

葡萄糖—6—磷酸脱氢酶冻干质控物的研制与评价^①

唐娟¹, 宁乐平², 周微雅¹, 刘晓春¹, 何毅¹, 周向阳^{1②}

(1. 广西壮族自治区人民医院广西临床检验中心, 广 西 南 宁 530021

E-mail: 502620806@qq.com;

2. 广西壮族自治区人民医院检验科, 广 西 南 宁 530021)

摘 要: **目的** 研制均一性、稳定性良好、适用于定量检测的葡萄糖—6—磷酸脱氢酶(G6PD)冻干质控物, 为广西 G6PD 缺乏症筛查和确诊提供质量保证。 **方法** 使用健康献血者抗凝全血做基质, 按不同比例加入小剂量 G6PD 纯分析物, 制备正常、缺乏两个不同水平 G6PD 全血质控物。分装后使用冷冻干燥。参照 CNAS—GL03《能力验证样品均匀性和稳定性评价指南》要求, 对复溶后质控物进行均匀性、稳定性评价。用国内不同品牌的定量试剂盒做适用性评价。与进口质控品相比较应用于室内质量控制。 **结果** 均匀性检验结果显示, 样品分装、冻干、复溶后 G6PD 检测值差异均无统计学意义($P > 0.05$)。在预期观察时间内, 2~8℃未开瓶质控物可稳定 1 年, 开瓶可稳定 3 d。用于不同定量试剂盒检测, 定性结果符合率一致, 定量结果具有可比性。用于室内质量控制, 朗道质控品和自制质控物在正常、缺乏两个不同水平的变异系数(CV)分别是 2.60%、5.92%和 2.99%、6.67%。 **结论** 自制 G6PD 冻干质控物有良好的均匀性、稳定性, 适用于定量检测试剂, 并能应用于室内质量控制, 满足广西 G6PD 筛查实验室室内质量评价需求。

关键词: 葡糖磷酸脱氢酶; 冻干质控物; 均匀性; 稳定性; 适用性

中图分类号: R345.41

文献标识码: A

文章编号: 1001—5817(2016)03—0307—04

doi:10.3969/j.issn.1001—5817.2016.03.022

Preparation and evaluation of lyophilized quality—control materials for glucose—6—phosphate dehydrogenase

Tang Juan¹, Ning Leping², Zhou Weiya¹, Liu Xiaochun¹, He Yi¹, Zhou Xiangyang¹

(1. Guangxi Clinical Laboratory Center, the People's Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530021, Guangxi, China E-mail: 502620806@qq.com; 2. Department of Laboratory Medicine, the People's Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530021, Guangxi, China)

Abstract: **Objective** To prepare the homogeneity, stability and applicability of lyophilized control materials for quantitative determination of glucose—6—phosphate dehydrogenase (G6PD), and to provide quality assurance for Guangxi G6PD deficiency screening and diagnosis. **Methods** The anticoagulated whole blood from healthy volunteers was used as the matrix. A small dose of G6PD pure analyte at different proportions was added to matrix for preparation two different levels of G6PD—lyophilized normal and deficient control materials. Freeze—drying was performed after aliquots. According to CNAS—GL03 “Guidance on Evaluating the Homogeneity and Stability of Samples Used for Proficiency Testing”, the homogeneity and stability of quality—controls were evaluated after re—dissolution. The applicability was evaluated by different domestic brand quantification kits. Comparing the self—made control materials with the import control materials in interior quality control was done. **Results** One—way ANOVA analysis of homogeneity indicated that G6PD measurements had no statistical differences ($P > 0.05$) after dispensing, lyophilization, re—dissolution of the control materials. Within anticipation observation time, the sealed lyophilized control materials were stable for one year and the unsealed bottle controls were stable for 3 days at 2 to 8℃. Applying to different quantitative de-

① 基金项目: 广西壮族自治区卫生厅科研课题(z2012321)

② 通讯作者, E-mail: zhouxiyang@126.com

tection kits, the same coincidence rate was obtained by qualitative determination, and quantitative results were comparable. In internal quality control, the coefficient of variation (CV) in normal and deficient Randox quality control materials and in normal and deficient homemade quality control materials was 2.60%, 5.92% and 2.99%, 6.29%, respectively. **Conclusion** The homemade G6PD lyophilized control materials have better homogeneity and stability, which can be applicable for quantitative detection and can be used in internal quality control; and can meet the needs of Guangxi G6PD screening laboratories in internal quality evaluation.

