓度。每一浓度样品每天测 2 批, 每批重复测定 2 次, 共测定 20 d。得到批内、批间以及总不精密度, 如小于厂家声明要求, 则通过验证。

1.3.3 正确度 按照定值参考物质检测的回收实验批准(EP15-A)指南, 选择厂家提供的质控物 Q1 和 Q2。每一质控物分 4 批测定, 每一样品重复测定 2 次。测量均值的偏差与可接受的性能标准(10%)进行比较, 当偏离小于性能标准时通过验证。

1.3.4 线性范围 按照定量检测系统线性评价方法(EP6-A)指南推荐用高值和低值浓度(厂家提供的基质液)的样本按比例精确配成等间距的 10 个不同浓度样本, 每个样本重复测定

* 基金项目: 国家高技术研究发展计划(863 计划)(2011AA02A1111)。

作者简介: 牛广华, 男, 博士, 主任技师, 主要从事临床免疫学、生物化学、心血管疾病的研究。 [△] 通讯作者, E-mail: jie_54@sohu.com。

4 次。采用二元一次直线回归、二次与三次的曲线回归统计处理,以统计估计值与实际检测值的差异(统计误差)来判断,统计误差最小的,为最适直线或曲线。

1.3.5 参考区间 按照美国临床实验室标准化委员会(NCCLS)要求,健康者应为肝肾功能、心肺功能、血压和心电图正常;近期无过量饮酒、吸烟;无服药、手术及住院治疗;无肥胖症;无家庭遗传病史的成年男女。选取本院体检中心的健康体检人员,年龄 20~76 岁,经体检医师检查,在符合 NCCLS 要求的健康人群中选择 20 例,男 10 例、女 10 例。若 20 例参考个体中观测值在原始报告参考限之外的不超过 2 例,厂商或提供参考区间的实验室报告的 95% 参考区间可以接受。

1.4 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计学软件进行数据分析;计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验;以 $\alpha = 0.05$ 为检验水准, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 精密度试验结果 在两个浓度水平下,经比较 I 均小于 II,精密度符合厂家声明性能要求。见表 1。

表 1 精密度实验结果

浓度水平(U/mL)	实测标准差	实测方差	自由度	性能要求方差	I(实测方差/性能要求方差)	II卡方值
94.6	1.08	1.166 4	42	89.41	0.55	55.8
74.7	1.18	1.392 4	42	55.76	1.05	55.8

2.2 正确度试验结果 选用质控品 Q1 和 Q2 所测得的相对偏差都小于 10%,正确度高。见表 2。

表 2 正确度试验结果

质控品	靶值(U/mL)	实测均值(U/mL)	偏差(U/mL)	相对偏差(%)
Q1	49.0	48.03	0.97	2.00
Q2	83.0	83.45	0.45	0.54

2.3 线性范围 做一次、二次及三次回归方程的评估,样本浓度在 18.5~99.5 U/mL 范围内呈直线分布,以预期值为 X,实测均值为 Y,所得最适方程为 $Y = 8.99X + 9.47$ 。Excel 软件做一次方程直线,见图 1。

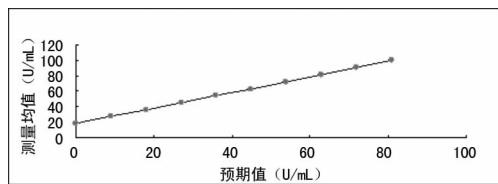


图 1 最适方程直线

2.4 参考区间结果 所有观测值范围为 60.2~76.3 U/mL;其中男性为 61.4~76.3 U/mL;女性为 60.2~75.6 U/mL;所有观测值均在参考区间之内,该参考区间可接受。

3 讨论

近年来发现 IMA 是一种新的缺血标志物,已被美国食品和药品管理局(FDA)批准用于急性心肌缺血的诊断,其形成机制尚不十分明确,可能与血清清蛋白(HAS)氨基末端变化有关。心肌缺血数分钟内,缺血心肌局部血流灌注不足和氧气供应减少,局部心肌细胞发生缺氧、酸中毒、自由基损害,细胞膜依赖的钠钾泵破坏和游离铜离子增多,可使血清清蛋白氨基末

端序列 2~4 个氨基发生乙酰化或缺失而形成 IMA,这些因素致 IMA 与钴离子(Co^{2+})结合能力降低,因此 IMA 在 ACS 的早期可逆阶段即可升高^[7]。

IMA 的检测方法目前主要是 ACB test^[8],正常对照的清蛋白与氯化钴溶液中的 Co^{2+} 结合后,溶液中游离 Co^{2+} 浓度下降;而缺血个体中含有较多的 IMA,由于 IMA 与 Co^{2+} 的结合能力弱,加入同浓度的氯化钴后,剩余的游离 Co^{2+} 浓度较高。待充分反应后,加入二硫苏糖醇(Dithiothreitol, DTT),即可与游离 Co^{2+} 发生显色反应,使溶液呈红褐色。通过比色法检测其吸光度,间接反映 IMA 浓度。因而可见 IMA 浓度越多,剩余 Co^{2+} 越多,溶液显色越深,反之亦然。因此,可根据反应后溶液的吸光度间接判定 IMA 浓度^[9]。