Key words: glucosephosphate dehydrogenase; lyophilized control materials; homogeneity; stability; applicability

目前,国内尚无商品化的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(glucose-6-phosphate dehydrogenase, G6PD)定量质控品,少部分实验室使用较为昂贵的朗道进口质控品或台湾卫生署制备的 G6PD 冻干品。要做该项目的室内质量控制,市场可提供的商品化质控品很少。广西是 G6PD 缺乏症高发区^[1],做好该项目质量控制是实现有效筛查大规模人群尤其是孕产妇和新生儿的重要保障。广西临床检验中心研制了适合 G6PD 定量检测方法、稳定性好、具备检测重复性的冻干质控物。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 Beckman AU5800 全自动生化分析仪(美国贝克曼库尔特公司),压盖型冻干机 LGJ-25C(北京四环科学仪器厂),汉密尔顿分配仪(瑞士 Hamilton 公司),磁力搅拌器(杭州仪表电机厂),G6PD 纯分析物(美国 Sigma 公司),英国朗道质控品(正常批号:607PD;缺乏批号:617PD),G6PD 定量试剂盒包括:长春汇力试剂盒、北京北检试剂盒、北京利德曼试剂盒、广州科方试剂盒、宁波美康试剂盒、深圳迈瑞试剂盒。

1.2 主要原料 健康献血者抗凝全血[人类免疫缺陷病毒(HIV)抗体、丙型肝炎病毒(HCV)抗体、乙型肝炎表面抗原(HBsAg)均为阴性]。

1.3 制备方法 将抗凝全血混匀,离心,红细胞与血浆分离。将红细胞分离,并用盐水洗涤 3 次,放置-80℃冰箱及室温反复融解,最终制成溶血液。血浆用磁珠法去除血浆纤维蛋白原,200 目丝网过滤,与溶血液混匀获得人全血基质。加入不同剂量的 G6PD 分析纯,加入量不超过总体积的 1%,制备出正常、缺乏两个批号 G6PD 全血质控物。用分配仪分装至西林瓶,每瓶分装 0.25 ml。正常、缺乏各分装 200 瓶。

1.3.1 冻干过程及冻干质控物评价 将分装好的西林瓶放置-80℃冰箱过夜,冷冻干燥机预冷至-50℃,取出西林瓶放入冷冻干燥机中,运行 32 h 后真空压盖封口,将冻干质控物放置 2~8℃保存。冻干质控物评价:①外观:呈红色圆饼状,表面平整,质地均匀,轻压呈粉末状;②复溶性:复溶后呈透明暗红色液体,无异物;③含水量:采用滴定法分析正常、缺乏随机抽

检的冻干物含水量,均<5%,符合《中国生物制品检定规程》要求。

1.4 检测方法 按照长春汇力试剂盒定量检测要求,将冻干质控物复溶,半小时后,按照试剂检测要求稀释,用 Beckman AU5800 全自动生化分析仪对冻干质控物进行 G6PD 活性及血红蛋白检测,最后计算每克血红蛋白 G6PD 活性含量。

1.5 均匀性和稳定性评价 根据 CNAS-GL03《能力验证样品均匀性和稳定性评价指南》^[2]对冻干质控物进行均匀性、开瓶稳定性和长期稳定性评价。

1.5.1 均匀性评价 每批号随机抽取 10 瓶冻干质控物检测,每个样本重复测定 2 次。计算每个样本每克血红蛋白 G6PD 活性含量。

1.5.2 开瓶稳定性评价 每批号随机抽取 3 瓶冻干质控物,开瓶复溶后每天检测,每个样本检测重复 2 次,每次检测完将剩余样本保存于 2~8℃,连续监测 4 d。第 1、2、3、4 d 检测结果与第 0 d 总均值(即均匀性结果的总均值)比较。