本实验采用试剂盒的参数指标大多数针对封闭式分析仪而言,但由于日立 7600-020 全自动生化分析仪是半开放式,所以要验证该试剂盒是否适用于本实验室。精密度实验证明,批间精密度、总不精密度均远小于厂家提供的参数,说明本实验室的检测系统对该项目来讲,具有较好的精密度;且相对偏差都小于 10%,说明该试剂盒测定 IMA 结果正确度高、非常稳定、重复性良好。另外该试剂线在 18.5~99.5 U/mL 浓度范围内呈直线分布,说明线性良好。但试剂中的显色剂 DTT 是一种有机还原剂,属挥发性液体,放置过久会影响检测的质量,所以在评估精密度时应把时间因素考虑进去,在较长时间内评估试剂的精密度会更为客观。由于本实验室采集的高值样本有限,所以正确度试验采用配套 2 个浓度质控品来验证,结果符合厂家要求,但 2 个浓度不能覆盖整个检测范围,代表性有限,应收集更多浓度的样本进行正确度检测来确保各个浓度范围内检测结果的准确性。

Gaze 等^[10]认为, HAS 与 IMA 呈负相关关系,即 HAS 增高会引起 IMA 水平下降,这是由于与 Co^{2+} 结合的 HAS 浓度增加,导致游离的 Co^{2+} 下降,与 DTT 结合后,溶液颜色变浅,吸光度下降。本研究在线性范围分析试验中验证了上述结论,在用生理盐水或去离子水稀释高值样本时,IMA 检测结果并不随稀释倍数增加而下降,基本维持原倍量,是由于随着稀释倍数的增加,血清中的 HSA 成倍数减少,加入原倍的显色剂和氯化钴后,结合物的吸光度值不会明显下降。所以 IMA 应用于临床时应考虑 HAS 水平,应用 IMA/HSA 校正值会提高 IMA 的灵敏度^[11]。所以本研究在进行线性范围验证试验时选用了厂家提供的低浓度样本,同样,临床可报告范围也无法得到验证。

关于参考区间的验证结果显示,所有观测值均在参考区间之内,所以该参考区间可接受。但由于本实验只采用小样本人群对说明书中的参考区间进行验证,所以得出的结果不能完全反映实际情况。若建立本地人群的参考区间,需要更详尽的试验方案进行归纳分析。

综上所述,本研究所采用的 IMA 精确度和正确度高,重复性和线性良好,但也不是完美的生化指标,因为其他非心源性缺血情况下 IMA 也可升高^[12]。所以临床医师应结合患者临床症状及其他指标和对其进行合适的诊断。

参考文献

[1] 张文平,魏军燕,苗玉霞,等. 缺血修饰蛋白在急性心肌缺血早期诊断中的应用价值[J]. 临床和(下转第 3242 页)

析表明,患者体内 sCD28 分子浓度与 FT3、FT4 和 TRAb 均呈正相关关系, r 分别为 0.786、0.746 和 0.734,但患者血液 sCD28 水平却与血清 sTSH 呈显著负相关, r 为 -0.719。初步实验表明,对 Graves 病患者血液 sCD28 及 TRAb 联合检测,对提高 Graves 病诊断的准确率,明显优于单独检测,但尚需扩大样本量后再进行统计分析比较。由此可知,患者血液中 sCD28 的浓度是诊断 Graves 病的重要生物学参数,对 Graves 病的临床辅助诊断和疗效评估具有重要的临床价值。文献报道,哮喘患者体内 sCD28 分子浓度与趋化因子 RANTES 血浆浓度、血清 IgE 总浓度均呈正相关,而与膜型 CTLA-4 和膜型 CD28 阳性百分率呈负相关;在活动性和非活动性系统性红斑狼疮患者体内 sCD28 浓度与可溶性 CTLA-4、CD86 的血浆浓度均呈正相关^[11]。因此,sCD28 分子参与了 Graves 病、系统性红斑狼疮等自身免疫性疾病和哮喘病的病理过程,但 sCD28 参与自身免疫性疾病和过敏反应的免疫病理机制,值得进一步深入探讨。

综上所述,Graves 病患者外周血中 sCD28 水平异常增高,并与患者血液中 FT3、FT4 和 TRAb 浓度呈正相关。因此,sCD28 水平测定将为临床诊断 Graves 病提供又一个有价值的实验室参数,也将为 Graves 病的治疗、预后判断及寻找新的免疫干预手段提供实验依据和理论基础。

参考文献

- [1] Laurberg P, Nygaard B, Andersen S, et al. Association between TSH-Receptor autoimmunity, hyperthyroidism, goitre, and orbitopathy in 208 patients included in the remission induction and sustenance in graves' disease Study [J]. *J Thyroid Res*, 2014;165487.
- [2] Zuhur SS, Ozel A, Kuzu I, et al. The diagnostic utility of color doppler ultrasonography, Tc-99m pertechnetate uptake, and TSH-Receptor antibody for differential diagnosis of graves' disease and silent thyroiditis; a comparative study [J]. *Endocr Pract*, 2014, 20(4): 310-319.
- [3] Pinto-Medel MJ, García-León JA, Oliver-Martos B, et al. The CD4+ T-cell subset lacking expression of the CD28

costimulatory molecule is expanded and shows a higher activation state in multiple sclerosis [J]. *J Neuroimmunol*, 2012, 243(1/2): 1-11.