1.5.3 长期稳定性评价 将放置在 2~8℃保存的两个批号 G6PD 冻干质控物每月抽检 1 次,每次随机抽取 3 瓶检测,观察时间为 12 个月。计算每次抽样检测结果均值与第 0 d 总均值比较。

1.6 定量试剂盒检测适用性评价 每批号随机抽取 10 瓶,将复溶后的质控物分别在长春汇力、北京北检、北京利德曼、广州科方、宁波美康、深圳迈瑞等不同品牌 G6PD 定量试剂盒检测,计算各试剂检测结果均值、标准差。

1.7 室内质控应用 取自制冻干质控物与朗道质控品各 1 瓶,复溶后按每天所需检测量分装至 EP 管(每支 10 μl),放置-20℃保存,每天进行室内质量控制时取一支回复室温,再行稀释检测。待第 1 瓶冻干质控物用完,复溶第 2 瓶,重复上述分装冷冻。监测 90 d,累积 90 d 数据,比较自制和朗道质控品结果。

1.8 统计学方法 所有统计方法均用统计软件 SPSS 13.0 均匀性检验用单因素方差分析。稳定性检验用 *t* 检验分析,计算随机抽检均值与第 0 d 总均值之间差异是否存在显著性。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 均匀性评价结果 G6PD 正常质控物总均值±标准差为 11.22±0.23(U/gHb),缺乏质控物总均值±标准差为 2.05±0.12(U/gHb)。对两个批号样本进行单因素方差分析,正常质控物 *F* 值为 1.265, *P* 值为 0.358(*P* > 0.05),缺乏质控物 *F* 值为 1.034, *P* 值为 0.475(*P* > 0.05),表明两批质控品中每克血红蛋白 G6PD 活性含量是均匀的。

2.2 开瓶稳定性评价结果 开瓶 4 d,第 4 d 与第 0 d 检测总均值做 *t* 检验比较,差异有统计学意义(*P* < 0.05),说明开瓶复溶后放置 2~8 ℃可稳定 3 d,放置太久酶活性减低,见表 1。

表 1 正常、缺乏 G6PD 冻干物复溶后开瓶稳定性检测结果 ($\bar{x}\pm s$,U/gHb)

时间	正常	<i>t</i>	<i>P</i>	缺乏	<i>t</i>	<i>P</i>
第 0 d	2.05±0.12	—	—	11.22±0.23	—	—
第 1 d	1.92±0.17	1.967	0.116	11.33±0.40	0.688	0.522
第 2 d	1.97±0.12	1.787	0.118	11.32±0.16	1.478	0.199
第 3 d	1.92±0.17	1.967	0.116	10.93±0.55	1.268	0.261
第 4 d	1.77±0.22 ^a	3.213	0.024	10.87±0.27 ^a	3.167	0.025

注:与第 0 d 比较,a: *P* < 0.05

2.3 长期稳定性评价结果 在观察时间 12 个月内,正常、缺乏每月检测结果与第 0 d 总均值比较,差异均无统计学意义(*P* 均 > 0.05)。每月检测结果与第 0 d 总均值比较做百分偏差图,结果显示缺乏偏差较大,在 0.5%~15%之间,正常偏差小,在 0.18%~6.06%,见图 1。