- [4] Link A, Selejan S, Hewera L, et al. Rosuvastatin induces apoptosis in CD4(+)CD28 (null) T cells in patients with acute coronary syndromes [J]. *Clin Res Cardiol*, 2011, 100(2): 147-158.
- [5] Shi B, Du X, Wang Q, et al. Increased PD-1 on CD4(+)CD28(-) T cell and soluble PD-1 ligand-1 in patients with T2DM: association with atherosclerotic macrovascular diseases [J]. *Metabolism*, 2013, 62(6): 778-785.
- [6] 孙中文, 邱玉华, 马泓兵, 等. 可溶性人细胞分化抗原 28 分子酶联免疫试剂盒的研制及应用 [J]. *中华检验医学杂志*, 2006, 29(6): 518-521.
- [7] Wang H, Wang K, Zhong X, et al. Plasma sCD28, sCTLA-4 levels in neuromyelitis optica and multiple sclerosis during relapse [J]. *J Neuroimmunol*, 2012, 243(1/2): 52-55.
- [8] Wk IK, Wong CK, Leung TF, et al. Elevation of plasma soluble T cell costimulatory molecules CTLA-4, CD28 and CD80 in children with allergic asthma [J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 2005, 137(1): 45-52.
- [9] Sakthivel P, Shively V, Kakoulidou M, et al. The soluble forms of CD28, CD86 and CTLA-4 constitute possible immunological markers in patients with abdominal aortic aneurysm [J]. *J Intern Med*, 2007, 261(4): 399-407.
- [10] Wong CK, Lit LC, Tam LS, et al. Aberrant production of soluble costimulatory molecules CTLA-4, CD28, CD80 and CD86 in patients with systemic lupus erythematosus [J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2005, 44(8): 989-994.
- [11] Wong CK, Lun SW, Ko FW, et al. Increased expression of plasma and cell surface co-stimulatory molecules CTLA-4, CD28 and CD86 in adult patients with allergic asthma [J]. *Clin Exp Immunol*, 2005, 141(1): 122-129.

(收稿日期:2014-04-20 修回日期:2014-08-12)

(上接第 3239 页)

实验医学杂志, 2011, 10(13): 1022-1023.

- [2] 鲁鸿昊, 高静, 董振南, 等. 终点法测定缺血修饰清蛋白 (IMA) 的评价及其应用研究 [J]. *标记免疫分析与临床*, 2012, 19(1): 44-46.
- [3] 陈志晓, 王前, 郑磊, 等. 改良缺血修饰清蛋白测定方法 (清蛋白-钴结合试验) 的建立 [J]. *检验医学*, 2010, 25(5): 372-375.
- [4] 黄湘宁, 郑春苏. Roche cobas e411 全自动化学发光分析仪性能评价 [J]. *检验医学与临床*, 2011, 8(16): 2028-2029.
- [5] 蔡会欣, 曹永献, 曹辉彩. 缺血修饰清蛋白 IMA 检测方法的建立及评价 [J]. *医学研究与教育*, 2009, 26(4): 20-21.
- [6] 张明艳, 陈玉敏, 崔玉英, 等. 缺血修饰清蛋白的检测与临床意义 [J]. *河北职工医学院学报*, 2008, 25(1): 67-69.
- [7] 郭宗强, 王晓菲. 缺血修饰清蛋白诊断急性心肌缺血价值 [J]. *中华实用诊断与治疗杂志*, 2010, 4(5): 511-513.

- [8] 王凡, 蒋红君. 罗氏 2010 免疫分析仪检测甲胎蛋白的性能验证 [J]. *现代预防医学*, 2012, 39(15): 3911-3914.
- [9] 张佳. 缺血修饰蛋白与重度子痫前期及其新生儿早期神经系统损伤的相关性研究 [D]. 石家庄: 河北医科大学, 2013.
- [10] Gaze DC, Crompton L, Collinson P. Ischemia-modified albumin concentrations should be interpreted with caution in patients with low serum albumin concentrations [J]. *Med Princ Pract*, 2006, 15(4): 322-324.
- [11] Aylin Hakligör, Arzu Kösem, Mehmet Şeneş, et al. Effect of albumin concentration and serum matrix on ischemia-modified albumin [J]. *Clin Biochem*, 2010, 43(3): 345-348.
- [12] 肖柯. 缺血修饰蛋白联合半小时内心电图变化对 ACS 早期鉴别诊断价值 [D]. 衡阳: 南华大学, 2012.

(收稿日期:2014-02-19 修回日期:2014-07-12)