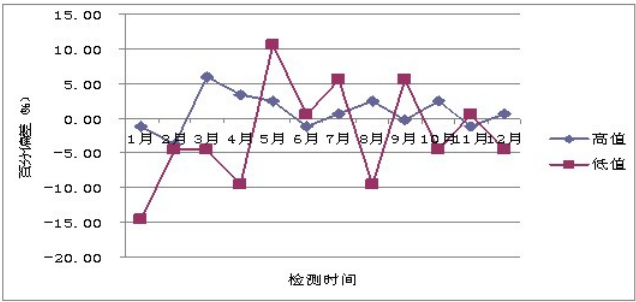


图 1 G6PD 冻干质控物长期稳定性监测结果与第 0 d 检测结果的百分偏差图

2.4 定量试剂盒检测适用性评价结果 每批号分别抽检 5 瓶,分别在 5 个不同品牌定量试剂盒检测,结果表明不同试剂盒均能适用。在定性判定中正常、缺乏结果均符合要求(汇力、北检参考范围是 >4.2 U/gHb;其余为 >1 300 IU/L),见表 2。

表 2 各定量试剂盒检测 G6PD 冻干质控物的结果 ($\bar{x}\pm s$)

组别	正常	缺乏
汇力(U/gHb)	11.22±0.23	2.05±0.12
北检(U/gHb)	10.93±0.18	1.99±0.15
利德曼(IU/L)	2238±22.39	491±10.27
科方(IU/L)	1380±16.76	272±9.35
美康(IU/L)	1755±18.41	316±11.97
迈瑞(IU/L)	2179±23.22	501±13.63

2.5 室内质控应用结果 自制冻干质控物与朗道质控物比较,连续观察 90 d,计算累积 90 d 的均值、标准差及变异系数(CV),见表 3。朗道质控物正常 CV 为 2.60%,缺乏 CV 为 5.92%。自制质控物正常 CV 为 2.99%,缺乏 CV 为 6.67%,略比朗道质控物 CV 大。

表 3 自制 G6PD 冻干质控物与朗道质控品室内质控累积 90 d 的检测结果

组别	自制		朗道	
	$\bar{x}\pm s$ (U/gHb)	CV(%)	$\bar{x}\pm s$ (U/gHb)	CV(%)
正常	10.75±0.32	2.99	12.69±0.33	2.60
缺乏	1.95±0.13	6.67	2.08±0.12	5.92

3 讨论

G6PD 缺乏症筛查实验室检测方法有定性和定量检测^[3]。定性检测可用于血斑作质控物,其存储方便,实验室可自制获得。但定量方法学检测的是每克血红蛋白 G6PD 活性含量,新鲜抗凝全血 G6PD 活性不易保存。Kahn M 等^[4]将抗凝血样本中的红细胞洗涤加入甘油为保护剂,放置深低温保存仅稳定 6 个月。国内报道^[5]混合抗凝全血加入甲醛、戊二醛等稳定剂,分装存储-80 ℃,可稳定 1 年。为此本研究采用冷冻干燥技术制备长期保存且 G6PD 活性稳定的冻干质控物。

根据 CNAS—GL03《能力验证样品均匀性和稳定性评价指南》要求,对自制冻干 G6PD 质控物进行了均匀性及开瓶稳定性、长期稳定性评价。使用精度为 1 μl 的汉密尔顿分配仪有效解决了少量质控物(250 μl)分配问题,实验结果表明,质控物冻干后抽检均匀性检验符合要求。质控物复溶后开瓶稳定性检测结果显示,2~8 ℃可稳定 3 d,4 d 后酶活性逐渐降低。建议用户开瓶复溶后,按每次检测量分装放置-20℃冷冻保存,以保持酶活性。长期稳定性评价结果显示,质控物 2~8 ℃可稳定 1 年。因此,G6PD 冻干质控物运输到各实验室稳定性也得到保证。

室内质控应用方面,将自制与朗道质控品比较,经 90 d 检测获取的数据累积结果显示:正常质控物 CV

(下转第 312 页)

损伤的软组织得到良好的修复。笔者治疗结果显示，原始点埋线配合正骨手法治疗腰腿痛的总有效率为 95.06%，对照组的总有效率为 80.88%，两组疗效差异有统计学意义，显示原始点埋线配合正骨手法疗法效果好于常规针灸疗法，尤其在改善腰腿疼痛的时间上更加突出，基本上治疗过后症状马上减轻或消失。

总之，原始点埋线配合正骨手法疗法治疗腰腿痛具有操作简单、疗效迅速、治愈率高、费用低廉、安全可靠等优点，值得在临床上积极推广应用。

参考文献：

[1] 马勇. 中医筋伤学[M]. 北京：人民卫生出版社，2012：83—150.

[2] 罗敏. 中西医治疗腰腿痛的进展[J]. 中医临床研究. 2014,6(13):145—147.

[3] 国家中医药管理局. 中华人民共和国中医药行业标准，中医病症诊断疗效标准[S]. 南京：南京大学出版社，1994：

201—202.

[4] 曾斌其，黄维军，罗秀宁. 腰腿痛误诊为腰椎间盘突出症的常见病因分析[J]. 右江民族医学院学报，2004,26(6): 877.

[5] Bertram CD Bilston, LE, Stoodley MA, et al. Tensile radial stress in the spinal cord related to arachnoiditis or tethering: a numerical model [J]. Medical & Biological Engineering & Computing, 2008,46 (7):701—707.

[6] 符仲华. 浮针疗法治疗疼痛手册[M]. 北京：人民卫生出版社，2013:161—166.

[7] 佟世民，谭智怀，冯武，等. 祛瘀舒筋汤联合针灸治疗腰椎间盘突出术后神经根水肿 58 例[J]. 右江民族医学院学报，2013,35(4):553—554.

[8] 李辉，夏婉贤，周承扬，等. 小针刀结合手法治疗盘源性腰腿痛 30 例疗效观察[J]. 长春中医药大学学报，2010,26 (6):911—912.

收稿日期：2016—04—19；修回日期：2016—05—24

(上接第 309 页)

值相近。缺乏质控物自制 CV 值略高于朗道质控品，主要原因可能是低值设计偏低，接近试剂盒的检测下限。

室间质评应用方面，该质控物均适用于国内主要定量检测试剂盒。将质控物用于全省各实验室评价，各试剂盒的检测结果显示与台湾卫生署公布的 G6PD 室间质评结果酶活性低 CV 较大，酶活性高 CV 较小结果相一致^[6]。由于目前国际上尚无用于 G6PD 定量检测的校准品，在 G6PD 缺乏症高发区各筛查实验室更应参加实验室间比对计划以确保品质。

G6PD 冻干质控物解决了 G6PD 活性不能长期稳定难题，将其应用于实验室内部质量控制和各实验室间质量评价计划中，更好地为广西 G6PD 筛查实验室提供质量保障。

参考文献：

[1] 郑敏，罗建明. 广西地区葡萄糖—6—磷酸脱氢酶缺乏症的流行病学调查和基因突变型鉴定[J]. 临床荟萃，2006,21

(11):775—777.

[2] CNAS—GL03. 能力验证样品均匀性和稳定性评价指南[S]. 中国合格评定国家认可委员会，2006.

[3] 唐娟，谭毅. 葡萄糖—6—磷酸脱氢酶缺乏症检测方法的研究进展[J]. 中国临床新医学，2015,8(1):92—96.

[4] Kahn M, LaRue N, Bansil P, et al. Cryopreservation of glucose—6—phosphate dehydrogenase activity inside red blood cells: developing a specimen repository in support of development and evaluation of glucose—6—phosphate dehydrogenase deficiency tests [J]. Malar J, 2013, 12: 286.

[5] 袁咏梅，刘和录，何亚，等. 自制 G6PD 室内质控物稳定性及瓶间均一性评价[J]. 国际检验医学杂志，2013,34 (18):1783—1785.

[6] Chiang SH, Fan ML, Hsiao KJ. External quality assurance programme for newborn screening of glucose—6—phosphate dehydrogenase deficiency [J]. Ann Acad Med Singapore, 2008,37(12 Suppl):84—87.

收稿日期：2016—03—07；修回日期：2016—05—23